

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04121

研究課題名（和文）腸内細菌代謝物による消化管ホルモン分泌制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of incretin secretion by microbiota 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） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：認知症や自閉スペクトラム症、また糖尿病や肥満症との関連が指摘されている腸内細菌代謝物は、腸内分泌細胞からの消化管ホルモンの1つであるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の分泌を促すことが分かった。腸内細菌代謝物の中でも、L-フェニルアラニンとL-アルギニンは、GLP-1の分泌を強く増強した。一方、人工甘味料の1種であるスクラロースは、腸内分泌細胞の糖代謝に影響を与え、GLP-1分泌不全を引き起こす可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢が作り出す特定の代謝産物が、消化管内分泌細胞からの消化管ホルモン、特にグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の分泌を促すことを見出した。このGLP-1は、膵細胞からのインスリン分泌を増強するだけでなく、膵細胞の再生を促すことが報告されている。また、求心性迷走神経を介して摂食行動を抑制することも知られている。これらのことから、GLP-1分泌を促す腸内細菌代謝物は、糖尿病や肥満などの創薬標的となりうるだけでなく、症状改善のための機能性食品の開発にもつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Gut bacterial metabolites, which have been linked to dementia and autistic spectrum disorders as well as diabetes and obesity, were found to stimulate the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), a gastrointestinal hormone, from enteroendocrine cells. Among the gut bacterial metabolites, L-phenylalanine and L-arginine were found to be potent enhancers of GLP-1 secretion. On the other hand, sucralose, a type of artificial sweetener, was found to affect the glucose metabolism of enteroendocrine cells and may cause impaired GLP-1 secretion.

研究分野：生理学

キーワード：消化管ホルモン 腸内細菌 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

ヒトを含む哺乳類宿主と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を与える。例えば、肥満マウスに抗菌剤を投与し、腸内細菌叢の組成を人為的に変化させると、肥満や糖尿病の症状に改善が見られる。また、腸内細菌叢によって産生されるポリアミンの消化管腔内濃度を人為的に増加させると、認知機能が向上する。認知症や自閉スペクトラム症、さらには統合失調症などの精神疾患においても、腸内細菌叢の組成が変化しており、その組成を健常マウスのものを移植すると、それらの神経疾患症状が緩和されるという報告もある。しかし、腸内細菌叢や腸内細菌代謝産物が、どのような機構で肥満症や糖尿病、認知症や自閉スペクトラム症、さらには統合失調症などの精神疾患の症状を緩和するのか、その詳細な分子基盤については明らかになっていない。

腸内細菌叢やその代謝産物(腸内細菌代謝物)の影響を受けるのが、小腸や大腸などの消化管である。消化管の機能は、栄養素や水分の吸収、腸管粘膜免疫や消化管ホルモン分泌など多岐にわたる。消化管ホルモンには、このグルカゴン様ペプチド-1、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、コレシストキニン、セロトニンなどがある。これらの消化管ホルモンは、血糖調節といった代謝恒常性維持だけでなく、摂食行動へも影響を与える。例えば、小腸内分泌L細胞(L細胞)は、このグルカゴン様ペプチド-1を分泌する。グルカゴン様ペプチド-1は、膵細胞へ作用し、インスリン分泌を増強して血糖を調節する。さらにグルカゴン様ペプチド-1は、求心性迷走神経を介して、摂食行動を抑制する。しかし、腸内細菌叢や腸内細菌代謝物とグルカゴン様ペプチド-1分泌に与える影響については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌代謝物が消化管ホルモン、特にグルカゴン様ペプチド-1分泌機能の調節を介して代謝や脳機能へ影響を与える可能性についての検証と影響を与える腸内細菌代謝物の同定を目指した。また、消化管内分泌細胞の代謝活動に対する腸内細菌代謝物の影響を評価するため、グルコースや乳酸、さらにはピルビン酸の細胞内動態を可視化する蛍光タンパク質を基盤としたバイオセンサーの開発にも取り組んだ。また、セカンドメッセンジャーであるcGMPの細胞内動態を可視化する蛍光センサーの開発にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) グルカゴン様ペプチド-1の分泌へ影響を与える腸内細菌代謝産物の同定

野生型正常マウスと無菌マウスの腸内細菌代謝物を比較したところ、プロピオン酸やポリアミンなどを含む60種類の腸内細菌代謝産物が結腸および血中に有意に多く存在することを先行研究において見出していた。また、野生型正常マウスの腸内細菌代謝産物中には、D-アラニンやD-アルギニンなどの10種類のD-アミノ酸が無菌マウスと比較して豊富に存在することも先行研究において見出していた。そこでこれら合計70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こととした。この腸内細菌代謝産物ライブラリーを小腸内分泌細胞株(GLUTag細胞やSTC-1細胞等)や小腸から単離した小腸内分泌(急性単離小腸内分泌細胞)に投与し、その際のグルカゴン様ペプチド-1の分泌への影響を酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって解析した。

(2) 蛍光タンパク質を基盤とした乳酸、ピルビン酸、グルコース、cGMPセンサーの開発

緑色蛍光タンパク質GFPを基盤とした単色輝度変化型乳酸センサーおよびピルビン酸センサーは、発色団付近で分割した質GFPの間に乳酸結合ドメイン(LldR)またはピルビン酸結合ドメイン(PdhR)を融合することでプロトタイプを構築した。一方、赤色蛍光タンパク質(mApple)を基盤とした単色輝度変化型グルコースセンサーおよびcGMPセンサーは、発色団付近で分割したmAppleにグルコース結合ドメイン(MglB)またはcGMP結合ドメイン(PDE5)を融合することでプロトタイプを構築した。

