

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780124

研究課題名(和文) 消化管内分泌細胞に発現する新たな食品たんぱく質/ペプチド受容体候補の網羅的探索

研究課題名(英文) Searching for dietary protein/peptide sensing receptors in enteroendocrine cells

研究代表者

比良 徹(Hira, Tohru)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10396301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)： 消化管内分泌細胞における食品タンパク質、食品ペプチドの認識機構に関して、網羅的遺伝子発現解析によりTRPチャネルの一つがCCK産生細胞に発現することを見いだした。

牛乳由来の食品タンパク質の認識およびアルデヒドの認識にこの分子が関与することが明らかとなった。さらにラットへのアルデヒドの経口投与により、胃排出の抑制が起きることを明らかにし、これにはTRPA1およびCCKが関与する可能性が考えられた。また、カルシウム感知受容体が種々の食品ペプチドの認識に関与することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We searched sensor molecules involved in dietary protein/peptide-sensing in enteroendocrine cells. By using enteroendocrine cell models, we found that a TRP channel was highly expressed in CCK-producing cell line.

It was demonstrated that the TRP channel is involved in alpha-casein-induced CCK secretion. Furthermore, an aldehyde was found to induce CCK secretion through the TRP channel. Oral administration of the aldehyde reduced gastric emptying rate in rats, suggesting the aldehyde directly acts enteroendocrine cell and reduces gastric emptying in vivo.

In separated experiments, we found that calcium-sensing receptor functions as sensor for various protein hydrolysates, rather than for specific peptides.

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： 消化管内分泌細胞 栄養素受容体 食品タンパク質 食品ペプチド

1. 研究開始当初の背景

摂取された食品成分は、消化・吸収後に全身に分配され、発達、成長、恒常性維持に加え、肥満、各種疾病など、長期的に多様な影響を与える。一方で食品を摂取することで、即座に消化酵素分泌の亢進や、消化管運動の変化、満腹感の誘導、体熱産生などの応答が起こる。これらの短期的応答は、吸収後の食品成分よりもむしろ、消化管腔内への食品成分の流入により誘導されている。これは即ち、消化管が食品成分を感知していることを示しており、消化管における栄養素認識 (Nutrient sensing, Luminal sensing) と呼ばれる。

Nutrient sensing の中心的な役割を担うのが、腸管上皮に約 1% の割合で散在する消化管内分泌細胞であり、管腔内の食品成分を認識した消化管内分泌細胞は、基底膜側へ各種消化管ホルモンを分泌し、血流、神経を介して標的臓器に管腔内の情報を伝達する。

食品成分を認識する機構として、G タンパク共役受容体 (GPCR) や各種輸送担体の関与が示唆されており、グルコースについては、グルコース輸送担体 SGLT1/3、甘味受容体 T1R2/3、脂肪酸については、GPR40/41/43/120 などの関与が国内外で報告されている。ペプチドに関しては、ペプチド輸送担体 PepT1 が候補とされているが、このリガンドとなるのはジ、トリペプチドなどの低分子ペプチドに限られる。また、2006 年、in vitro の試験において GPR93 (GPCR の一つ) がペプチド受容体候補として見いだされたが、その後 in vivo での試験結果は報告されていない。

我々は、細胞外カルシウムやアミノ酸のセンサーとして働くことが知られるカルシウム感知受容体 (CaSR) が、消化管内分泌細胞株での、アミノ酸 (Phe) が誘導する消化管ホルモン Cholecystokinin (CCK) の分泌においても受容体として機能することを明らかにした。

さらに、CaSR 強制発現系や阻害剤を用いた試験により、CCK 分泌を促進して食欲を抑制する作用を持つ大豆由来の塩基性ペプチド 51-63 も、CaSR に受容されて CCK 分泌を誘導することを見出した。現在は、消化管内分泌細胞株に発現する CaSR が、51-63 ペプチド以外の食品ペプチドの受容にも関与する可能性について検討を始めている。しかし、多種多様な食品ペプチドを CaSR, GPR93 だけで認識しているとは考えにくい。また、加水分解していない食品たんぱく質そのもの (-カゼイン) も消化管内分泌細胞に認識されることを見いだしているが、我々のこれまでの検討においても、その受容体候補は未だ不明である。

