

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09507

研究課題名（和文）味細胞甘味調節機構の分子・生理基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular and cellular mechanisms for modulation of sweet taste sensitivity

研究代表者

吉田 竜介（Yoshida, Ryusuke）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60380705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、レプチンが甘味受容細胞の応答性を抑制するメカニズムを解析し、甘味受容体を発現する細胞に、レプチンの細胞内情報伝達に関わる分子（STAT3、SH2、PI3K）が発現すること、中でもPI3Kがレプチンの甘味抑制効果に重要な働きをしていること、レプチンによるPI3K活性化により甘味受容細胞でイノシトール三リン酸の産生や、Aktのリン酸化が生じることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとなった甘味抑制に関わる味細胞におけるレプチンシグナル経路は、肥満時に見られるレプチン抵抗性にも関与する可能性がある。この経路の破綻は、摂食行動やグルコース恒常性の変調を齎し、肥満の進行に関わると考えられる。このシグナル経路を標的とした薬剤は、レプチン抵抗性を示すヒトに適切な摂食行動やグルコース恒常性を維持するよう機能し、肥満や肥満により生じる様々な病態の抑制につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that (1) sweet-sensitive taste cells (T1R3-expressing taste cells) possess leptin signaling components (STAT3, SH2, PI3K), (2) among these components, PI3K plays a critical role in suppression of sweet responses of taste cells by leptin, and (3) leptin-induced activation of PI3K leads to production of PIP3 and phosphorylation of Akt in T1R3-expressing taste cells.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 甘味 レプチン 肥満 内因性カンナビノイド 遺伝子改変マウス 味細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甘味は生存に必要なエネルギー源(糖)を検知する感覚であり、食の嗜好性にも強く関与する。味細胞における甘味受容機構は、分子生物学的研究の進展に伴い急速に理解が進んできた。糖や人工甘味料など甘味物質は、味細胞に発現する甘味受容体 T1R2/T1R3 と結合し、G タンパク質 PLC 2 IP₃R3 を活性化し、細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺の放出を引き起こす。これにより Ca²⁺感受性 TRPM5 チャンネルが開口・脱分極し、活動電位が発生する。申請者は、T1R3 発現味細胞が各種甘味物質に応答し活動電位を発生すること、活動電位を発生する味細胞から味神経へと味情報が伝達され脳へと送られることを示してきた。これらは、T1R3 発現味細胞が甘味情報の起点となることを意味する。

近年、申請者は、摂食調節に関わるホルモンや生理活性物質が末梢の甘味感受性を調節することを明らかとしてきた。脳で摂食抑制に機能するホルモンであるレプチンは、マウスの甘味に対する神経・行動応答を選択的に抑制する。また、健康ヒト成人では甘味閾値がレプチンの日内変動に応じて変化する。一方、レプチンとは逆に脳で摂食促進に機能する内因性カンナビノイドはマウスの甘味応答を選択的に増強する。このように、脳で摂食調節に働くレプチンや内因性カンナビノイドが末梢の甘味感受性も脳と協調して調節することで、食物摂取・嗜好行動をより適切に制御し、体内エネルギーバランスを維持するよう機能すると考えられる。

