

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05927

研究課題名(和文)非栄養性食品分子によるGPR120/インクレチンシグナリング制御機構の全容解明

研究課題名(英文)Elucidation of the control mechanism of GLP-1/incretin signaling by non-nutritional food molecules.

研究代表者

光武 進 (Mitsutake, Susumu)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：10344475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私は近年、酵母の細胞膜に含まれるスフィンゴ脂質の一つphytosphingosine (PHS) がGPR120の新規リガンドとなりインクレチンの一つGLP-1の分泌を誘導する事を見出した。GLP-1は抗糖尿病/抗肥満症を誘導する事が知られ、PHSは非栄養的にGLP-1の分泌を促す興味深い分子であった。私は食品中にはまだまだこの様な分子が存在すると考え、本研究課題では、新たに、微生物発酵茶中のteadenol Aや海苔中のisofloridosideがGPR120のリガンドなる事を見出した。さらに、PHSが他のリガンドと異なる領域でGPR120と結合する事も明らかにした

研究成果の学術的意義や社会的意義

インクレチンの一つGLP-1は、インスリンの分泌や食欲の抑制を介して抗メタボリック症候群に働き、2型糖尿病の創薬ターゲットとして注目を集めている。私は本研究でPHS以外にも、teadenol Aとisofloridosideが小腸内分泌細胞からGLP-1の分泌を誘導する事を明らかにした。GLP-1やインクレチンシグナリングは、元来、エネルギーの過剰摂取を防ぐためのフィードバックシステムであるが、私が見出した3つの分子は、何も非栄養的にこのシステムを活性化させる。私の発見は、食品中の非栄養分子の新たな食品機能の存在を示唆しており大変興味深い。

研究成果の概要(英文)：Recently, I found that phytosphingosine (PHS), one of the sphingolipids contained in the plasmamembrane of yeast, is a novel ligand for GPR120 and induces the secretion of GLP-1, one of the incretins. GLP-1 is known to induce anti-diabetes/anti-obesity, and PHS was an interesting molecule that promotes GLP-1 secretion in non-nutritive manner. I believe that such molecules still exist in foods. In this research, I found that teadenol A, contained in microbially fermented tea, and isofloridoside, contained in seaweed, stimulate the secretion of GLP-1 from mouse endocrine cells. Additionally, I also revealed that PHS binds to GPR120 in a region distinct from other ligands.

研究分野：食品科学

キーワード：GPR120 GLP-1 phytosphingosine teadenol A isofloridoside incretin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、食品由来の脂肪酸、糖、ペプチド等が消化管内分泌細胞上の受容体を刺激し、インクレチンと呼ばれるホルモンの分泌に関わる事が明らかになってきた。その一つ、長鎖脂肪酸受容体 GPR120 (FFAR4) は、小腸上皮内分泌 L 細胞に発現し、食品中の脂肪酸に応答しインクレチンの一つ GLP-1 の分泌を促進する。GLP-1 は、脳下垂体や膵細胞に作用し、インスリンの分泌促進、食欲抑制等、抗メタボリックシンドロームに働く事が知られている。これら GLP-1 の働きは創薬ターゲットとして注目を集め、その分解酵素 DPP4 の阻害剤は、GLP-1 の働きを増強する 2 型糖尿病の分子標的治療薬として複数の製薬企業から上市されている。この事は、GPR120/GLP-1 シグナリングの活性化が、2 型糖尿病を含むメタボリックシンドローム治療 / 予防に有効である事を示している。GPR120 はゲノム創薬のターゲットとして製薬業界を中心にリガンド探索が行われた。見出された多くが、脂肪酸誘導体や化学合成分子で、脂肪酸を除く天然物では、コウモリタケ由来 grifolic acid のみが知られている。しかし、コウモリタケは苦味の強い非食用キノコで、日常的に食する食品に含まれる脂肪酸以外の天然リガンドの存在は知られていなかった。

