

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08529

研究課題名(和文)腸内細菌代謝産物による消化管ホルモン分泌調節メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of gastrointestinal hormone secretion by intestinal bacterial metabolites

研究代表者

坪井 貴司 (TSUBOI, Takashi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：80415231

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)：消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)は、小腸内分泌L細胞から分泌され、食餌由来成分や腸内細菌代謝産物により、分泌される。しかし、その詳細な制御機構は不明である。腸内細菌代謝産物の一種であるL-グルタミンを小腸内分泌L細胞に投与すると、GLP-1分泌が促進された。このL細胞には、味覚受容体の一種であるTAS1R3が発現していた。そこで、TAS1R3変異小腸内分泌L細胞を作成し、解析したところ、GLP-1分泌が抑制された。これらの結果から、TAS1R3が、L-グルタミンによるGLP-1分泌に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食餌由来成分である、糖、脂肪酸、アミノ酸によって小腸内分泌L細胞からグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)の分泌が促進されるが、その詳細な分泌促進分子機構は不明であった。本研究では、アミノ酸の中でもL-グルタミンによって起こるGLP-1分泌の促進が、うまみ受容体や甘味受容体を形成するTAS1R3によって制御されることを見出した。つまりL細胞は、消化管腔内のケミカルセンサーとして機能している可能性がある。この結果は、GLP-1分泌を促す機能性食品の開発などにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), a gastrointestinal hormone, is secreted from enteroendocrine L cells in the small intestine. GLP-1 secretion is induced by various luminal nutrients, including amino acids and intestinal bacterial metabolites. However, the underlying mechanisms of intestinal bacterial metabolites-induced GLP-1 secretion are not well characterized. We investigated the mechanisms underlying the L-glutamine, one of the intestinal bacterial metabolite, induced GLP-1 secretion. We found that taste receptor type 1 member 3 (TAS1R3) was expressed in the L cells. We generated TAS1R3 mutant L cells using the CRISPR/Cas9 system. TAS1R3 mutant L cells did not exhibit L-glutamine-induced GLP-1 secretion. Thus, these results suggest that TAS1R3 plays an important role in L-glutamine-induced GLP-1 secretion.

研究分野：分泌生理学

キーワード：開口分泌 イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類宿主とその腸内細菌叢との共生関係は、宿主のエネルギー摂取や認知機能などに大きく影響する。例えば、糖尿病や認知症、自閉スペクトラム症などは、腸内細菌叢の機能異常によって発症する例が報告されている(文献、)。さらに、肥満マウスと正常マウスとを比較すると腸内細菌叢の組成や代謝産物が異なっており、肥満マウスでは特定の腸内細菌と代謝産物が増加している(文献)。しかし、腸内細菌代謝産物が、どのようなメカニズムで糖尿病や認知症、自閉スペクトラム症などの疾患発症に関与しているのかは不明である。

消化管には、消化管ホルモン(グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(GIP)、セロトニン、グレリン等)を分泌する消化管内分泌細胞が散在する。例えば、小腸内分泌L細胞は、GLP-1を分泌する。このGLP-1は、膵細胞へ作用し、インスリン分泌を促進するだけでなく、迷走神経にも作用し、食欲を抑制する。つまりGLP-1は、血糖調節や摂食行動を制御する。

この小腸内分泌L細胞は、消化管管腔に面しており、食餌成分を感受し、GLP-1を分泌する。しかし、食餌成分と同様に消化管内に存在する腸内細菌代謝産物による消化管ホルモン分泌への影響については、検証されていなかった。

2. 研究の目的

腸内細菌代謝産物がどのようなメカニズムで消化管内分泌細胞からの消化管ホルモンの分泌を調節するのか、その分子メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病や認知症、自閉症との関連が指摘されている腸内細菌代謝産物(キヌレン酸、エチルフェニル硫酸など50種類)が報告されている。そこで、これら計50種類の腸内細菌代謝産物を腸内細菌代謝産物ライブラリーとして用いる。そして、小腸内分泌細胞株(GLUTag細胞やSTC-1細胞等)や急性単離小腸に腸内細菌代謝産物ライブラリーを投与した際の消化管ホルモン分泌能(GLP-1、GIP、グレリン、セロトニン等)への影響をELISAにより解析する。

(2) 細胞内セカンドメッセンジャー(Ca^{2+} 、cAMP、cGMP、ATPなど)の濃度測定を可能にした蛍光タンパク質型分子スパイプローブ(文献-)を小腸内分泌細胞株や急性単離小腸に遺伝子導入し、上記(1)の解析で見出した消化管ホルモン分泌機能へ影響を与える腸内細菌代謝産物の作用機序を、細胞イメージング解析によって同定する。

