

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05866

研究課題名(和文) Gタンパク質共役型受容体を介した食品因子の抗2型糖尿病機能に関する研究

研究課題名(英文) Anti-diabetic role of food factors via G protein-coupled receptors

研究代表者

乾 博 (Inui, Hiroshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員

研究者番号：20193568

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)：食品成分の機能性を発揮する作用機序を明らかにする上で、その標的となる因子を同定することは重要な課題である。本研究では、食品成分によるGタンパク質共役型受容体の活性化について検討し、構造活性相関や活性化メカニズム、さらに生理作用における役割について評価を行った。その結果、GPR55およびGPR97が食品成分クルクミンの標的分子となること、さらに両受容体の活性化におけるクルクミンの構造活性相関を明らかにし、GPR55についてはインクレチンホルモン分泌による抗糖尿病への関与という生理的意義についても見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能性食品成分を用いた健康社会の実現のために、食品成分の効果が現れるための分子機構を知ることは重要な課題となっている。本研究では、ターメリックに含まれる機能性食品成分であるクルクミンが、Gタンパク質共役型受容体ファミリーの一員であるGPR55とGPR97を活性化させることで機能性を発揮する機構が存在することを見出した。GPR55の活性化機構については、クルクミンの抗糖尿病作用に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Identification of target molecules is important to elucidate the action mechanism of functional foods. In this study, we investigated the effects of food ingredients on the activation of G protein-coupled receptors.

As a result, GPR55 and GPR97 were identified as potential target molecules of curcumin. The structure-function relationship in the activation of both the receptors was clarified. In addition, our results suggested that the activation of GPR55 by curcumin was involved in the secretion of incretin hormone, leading to anti-diabetic activity of curcumin.

研究分野：栄養生化学

キーワード：クルクミン Gタンパク質共役型受容体 インクレチンホルモン GLP-1 機能性食品成分 GPR55 GPR97 構造活性相関

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 食品成分は様々な生理作用を発揮するが、その詳細な作用メカニズムについては未だ不明なものが多い。そのため、例えばターメリックの成分であるクルクミン ( (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione ) では、機能性食品因子としての健康作用に疑義が持たれるといった論旨の論文も報告されている [ *Nature*, 541, 144–145, 2017 ]。食品成分はどのようなメカニズムで生理機能を発揮しているのか? という問いに対して、十分な科学的エビデンスを与えること、さらにその中で、標的となる分子 ( 受容体 ) を明らかにすることは重要な研究課題である。

(2) ヒトに約 800 種類存在する G protein-coupled receptor ( GPCR ) は、薬のターゲットの半数を占める。この事実は、GPCR の限定的な組織発現分布とリガンド特異性による生体制御のターゲットとしての有益性を裏付ける。

(3) 上記の (1) と (2) の背景から、食品因子の標的となる GPCR を同定するためのスクリーニング系を構築した。そしてスクリーニングの結果、ターメリックの成分であるクルクミンに対して GPR55 と GPR97 が応答することを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、クルクミンが GPR55 と GPR97 をどのように活性化して、どのような生理作用に関与するかを明らかにすることを主たる目的とした。さらに、エネルギー代謝に関わる幾つかの GPCR について、機能を調節する食品成分を探索することについても取り組んだ。これにより、GPCR は食品成分の標的となりうるという概念を確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) クルクミンと GPR55 の関係に関する検討

- 1-1. *in silico* での結合モデルを構築して、相互作用に重要なアミノ酸残基を推定した。
- 1-2. 推定されたアミノ酸残基に変異を持つ GPR55 変異体の発現系を構築して、血清応答配列を利用したルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、培養細胞においてクルクミンによる GPR55 変異体の活性化を評価した。
- 1-3. クルクミン類縁体を用いた構造活性相関について、レポーターアッセイを用いて評価した。
- 1-4. GPR55 の発現細胞を同定し、クルクミンによる GPR55 活性化の生理的意義を評価した。

#### (2) クルクミンと GPR97 の関係に関する検討

- 2-1. クルクミンによる GPR97 の活性化についてレポーターアッセイを用いて検証した。
- 2-2. 既知リガンドである合成グルココルチコイドやフェニルアラニンとの活性化メカニズムを比較した。
- 2-3. クルクミン類縁体を用いて構造活性相関について評価した。

