

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05908

研究課題名(和文) 食品成分が標的とする体内の苦味受容体の役割を探る

研究課題名(英文) Study on the role of internal organ bitter taste receptor targeted by food derived compounds

研究代表者

加藤 英介 (KATO, EISUKE)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40466446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：苦味受容体は口腔以外の様々な組織でも機能している。本研究では、脂肪組織や筋肉、肝臓にも苦味受容体遺伝子が発現することを示した。また白色脂肪組織や各種のモデル細胞株の苦味受容体遺伝子発現が、外部刺激に反応して変動することを示し、これら組織や細胞株において苦味受容体が機能している可能性を示唆した。さらに、モデル細胞を用いた実験から脂肪細胞における苦味受容体の機能が細胞分化に関わることを示し、肝細胞における苦味受容体機能を推定するための基礎データを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の機能は、食品成分と体の相互作用から生じるが、その詳細は不明であることが多い。味覚受容体は食品成分の標的となる生体分子であるが、口の中以外での機能はあまり分かっていない。口腔外組織における苦味受容体の機能を解析することで、食品の機能の一端を分子レベルで詳細に明らかにすることが期待できる。本研究で得た成果は、今後の苦味受容体研究の基礎として有用であり、食品の機能性を利用した健康維持を前進させる基礎となると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bitter taste receptors function in various tissues. In this study, we show that bitter taste receptor genes are also expressed in adipose tissue, muscle, and liver. We also showed that bitter taste receptor gene expression in white adipose tissue and various model cell lines fluctuated in response to external stimuli, suggesting that bitter taste receptors may function in these tissues and cell lines. Furthermore, experiments using model cells showed that bitter taste receptor function in adipocytes is related to cell differentiation, and also obtained basal data for estimating bitter taste receptor function in hepatocytes.

研究分野：食品機能化学

キーワード：苦味受容体 苦味化合物 脂肪細胞 肝細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

苦味受容体 (Tas2R) は、毒性成分を感知するために発達したと考えられている味覚受容体の一種である。Tas2R が毒性成分の感知を目的として発達したと考えられているのは、この受容体により口腔で感知される苦味が一般的には忌避する味であり、また胃に発現する Tas2R が胃排出の遅延や胃酸の分泌に関わることなど、毒性成分の分解を促進していると推定されていることなどからである (Behrens and Meyerhof 2011; Liszt *et al.* 2017)。

一方で、『毒性成分の感知だけが本当に Tas2R の役割なのか?』というのが本研究課題の学術的「問い」である。例えば、苦味はヒトにとって好ましい味とされることもある。緑茶、紅茶などの茶類や、コーヒー、カカオなどには苦味成分が含まれるが、この苦味は食品の味として重要な要素である。また必須アミノ酸は苦味を示すことが古くから知られている (萩原清和, 調理化学 1980)。これらに加えて、毒性成分の忌避や分解には関与できない脂肪組織や胎盤のような体内臓器でも Tas2R は発現している (Ning *et al.* 2016; Wölfle *et al.* 2016)。また Tas2R はヒトで 25 種、マウスで 35 種と多数が同定されている。こうしたことから、口腔外組織、特に体内組織に発現する Tas2R は、毒性成分の感知以外の役割も担っていると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、体内の各組織細胞における Tas2R の機能を解析し、その新たな役割を提示することである。ただし、Tas2R に分類される受容体は多数あり、機能解析といっても様々な機能が考えられる。そこで、以下の Tas2R と機能を主な対象とした。

まず、多数の Tas2R のうち対象とするのは『食品中の苦味成分が標的とする』受容体とした。Tas2R は受容体であるため、化合物に対する特異性や選択性が存在する。食品成分は毒性が低いため、食品成分を感知する Tas2R は毒性成分の感知以外の役割を担っている可能性が高い。したがって、各種ポリフェノールや苦味を有する必須アミノ酸など、食品中の苦味成分が標的とする Tas2R を対象とすれば、新たな役割を見出す可能性は高くなると考えた。