2. 研究の目的

本申請課題では消化管内分泌細胞に特異的に発現する受容体関連分子を網羅解析によ

り探索し、その候補分子の食品たんぱく質/ペプチド受容体としての機能を検証した。

我々が保有する (市販されていない) 2 種の消化管内分泌細胞株を用い、消化管内分泌細胞における、新たな食品ペプチド受容体ならびに未知の食品たんぱく質受容体候補を探索、同定することを目的とした。消化管内分泌細胞特異的に発現する受容体関連分子を見だし、その機能を in vitro, in vivo において明らかにし、消化管での食品たんぱく質/ペプチド受容メカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 消化管内分泌細胞のモデルとして広く用いられるマウス小腸由来の CCK 産生細胞株 STC-1 および大腸由来の GLP-1 産生細胞株 GLUTag 細胞を用いて、消化管内分泌細胞に発現する食品たんぱく質/ペプチド受容体候補を探索するため、mRNA 発現を網羅的に解析、比較した。

(2) CCK 産生細胞株 STC-1 を用いて、食品タンパク質および各種食品ペプチド、さらに候補受容体アゴニストの認識機構、CCK 分泌機構を解析した。

(3) CCK 分泌促進作用を有する各種食品ペプチドについて、液体クロマトグラフィーを始めとした種々の手法により分画を行い、活性化区分の特定、特徴の解析を行った。

(4) STC-1 細胞において CCK 分泌を強く促進した新規食品成分について、CCK の生理作用の一つである胃排出抑制作用が見られるかを、実験動物 (ラット) を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 2 種類の消化管内分泌細胞株にける遺伝子発現の網羅解析により、STC-1 細胞において TRP チャネル型受容体の一つで、冷感および辛味受容体として知られる TRP チャネルの一つである Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRAP1) の発現が高いという結果が得られた。また、STC-1 細胞を β -カゼインを含む培地で培養すると、TRPA1 遺伝子の発現が高まったことより、このものが、 β -カゼインの認識に関することが考えられた。

(2) 代表的な食品たんぱく質である牛乳カゼインの主要なサブユニットである β -カゼインの CCK 分泌作用について上記の STC-1 細胞を用いて解析した。カゼインに含まれる他のサブユニット (α -カゼイン、 β -カゼイン) との比較において、 β -カゼインは高い CCK 分泌促進作用を有していた。また、カゼインの加水分解物と比較したところ、 β -カゼインは大幅に低い濃度で CCK 分泌を促進した。これらの結果より、インタクトな β -カゼインが高い CCK 分泌活性を持つことが明らかとなった。