2. 研究の目的

私は、近年、GPR120 を活性化する天然分子の探索を行い、酵母の細胞膜に含まれるスフィンゴ脂質の一つ phytosphingosine (PHS) が新規リガンドとなる事を見出した (1)。私はさらに、PHS の経口投与がマウス 2 型糖尿病モデルである高脂肪食誘導性耐糖能異常を改善させる事も確認した。興味深い事に、PHS は、小腸で多剤排出トランスポーター MDR1 を介して速やかに排出される事が報告されている。つまり、PHS は、小腸上皮内分泌細胞上で GPR120/GLP-1 シグナリングを活性化するが、それ自体は排出され栄養とはならない非栄養性リガンドと考えられた。GPR120/GLP-1 シグナリングは、本来、高エネルギー分子である脂肪酸の摂取に応答し、過剰なエネルギーの摂取 / 蓄積を抑制する為のフィードバック機構として働き、抗メタボリックシンドロームに向かう生体応答を引き起こす。私の発見は、エネルギーとならない特定の食品分子が GPR120/GLP-1 シグナリングを活性化させ、エネルギーの摂取 / 蓄積を抑制し、生体恒常性の維持に寄与してきた可能性を示している。この事は、非栄養成分が持つ新しい食品機能の存在を示唆している。本研究課題では、GPR120 を活性化する食品成分は他にも広く存在するのか、遊離型 PHS が多く含まれる食品と加工技術によるその含量の違い、の二つの疑問に対して研究を行った。次に 長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR120 にどの様にしてこれら様々な構造の分子が結合するのか、といった疑問に対しても *in silico* シミュレーションと生化学的な解析を用いて、それぞれにの結合様式を明らかにした。これらの実験を通して、食品に含まれるインクレチン誘導性食品分子に関してその全容解明を試みた。

3. 研究の方法

私は本研究で、自らが見出した「PHS が GPR120 の非栄養性リガンドとなる事」を発展させ、新しい食品機能の概念を確立したいと考えた。まず、一つ目の問いである、GPR120 を活性化
する食品成分は他にも広く存在するのか、に対しては食品に含まれる分子を対象にして、GPR120 のリガンドスクリーニングを行った。また、二つ目の問いである、遊離型 PHS が多く含まれる
食品と加工技術による含量の違い、に関しては、新しく大学に導入された LC-MS を用いた PHS の定量方法を確立し、様々な発酵食品から PHS を抽出 / 分析を行った。最後の問いである、長鎖
脂肪酸をリガンドとする GPR120 にどの様にしてこれら様々な構造の分子が結合するのか、に対しては AutoDock を用いた *in silico* 結合シミュレーションを用いて、相互作用するアミノ酸残基を明らかにし、そのアミノ酸のミュータントを作製し、生化学的に相互作用の変化を実験的に明らかにした。

4. 研究成果

まず私は、リガンド未知 GPCR のリガンドスクリーニングの為に開発された TGF α -shedding assay を用いて、食品分子を対象に、GPR120 のリガンドスクリーニングを行った。その結果、新たに微生物発酵茶に含まれるポリフェノールの一つ teadenol A が FFAR4 のリガンドになる事を見出した (2)。GPR120 のリガンド探索は、創薬分野を中心にこれまでも行われてきた。これまで報告された GPR120 リガンドは、合成された化合物が多く、その構造的な特徴は、カルボキシ基を持つことであり、カルボキシ基が GPR120 のリガンド認識に必要であると考えられてきた。しかし、私が以前見出した酵母の細胞膜の構成脂質の一つ PHS はカルボキシ基を持たない。我々は、PHS や teadenol A がどの用にして GPR120 を活性化するのかを明らかにする為に、*in silico* ドッキングシミュレーションを行った。Activated turkey beta-1 adrenoceptor を鋳型にホモロジーモデルを構築し、AutoDock v4.2 を用いて ALA と PHS が相互作用するアミノ酸を予測した。その結果、R264 が ALA のカルボキシレート酸素と、E249 が PHS の C-4 位の水酸基と水素結合を形成する事が予測された。そこで我々は、R264 と E249 のアラニン変異体を作製し、相互作用を