次に、機能解析は栄養素の代謝に関連するものを候補とした。Tas2R には、腸分泌細胞からのグルカゴン様ペプチド - 1 の分泌を促進することや (Behrens and Meyerhof 2011)、糖代謝に関与すること (Dotson *et al.* 2008)、脂肪細胞の分化に関わるという報告がある (Ning *et al.* 2016)。したがって、Tas2R は栄養素を感知して代謝などに関わる可能性は高いと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 体内組織細胞に発現する *Tas2r* の解析

糖、脂質代謝にかかわる組織としてマウス (C57BL/6) の小腸、肝臓、脂肪、骨格筋より mRNA を抽出し、PCR 法を用いて *Tas2r105-144* の発現を解析した。また白色脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞、骨格筋のモデルである C2C12 細胞、肝臓のモデル細胞である NCTC1469 細胞についても同様に解析した。また各組織もしくはモデル細胞に苦味化合物を投与した際の *Tas2r* 発現変化についても RT-qPCR 法により解析した。

#### (2) モデル細胞株における Tas2r タンパク質の発現解析

Tas2r の部分配列を抗原として抗 Tas2r 抗体を作製し、3T3-L1 細胞および Hepa1-6 細胞における Tas2r タンパク質の発現をウェスタンブロットティングにより確認した。

#### (3) モデル細胞株への苦味化合物投与時の遺伝子発現解析の網羅的解析

3T3-L1 脂肪細胞に食品中の苦味成分を投与し、一定時間刺激後の遺伝子発現変化を RNA-seq 解析により網羅的に解析した。また Hepa1-6 細胞に Tas2r を過剰発現させ、この細胞を食品中の苦味成分を投与し、一定時間刺激後の遺伝子発現変化を RNA-seq 解析により網羅的に解析した。解析結果から苦味成分刺激が影響した細胞の機能を GO 解析などから抽出し、これが Tas2r を介した機能であると推定した。

#### (4) 3T3-L1 脂肪細胞における Tas2r 機能解析

Tas2r 過剰発現用のプラスミドベクターを作製し、3T3-L1 細胞にトランスフェクション後、薬剤により選抜して Tas2r を過剰発現させた細胞を作製した。これらの細胞を、分化誘導した後、脂肪蓄積量を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 体内組織細胞に発現する *Tas2r* の解析

C57BL/6J マウスの各組織より抽出した RNA を用いて、各組織における *Tas2r* 発現を解析したところ、白色脂肪組織では 11 種類、骨格筋では 8 種類、小腸では 8 種類、肝臓では 8 種類の *Tas2r* の発現が確認された。この際に複数個体のマウスから抽出した RNA を用いたが、個体ごとに若干の発現している *Tas2r* の違いがあり、生育環境などの因子が *Tas2r* 発現に影響していることが予想された。一方で、*Tas2r108*, *126*, *135*, *137*, *143* の 5 つについては、解析した全ての組織、全てのマウス個体で発現が見られ、これらは各組織において必要な何らかの機能を担っていると考えられた。また、3T3-L1 細胞、C2C12 細胞、NCTC1469 細胞においてもこれら 5 つの

Tas2r の発現がみられることも確認し、Tas2r 機能解析のためのモデル細胞として利用できることを明らかとした (表 1) (Kimura and Kato 2020)。

表 1 マウス各組織及びモデル細胞株での Tas2r 発現解析結果

Tas2r	Brown Adipose	White Adipose	Skeletal Muscle	Small Intestine	Liver	3T3-L1	C2C12	NCTC1469
102								
103								
104								
105								
106								
108	○	○	○	○	○	○	○	○
109				○	○			
110								
113		○						
115								
116								
118		○						
119		○		○				
120								
122								
123								
125								
126	○	○	○	○	○	○	○	○
130					○			
134	○		○					
135	○	○	○	○	○	○	○	○
137	○	○	○	○	○	○	○	○
138		○		○	○			
139						○		
140	○	○	○	○				
143	○	○	○	○	○	○	○	○
144		○	○	○				

