

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658109

研究課題名（和文）Gタンパク質共役受容体を標的とした機能性食品成分探索研究

研究課題名（英文）Study on functional foods that associate with G protein-coupled receptors

研究代表者

佐藤 隆一郎 (SATO RYUICHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50187259

研究成果の概要（和文）：

7回膜貫通領域を持つGタンパク質共役受容体(GPCR)は、それぞれ固有の特異的リガンドを結合し、代謝調節に関与する事が知られている。胆汁酸を結合するGタンパク質共役受容体TGR5に結合する食品成分を探索する研究から、複数の植物由来成分の探索に成功した。さらに、複数のGPCRについて、アッセイ系の構築を試みた。

研究成果の概要（英文）：

It is known that G protein-couple receptors (GPCR) with 7 transmembrane domains can bind specific intrinsic ligands and be involved in metabolic regulation. In terms of a G protein-couple receptor TGR5 that interacts with bile acids, we managed to identify a couple of chemical compounds derived from plants. Moreover, we attempted to establish different assay systems that are able to monitor ligand activities of various food factors for GPCRs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能、Gタンパク質共役受容体

## 1. 研究開始当初の背景

多価不飽和脂肪酸、胆汁酸の機能の一部は細胞表面のそれぞれに対する特異的Gタンパク質共役受容体(GPCR; GPR120とTGR5)が、善玉であるHDLコレステロールを上昇させるニコチン酸の特異的受容体(HM74)が近年次々と明らかにされてきている(*Cell* 2010, *Cell Met.* 2009, *Nature Med.* 2003)。ヒトゲノム中にGPCRは700から800近く存在する可能性が示唆されており、その多くが多様な生命現象の調節を担っている。そのうち

250程度の受容体リガンドが同定されており、今回申請者が解析を行う受容体のリガンドは、いずれも食事由来の因子、もしくはその代謝産物であり、同様の機能を有した食品中成分の存在の可能性が考えられる。このような仮説の基に、機能成分を探索するアッセイ系を構築し、その同定を試みると同時に、機能性成分を用いた細胞、動物実験を通じて受容体活性制御の分子基盤の解析を試みる。

## 2. 研究の目的

(1) Gタンパク質共役受容体（GPCR:G protein-coupled receptor）は7回膜貫通型の受容体で多様な生命応答のシグナル伝達役を果たしている。

(2) 近年、多価不飽和脂肪酸、胆汁酸、ニコチン酸を特異的に認識する受容体が明らかにされ、その機能解析の必要性が高まっている。

(3) これらリガンドは食品成分（もしくは関連分子）であり、食品に含まれる成分と同様なリガンド活性を有する分子の存在する可能性がある。

(4) これらリガンドはいずれも代謝改善効果を有し、生活習慣病予防に資する食品成分であり、その機能を模する食品成分を探索、同定する試みは社会的要請度が高い。

## 3. 研究の方法

### (1) 胆汁酸受容体 TGR5 を活性化させる植物由来成分の探索

すでに構築したアッセイシステムを用い、植物由来の香料精製化合物について、TGR5 リガンド活性を有する化合物の探索を行った。具体的には、ヒト TGR5 発現ベクターと転写因子 CREB の応答配列を4回繰り返した人工プロモーターの下流に Luciferase 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を HEK293 細胞に導入した（図1）。精製化合物が TGR5 に結合し、細胞内の cAMP 濃度を上昇させると、細胞内 CREB がリン酸化を受け活性型に変換し、Luciferase 発現が上昇する。細胞内 Luciferase 活性を定量し、TGR5 リガンド活性として評価した。

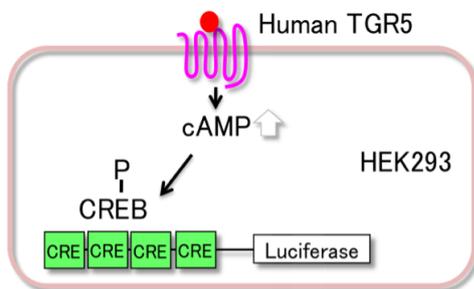


図1 レポーターアッセイの概要

### (2) 胆汁酸受容体 TGR5 と結合する柑橘成分ノミリンの結合様式解析

先行研究で TGR5 リガンド食品成分として柑橘成分のノミリンを同定した。ノミリンと TGR5 の結合様式は、コンピューターシミュレーションにより推定した。その結果、水素結合等に関与すると予想される TGR5 アミノ酸がリストアップされ、それぞれについて Ala 置換を導入した。ヒト TGR5 発現ベクターに部位特異的な変異を入れ、特定のアミノ酸残基を Ala に置換させた。この変異 TGR5 を過剰発現させ、ノミリンの TGR5 リガンド活性の変動を追跡した。

### (3) 新規 GPCR リガンド評価系の構築

複数の GPCR について、そのリガンド活性を評価するアッセイ系の構築を目指した。具体的には、それぞれのヒト cDNA を取得し、培養細胞に過剰発現させる系を構築した。GPCR の下流シグナルに多様性があるため、それぞれのシグナルを受容するシステムを作動させる工夫を施した。