(3) 小腸内分泌細胞株(GLUTag細胞やSTC-1細胞等)や小腸から単離精製した消化管内分泌細胞を用いてmRNAを回収し、次世代シーケンシングシステム(Genome Analyzer, Illumina社)を用いて、網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析する(RNA sequencing解析(RNA-seq)、対象約300万リード)。そのうち、細胞内シグナル伝達や分泌に関与する遺伝子群に対するsiRNAライブラリーを設計して発現抑制を行う。上記(1)の解析で消化管ホルモン分泌機能への影響が確認された腸内細菌代謝産物を投与した際、発現抑制によって細胞内シグナル分子動態や分泌動態が変動するものを見つけ、腸内細菌代謝産物を感受する遺伝子候補とする。同時に、腸内細菌代謝産物を長期間投与した際の消化管ホルモン分泌調節に関与する遺伝子の発現変動も解析し、それらの遺伝子の過剰発現や発現抑制による細胞内シグナル分子動態や分泌動態の変化を解析する。これらの解析により、腸内細菌代謝産物に対する標的タンパク質と細胞内シグナル伝達経路を同定する。

4. 研究成果

(1) 小腸内分泌細胞株GLUTag細胞およびSTC-1細胞に腸内細菌代謝産物ライブラリーを投与した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化への影響を測定した。その結果、吉草酸、プロピオン酸、サルコシン、プロスタグランジンE2といった物質を含む合計30種類の腸内細菌代謝産物の投与によって細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察された。一方、インドール-3-アセトアミドやグルコン酸を含めた合計5種類の腸内細菌代謝産物で細胞内 Ca^{2+} 濃度低下が観察された。

そこで、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察された腸内細菌代謝産物を投与した際のGLP-1分泌への影響をELISAによって解析した。その結果、吉草酸、プロピオン酸、L-グルタミンなどを含めた合計6種類の腸内細菌代謝産物によってGLP-1分泌が誘発された。特にL-グルタミンは、最も強いGLP-1分泌促進効果があることが分かった。

一方、細胞内 Ca^{2+} 濃度低下が観察された腸内細菌代謝産物を投与した際のGLP-1分泌への影響も解析した。その結果、2種類の腸内細菌代謝産物によってGLP-1分泌が抑制されることが分かった。次に、ペプチドホルモンに蛍光タンパク質を融合させたプラスミドをGLUTag細胞へ遺伝子導入し、実際の生きた細胞からのGLP-1分泌動態のリアルタイムでの可視化解析を行った。全

反射蛍光顕微鏡を用いて、6種類の腸内細菌代謝物によって引き起こされる GLP-1 分泌反応の可視化解析を行ったところ、それぞれの腸内細菌代謝物によって分泌顆粒の開口放出動態が異なることが分かった。

(2) 次世代シーケンサーを用いて、小腸内分泌細胞株 GLUTag 細胞および STC-1 細胞に発現している各種受容体、チャネル、トランスポーター、ホルモン受容体の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、カルシウム感受性受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR)、アミノ酸受容体の一種である G protein-coupled receptor class C group 6 member A (GPCR6A)、うま味受容体を構成する taste receptor type 1 member 1 (TAS1R1) および member 3 (TAS1R3)、短鎖脂肪酸受容体、グルタミン受容体だけでなく、オキシトシン受容体やアドレナリン受容体も発現していた。

そこで、GLP-1 分泌を強力に増強した L-グルタミンの細胞内シグナル伝達機構について解析を行った。L-グルタミンをはじめとするアミノ酸を受容する受容体として、これまでの先行研究から、CaSR、GPCR6A、TAS1R1 および TAS1R3 のヘテロダイマーなどが示唆されていた。しかし、これらの受容体のうち、どの受容体が L-グルタミンの受容に関与し、どのような細胞内シグナル伝達に関与しているのかについて不明であった。

まず、GLUTag 細胞に L-グルタミンを投与し、カルシウム感受性蛍光色素 Fluo3 および緑色 cAMP センサーFlamindo2 (文献)を用いて細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) および細胞内 cAMP 濃度 ($[cAMP]_i$) の変化を可視化解析した。解析の結果、L-グルタミンの投与により $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ の両方が上昇した。しかしながら、L-グルタミン以外の L-アミノ酸を細胞に投与しても $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ の両方が上昇することはなかった。