○ : 2 個体以上に発現が見られた、○ : 1 個体にのみ発現が見られた

次に、苦味化合物の刺激により Tas2r 発現が変動するか確認した。白色脂肪組織について解析したところ、苦味化合物での刺激により一部の Tas2r 発現が上昇することが確認された。このような変動は 3T3-L1 細胞や NCTC1469 細胞でも見られ、こうした組織、細胞が Tas2r を介して苦味化合物を感知し、正のフィードバックを介して Tas2r の発現を変動させているのではないかと推定された。

続いて、抗 Tas2r 抗体を用いて、3T3-L1 細胞および肝細胞のモデルである Hepa1-6 細胞にタンパク質として Tas2r が発現しているか解析した。抗体は Tas2r135 については市販品を、残りは Tas2r の一部アミノ酸配列を抗原として作成したものをを用いた。ウェスタンブロッティングにより解析の結果、どちらの細胞株も一部の Tas2r をタンパク質として発現していることを示唆した。

## ( 2 ) モデル細胞株を用いた脂肪細胞および肝細胞における Tas2r 機能の推定

3T3-L1 細胞および Hepa1-6 細胞において Tas2r が発現し機能していることが推定されたため、その機能推定へと進展した。まず、3T3-L1 細胞を苦味化合物で刺激した際の遺伝子発現変化を分析し、遺伝子オントロジー・エンリッチメント解析によりどのような細胞機能が変化したかを解析したところ、脂肪細胞の分化に影響していることが推定された。つづいて、3T3-L1 細胞に Tas2r を過剰発現させることで、分化誘導に影響するかを確認したところ、Tas2r 過剰発現により分化誘導後の脂肪蓄積量が減少し、分化が抑制されている、もしくは分化後の脂肪蓄積が抑制されていることが示された。本研究とは別の Tas2r についても同様の結果を示した報告もあることから (Ning *et al.* 2016)、Tas2r は脂肪細胞の分化を制御しているのではないかと推定される。脂肪細胞の分化は、肥満とも関係が深く、分化阻害機能は抗肥満効果が期待されることもある。個体レベルでの機能解析でも類似の結果を得られれば、肥満の予防や解消ターゲットとして応用できる可能性がある。

次に Hepa1-6 細胞を、苦味化合物で刺激した際の遺伝子発現変化を分析し、遺伝子オントロジー・エンリッチメント解析によりどのような細胞機能が変化したかを解析した。変化を顕著にするため、プラスミドベクターを用いて Tas2r を過剰発現させた細胞に対して、苦味化合物を投与した際の遺伝子発現変化を解析した。網羅的解析結果を、IPA (Ingenuity® Pathway Analysis) 解析に付したところ、味覚伝達経路やカルシウムシグナル経路を含めた経路への影響が浮かび上がってきた (図 2)。今後これら経路について解析を行っていくことで肝臓のモデル細胞である Hepa1-6 細胞における Tas2r 機能を明らかにすることが期待される。

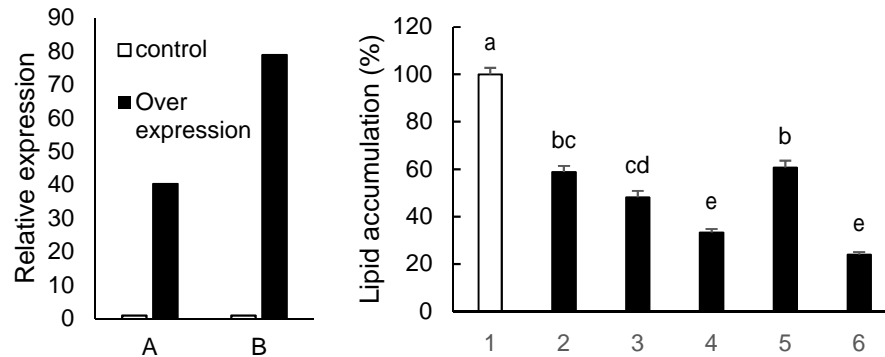


図1 Tas2r の過剰発現 (左) と過剰発現細胞の分化誘導後の脂肪蓄積量  
 左: A と B はそれぞれ別の Tas2r を過剰発現させている。右: 1 はコントロール細胞、2 は苦味化合物で刺激した細胞、3 と 5 は Tas2r 過剰発現細胞、4 と 6 は Tas2r 過剰発現細胞を苦味化合物で刺激した