しかし、甘味細胞においてレプチンや内因性カンナビノイドがどのような分子機構を介しその効果を発現するかについては不明な点が多い。レプチンはその受容体 (Ob-Rb) を介し、最終的には K⁺チャンネルの 1 種である K_{ATP} チャンネルを活性化させることで、甘味細胞の興奮性を抑える。また内因性カンナビノイドはその受容体 (CB₁) を介し甘味応答を増強する。これら受容体の活性化は非常に多様な細胞内情報伝達系を活性化することが報告されている。Ob-Rb は、クラス I サイトカインファミリーに属し、JAK2/STAT3、JAK2/STAT5、SHP2/ERK、IRS/PI3K などの細胞内情報伝達系を活性化することが知られている。また CB₁ は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体であり、Gs、Gi/o、Gq/11 および各種セカンドメッセンジャーを介した様々な経路を活性化する可能性が示されている。これら経路のいずれかが甘味応答調節に関わると推察されるが、その詳細は謎に包まれている。また、レプチンや内因性カンナビノイドはそれぞれ一部の甘味細胞(どちらもおよそ 40%程度)に影響を与えるが、その細胞特異性(同じ味細胞で効果を発揮するのか?異なる味細胞が標的なのか?)についても明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、甘味受容細胞の OB-Rb、および CB₁ 活性化後にどのようなシグナル伝達経路を介し甘味応答を抑制・増強するかについて明らかとすることを目的とした。Ob-Rb 活性化後の経路として、JAK2/STAT3、JAK2/STAT5、SHP2/ERK、IRS/PI3K などが挙げられるが、予備実験の結果から PI3K を介した経路が関与する可能性が高まっている。CB₁ の下流で活性化する経路についても複数可能性が示されているが、Gi/o を介しアデニル酸シクラーゼ(AC)を抑制し、細胞内 cAMP 濃度を減少させる経路、Gq/11 を介し細胞内 Ca²⁺濃度を増加させる経路が甘味応答増強に関与するのではないかと推察される。様々な細胞内情報伝達経路の中でも特にこれらに着目し、レプチンや内因性カンナビノイドによる甘味調節に関わる分子機構の全容解明を目指す。さらに、各甘味細胞におけるレプチン/内因性カンナビノイドの効果を解析し、これら甘味調節因子の細胞特異性について明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 味細胞応答の記録

本実験には、申請者らが開発した味細胞応答記録システムを利用した。また、甘味受容細胞を同定するため、T1R3 発現細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する T1R3-GFP マウスを用いた。T1R3-GFP マウス舌組織より茸状乳頭を単離し、その味孔側を刺激ピペットにより吸引保持した。刺激ピペットを介し、甘味刺激としてショ糖溶液を味細胞の味孔側のみに与えた。共焦点レーザー顕微鏡観察下で T1R3-GFP 発現細胞に記録電極を当て、味細胞が発生する活動電位を記録した。レプチン、および各種阻害剤は基底外側膜側から与えることで、これらの味応答に対する効果を調べた。

(2) single cell-RT-PCR

甘味細胞における遺伝子発現を調べるため、single cell RT-PCR を行った。T1R3-GFP マウスの舌上皮を酵素的に剥離し、茸状乳頭味蕾を回収する。共焦点レーザー顕微鏡下で、GFP 発現細胞を採取し、One Step RT-PCR kit を用いて、各細胞の遺伝子発現を解析した。

(3) 免疫化学的染色

味蕾内でのレプチン刺激によるフォスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP₃) の産生、および Akt のリン酸化を明らかにするため、免疫化学的染色を行った。T1R3-GFP マウス、および GAD67-GFP マウスの舌上皮を酵素的に剥離し、三分割シリコンディッシュにピン止めした。これらを、無処理、レプチン処理、またはレプチン + PI3K 阻害剤処理を施したのち固定し、PIP3 抗体、およびリン酸化 Akt 抗体を一次抗体として用い、蛍光標識二次抗体により処理した後、共焦点レーザー顕微鏡にて組織像を得て解析を行った。

4. 研究成果

(1) T1R3 発現細胞におけるレプチンシグナリング関連遺伝子の発現

まず、T1R3 発現細胞におけるレプチンシグナリング関連遺伝子 (STAT3、STAT5、SHP2、PI3K) の発現を single cell RT-PCR により調べた。20 個の T1R3 発現味細胞のうち、19 個 (95%) で PI3K の発現が見られ、18 個 (90%) で STAT3 の、7 個 (35%) で SHP2 の発現が見られた。しかし、STAT5 の発現は 2 個 (10%) の細胞でのみ認められた。

(2) レプチンによる甘味抑制効果に対する各種阻害剤の影響

T1R3 発現細胞のショ糖に対する応答は、一部の細胞でレプチンにより可逆的に抑制される (図 1. a-c)。このレプチンによる甘味抑制効果に対して、STAT3、SHP2、PI3K の阻害剤が影響を与えるかについて解析した。PI3K の阻害剤である wortmannin (図 1. d-f) または LY294002 (図 1. g-i) を添加するとレプチンによる甘味抑制効果は消失した。一方、STAT3 阻害剤である Stattic (図 1. j-l) および SHP2 阻害剤である SHP099 (図 1. m-o) を添加してもレプチンによる甘味抑制効果は変化しなかった。この結果から、甘味細胞におけるレプチンの甘味応答抑制には PI3K が関与する可能性が示唆された。