中でも小腸下部において GLP-1 発現を促進する働きのある GPR119 について解析を進めた。ヒト小腸様培養細胞である Caco-2 より RNA を回収し、cDNA を作製し、GPR119 のクローニングを行った。これを発現ベクターに組み込み、発現コンストラクトを完成させた。転写因子 CREB の応答配列を5回繰り返したプロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトを作成し、GPR119 発現コンストラクトと同時にヒト HEK293 細胞に遺伝子導入した。

## 4. 研究成果

### (1) 新たな TGR5 リガンド成分

約 200 種類の香料精製化合物の TGR5 リガンド活性を評価した。その結果、これまで見いだした  $\alpha$ -イオノンの他に、グレープフルーツ香料であるヌートカトン等に高いリガンド活性を見いだした。 $\alpha$ -イオン、ヌートカトンのそれぞれについて、構造類縁体を複数入手し、その活性を比較したところ、類縁体にもほぼ同様の活性が検出された。また、アッセイ系を用いて EC50 値を算出したところ、 $\alpha$ -イオンとヌートカトンはほぼ同程度の値で、ノミリンより結合活性がやや低い事が判明した。

## (2) ノミリンの結合様式解析

コンピューターシミュレーション（新潟薬科大学 石黒正路先生との共同研究）より、複数のアミノ酸がノミリンと水素結合する可能性が示唆された。それぞれのアミノ酸をAlaに置換し、これを細胞に過剰発現させ、ノミリンのリガンド活性を評価した。その結果、ノミリンのフラン環に結合する事が予測された、TGR5中の2カ所のTyr残基をAlaに置換すると、ノミリンのリガンド活性が消失した。以上の結果より、フラン環とTyr残基の結合の重要性が示唆された。柑橘類中では、ノミリンは配糖体としても存在するが、この配糖体はリガンド活性が低い事を我々は確認している。配糖体の糖は、フラン環の近傍に結合する事から、配糖体のリガンド活性の低さを本研究結果は良く説明している。従って、リガンド活性の強い食品成分は糖を含まないアグリコン型ノミリンである。複数の柑橘類より粗抽出物を得て、リガンド活性を評価したところ、柚子種子抽出物に強い活性が検出された。

## (3) 新規GPCRリガンド評価系の構築

これまでに関連GPCRとしてヒトGPR119、GPR40、GPR41のクローニングに成功している。GPR119に関しては、TGR5と同様のGタンパク質を共役しており、細胞内cAMP濃度を上昇させる事がわかっている。そこで、TGR5で用いた方法と同様のアッセイ系を構築した。その結果、GPR119の発現に伴い、合成リガンドを添加した培地で培養した細胞で高いLuciferase活性の検出に成功した。本アッセイ系を用い、およそ300種類の食品成分、香料成分についてGPR119リガンド活性の評価を開始している。GPR40、41に関しては下流にPKCが存在する事から、PKC活性化を評価するアッセイ系の構築を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

(1) Sato, R Nomilin as an anti-obesity and anti-hyperglycemic agent. *Vitamins and Hormones* 2013; 91:425-439. 査読無し

(2) 佐藤隆一郎 「柑橘成分ノミリンは胆汁酸受容体を介して血糖低下、抗肥満効果を発揮する」 *バイオサイエンスとインダストリー*、70, 128-132. (2012) 査読無し

(3) 佐藤隆一郎 「胆汁酸受容体リガンドとして抗肥満活性を發揮する柑橘成分の発見」 *日本ポリフェノール学会雑誌* 1(2), 38-43. (2012) 査読無し

[学会発表] (計5件)

① 碓 菜穂、清水 誠、石黒 正路、井上 順、佐藤 隆一郎 「胆汁酸受容体TGR5の各種リガンド結合能の解析」 *日本農芸化学会* 2013年度大会 2013. 3. 25-27 仙台

② 佐藤 隆一郎 「胆汁酸受容体TGR5リガンド活性を有する柑橘成分ノミリンの抗肥満効果」 第33回日本肥満学会 2012. 10. 11 京都

③ 井上 順、小野 絵里、橋詰 力、清水 誠、佐藤 隆一郎 「柑橘由来成分ノミリンの胆汁酸受容体TGR5を介した抗肥満作用」 第66回日本栄養・食糧学会大会 2012. 5. 18-20 仙台

④ 佐藤 隆一郎 Food factors that mimic bile acid functions. 2011 International Conference on Food Factors 2011. 11. 20-23 台北 (台湾)

⑤ 佐藤 隆一郎 「胆汁酸受容体リガンドとして抗肥満活性を發揮する柑橘成分の発見」 第5回日本ポリフェノール学会年次大会 2011. 11. 10 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/food-biochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 隆一郎 (SATO RYUICHIRO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：50187259

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

清水 誠 (SHIMIZU MAKOTO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：40409008