

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292068

研究課題名(和文) 消化管における味覚関連遺伝子発現細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of cells expressing taste-related genes in the gastrointestinal tract

研究代表者

石丸 喜朗 (ISHIMARU, YOSHIRO)

東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10451840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：小腸上皮細胞の約0.4%を占める刷子細胞の分化機構と細胞機能は不明であった。本研究では、以前我々のグループが味蕾の甘味、苦味、うま味細胞への運命決定を司ることを報告した転写因子Skn-1aが、小腸刷子細胞の分化も制御していることを明らかにした。Skn-1欠損マウスは野生型マウスと比べて、摂餌量には差がなかったが、カテコールアミン分泌量の増大によって消費エネルギーが増加したために、低体重・低体脂肪を示した。以上より、腸脳軸を介した新しい生体恒常性維持機構の存在が示唆された。今後、これらの細胞に作用する食品由来因子を探すことによって、肥満や糖尿病の新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of differentiation and the function of tuft cells, which constitute about 0.4% of the intestinal epithelium, remain elusive. Here we show that both tuft cells and type II taste cells are eliminated in the gastrointestinal (GI) tract of transcription factor Skn-1 knockout (KO) mice. Despite unaltered food intake, Skn-1 KO mice have reduced body weight with lower body fat due to increased energy expenditure. In this model, 24-hr urinary excretion of catecholamines was significantly elevated, accompanied by increased fatty acid beta-oxidation and fuel dissipation in skeletal muscle and impaired insulin secretion driven by glucose. These results suggest the existence of brain-mediated energy homeostatic pathways originating from tuft cells and type II taste cells in the GI tract and ending in peripheral tissues, including the adrenal glands. The discovery of food-derived factors that regulate these cells may open new avenues for the treatment of obesity and diabetes.

研究分野：食品科学

キーワード：受容体 消化管 代謝 栄養素 遺伝子破壊マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物は、食物の栄養価(糖、アミノ酸含量)、毒性(苦味強度)、塩濃度、酸性度(腐敗度)を評価するために味覚系を利用している。口腔内に取り込まれた食物は、主に舌上皮に存在する味蕾という組織でまず受容される。近年、味蕾における味覚受容の分子機構に関しては、受容体からその下流のシグナル伝達因子など、多くの知見が得られた。一方、甘味、苦味、うま味受容体(T1RsとT2Rs)と下流シグナル伝達因子(*gustducin*, *Trpm5*, *PLC-2*)は、味蕾だけでなく、気道、胃、小腸、膵臓、肝臓、腎臓、精巣、脳など様々な組織においても発現している。しかし、味蕾以外の組織における味覚関連遺伝子の機能については、消化管の内分泌細胞に関する報告などはあったが、大部分は依然として未解明のままであった。

小腸上皮には主に、吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞という4種類の細胞が存在する。これらの細胞以外にも、小腸上皮細胞の約0.4%を占める刷子細胞が存在するが、その細胞機能は不明であった。細胞系譜に関しては、幹細胞から上述した主要な4種類の細胞への分化を制御する転写因子群が同定されていたが、刷子細胞へ分化誘導する転写因子は明らかにされていなかった。

我々の研究室は、転写因子 *Skn-1a* (*Pou2f3*) 欠損マウスの味蕾では、甘・苦・うま味細胞が消失し、代わりに酸味細胞に置き換わっていることを報告した(Matsumoto *et al.*, *Nature Neurosci.* (2011))。つまり、*Skn-1a* は甘・苦・うま味細胞への運命決定に必須の転写因子である。研究代表者は、胃や小腸においても味覚関連遺伝子が発現することから、*Skn-1a* が味蕾同様に、胃や小腸に存在する細胞の分化も制御する可能性を検証した。

2. 研究の目的

本研究課題は、(1)*Skn-1a* が刷子細胞へ分化誘導する転写因子として働くか、(2)*Skn-1* 欠損マウスを用いて、機能未知である刷子細胞が果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Skn-1 欠損マウスの表現型を、以下に示す様々な手法を用いて解析した。

