

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07794

研究課題名(和文)新規作用機序を持つインクレチンシグナル制御食品分子の探索

研究課題名(英文) Screening of the food molecules to control incretin-signalin with novel mode of action

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、食品中分子がインクレチンシグナリングにどのような影響を与えるのかを明らかにする事を目指した。私はTGF $\beta$ -shedding assayを長鎖脂肪酸受容体GPR120に応用し定量性の高い活性化検出方法を確立した。本方法を用い、酵母の細胞膜に多く含まれるphosphatidylcholine (PHS)がGPR120の新規リガンドとなる事を見出した。さらに、黒茶(微生物発酵茶)に含まれるポリフェノールがGPR120の新規リガンドとなる事も見出している。これらの分子はどちらも微生物発酵により食品内で増加する。本研究による発見は発酵食品の新しい機能性を示すものと興味深い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPR120/インクレチンシグナリングは、元来、高エネルギー分子である脂肪酸の摂取に応答し、過剰なエネルギー摂取を抑制する為に、インスリンの分泌や食欲抑制といった生体応答を引き起こす。一方PHSは、小腸から吸収されずエネルギーとはなりにくい事が知られている。我々の発見は、ヒトが高エネルギー分子である脂肪酸を摂取せずに、非栄養成分であるPHSを介して抗肥満システムを惹起し、生体恒常性の維持/肥満・2型糖尿病の予防を行ってきた可能性を示している。これらが日本の伝統的な発酵食品中から見つかった事から、発酵食品の新たな食品機能性を示唆しており、社会的意義を持つ研究へ発展する事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate how the food molecules affect incretin signaling. I applied the TGF $\beta$ -shedding assay to the GPR120 and established a highly quantitative detection method. Using this method, we discovered that phosphatidylcholine (PHS), which is abundant in yeast cell membranes, is a novel ligand for GPR120. Additionally, we found that the polyphenols contained in black tea (microorganism fermented tea) could be new ligands for GPR120. Both of the molecules are increased in food by microbial fermentation. These studies are interesting, and show new food function of fermented foods.

研究分野：食品生化学、脂質生化学

キーワード：sphingolipid sphingoid base GPR120 incretin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴミエリン (SM) は細胞膜上に最も多く存在するスフィンゴ脂質で、コレステロールと共に、細胞膜脂質マイクロドメインの構成脂質となっている。この脂質マイクロドメインには、様々な受容体やシグナル伝達分子が集積し、「情報伝達の間」を形成している。私は、SM 合成酵素欠損マウスの解析を行う過程で、脂質マイクロドメイン上の受容体やシグナル伝達分子のいくつかは、その足場である SM の合成 / 代謝制御により時空間的に活性を制御されている可能性を報告した。SM 合成酵素には、ゴルジ体でバルクの SM 合成に関わる SMS1 と細胞膜に発現する SMS2 が存在する。私は SMS2 の遺伝子欠損が高脂肪食誘導性耐糖能異常を回避する事を報告した。その原因の一つが脂質マイクロドメインに発現する脂肪酸受容体 CD36/FAT の機能異常にある事を報告した。これらの事から、スフィンゴ脂質の代謝制御と耐糖能異常を含むメタボリックシンドロームに深い関係がある事が明らかになった。一方、近年、2 型糖尿病の分子標的薬として DPP4 阻害剤が注目されている。DPP4 阻害剤は、インクレチンの一つ GLP-1 の血中半減期を伸ばす薬剤である。小腸内分泌細胞上には食品由来分子に対する受容体が存在する。その一つである受容体 GPR120 は、長鎖脂肪酸に反応し GLP-1 の分泌を促す。GLP-1 は脳下垂体や膵細胞に作用し、インスリンの分泌や食欲抑制といった抗糖尿病 / 抗メタボリックシンドロームに働く。興味深い事にこの長鎖脂肪酸受容体 GPR120 も脂質マイクロドメイン上で働く事が知られている。私はスフィンゴ脂質の代謝制御とメタボリックシンドロームに GPR120 の働きがどの様に絡むのかに興味を持った。

### 2. 研究の目的

近年、柑橘に含まれるリモノイド類の中にスフィンゴミエリンの合成を阻害する分子が見出された。また、海藻に含まれるポリフェノールの中には、脂質マイクロドメイン上の SM に作用し、脂質マイクロドメイン上の Fc 受容体に影響を与える分子が報告された。この様に食品分子の中にも脂質マイクロドメインの制御を介して脂質マイクロドメイン上に存在する受容体の活性を変化させる分子の存在が明らかになってきた。本研究で私は、脂質マイクロドメインに存在する長鎖脂肪酸 GPR120 に着目して、食品成分を中心に (A) GPR120 活性評価系の確立と、細胞膜機能制御を介し長鎖脂肪酸 / GPR120 シグナリングを制御する食品分子の探索、(B) 長鎖脂肪酸 / GPR120 シグナリングを制御する分子の作用メカニズムの解明、を行なった。

### 3. 研究の方法

本研究では、食品中分子の中から、細胞膜機能を制御する分子を同定し、それがインクレチンシグナリングにどのような影響を与えるのか、分子レベル / 細胞レベルで明らかにしたい。その為に、まず長鎖脂肪酸受容体 GPR120 の活性検出方法を確立する必要がある。GPR120 は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に分類される。GPCR はゲノム創薬のターゲット分子となったおり、未だリガンドが同定されていない受容体 (orphan GPCR) が多数存在する。近年、井上らによって TGF の切断を指標にした orphan GPCR のリガンドスクリーニング方法が開発された。本研究では、この TGF の切断を指標にした TGF -shedding アッセイを GPR120 に応用し、高感度かつ定量性の高い GPR120 活性検出方法を確立した。