#### (3) エネルギー代謝に関わる GPCR の機能調節評価系の確立

### 4. 研究成果

#### (1) クルクミンと GPR55 に関して

1-1. ヒト  $\delta$ -opioid receptor の protein data base より導かれたヒト GPR55 の構造モデルである GPR55 R\* model [ *Biochemistry* 56, 473–486, 2017 ]、および AutoDock Vina を用いてドッキングシミュレーションを行った。その結果、水素結合 ( H170<sub>ECL2</sub>, N171<sub>ECL2</sub>, S173<sub>5.31</sub> ) あるいはファンデルワールス力 ( F102<sub>3.33</sub>, I156<sub>4.60</sub>, F159<sub>4.64</sub>, F182<sub>5.40</sub>, E186<sub>5.44</sub>, F190<sub>5.47</sub>, F246<sub>6.55</sub> ) によって相互作用する候補アミノ酸残基が推定された。

1-2. 推定されたアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体 GPR55 発現ベクターを構築して、内在性リガンドであるリゾフォスファチジルイノシトール ( LPI ) と比較検討した。評価には、血清応答配列を利用したルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた。GPR55 を高発現させた HEK293FT 細胞において、GPR55 の F190<sub>5.47</sub> 変異によって、クルクミンでのみ活性促進作用が低下した。一方で、I156<sub>4.60</sub>, N171<sub>ECL2</sub>, S173<sub>5.31</sub>, F102<sub>3.33</sub>, F159<sub>4.64</sub>, F246<sub>6.55</sub> 変異では、LPI による活性化作用のみが顕著に低下した。I156<sub>4.60</sub> 変異では、LPI による活性化は低下し、クルクミンによる活性化作用は増加した。よって、少なくとも F190<sub>5.47</sub> がクルクミンとの相互作用に重要であることが示唆された。

クルクミンによる GPR55 の活性化はアンタゴニストである CID16020046 や ML193 によって抑制されたこと、F190<sub>5.47</sub> はリガンド結合ポケットに位置することから、クルクミンがアゴニス

トとして作用することが示唆された。

1-3. GPR55 の活性化作用に関して、デメトキシクルクミン、2,6-ジメチルクルクミン、4',4''-ジメチルクルクミンは、クルクミンと同レベルの活性化作用を有していたが、ビスデメトキシクルクミンやアセタールクルクミンでは活性化作用は持つもののクルクミンよりも弱かった。テトラヒドロクルクミン、クルクミン  $\beta$ -D-グルクロニド、分解産物であるバニリンやフェルラ酸などでは活性化作用は認められなかった。また、クルクミンは酸化分解を受けるが、酸化分解産物には活性化作用は認められなかったことから、クルクミンが直接 GPR55 を活性化させることが示唆された。構造活性相関の評価の結果、クルクミンのヘプタジエン構造および少なくとも 1 つのメトキシ基が GPR55 の活性化に重要であることが判明した。

1-4. 各種培養細胞を用いて、GPR55 の発現細胞を評価したところ、既に先行研究で報告されているが、マウス腸管 L 細胞株である GLUTag 細胞に GPR55 の発現が認められた。そこで、GLUTag 細胞におけるクルクミンと GPR55 の役割について検討したところ、クルクミンは、GLUTag 細胞の細胞内カルシウム濃度を上昇させ、GLP-1 分泌を促進した。さらに、GPR55 アンタゴニストは、クルクミンによるこれらの作用を減弱させた。

## (2) クルクミンと GPR97 の関係について

2-1. GPR97 を高発現させた HEK293FT 細胞において、血清応答配列の制御下にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、クルクミンは濃度依存的にルシフェラーゼ活性を上昇させた。

クルクミンは高発現させた GPR97 のタンパク質レベルを減少させたため、翻訳後レベルで GPR97 の発現を制御することが示唆された。クルクミンによる GPR97 の減少は、プロテアソーム阻害剤では抑制されなかったが、オートファジー阻害剤によって抑制された。

GPR97 には、細胞外に GPCR proteolysis site (GPS) が存在して切断を受けるが、GPS サイトに変異を持つ GPR97(T250A)や GPS サイトよりも N 末端側を欠いた GPR( $\Delta$ N)に対してもクルクミンは活性化作用を有することが判明した。よって、クルクミンによる GPR97 の活性化には、このサイトの切断は関係しないことが明らかになった。