- (3) α -カゼインによるコレシストキニン分泌は、細胞外のカルシウム除去では影響を受けなかったが、細胞内のカルシウムをキレートする BAPTA-AM により部分的に抑制され、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出が一部関与することが示唆された。また、プロテインキナーゼ A 阻害剤処理およびアデニル酸シクラーゼ阻害剤処理により α -カゼインによるコレシストキニン分泌が抑制された。さらに α -カゼインに暴露することで、STC-1 細胞内の cAMP 産生が増加することが見いだされ、 α -カゼインが cAMP の産生を介してコレシストキニン分泌を誘導することが示唆された。
- (4) また、これまでの研究において STC-1 細胞での発現が確認された TRP チャネルの一つである Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) に関して、この阻害剤処理下では、 α -カゼインによるコレシストキニン分泌が抑制された。以上の結果より、食品たんぱく質による TRPA1 の活性化が、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出、アデニル酸シクラーゼ活性化を介した cAMP 産生などの細胞内情報伝達経路を介してコレシストキニンを放出するメカニズムの存在が示唆された。
- (5) CCK 分泌促進作用を有する大豆たんぱく質加水分解物において、活性成分を単離するために、液体クロマトグラフィー (FPLC) を用いて分子量に基づく分画を行った。その結果、特定の画分への活性の集約は見られず、活性が分散したことより、CCK 産生細胞は混在する遊離アミノ酸や、特定の分子量のペプチドだけを認識するのではないことが示された。多様なペプチドの構造を広く認識する機構の存在が考えられた。
- (6) 食品タンパク質、食品ペプチドに加え、我々はある種のアルデヒドが STC-1 細胞からの CCK 分泌を強く刺激することを見いだした。鎖長や飽和度の異なるアルデヒド間で比較したところ、短～中鎖の 2 価不飽和アルデヒドが強い作用を持つことが明らかとなった。アルデヒドが TRPA1 を活性化するという報告を参考に、TRPA1 の関与を検討したところ、このアルデヒドによる CCK 分泌促進において細胞内カルシウムシグナルならびに TRPA1 が関与することが新たに見いだされた。このことから、TRPA1 は、消化管内分泌細胞において食品タンパク質、ペプチド、アルデヒドなど様々な食事因子を受容する分子として機能することが示唆された。
- (7) また、ラットにおいてアルデヒドを経口投与することで食品ペプチドの経口投与と同様に胃排出が抑制される結果が得られた。胃排出の抑制は CCK の代表的生理作用の一つであり、消化管組織においても TRPA1 の活性化が寄与する可能性が考えられた。

(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4件)

- Nakajima S, Hira T, Yahagi A, Nishiyama C, Yamashita T, Imagi J, Hara H. (2014) Unsaturated aldehydes induce CCK secretion via TRPA1 in STC-1 cells. *Mol Nutr Food Res.* 58(5):1042-51. doi: 10.1002/mnfr.201300412. 査読有り
- Higuchi N, Hira T, Yamada N, Hara H (2013) Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology.* 154(9):3089-98.
- Chen W, Hira T, Nakajima S, Tomozawa H, Tsubata M, Yamaguchi K, Hara H (2012) Suppressive effect on food intake of a potato extract (Potein®) involving cholecystokinin release in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76(6):1104-9. 査読有り
- Nakajima S, Hira T, Hara H (2012) Calcium-sensing receptor mediates dietary peptide-induced CCK secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Mol Nutr Food Res.* 56(5):753-60. doi: 10.1002/mnfr.201100666. 査読有り

[学会発表](計20件)

- 矢萩 明日香, 比良 徹, 西山 千草, 山下 貴稔, 今義 潤, 原 博「trans,trans-2,4-デカジエナールの経口投与によるラット胃排出遅延作用」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014/3/30、明治大学生田キャンパス (川崎市)
- 比良 徹「食品ペプチドの消化管での作用を介した血糖制御に関する研究」2013 年度日本アミノ酸学会 科学・技術賞受賞講演、日本アミノ酸学会、2013/11/2、熊本市医師会館 (熊本市)
- 山田 菜央, 比良 徹, 原 博「トウモロコシペプチドによる in vivo, invitro での GLP-1 分泌作用」日本アミノ酸学会、2013/11/2、熊本市医師会館 (熊本市)
- 矢萩 明日香, 比良 徹, 西山 千草, 山下 貴稔, 今義 潤, 原 博「ラットにおいて trans,trans-2,4-デカジエナールの経口投与は胃排出を抑制する」第 43 回 日本栄養・食糧学会北海道支部会、2013/10/26、北海道大学 (札幌市)
- Hara H; Nakajima S; Hira T, PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF SOYBEAN PEPTIDES, Diversity of physiological functions of amino acids and peptide, 20th International Congress of Nutrition (ICN2013), 2013/9/16, Granada Congress, Granada, Spain

