

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05890

研究課題名(和文) 難吸収性食品成分の腸管上皮における認識・応答の可視化

研究課題名(英文) Visualization for reception of poorly absorbable food compounds on intestinal epithelia

研究代表者

藍原 祥子 (Aihara, Yoshiko)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：30620877

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)：本研究は難消化性ながら身体に影響を及ぼす食品成分の機能として腸管上皮による受容と腸脳相関に着目したもので、腸管上皮のライブイメージングによる実験系の構築と、計算科学的手法を用いた食品因子-受容体の結合を予測する系の構築を試みた。その結果、バイオセンサーを導入したマウスを用いて、空腸内分泌細胞において食品因子に対する応答を検出・評価することができた。また、難消化性食品成分の受容体探索の方法として、計算科学的手法を構築するため、ヒト苦味受容体とリモニンのシミュレーションを行い、2種類の結合パターンを予測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活が多様化し生活習慣病が増える一方で、医療が発達している現代社会では、疾病を未然に防ぎ健康寿命を延ばすことが望まれるようになった。このような背景のなかで、普段摂取できる食品で健康を維持することが期待されている。食品に含まれるさまざまな成分は、栄養になる以外にも生理活性があることがわかってきた。栄養素以外の食品成分は、腸管でわずかに吸収されるものの、不活性化された状態で血流に乗り、ほとんどが体外へと排出される。従って、腸管で吸収されずに作用する仕組みの解明が望まれる。本研究はこうした研究に新しい評価系を導入しようとするものであり、新しい機能性食品の開発などに利用していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study examines the function of food components that are difficult to digest but still have an effect on the body, as well as the intestinal epithelial cell receptors and the gut-brain axis. An experimental system has been constructed using live imaging of intestinal epithelial cells and a system that predicts the binding of food factors and receptors using computational science methods. This system has enabled the detection and evaluation of the response of food factors in jejunal endocrine cells using mice with a biosensor. Furthermore, in order to construct a computational science-based method for searching for receptors for indigestible food components, we conducted simulations of human bitter taste receptors and limonin, and predicted two types of binding patterns.

研究分野：食品の機能に関する研究

キーワード：腸脳相関 味覚受容体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

食生活が多様化し生活習慣病が増える一方で、医療が発達している現代社会では、疾病を未然に防ぎ健康寿命を延ばすことが望まれるようになった。このような背景のなかで、普段摂取できる食品の生体調節機能が注目されている。栄養素以外の食品成分は、腸管でわずかに吸収されるものの、不活性化された状態で血流に乗り、ほとんどが体外へと排出される（難吸収性食品成分）ため、食事による効果は期待しにくい。一方で、難吸収性の食品成分には、取り込まれた口腔内の化学感覚受容体に認識されるものがある。さまざまな食品成分に応答する受容体分子として、40種あまりの味覚受容体（GPCR）と、チャネル型受容体があり、口腔内のみならず、腸管や気管などで機能する他、さまざまな組織で発現している。そこで、難吸収性食品成分の機能の発現として、生体内の食品成分の受容体を介した経路が想定される。

腸管では、食物の侵入に際して十数種類ものホルモンが分泌され、消化機能や血糖および食欲を調節することで代謝機能に働きかける。この仕組みは、上皮に存在する特殊な細胞（内分泌細胞）を介したシステムである。さらに腸管には20種ともいわれる多様な神経が分布し、迷走神経と脊髄神経という二つの経路を介して脳へと連絡しており、腸と脳との連絡が多様で密であることが組織学的にも予想されている（腸脳相関）。

### 2. 研究の目的

難吸収性食物因子による代謝調節機能に関して、腸管ホルモンと腸神経応答に注目し、刺激に対する腸管上皮の応答を細胞レベルで解析することで、腸脳相関の重要な経路を明らかにすることを目的とする。

特に、新しい実験系を構築することにより、「食品成分→腸管上皮の食品成分受容体→腸管ホルモン分泌 / 神経活性化→腸脳相関」を介した生体調節機能の研究を加速させることを目論む。