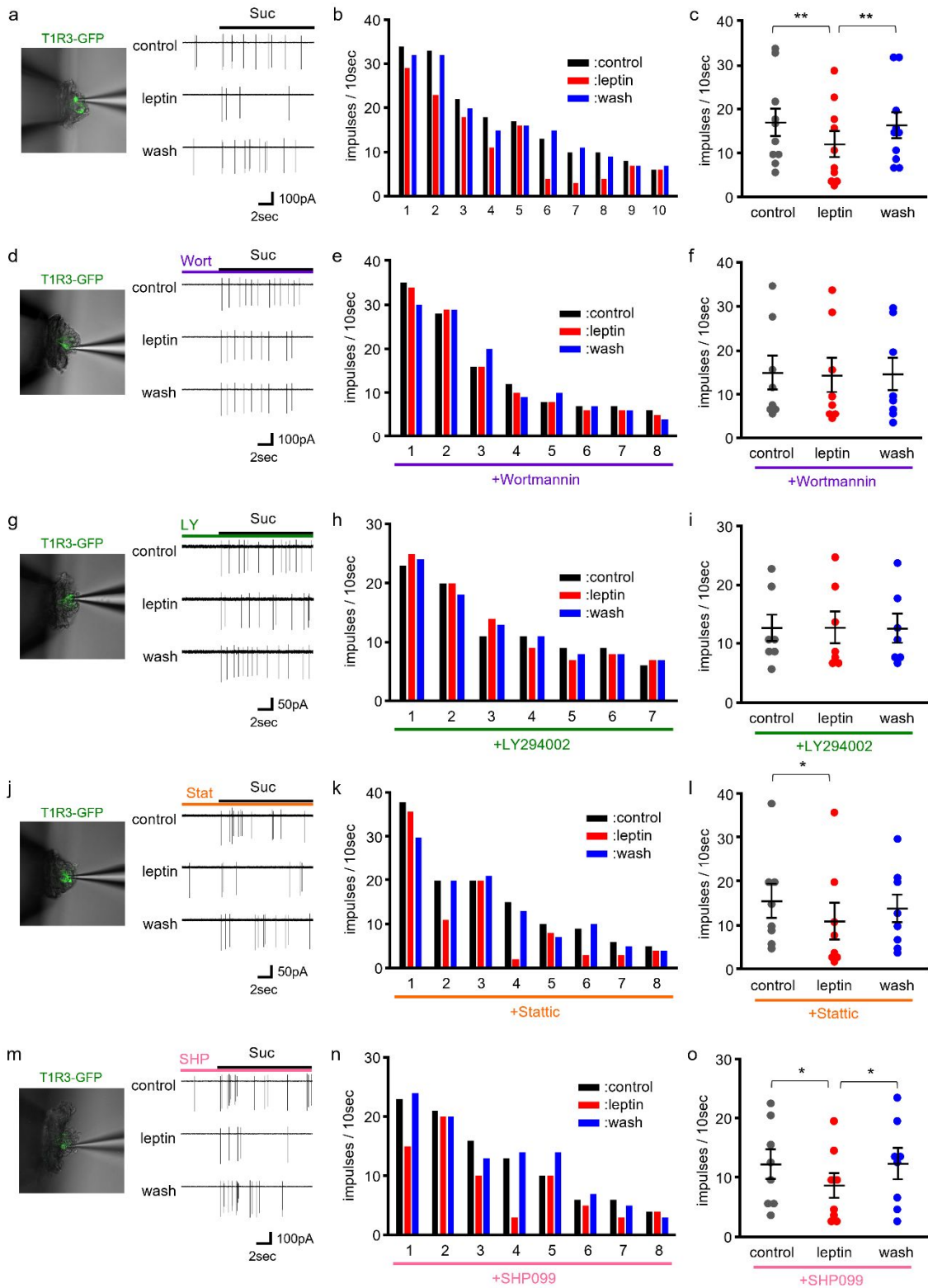


図1. レプチンによる甘味抑制効果とそれに対する各種阻害剤の効果

a-c. T1R3-GFP 味細胞におけるシヨ糖応答と、それに対するレプチンの効果。d-f. PI3K 阻害剤 wortmanninn を添加した場合。g-i. PI3K 阻害剤 LY294002 を添加した場合。j-l. STAT3 阻害剤 Stattic を添加した場合。m-o. SHP2 阻害剤 SHP099 を添加した場合。PI3K 阻害剤を添加するとレプチンによる甘味抑制効果が消失するが、STAT3 阻害剤、SHP2 阻害剤を添加してもレプチンによる甘味応答抑制効果は残存する。(Yoshida et al., J Neurochem, in press)