佐藤 恵理、比良 徹、満永 有美、中島 進吾、江藤 謙、原 博「ポリリジンはラット腸管において胃排出を遅延し、血糖値上昇を抑制する」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013/5/25、名古屋大学(名古屋市) 比良 徹、樋口 謹行、原 博「ラットにおいてトウモロコシペプチドの経口投与が、インクレチン分泌促進を介して血糖上昇を抑制する」第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013/5/16、テトリア熊本ビル(熊本市)

T. Hira, M. Muramatsu, A. Mitsunaga, E. Sato, S. Nakajima, Y. Kitahara, Y. Eto and H. Hara. Activation of gut calcium-sensing receptor by peptide agonists promotes glucose tolerance in rats. Experimental Biology 2013, 2013/4/23, Boston Convention & Exhibition Center, Boston (US)

中島 進吾、比良 徹、西山 千草、山下 貴俊、今義 潤、原 博「消化管内分泌細胞株において不飽和アルデヒドは TRPA1 を介して CCK 分泌を誘導する」日本農芸化学会 2013 年度大会、2013/3/27、東北大学(仙台)

比良 徹、満永 有美、佐藤 恵理、中島 進吾、江藤 謙、原 博「ラットにおいて、ポリリジンの経口投与は胃排出を遅延して血糖上昇を抑制する」第 33 回日本肥満学会、2012/10/12、ホテルグランヴィア京都(京都)

後藤 健仁、比良 徹、中島 進吾、原 博「消化管内分泌細胞におけるカゼインによる CCK 分泌機構の解析」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3/24、京都女子大学(京都)

中島 進吾、比良 徹、原 博「異なる分子量の食品ペプチドがカルシウム感知受容体を介した Cholecystokinin 分泌を誘導する」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3/24、京都女子大学(京都)

Wenya Chen, Tohru Hira, Hiroshi Hara. Wheat gluten hydrolysate induces PYY secretion and suppresses food intake in rats. 日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3/24、京都女子大学(京都)

Wenya Chen, Shingo Nakajima, Tohru Hira, Rika Nagamine, Hiroshi Tomozawa, Kinya Takagaki, Hiroshi Hara. Potato extract (Potein) suppresses food intake via CCK release in rats. 2011 The International Conference on Food Factors, 2011/11/21, Taipei International Convention Center, 台北(台湾)

Tohru Hira, Maya Muramatsu, Yusuru Eto, Hiroshi Hara. Oral and duodenal administration of calcium-sensing receptor antagonists improve glucose tolerance in rats. 2011 The International Conference on Food

Factors, 2011/11/21, Taipei International Convention Center, 台北(台湾)

Wenya Chen, Tohru Hira, Hiroshi Hara. Oral preload of a grain peptone enhances PYY secretion and suppresses food intake in rats. International Society for Nutraceuticals and Functional Foods 2011, 2011/11/14-15, ロイトン札幌ホテル(札幌市)

須田 和希、比良 徹、原 博「ビール酵母抽出物中の CCK 分泌促進ペプチドの探索」日本アミノ酸学会第 5 回学術大会。2011/11/4、名古屋大学シンポジオン(名古屋市)

比良 徹、村松 茉耶、江藤 謙、原 博「Calcium-sensing receptor アゴニストによる血糖上昇抑制とその作用機構の解明」第 32 回日本肥満学会、2011/9/23、淡路夢舞台国際会議場(淡路市)

中島 進吾、比良 徹、Sufian Kaosar、江藤 謙、原 博「Calcium-sensing receptor は CCK 産生細胞における食品ペプチド受容体として多様なペプチドを認識する」第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011/5/15、お茶の水女子大学(東京)

須田 和希、比良 徹、KAOSAR SUFIAN、原 博「ビール酵母抽出物中の CCK 分泌促進ペプチドの探索とラットでの食欲抑制作用」第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011/5/15、お茶の水女子大学(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/shokuei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比良 徹(HIRA, Tohru)
北海道大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号： 1 0 3 9 6 3 0 1