### 3. 研究の方法

#### I) ライブイメージングを用いた難溶性食品成分に対する腸管上皮の応答細胞の可視化

腸上皮の食品成分に対する応答は、①腸管上皮細胞の特定の細胞種で受容され、液性因子の分泌あるいは迷走神経か後根神経節神経を活性化させる、②直接上皮下に投射している自由神経終末に受容され、迷走神経か後根神経節神経を活性化させる、という2種類の経路が想定される。本研究では以下の実験系を用いて、まずは作用することが明らかになっている化合物を用いて評価した。

蛍光共鳴エネルギー移行（FRET）を利用したカルシウムセンサーであるYC3.60を発現させたマウスを、麻酔をかけたうえで腹部を小さく切開し、空腸の一部を切開して共焦点顕微鏡に設置した。難吸収性の食品因子の候補として、腸管ホルモンの分泌を促進するものを選択し、我々が以前明らかにしたエピガロカテキンガレート（受容体はTAS2R125）と、またTRPA1に作用するアリルイソチオシアネートを用いた。

#### II) 腸管ホルモンを分泌する分子基盤の解析

培養細胞あるいはオルガノイド培養系で機能阻害実験を行い、腸管ホルモン分泌における難吸収性食品成分に反応する受容体と、細胞内シグナル伝達経路の同定を試みる。マウス由来のSTC-1細胞はさまざまな受容体を保有し、複数の腸管ホルモンを産生することが知られている。我々は、ヒト由来のCaco-2細胞において味覚受容体が発現しており、腸管ホルモンを分泌することを報告している。本研究ではこれらにヒトのHT-29細胞を加え、改めて遺伝子発現のプロファイルを検討した。

また、食品因子と作用する味覚受容体のペアの探索のため、分子ドッキングシミュレーションを用いて予測することを試みた。2022年にCryo-EM法により解かれたヒト味覚受容体の構造を鋳型にして予測構造を作成し、ドッキングシミュレーションおよび分子動力学シミュレーションを行ってリガンドと受容体の結合部位を予測した。

### 4. 研究成果

#### I) ライブイメージングを用いた難溶性食品成分に対する腸管上皮の応答細胞の可視化

細胞の応答は、カルシウムセンサーであるYC3.60を用いて2波長の蛍光強度の比で計測した。観測する細胞を選抜する方法としては、腸管内分泌細胞のほとんどに存在することが明らかになったTRPA1を利用することにした。すなわちTRPA1の遺伝子領域にYC3.60を導入したマウスを用い、TRPA1のリガンドを刺激とする応答を計測した。その結果、TRPA1とYC3.60を発現するマウスでは、リガンドであるアリルイソチオシアネートによるカルシウム濃度上昇が観測されるが、YC3.60のみを発現しTRPA1の遺伝子を欠損したマウスではアリルイソチオシアネートによるカルシウム濃度変化が観測されないという結果が得られ、腸管内分泌細胞における細胞応答が可視化できた。カルシウム濃度変化は取得した画像の蛍光強度を解析することで求めるが、撮影中に動きのある腸管上皮から目的の細胞を絞ることが困難であった。そのため、取得した動

画において目的の領域を指定し、かつ追尾するプログラムを構築した(図1)。

経時的な画像解析には、画像の視野が動かないことが大前提である。しかしながら、本実験系の麻酔下のマウスでは観察対象を固定することが非常に困難である。応答の強いアリルイソチオシアネートでは刺激を評価することができたが、エピガロカテキンガレートでは結論づけるほどの結果が得られなかった。この問題点の解決を目指し、麻酔薬の利用やデバイスの作成を検討したが、再現度の高い実験系の構築には至らなかった。そこで、研究手法を簡便にするため、培養組織として腸上皮のオルガノイドを利用することを計画した。研究期間内にはオルガノイドの実験系を構築することまで到達した。