(3) レプチン刺激による PIP3 産生と Akt のリン酸化

PI3K が活性化されると PIP3 が産生される。PIP3 は K_{ATP} チャネルを活性化することが知られていることから、味細胞におけるレプチン刺激による PIP3 産生について免疫組織化学的手法により検索した。

味細胞の基底側にレプチンを投与すると一部細胞で PIP3 の免疫陽性が見られた。T1R3-GFP マウス、および GAD67-GFP マウスを用いて T1R3、および GAD67 との共局在を検索すると、およそ 35%(91/257)の T1R3-GFP 発現細胞で PIP3 の局在が見られたが(図 2.a) GAD67-GFP 細胞では PIP3 の局在はほとんど見られなかった(6/134, 4%)。また、レプチンによる PIP3 の産生は、PI3K 阻害剤 LY294002 の添加によりほとんど見られなくなった(図 2.b)。さらに、PI3K による Akt のリン酸化についても検討した。レプチン刺激により、およそ 35% (93/271) の T1R3-GFP 発現細胞でリン酸化 Akt の陽性が見られた(図 2.c)。また、リン酸化 Akt 陽性細胞はレプチンに LY294002 を添加することで見られなくなった。以上の結果から、レプチンは T1R3 発現細胞の PI3K を活性

化し、PIP3 の産生や Akt のリン酸化を引き起こし、これにより K_{ATP} チャネルの開口が促進され、細胞の興奮性が抑制されることが示唆された。

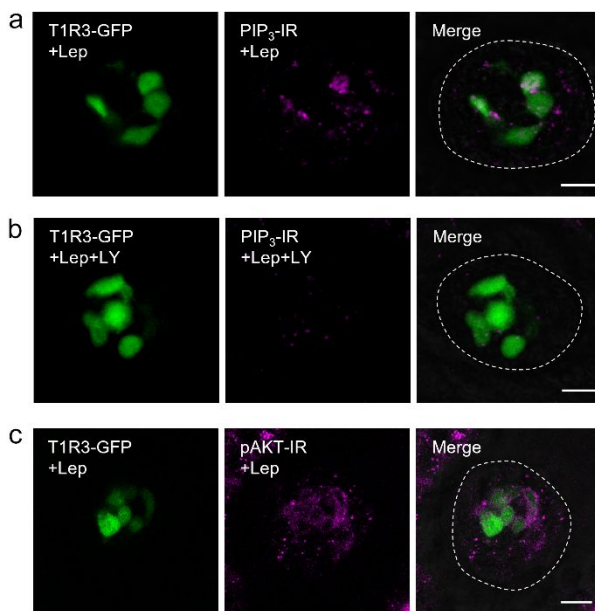


図2 . レプチンによる味細胞での PIP3 産生と Akt のリン酸化

a. レプチン刺激により T1R3-GFP 細胞で PIP3 の産生が見られる。b. PI3K 阻害剤を添加するとレプチンによる PIP3 産生が消失する。c. レプチン刺激により T1R3-GFP 細胞でリン酸化 Akt の免疫陽性が見られる。(Yoshida et al., J Neurochem, in press)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takai Shingo, Watanabe Yu, Sanematsu Keisuke, Yoshida Ryusuke, Margolskee Robert F., Jiang Peihua, Atsuta Ikiru, Koyano Kiyoshi, Ninomiya Yuzo, Shigemura Noriatsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of insulin signaling on mouse taste cell proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shigemura Noriatsu, Takai Shingo, Hirose Fumie, Yoshida Ryusuke, Sanematsu Keisuke, Ninomiya Yuzo	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression of Renin-Angiotensin System Components in the Taste Organ of Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2251 ~ 2251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11092251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 吉田竜介	4. 巻 26
2. 論文標題 末梢味覚器におけるうま味のコーディング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 71-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 吉田竜介	4. 巻 38
2. 論文標題 末梢における味覚情報伝達	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 岡山歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 25-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohla Kathrin, Yoshida Ryusuke, Roper Stephen D, Di Lorenzo Patricia M, Victor Jonathan D, Boughter John D, Fletcher Max, Katz Donald B, Chaudhari Nirupa	4. 巻 44
2. 論文標題 Recognizing Taste: Coding Patterns Along the Neural Axis in Mammals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Senses	6. 最初と最後の頁 237-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemse/bjz013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida Ryusuke, Margolskee Robert F., Ninomiya Yuzo	4. 巻 in press
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 3 kinase mediates the sweet suppressive effect of leptin in mouse taste cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida Ryusuke, Yasumatsu Keiko, Ninomiya Yuzo	4. 巻 20
2. 論文標題 The sweet taste receptor, glucose transporters, and the ATP-sensitive K ⁺ (KATP) channel: sugar sensing for the regulation of energy homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Physiology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cophys.2021.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasumatsu Keiko, Ohkuri Tadahiro, Yoshida Ryusuke, Iwata Shusuke, Margolskee Robert F., Ninomiya Yuzo	4. 巻 230