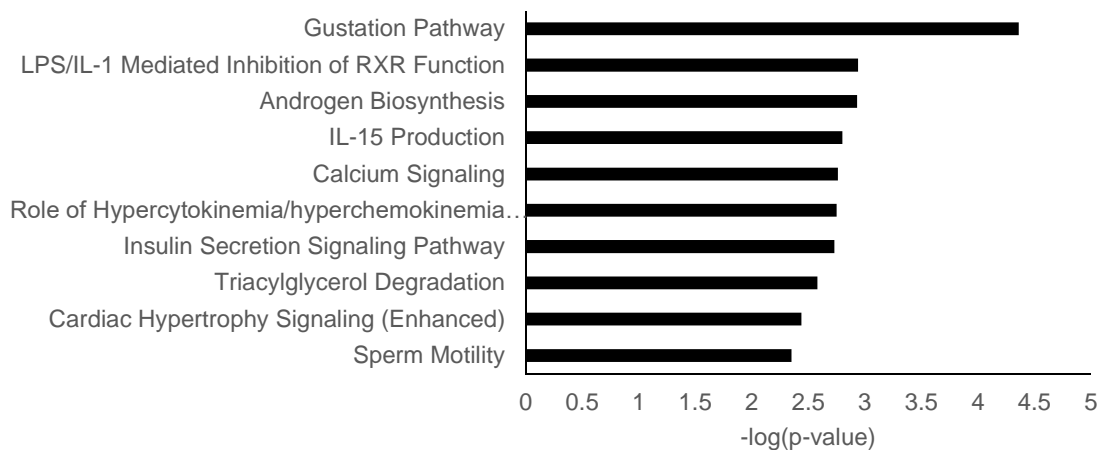


図2 苦味化合物で刺激した Tas2r 過剰発現 Hepa1-6 細胞の IPA 解析結果

#### 参考文献

- Behrens M, Meyerhof W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav* 2011;**105**:4-13.
- Dotson CD, Zhang L, Xu H *et al*. Bitter Taste Receptors Influence Glucose Homeostasis. *PLoS One* 2008;**3**:e3974.
- Kimura S, Kato E. TAS2R expression profile in brown adipose, white adipose, skeletal muscle, small intestine, liver and common cell lines derived from mice. *Gene Reports* 2020;**20**:100763.
- Liszt KI, Ley JP, Lieder B *et al*. Caffeine induces gastric acid secretion via bitter taste signaling in gastric parietal cells. *Proc Natl Acad Sci* 2017;**114**:E6260-9.
- Ning X, He J, Shi X *et al*. Regulation of Adipogenesis by Quinine through the ERK/S6 Pathway. *Int J Mol Sci* 2016;**17**:504.
- Wölfle U, Elsholz F, Kersten A *et al*. Expression and Functional Activity of the Human Bitter Taste Receptor TAS2R38 in Human Placental Tissues and JEG-3 Cells. *Molecules* 2016;**21**:306.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kimura Shunsuke, Kato Eisuke	4. 巻 20
2. 論文標題 TAS2R expression profile in brown adipose, white adipose, skeletal muscle, small intestine, liver and common cell lines derived from mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.genrep.2020.100763	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Eisuke Kato
2. 発表標題 Bioactivity and health effect of natural products Are there any relation with bitter taste?
3. 学会等名 The 6th International Conference on Food, Agriculture, and Natural Resources (FANRes) 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴間 あい、木村 駿介、加藤 英介
2. 発表標題 3T3-L1細胞における苦味受容体タンパク質発現解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 駿介、鶴間 あい、加藤 英介
2. 発表標題 脂肪細胞における苦味受容体（T2R）の遺伝子発現解析とその機能推定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 駿介、加藤 英介
2. 発表標題 マウス体内組織の苦味受容体発現解析
3. 学会等名 日本味と匂学会 第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 駿介, 森合 健太, 加藤 英介
2. 発表標題 体内組織と株化培養細胞における苦味受容体発現プロファイルの比較
3. 学会等名 日本農芸化学会 北海道支部第1回講演会
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

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