次に、L-グルタミン投与により引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇に対する細胞外 Na^+ の影響について解析した。解析の結果、細胞外の Na^+ 濃度を低下させると、L-グルタミン依存的に起こる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制されたが、 $[cAMP]_i$ 上昇は抑制されなかった。この結果から、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、L-グルタミンがナトリウム-アミノ酸共輸送体によって細胞内に取り込まれる際、ナトリウムが細胞内に流入することで膜電位が脱分極し、電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内へカルシウムが流入する可能性が考えられた。

アミノ酸受容体の一種である CasR と GPCR6A が、L-グルタミン投与によって起こる $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇に関与しているか検討した。CasR と GPCR6A のアンタゴニストである NPS-2143 を GLUTag 細胞に L-グルタミンと共投与したが、 $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇を抑制しなかった。この結果から、L-グルタミン依存的に起こる $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇に CasR および GPCR6A は関与しないことが示唆された。

うま味受容体は、TAS1R1 と TAS1R3 のヘテロダイマーから構成されている。そこで、L-グルタミン依存的に起こる $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇に、このうま味受容体に関与しているかを検討した。そこでまず GLUTag 細胞細胞に、TAS1R3 の阻害剤である lactisole を投与した。その結果、lactisole の投与により、L-グルタミン依存的に起こる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に変化は見られなかったが、L-グルタミン依存的に起こる $[cAMP]_i$ 上昇は、有意に抑制された。

L-グルタミン依存的に起こる $[cAMP]_i$ 上昇に TAS1R3 が関与しているのかを明らかにするために、siRNA を用いて、TAS1R3 および、TAS1R3 とヘテロダイマーを形成する TAS1R1 の遺伝子ノックダウンを試みた。しかしながら、siRNA によって TAS1R3 と TAS1R1 遺伝子をノックダウンすることができなかった。そこで、CRISPR/Cas9 を用いて、遺伝子ノックダウンを試みた。具体的には、TAS1R3 と TAS1R1 の C 末端に変異を導入した、機能喪失変異 GLUTag 細胞を樹立した。樹立した TAS1R1 および TAS1R3 変異 GLUTag 細胞を用いて、L-グルタミン依存的に起こる GLP-1 分泌量を定量測定した。その結果、TAS1R3 変異 GLUTag 細胞では、有意に GLP-1 分泌が抑制されたが、TAS1R1 変異 GLUTag 細胞では遺伝子ノックダウンの影響は見られなかった。

次に、各変異 GLUTag 細胞の L-グルタミン依存的に起こる $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇について可視化解析を行った。解析の結果、TAS1R3 変異 GLUTag 細胞では、L-グルタミン投与による $[cAMP]_i$ 上昇が抑制された。一方、TAS1R1 変異 GLUTag 細胞では、L-グルタミン依存的に $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ 上昇が起こった。これらの結果から、L-グルタミン依存性 $[cAMP]_i$ 上昇において、TAS1R3 の関与が示唆された。

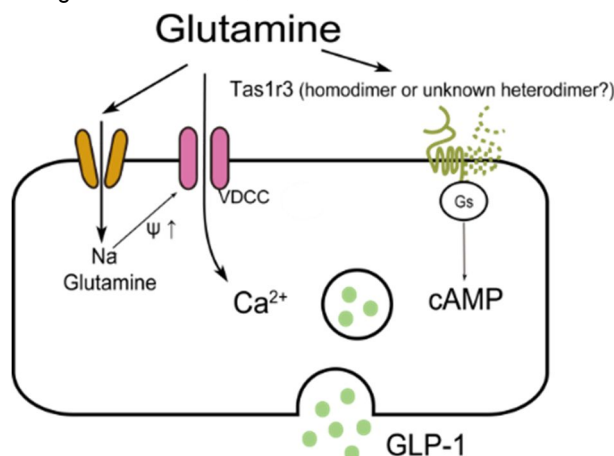


図 GLP-1 分泌促進機構モデル

以上の結果から、L-グルタミンによる GLP-1 分泌促進機構は、以下のように考えられる。それは、小腸内分泌細胞がナトリウム-アミノ酸共輸送体を介して細胞内に L-グルタミンを取り込み、膜が脱分極する。その結果、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こる。それと並行して、アデニル酸シクラーゼを活性化する G タンパク質と共役した TAS1R3 が L-グルタミンを感受し、活性化することで $[cAMP]_i$ 上昇が起こる。この $[Ca^{2+}]_i$ および $[cAMP]_i$ の同時上昇が、GLP-1 分泌を促進すると考えられる (図)。さらに、TAS1R3 は TAS1R1 とのヘテロダイマーだけでなく、TAS1R3 のホモダイマー、または TAS1R1 以外の G タンパク質共役型受容体とのヘテロダイマーを構成し、 $[cAMP]_i$ 上昇を引き起こす可能性が考えられる (文献)。