2-2. クルクミンが野生型 GPR97、GPR97(T250A)、GPR( $\Delta$ N)の全てを活性化させたのに対して、既知アゴニストである合成グルココルチコイド beclomethasone dipropionate (BDP) と L-Phe では野生型 GPR97 と GPR97(T250A)は活性化させたが GPR( $\Delta$ N)は活性化させなかった。さらに、クルクミンと BDP は、それぞれ単独で使用した場合の活性化作用が飽和する濃度で使用した場合でも、ともに使用すると相加的に野生型 GPR97 の活性化を促進した。よって、BDP とクルクミンは GPR97 の異なる部位を標的として活性化させることが示唆された。

2-3. GPR97 の活性化作用に関して、デメトキシクルクミンやアセタールクルクミン、2,6-ジメチルクルクミン、4',4''-ジメチルクルクミンはクルクミンよりも活性化作用が強かった。ビスデメトキシクルクミンは活性化作用を持つもののクルクミンよりも弱かった。テトラヒドロクルクミン、クルクミン  $\beta$ -D-グルクロニド、分解産物であるバニリンやフェルラ酸などでは活性化作用は認められなかった。酸化分解産物には活性化作用は認められなかったことから、クルクミンが直接 GPR97 を活性化させることが示唆された。構造活性相関の評価の結果、クルクミンのヘプタジエン構造および少なくとも 1 つのメトキシ基が GPR97 の活性化に重要であることが判明した。

(3) エネルギー代謝に関わる幾つかの GPCR (GPR40、GPR119、GPR120、グルカゴン受容体、GLP-1 受容体) の活性化をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価する実験系を構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada Naoki, Arahori Yumi, Okuyama Mai, Luis Paula B., Joseph Akil I., Kitakaze Tomoya, Goshima Naoki, Schneider Claus, Inui Hiroshi, Yamaji Ryoichi	4. 巻 595
2. 論文標題 Curcumin activates G protein-coupled receptor 97 (GPR97) in a manner different from glucocorticoid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 41～46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.075	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 Harada Naoki, Okuyama Mai, Teraoka Yoshiaki, Arahori Yumi, Shinmori Yoh, Horiuchi Hiroko, Luis Paula B., Joseph Akil I., Kitakaze Tomoya, Matsumura Shigenobu, Hira Tohru, Yamamoto Norio, Inui Takashi, Goshima Naoki, Schneider Claus, Inui Hiroshi, Yamaji Ryoichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of G protein-coupled receptor 55 (GPR55) as a target of curcumin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Science of Food	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41538-021-00119-x	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoki Harada, Mai Okuyama, Yoshiaki Teraoka, Yumi Arahori, Tomoya Kitakaze, Takashi Inui, Naoki Goshima, Claus Schneider, Hiroshi Inui, Ryoichi Yamaji.
2. 発表標題 Identification of G protein-coupled receptors GPR55 and GPR97 as molecular targets of curcumin and involvement of GPR55 in the antidiabetic function of curcumin
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (ICN2022)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田直樹、奥山真衣、寺岡佳晃、荒堀有美、新森耀、北風智也、乾隆、乾博、山地亮一。
2. 発表標題 GPR55活性化物質としてのクルクミンの同定とインクレチン分泌における役割
3. 学会等名 2022年度 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒堀有美、原田直樹、五島直樹、乾博、山地亮一
2. 発表標題 クルクミンによるGPR97活性化機構の解明
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 漆崎広喜、寺岡佳晃、原田直樹、伊藤雄太、村田雄司、石黒正路、乾隆、乾博、山地亮一
2. 発表標題 Mogrolによる胆汁酸受容体TGR5の活性化作用について
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会（第512回講演会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumi Arahori, Mai Okuyama, Naoki Harada, Yoshiaki Teraoka, Hiroko Horiuchi, Norio Yamamoto, Naoki Goshima, Takashi Iuni, Hiroshi Inui, Ryoichi Yamaji
2. 発表標題 Identification of two G protein-coupled receptors as targets of curcumin
3. 学会等名 2019 International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Harada, Hiroko Horiuchi, Hiroshi Inui, Ryoichi Yamaji
2. 発表標題 Effects of S-equol on pancreatic $\beta$ -cell function as incretin mimetics
3. 学会等名 2019 International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	原田 直樹  (Harada Naoki)  (00529141)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	
研究 分担者	乾 隆  (Inui Takashi)  (80352912)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授   (24403)	

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	Vanderbilt University		