2. 論文標題 Sodium glucose cotransporter 1 as a sugar taste sensor in mouse tongue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	6. 最初と最後の頁 e13529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apha.13529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masamoto Michimasa, Mitoh Yoshihiro, Kobashi Motoi, Shigemura Noriatsu, Yoshida Ryusuke	4. 巻 730
2. 論文標題 Effects of bitter receptor antagonists on behavioral lick responses of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135041 ~ 135041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 吉田竜介
2. 発表標題 うま味の末梢伝導路
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田竜介, 實松敬介, 高井信吾, 岩田周介, 重村憲徳
2. 発表標題 ヒト味覚認知閾値に対する低濃度塩添加の影響
3. 学会等名 味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryusuke Yoshida, Robert F. Margolskee, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Signaling cascade for the sweet suppressive effect of leptin
3. 学会等名 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms for Taste and Olfactory Perception (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 竜介, Robert F. Margolskee, 二ノ宮 裕三
2. 発表標題 甘味受容細胞に対するレプチンの作用とそのメカニズム
3. 学会等名 第71回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田竜介, 實松敬介, 高井信吾, 岩田周介, 重村憲徳
2. 発表標題 低濃度塩添加によるヒト味覚認知閾値の低下
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会(誌上)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryusuke Yoshida, Robert F. Margolskee, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Involvement of phosphoinositide 3-kinase in leptin signaling in sweet sensitive taste cells
3. 学会等名 FAOPS2019(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryusuke Yoshida, Robert F. Margolskee, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Leptin signaling pathway linking from activation of leptin receptor to KATP channel activation in sweet sensitive taste cells in mice
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田竜介
2. 発表標題 味細胞におけるレプチンシグナリング
3. 学会等名 第52回味と匂学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田竜介
2. 発表標題 末梢における甘味の受容と調節メカニズム
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田竜介、Robert F. Margolskee、二ノ宮裕三
2. 発表標題 レプチンによる甘味細胞応答抑制にはPI3Kが関与する
3. 学会等名 第54回味と匂学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryusuke Yoshida, Robert F. Margolskee, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Intracellular signaling pathway for the sweet suppressive effect of leptin
3. 学会等名 ISOT2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuzo Ninomiya, Keiko Yasumatsu, Shusuke Iwata, Ryusuke Yoshida
2. 発表標題 Signal detection and transmission pathways for sugars and fatty acids in the mouse peripheral taste system
3. 学会等名 ISOT2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryusuke Yoshida, Robert F. Margolskee, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Leptin suppresses sweet responses via Ob-Rb-PI3K-KATP channel pathway
3. 学会等名 第126回日本解剖学会・第98回日本生理学会大会・合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ryusuke Yoshida, Yuzo Ninomiya	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 20
3. 書名 Section 21: 3.10 - Sweet and Umami Taste, The Senses: A Comprehensive Reference, Reference Work, 2nd Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学医歯薬学総合研究科口腔生理学分野
<http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~oralphys/OralPhysiology.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	モネル化学感覚研究所			