(1)組織学的な表現型解析

Skn-1 欠損マウスの消化管(胃・小腸)において、刷子細胞が消失しているかを組織学的な解析から検証した。*in situ* hybridization(ISH)法、免疫染色法、RT-PCR法を用いて、野生型マウスと*Skn-1*欠損マウス間で、胃と小腸(十二指腸、空腸、回腸)における味覚関連遺伝子(T1Rs、T2Rs、*gustducin*、G13、*Trpm5*、*PLC-2*)、刷子細胞マーカー(*Dclk1* やサイトケラチン18)、内分泌細胞マーカー(*ChgA*)、L細胞マーカー(*GLP-1*)、K細胞マーカー(*GIP*)、*Skn-1a* の

発現を比較解析した。また、二重ISH法や二重免疫染色法を用いて、これらの遺伝子間の発現相関関係を詳細に調べた。

(2)解剖学的な表現型解析

Skn-1 欠損ヘテロマウス同士を交配した同腹仔を普通食・高脂肪食摂取条件下で飼育し、出生直後、および、3週齢から16週齢まで週に一回体重を測定した。飼育期間終了後に、白色脂肪組織や肝臓など各組織の湿重量を測定した。

(3)行動学的な表現型解析

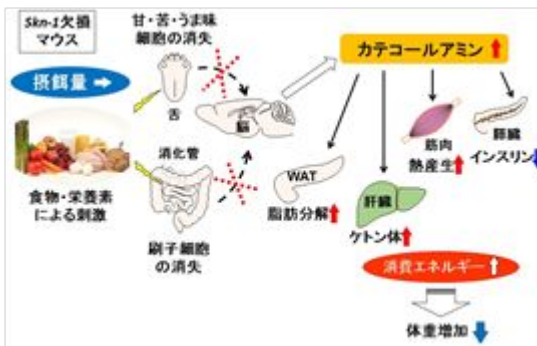
Skn-1 欠損ヘテロマウス同士を交配した同腹仔を用いて、経口グルコース負荷試験を行った。また、ELISA法を用いて、血漿インスリン濃度、血漿GIP濃度、血漿GLP-1濃度を経時的に測定した。摂餌量と、代謝測定システムを用いて消費エネルギーと呼吸商を測定した。24時間における尿中カテコールアミン分泌量を測定した。

4. 研究成果

まず、*Skn-1a* が味蕾同様に、消化管(胃・小腸)に存在する特定の細胞の分化も制御する可能性を検証した。*in situ* hybridization法などを用いて発現解析を行った結果、*Skn-1a* は消化管刷子細胞に発現しており、*Skn-1* 欠損マウスでは消化管刷子細胞も完全に消失していた。つまり、転写因子 *Skn-1a* は消化管刷子細胞の分化も制御していることが示された。

食品に含まれる味物質などの化合物は、口腔や消化管に存在する細胞によって受容される。この情報は、求心性神経や液性因子(ホルモン、神経ペプチド等)を介して脳に到達・認知され、摂食行動やエネルギー代謝が制御される。次に、消化管刷子細胞と甘・苦・うま味細胞の消失が摂食行動やエネルギー代謝に与える影響を調べた。興味深いことに、*Skn-1* 欠損マウスは野生型マウスに比べて、普通食・高脂肪食のいずれにおいても、離乳直後の3週齢から体脂肪の低下を伴う体重減少を示した。体重は摂取エネルギーと消費エネルギーのバランスで決まる。*Skn-1* 欠損マウスは摂餌量には差がなかったが、消費エネルギーが増加していた。消費エネルギーを上昇させるホルモンのうち、血清中甲状腺ホルモンに変化は見られなかったが、カテコールアミンの尿中分泌量が *Skn-1* 欠損マウスで有意に増加した。その結果、*Skn-1* 欠損マウスでは、血清中総ケトン体の上昇、腓腹筋ミトコンドリアのコピー数増加、脂肪分解の亢進、および、インスリン分泌量が低下していることが示された(Ushiyama *et al.*, *EBioMedicine* (2016))。

以上より、刷子細胞や味細胞を起点とし、脳を介して末梢組織(肝臓・筋肉・脂肪組織など)のエネルギー代謝を制御する新しい機構の存在が示唆された。今後、これらの細胞に作用する食品由来因子を探ることによって、肥満や糖尿病の新たな治療法の開発に繋



ることが期待される。

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 8 件)

Ushiana S, Ishimaru Y, Narukawa M, Yoshioka M, Kozuka C, Watanabe N, Tsunoda M, Osakabe N, Asakura T, Masuzaki H, Abe K, Catecholamines facilitate fuel expenditure and protect against obesity via a novel network of the gut-brain axis in transcription factor *Skn-1*-deficient mice、*EBioMedicine*、査読有、2016、印刷中
DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.04.031

