

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：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780127

研究課題名（和文） 抗肥満性胆汁酸受容体を活性化する新規食品成分の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of novel food factors which activate anti-obese receptor for bile acids

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：TGR5 は胆汁酸をリガンドとする G タンパク質共役受容体であり、その活性化は抗肥満・抗糖尿病効果を示すことが知られている。本研究では、TGR5 を活性化する食品成分のスクリーニングを行い、ノミリンを含む複数の食品成分を同定した。動物実験の結果から、ノミリンは肥満や耐糖能異常を改善する事を明らかにした。また、TGR5 を活性化する他の成分（成分 A）に関しても、高脂肪食による体重増加を抑制する効果がある事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：TGR5 is a member of G protein-coupled receptor which is activated by bile acids, and has been reported its anti-obese and anti-diabetic effects. The screening experiments using food factor library identified some food factors, including nomilin, activate TGR5. From animal studies, we found that nomilin improved high fat diet-induced obesity and hyperglycemia, suggesting nomilin may contribute to an improvement of metabolic syndrome. We also found that another food factor (factor A), which activates TGR5, decreased body weight gain by high fat diet.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：TGR5、胆汁酸、肥満、機能性食品

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は食習慣の欧米化に伴うエネルギーの過剰摂取や運動不足などの環境因子が主な原因である。従って、抗肥満・抗糖尿病効果を示す機能性食品成分の探索・解析は、生活習慣病の予防・改善に大きく貢献する事が期待される。

TGR5 は胆汁酸などのリガンドにより活性化される G タンパク質共役型受容体（G protein-coupled receptor、以下 GPCR）である。TGR5 は、褐色脂肪組織（げっ歯類）や筋肉組織（ヒト）、及び小腸で機能している事が知られている。胆汁酸などのリガンドによ

り TGR5 が活性化されると、細胞内の cAMP が増加し、PKA 経路が活性化される。その結果、褐色脂肪組織及び筋肉組織では甲状腺ホルモン経路を介したエネルギー消費が亢進し、小腸では GLP-1 の分泌を促進する事が報告されている（Watanabe et al. 2006. Nature. 439. 484, Thomas et al. 2009. Cell Metab. 10. 167）。GLP-1 は小腸から分泌されるインクレチンであり、膵臓におけるインスリン分泌の促進、膵β細胞の機能維持などの効果や、糖尿病患者でのインスリン感受性の改善などの効果が報告されている。また、ヒトでは筋肉組織で TGR5 が高発現している。体を構成

要素の中で筋肉組織は主要であり、TGR5 を介したエネルギー消費亢進の顕著な効果が期待される。以上の事から、TGR5 を活性化する食品成分の探索・解析は生活習慣病の改善に大きく貢献する事が期待される。

2. 研究の目的

これまで申請者らは HEK293 細胞を用いた TGR5 の評価方法を確立し、約 250 種の食品成分ライブラリーを用いたスクリーニング実験を行った。その結果、TGR5 を活性化する複数の新規食品成分を同定した。本研究では次に示す項目を検討し、TGR5 活性化を介した抗肥満作用を持つ機能性食品成分の同定を目指す。

(1) 同定した食品成分が内在性 TGR5 を活性化するか、TGR5 が発現している褐色脂肪細胞等を用いて検討する。

(2) 肥満モデルマウスを用いて、これらの食品成分が個体レベルで抗肥満・抗糖尿病効果を示すか検討する。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングでは、HEK293 細胞に外来的に TGR5 を発現させた人工的な系を用いた。そのため、内在性 TGR5 に対する食品成分の作用を検討するため、TGR5 が機能する褐色脂肪組織由来の組織培養細胞を用いた実験を行う。実験に使用する細胞に関しては、p53 欠損マウスの肩甲間褐色脂肪由来の株化細胞 HB2 細胞を齊藤昌之教授（天使大学）より供与して頂いた。この細胞に同定した食品成分を処理し、TGR5 標的遺伝子の発現解析を行う。以上の解析により、内在性の TGR5 に対し活性を有する食品成分を同定する。

(2) 個体レベルでの TGR5 の活性化は抗肥満・抗糖尿病作用に繋がる事が報告されている (Watanabe et al. 2006. Nature. 439. 484, Thomas et al. 2009. Cell Metab. 10. 167)。この事から、TGR5 を活性化する食品成分に関して、個体レベルで抗肥満作用があるかを検討する。高脂肪食、もしくは高脂肪食に TGR5 を活性化する食品成分を含む食事をマウスに与え、体重や血糖値など様々な代謝パラメーター、そして TGR5 が発現・機能する組織での機能解析を行う。また、食品成分は味覚を刺激する場合があります。従って摂食量が変動する可能性がある。従って摂食量を常時記録し、必要に応じて pair-feeding を行う。以上の実験により、同定した食品成分が個体レベルで抗肥満・抗糖尿病効果を示すか検討する。