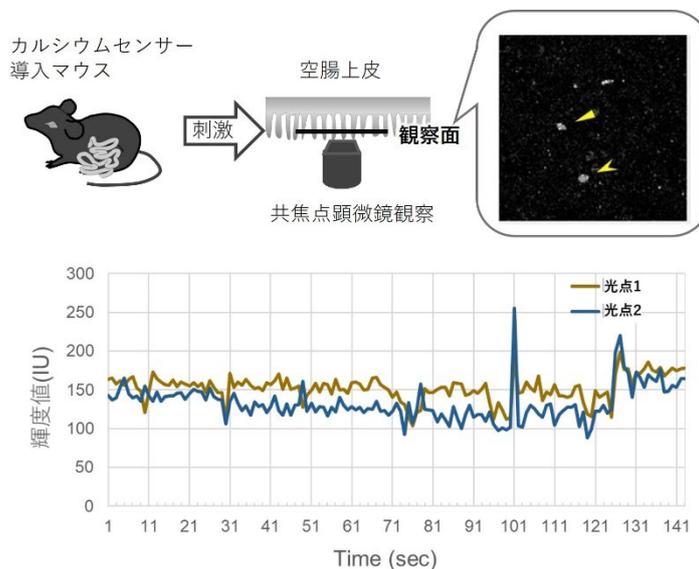


図1 内分泌細胞のみにバイオセンサーを導入したマウスにおける腸上皮のカルシウム応答の評価。右上の写真の丸く白いシグナル(矢尻および三角の印など)が細胞一つ一つの領域。カルシウム濃度が増すと輝度値(白さ)が増す。グラフは写真で示した光点の蛍光強度の軌跡。特に101秒では大きく変化している。

## II) 腸管ホルモンを分泌する分子基盤の解析

ヒト由来の培養細胞である Caco-2 と HT-29 において遺伝子発現解析を行った結果、HT-29 細胞が比較的多種の苦味受容体を発現することが確認された。HT-29 細胞は粘液の産生が活発なことから、腸上皮の防御機構の研究にはよく用いられているが、食品の刺激を受け取る研究では利用されてこなかった。本年度の研究の結果、新規に利用可能な生物材料が見いだされたといえる。

苦味受容体はヒトで 25 種類存在する。そのうちの TAS2R38 はヒトにおいて一塩基多型の変異による機能の有無が知られており、柑橘類に含まれる苦味成分に結合すると言われている。さらにリモニンの前駆体はリモニンの環構造がひとつない状態であり、苦味がない。そこで、リモニンと TAS2R38 を例として、分子ドッキングシミュレーションおよび分子動力学シミュレーションを行った(図2)。その結果、リモニンの環構造が TAS2R38 との安定的な結合に関与していることが示された。加えて、リモニンに結合する受容体の部位は、TAS2R38 における PROP や PTC の結合部位とも一部共通していた。

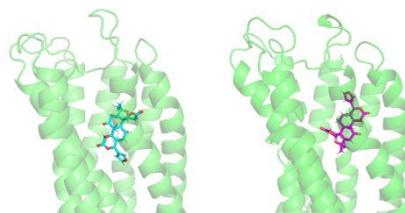


図2 TAS2R38 に対するリモニンの結合予測。2つのポーズが予想された。

研究期間全体としての成果の要約は以下のとおりである。

1. 腸上皮での受容を経時的に解析するシステムとして、マウスを用いた腸管上皮のライブイメージング系の構築を行った。YC3.60 を導入したマウスを用いて、アリルイソチオシアネートによるカルシウム濃度変化を検出した。
2. 1の実験を簡易にするために、腸オルガノイドを用いた実験系の構築を行い、オルガノイドを安定的に作成するところまで達成した。
3. 難消化性食品成分の受容体探索の方法として、計算科学的な手法を利用するため、まずは具体的な候補分子のシミュレーションを行い、結合部位を予測することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masamune Kashihara, Daiki Hayashi, Shigenori Tanaka, Yoshiko Aihara
2. 発表標題 Computational analysis on binding structure of limonin to a bitter taste receptor TAS2R38
3. 学会等名 International Union for Pure or Applied Biophysics (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------