Maeda N, Ohmoto M, Yamamoto K, Kurokawa A, Narukawa M, Ishimaru Y, Misaka T, Matsumoto I, Abe K, Expression of serotonin receptor genes in cranial ganglia、*Neurosci. Lett.*、査読有、617 巻、2016、46-51
DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.050

Ogi K, Yamashita H, Terada T, Homma R, Shimizu-Ibuka A, Yoshimura E, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Long-Chain Fatty Acids Elicit a Bitterness-Masking Effect on Quinine and Other Nitrogenous Bitter Substances by Formation of Insoluble Binary Complexes、*J. Agric. Food Chem.* 査読有、63 巻、2015、8493-8500
DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03193

Ishimaru Y、Molecular mechanisms underlying the reception and transmission of sour taste information、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*、査読有、79 巻、2015、171-176
DOI: 10.1080/09168451.2014.975187

Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Matsui A, Go Y, Ishimaru Y, Misaka T, Abe K, Hirai H, Satta Y, Imai H, Rapid Expansion of Phenylthiocarbamide Non-Tasters among Japanese Macaques、*PLoS One*、査読有、10 巻、2015、e0132016
DOI: 10.1371/journal.pone.0132016

Midorikawa K, Kuroda M, Terauchi K, Hoshi M, Ikenaga S, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Additional nitrogen

fertilization at heading time of rice down-regulates cellulose synthesis in seed endosperm、*PLoS One*、査読有、9 巻、2014、e98738

DOI: 10.1371/journal.pone.0098738

Hoshi M, Ohki Y, Ito K, Tomita T, Iwatsubo T, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Experimental detection of proteolytic activity in a signal peptide peptidase of *Arabidopsis thaliana*、*BMC Biochem.*、査読有、14 巻、2013、16
DOI: 10.1186/1471-2091-14-16

Toda Y, Nakagita T, Hayakawa T, Okada S, Narukawa M, Imai H, Ishimaru Y, Misaka T, Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor) 、*J. Biol. Chem.*、査読有、288 巻、2013、36863-36877
DOI: 10.1074/jbc.M113.494443

[学会発表](計 18 件)

Ishimaru Y, Ushiana S, Narukawa M, Yoshioka M, Kozuka C, Watanabe N, Osakabe N, Asakura T, Masuzaki H, Abe K, Loss of brush cells in the gastrointestinal tract alters energy metabolism in *Skn-1*-deficient mice、*ECRO 2015*、2015 年 9 月 2 日、トルコ・イスタンブール

石丸喜朗、牛尼翔太、成川真隆、吉岡美沙子、小塚智沙代、越阪部奈緒美、朝倉富子、益崎裕章、阿部啓子、転写因子 *Skn-1* 欠損マウスにおける腸脳軸ネットワークを介したカテコールアミンのエネルギー亢進・抗肥満作用、第 93 回日本生理学会、2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

谷下道大、吉岡美沙子、朝倉富子、阿部啓子、石丸喜朗、RNA-Seq 法を用いた小腸刷子細胞発現遺伝子の網羅的探索、日本農芸化学会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

Ishimaru Y, Yoshioka M, Asakura T, Abe K, Loss of gastrointestinal brush cells in *Skn-1*-deficient mice reduces insulin secretion、*Association for Chemoreception Sciences 36th Annual Meeting*、2014 年 4 月 11 日、アメリカ合衆国・ボニタスプリングス

Ishimaru Y, Yoshioka M, Asakura T, Abe K, Loss of gastrointestinal brush cells in *Skn-1*-deficient mice reduces insulin secretion、*The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception*、2014 年 11 月 2 日、九州大学(福岡)

吉岡美沙子、石丸喜朗、朝倉富子、阿部啓子、小腸刷子細胞の分化制御と機能の解明、日本農芸化学会、2014 年 3 月 29 日、明治大学(神奈川)

角田俊介、石丸喜朗、吉澤真人、吉岡美沙子、朝倉富子、阿部啓子、mRNA-Seq法を用いた味蕾特異的発現遺伝子の網羅的解析、日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学（神奈川）

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 喜朗 (ISHIMARU Yoshiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10451840

(2) 連携研究者

三坂 巧 (MISAKA Takumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40373196