4. 研究成果

(1) TGR5 を活性化する新規食品成分ノミリン
食品成分ライブラリーを用いたスクリーニングより、TGR5 を活性化する複数の食品成分を同定した。その中で、申請者らは特にノミリンに注目した (図 1)。

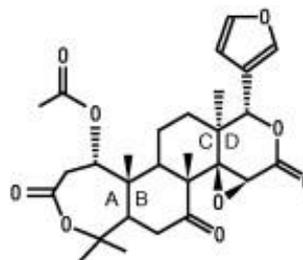


図 1 ノミリンの構造

ノミリンは柑橘類に含まれる苦味成分であり、これまで TGR5 活性化能に関する報告はない。さらにルシフェラーゼアッセイの結果から、ノミリンは既知の TGR5 リガンドである胆汁酸 (CDCA : ケノデオキシコール酸) と同程度に TGR5 を強力に活性化することが示された (図 2)。これらの結果から、ノミリンに関して更に解析を進めた。

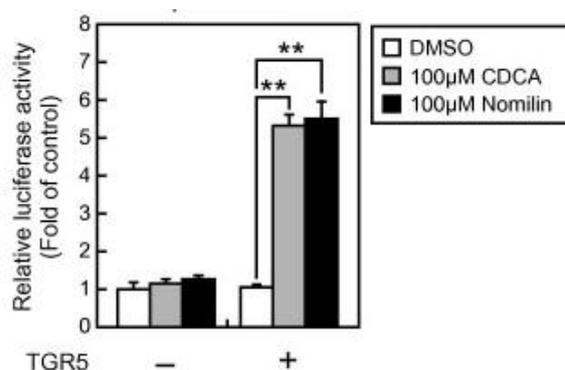


図 2 ノミリンによる TGR5 活性化

胆汁酸は、TGR5 以外に核内受容体 FXR を活性化することが知られている。ノミリンが FXR を活性化するか検討するため、酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域と FXR のリガンド結合領域の融合タンパク質 (GAL4-FXR) を用いた実験を行った。その結果、胆汁酸 (CDCA) は FXR を活性化したが、ノミリンによる活性化は見られなかった (図 3)。この結果から、ノミリンは TGR5 選択的な活性化剤である事が示された。

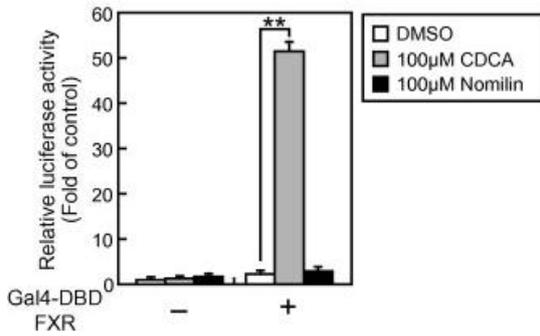


図3 GAL4-FXR を用いた FXR 活性化能の検討

(2) 褐色脂肪細胞でのノミリンによる内在性 TGR5 の活性化

TGR5 は褐色脂肪組織に発現・機能していることが知られている。このことから、培養細胞を用いて褐色脂肪細胞でのノミリンによる内在性 TGR5 の活性化能を検討した。褐色脂肪細胞のモデルとして、p53 欠損マウスの肩甲骨間褐色脂肪由来の株化細胞 HB2 を用いた。HB2 細胞を褐色脂肪細胞へ分化させた後にノミリン処理を行い、mRNA を回収した。リアルタイム PCR による解析の結果、TGR5 の標的遺伝子である Dio(deiodinase)-2 の発現増加が認められた。この結果から、ノミリンは内在性の TGR5 に対してもリガンド活性がある事が示された。一方、TGR5 は小腸においてインスリン分泌や血糖値の低下を促すインクレチン GLP-1 の分泌を亢進することが知られている。GLP-1 の分泌実験で繁用されている STC-1 細胞を用いた実験を試みたが、GLP-1 濃度の定量性などの問題のため期間内で結果を得られなかった。今後、実験方法の改善を行い、ノミリンによる TGR5 を介した GLP-1 分泌の亢進能について検討する予定である。

(3) ノミリンによる抗肥満効果及び耐糖能の改善作用

TGR5 の活性化は抗肥満、抗糖尿病効果に繋がることが報告されている (Watanabe et al. 2006. Nature. 439. 484, Thomas et al. 2009. Cell Metab. 10. 167)。このことから、ノミリンが抗肥満・抗糖尿病効果を有するか検討するため、高脂肪食負荷マウスを用いた実験を行った。野生型マウスに高脂肪食 (HF)、または高脂肪食に 0.2%のノミリンを含む食事 (HF + Nomilin) を 11 週間与えた。ノミリンは苦味成分であるため、pair-feeding により両群の摂食量を調整した。この実験の結果、ノミリン群において、投与開始後 64 日目より体重の有意な減少が確認された (図 4)。この事より、ノミリンは抗肥満効果を有することが示された。