### 4. 研究成果

上述の様に、長鎖脂肪酸受容体 GPR120 は、小腸内分泌細胞に発現し GLP-1 の分泌に関与する事が知られている。GLP-1 は、インスリン分泌促進に加え、食欲抑制作用をもつ事から、その分解酵素阻害剤は 2 型糖尿病の改善薬となっている。本研究では、この GPR120 の活性化を orphan GPCR のリガンド探索法である TGF shedding assay を用いて検出する事を試みた。まず長鎖アルキルを持つ、脂質を中心に GPR120 への作用を検討した。その結果、スフィンゴイド塩基である phytosphingosine (PHS) が GPR120 の新規リガンドとなる事が明らかになった。興味深い事に 2 本の長鎖アルキルを持つグリセロール型リン脂質や、PHS と同じく 1 本の長鎖アルキルを持つリゾグリセロリン脂質は活性を示さなかった。スフィンゴイド塩基は動物種によって構造の異なる分子が存在する。その分子間での活性の違いを調べた結果、酵母の細胞膜に多く含まれる PHS と dihydrosphingosine、*Aspergillus oryzae* を含む真菌類に含まれる 9 位がメチル化された 9-met Sph が GPR120 を活性化した。一方、動物に多く見られる sphingosine (SPH) は GPR120 を活性化しなかった。また PHS と GPR120 の結合は GPR120 アンタゴニストによって阻害された。これらのことは、PHS は GPR120 に直接結合する事を示している。PHS と GPR120 の結合に関して、リノレン酸と GPR120 の結合と IC50 を求めて比較した結果ほぼ同等の強度で結合する事が明らかになった。これまで見出されて来た GPR120 リガンドの殆どは、カルボキシ基を持つ。近年、GPR120 と脂肪酸のドッキングシミュレーションが発表されたが、脂肪酸のカルボキシ基と GPR120 の 99 番目の Arg が水素結合を形成する可能性が示された。興味深い事に、PHS はカルボキシ基を持たず、このシミュレーションが適応できない結合様式をとっている可能性が高く、この点も非常に興味深い。

GPR120/GLP-1 シグナリングは、元来、高エネルギー分子である脂肪酸の摂取に応答し、過剰なエネルギー摂取を抑制する為の食のフィードバック機構として、インスリンの分泌や食欲抑制といった生体応答を引き起こす。一方 PHS は、多剤耐性トランスポーターMDR1 により速やかに排出され、小腸から吸収されずエネルギーとはなりにくい事が知られている。我々の発見は、ヒトが高エネルギー分子である脂肪酸を摂取せずに、非栄養成分である PHS を介して抗肥満システムを惹起し、生体恒常性の維持 / 肥満・2 型糖尿病の予防を行ってきた可能性を示している。

本研究では、微生物発酵茶に含まれるポリフェノールも GPR120 に作用する事が明らかになった（未発表）。本研究では、細胞膜に作用する食品分子の探索を試みたが、図らずも様々な構造を持つ食品分子が GPR120 を活性化する事が明らかになった。見出された分子は、発酵食品に含まれる物が多く、今回の研究は発酵食品の新しい食品機能の存在を示唆する物と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 S. Esaki, T. Nagasawa, H. Tanaka, A. Tomonaga, D. Mikami, S. Usuki, H. Hamajima, S. Sakai, Y. Hama, Y. Igarashi, H. Kitagaki, S. Mitsutake*	4. 巻 なし
2. 論文標題 The fungal 9-methylsphingadiene is a novel ligand for both PPAR $\gamma$ and GPR120	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Food Biochem.	6. 最初と最後の頁 e12624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.12624	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 M.M.M. Swamy, Y Murai, Y Ohno, K Jojima, A Kihara, S Mitsutake, Y Igarashi, J Yu, M Yao, Y Suga, M Anetai and K Monde	4. 巻 54
2. 論文標題 Structure-inspired design of a sphingolipid mimic sphingosine-1-phosphate receptor agonist from a naturally occurring sphingomyelin synthase inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 12758-12761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8cc05595e.	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 H. Hamamatsu, S. Mitsutake, S. Sakai, T. Okazaki, K. Watanabe, Y. Igarashi, K. Yuyama	4. 巻 7
2. 論文標題 Multiple roles of SMS2 in white and brown adipose tissues form diet-induced obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Metabolic Syndrome	6. 最初と最後の頁 241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/2167-0943.1000241	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 Nagasawa Tomotaka, Nakamichi Hikaru, Hama Yoichiro, Higashiyama Shigeki, Igarashi Yasuyuki, Mitsutake Susumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Phytosphingosine is a novel activator of GPR120	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy017	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 Zama Kota, Mitsutake Susumu, Okazaki Toshiro, Igarashi Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Sphingomyelin in microdomains of the plasma membrane regulates amino acid-stimulated mTOR signal activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.10941	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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Susumu Mitsutake
2. 発表標題 Dynamic modification of Sphingolipids Regulate Function of the Plasma Membrane
3. 学会等名 2017 International Conference Korean Society for Molecular and Cellular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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
---------	---------------------------	-----------------------	----