< 引用文献 >

- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Colin N Haile. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nature Medicine* 9, 1173-9, 2003.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262-7, 2012.
- Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 701-12, 2012
- Matsuda S, Harada K, Ito M, Takizawa M, Wongso D, Tsuboi T, Kitaguchi T. Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid linkers between a fluorescent protein and PDE5 . *ACS Sensors* 2, 46-57, 2017.
- Harada K, Ito M, Wang X, Tanaka M, Wongso D, Konno A, Hirai H, Hirase H, Tsuboi T, Kitaguchi T. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Scientific Reports* 7, 7351, 2017.
- Arai S, Kriszt R, Harada K, Looi LS, Matsuda S, Wongso D, Suo S, Ishiura S, Tseng YH, Raghunath M, Ito T, Tsuboi T, Kitaguchi T. RGB-color intensimetric indicators visualize spatiotemporal dynamics of ATP in single cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 57, 10873-10878, 2018
- Odaka H, Arai S, Inoue T, Kitaguchi T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One*, 9(6), e100252, 2014.
- Nakamura T, Harada K, Kamiya T, Takizawa M, Koppers J, Nakajima K, Gutschow M, Kitaguchi T, Ohta K, Kato T, Tsuboi T. Glutamine-induced signaling pathways via amino acid receptors in enteroendocrine L cell line. *Journal of Molecular Endocrinology*, 64, 133-143, 2020.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada Kazuki, Chihara Takami, Hayasaka Yuki, Mita Marie, Takizawa Mai, Ishida Kentaro, Arai Mary, Tsuno Saki, Matsumoto Mitsuharu, Ishihara Takeshi, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya, Tsuboi Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Green fluorescent protein-based lactate and pyruvate indicators suitable for biochemical assays and live cell imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76440-4	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 Nakamura Takumi, Harada Kazuki, Kamiya Taichi, Takizawa Mai, Kuppers Jim, Nakajima Kazuo, Gutschow Michael, Kitaguchi Tetsuya, Ohta Kunihiro, Kato Tadafumi, Tsuboi Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Glutamine-induced signaling pathways via amino acid receptors in enteroendocrine L cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-19-0260	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 該当する

1. 著者名 Harada Kazuki, Sakaguchi Hidekazu, Sada Shoko, Ishida Rika, Hayasaka Yuki, Tsuboi Takashi	4. 巻 500
2. 論文標題 Bitter tastant quinine modulates glucagon-like peptide-1 exocytosis from clonal GLUTag enteroendocrine L cells via actin reorganization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 723 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.143	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 Harada Kazuki, Sada Shoko, Sakaguchi Hidekazu, Takizawa Mai, Ishida Rika, Tsuboi Takashi	4. 巻 501
2. 論文標題 Bacterial metabolite S-equol modulates glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L cell line GLUTag cells via actin polymerization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1009 ~ 1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.100	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 Takizawa Mai、Harada Kazuki、Nakamura Kazuaki、Tsuboi Takashi	4. 巻 501
2. 論文標題 Transient receptor potential ankyrin 1 channels are involved in spontaneous peptide hormone release from astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 988 ~ 995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.097	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 坪井貴司
2. 発表標題 腸内環境感受による消化管ホルモン分泌調節機構
3. 学会等名 うま味研究会公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田一貴, 中村匠, 神谷泰智, 滝澤舞, 中島一夫, 北口哲也, 太田邦史, 坪井貴司
2. 発表標題 L-グルタミンによるアミノ酸受容体を介したグルカゴン様ペプチド-1分泌制御機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田一貴、阪口秀和、佐田尚子、坪井貴司
2. 発表標題 小腸内分泌L細胞に対する苦味物質および腸内細菌代謝産物の消化管ホルモン分泌への影響
3. 学会等名 第248回生理学東京談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Harada, Hidekazu Sakaguchi, Shoko Sada, Takashi Tsuboi
2. 発表標題 Bitter tastant and bacterial metabolite modulate glucagon-like peptide-1 secretion
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maoko Takashima, Kazuki Harada, Taichi Kamiya, Takashi Tsuboi
2. 発表標題 Molecular mechanisms of deoxycholic acid induced glucagon-like peptide-1 secretion
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	北口 哲也 (Kitaguchi Tetsuya) (60432374)	東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	University of Bonn		