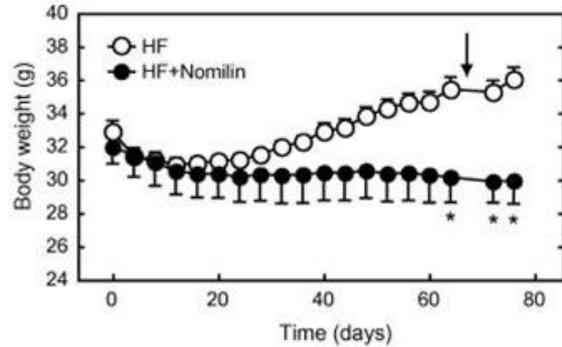


図4 ノミリンの抗肥満効果

また投与開始から 66 日目 (図 4 の矢印で表示) に、経口グルコース負荷試験を用いて耐糖能試験を行った。その結果、高脂肪食群 (HF) と比較してノミリン群 (HF + Nomilin) においてグルコース負荷後の血糖値の有意な低下が見られた (図 5)。この結果より、ノミリンは高脂肪食摂取時における耐糖能異常の改善効果を有する事が示された。

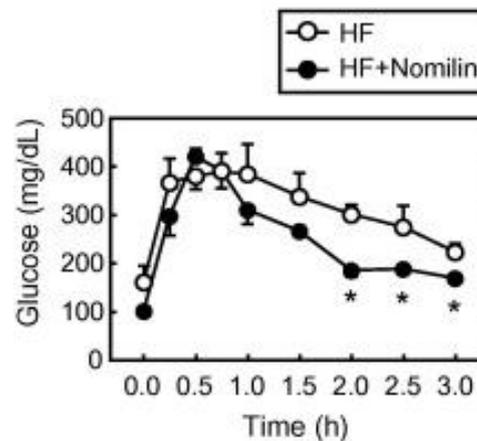


図5 ノミリンによる耐糖能改善効果

この他に、ノミリン群において、血中インスリン、血中トリグリセリド、血中遊離脂肪酸、内臓脂肪重量の低下が確認された。

これらノミリンによる様々な効果の作用機序の解明のため、TGR5 が機能する褐色脂肪組織の解析を行った。リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析を行ったが、TGR5 の標的である Dio-2 や PGC-1 α などの発現の変動は認められた。

以上の結果より、ノミリンは高脂肪食摂取時における抗肥満効果、及び耐糖能の改善効果を有することが示された。今後は、血中 GLP-1 量の検討や他の組織 (肝臓、筋肉、白色脂肪組織など) の遺伝子発現解析により、ノミリンの作用機序を解明する予定である。

(4) TGR5 を活性化する新たな食品成分の同定ノミリン以外の TGR5 活性化成分を同定するため、新たに植物成分ライブラリーを加えスクリーニングを行った。この結果、TGR5 を活性化する複数の植物成分の同定に成功した。スクリーニングより同定した食品成分の中で、TGR5 を特に強く活性化した食品成分(成分 A; 投稿論文準備中)に注目した。ルシフェラーゼアッセイを用いた実験結果より、成分 A は既知の TGR5 リガンドである胆汁酸 (CDCA) と同程度に TGR5 を活性化した。また、成分 A は胆汁酸をリガンドとする核内受容体 FXR には作用せず、TGR5 選択的な活性化剤であることが示された。

TGR5 は褐色脂肪組織で熱産生や脂肪分解を活性化することから、マウス初代褐色脂肪細胞を用いた実験を行った。リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析の結果、成分 A の添加により TGR5 の標的遺伝子である Dio-2 の発現増加が認められた。さらに高脂肪食付加マウスを用いた実験から、成分 A は高脂肪食による体重増加量を抑制する事が示された。様々な代謝パラメーターを解析した結果、成分 A の投与により内臓脂肪量が低下する事が示された。一方、成分 A による血糖値の変動は認められなかった。これらの結果から、成分 A は抗肥満効果を有する事が示された。以上の実験結果から、成分 A は TGR5 を活性化する新たな植物成分であり、抗肥満効果を有する事が示された。今後、各組織における遺伝子発現解析などを行い、成分 A の作用機序を明らかにする予定である。

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 1 件)

(1) Ono E, Inoue J, Hashidume T, Shimizu M, Sato R, Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.410, No.3, 2011, pp.677-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.055.

〔学会発表〕(計 1 件)

①清水 誠：“TGR5 を活性化する新規化合物の機能解析” 第 67 回日本栄養・食糧学会、20130525)、名古屋大学(愛知県)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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