生化学的に検討した。算出された K_m の値から、GPR120 の E249A の変異で PHS に対する親和性が大きく下がるものの、ALA に対する親和性は大きく下がらない事が確認された。一方 R264A の変異体では、ALA に対する親和性は大きく下がるが、PHS に対する親和性の低下はマイルドであった。これらの事から、PHS は ALA と全く異なる領域に作用して FFAR4 を活性化する事が明らかになった (3)。一方、teadenol A はカルボキシ基を持ち、やはり R264 と相互作用する事が明らかになった。GPR120 は、2 型糖尿病の標的として注目されている。今回の我々の結果は、GPR120 の新たな活性化部位の存在を示し、アゴニストの開発に新しい示唆を加えるかもしれない。さらに、我々は同じくインクレチンシグナリングを活性化する受容体の一つである甘味受容体 T1R2/T1R3 に着目した。甘味受容体 T1R2/T1R3 は、ヘテロ二量体の GPCR であり、味蕾細胞上で甘味の受容体として働く事が知られ、一方、小腸内分泌 L 細胞上にも発現しインクレチンシグナリングに関わっている事が知られている。従って甘味を呈する分子の中から T1R2/T1R3 の新規リガンドを探した。ササビノリにはガラクトースとグリセロールが結合した isofloridoside (IF) と呼ばれる光合成由来の低分子量炭水化物が多量に存在する。IF を舌に乗せると爽やかな甘味を呈することから、ノリが持つ微かな甘みは IF に起因すると考えられる。我々はまず、T1R2/T1R3 哺乳動物細胞発現ベクターを作製し、甘味受容体を持たないヒト胎児由来腎臓上皮細胞 293T 細胞にこれらベクターを導入し培地に IF を添加した。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度の大幅な上昇が検出された。発現ベクターを導入していない細胞では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が確認されなかった事から、IF が甘味受容体特異的に細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇を誘導することが示された。さらに IF はマウス小腸内分泌細胞株 STC-1 からの GLP-1 の分泌を有意に促進した (4)。本研究で私はインクレチンシグナリングを活性化させる分子として、PHS、TdA、IF の 3 分子を同定した。PHS は酵母の細胞膜の構成脂質として発酵食品に含まれており、TdA はプーアル茶等の微生物発酵茶に含まれている。興味深い事に、これらは生体のエネルギー源とならない分子である。インクレチンシグナリングは元来生体の過剰なエネルギー摂取を抑制するためのフィードバックシステムである。PHS や TdA は、高エネルギー分子である脂肪酸を mimic し、自らは非エネルギー分子ながらフィードバックシステムを活性化させる事ができる。本研究による発見は、人が知らないうち、これら非栄養性分子を摂取し生体恒常性を維持してきた事を示唆し大変興味深い。

- (1) T. Nagasawa, H Nakamichi, Y Hama, S Higashiyama, I Yasuyuki, S. Mitsutake*
Phytosphingosine is a novel activator of GPR120.
Journal of Biochemistry (2018) **164**(1), 27-32
- (2) T. Nagasawa, K. Ishimaru, S. Higashiyama, Y. Hama, S. Mitsutake*
Teadenol A in microbial fermented tea acts as a novel ligand on GPR120 to increase
GLP-1 secretion
Food & Function (2020) **11**, 12, 10534
- (3) T. Nagasawa, M. Horitani, S. Kawaguchi, S. Higashiyama, Y. Hama, S. Mitsutake*
The molecular mechanism of phytosphingosine binding to FFAR4/GPR120 differs from that of
other fatty acids
FEBS Open Bio (2021) **11**, 3081-3089
- (4) M. Akishino, A. Yuko, H. Baba, M. Asakawa, Y. Hama, S. Mitsutake*
Red algae-derived isofloridoside activates the sweet taste receptor T1R2/T1R3
Food Bioscience (2022) **50**, 102186

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tomotaka Nagasawa, Masaki Horitani, Shin-ichi Kawaguchi, Shigeki Higashiyama, Yoichiro Hama, and Susumu Mitsutake | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 The molecular mechanism of phytosphingosine binding to FFAR4/GPR120 differs from that of other fatty acids | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Open Bio | 6. 最初と最後の頁 3081-3089 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13301 | 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 Yoichiro Hama, Emi Yamagata, Noriko Takahama, Yuka Yoshimura, Rin Yanagida, Susumu Mitsutake | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Liberation of eicosapentaenoic acid and degradation of the major cell wall polysaccharide porphyran by fermentation of nori, the dried thalli of <i>Pyropia yezoensis</i> , with koji | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology | 6. 最初と最後の頁 4105-4111 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10811-021-02590-1 | 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 - |
| 1. 著者名 Tomotaka Nagasawa, Kanji Ishimaru, Shigeki Higashiyama, Yoichiro Hama, Susumu Mitsutake | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Teadenol A in microbial fermented tea acts as a novel ligand on GPR120 to increase GLP-1 secretion | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Food & Function | 6. 最初と最後の頁 10534-10541 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0fo02442b | 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 - |
| 1. 著者名 Miku Akishino, Aoki Yuko, Hajime Baba, Makio Asakawa, Yoichiro Hama, Susumu Mitsutake | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Red algae-derived isofloridoside activates the sweet taste receptor T1R2/T1R3 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Food Bioscience | 6. 最初と最後の頁 102186 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fbio.2022.102186 | 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 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 光武 進 |
| 2. 発表標題 インクレチンシグナリングを活性化させる食品分子 |
| 3. 学会等名 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Susumu Mitsutake |
| 2. 発表標題 Phytosphingosine is a novel ligand of GPR120/FFAR4 |
| 3. 学会等名 2021 BLIRC/KSMCB-Division of Lipid Biology Joint Symposium, Seoul（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長澤智隆、石丸幹二、東山繁樹、濱 洋一郎、光武 進 |
| 2. 発表標題 微生物発酵茶に含まれるTeadenol AはGPR120に作用しGLP-1の分泌を誘導する |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|