(3) グルカゴン様ペプチド-1の分泌機能へ影響を与える腸内細菌代謝産物の作用機序の同定

小腸内分泌細胞株(GLUTag細胞やSTC-1細胞等)や急性単離小腸内分泌細胞からのグルカゴン様ペプチド-1の分泌機能へ影響を与えた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した。具体的には、細胞内Ca²⁺やcAMP、ATPに加え、本研究で新たに開発した乳酸、ピルビン酸、グルコース、cGMPの濃度変化を測定可能にした蛍光タンパク質を基盤としたセンサーを腸内分泌細胞株や急性単離小腸内分泌細胞に遺伝子導入して、生細胞イメージング解析を行った。

4. 研究成果

(1) グルカゴン様ペプチド-1分泌を促進する腸内細菌代謝産物の同定

小腸内分泌細胞株(GLUTag細胞やSTC-1細胞等)や急性単離小腸内分泌細胞に腸内細菌代謝

産物ライブラリーを投与したところ、70種類のうち11種類の腸内細菌代謝物の投与によってグルカゴン様ペプチド-1の分泌が増強された。そこで、これら腸内細菌代謝物をマウスの小腸に直接注入したところ、11種類のうち6種類(L-フェニルアラニンやL-アルギニンなどを含む)によってグルカゴン様ペプチド-1の分泌が誘導されることが分かった。一方で、これら11種類の腸内細菌代謝物をマウスの大腸に直接注入してもグルカゴン様ペプチド-1の分泌は誘導されなかった。これらのことから、11種類の腸内細菌代謝物は、小腸に存在する腸内分泌細胞に作用することが分かった。

(2) 腸内分泌細胞からのグルカゴン様ペプチド-1分泌の調節機構の解析

グルカゴン様ペプチド-1の分泌を促進した6種類の腸内細菌代謝産物のうち、特にグルカゴン様ペプチド-1の分泌を強く引き起こしたL-フェニルアラニンとL-アルギニンの作用機序を明らかにするために、細胞内 Ca^{2+} およびcAMP、そして細胞内ATP濃度変化を可視化できる蛍光タンパク質を基盤としたバイオセンサーを腸内分泌細胞株STC-1に遺伝子導入し、影響を受ける細胞内情報伝達経路を可視化解析した。

L-フェニルアラニンのSTC-1細胞への投与は、細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇を誘導した。一方で、細胞内cAMP濃度($[cAMP]_i$)や細胞内ATP濃度($[ATP]_i$)には、何ら変化が見られなかった。次に、L-フェニルアラニン受容体候補の1つであるGタンパク質共役型受容体142(G protein-coupled receptor 142: GPR142)の阻害剤をSTC-1細胞に投与し、細胞内シグナル伝達への影響を可視化解析した。解析の結果、GPR142受容体阻害の投与によって、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が有意に抑制された。Gqタンパク質の阻害剤の投与によって、L-フェニルアラニン投与によって起こる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が有意に抑制されたが、Gsタンパク質の阻害剤の投与では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に何ら影響を与えなかった。これらの結果から、GPR142は、Gqタンパク質と共役し、STC-1細胞においてL-フェニルアラニン受容体として機能している可能性が示唆された。

一方で、GPR142の阻害剤の投与でグルカゴン様ペプチド-1の分泌は、完全に抑制されなかった。そのため、L-フェニルアラニンによるグルカゴン様ペプチド-1の分泌促進機構には、Gqタンパク質と共役したGPR142以外の何らかのシグナル伝達経路によって調節されている可能性が考えられた。L-フェニルアラニンは、 Na^+ 依存性アミノ酸トランスポーターによって細胞内に取り込まれる可能性が考えられる。そこで、細胞外の Na^+ を低濃度にし、L-フェニルアラニン投与時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇への影響を可視化解析した。その結果、L-フェニルアラニン投与による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制された。この結果から、 Na^+ 依存性アミノ酸トランスポーターを介してL-フェニルアラニンと共に細胞内に取り込まれた Na^+ が、膜の脱分極を引き起こすことで $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こる可能性が示唆された。

L-アルギニンは、L-フェニルアラニンと同様にグルカゴン様ペプチド-1の分泌を促進したが、その詳細な調節機構については不明であった。そこでまず、STC-1細胞へL-アルギニンを投与したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ や $[ATP]_i$ 上昇が観察された。しかし、L-アルギニンの投与によって $[cAMP]_i$ の変化は観察されなかった。

一酸化窒素は、L-アルギニンを基質として一酸化窒素合成酵素によって産生される。そして産生された一酸化窒素は、細胞内に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内のcGMP濃度($[cGMP]_i$)を上昇させ、さまざまな細胞機能を調節する。そこでL-アルギニンによるグルカゴン様ペプチド-1の分泌の促進に $[cGMP]_i$ が関与している可能性が考えられた。また、L-アルギニンが細胞内で代謝されATPが産生される可能性も考えられた。そこでまず、蛍光タンパク質を基盤としたcGMPセンサーと代謝関連分子であるピルビン酸、乳酸、グルコースセンサーの開発に取り組んだ。

赤色蛍光タンパク質型グルコースセンサーは、赤色蛍光タンパク質mAppleとMgIBの間にリンカーアミノ酸領域が存在する。この領域のアミノ酸配列の長さの種類を最適化したところ、グルコースとの結合によって最大で約4倍の蛍光輝度上昇を示す変異体を獲得した。細胞内のグルコース濃度は、細胞種によって異なる。そこで、グルコース結合ドメインであるMgIBに点変異を導入して、グルコースへの結合能の異なるグルコースセンサーの開発を試みた。その結果、グルコースへの結合能の異なる2種類(Red Glifon 300とRed Glifon 3000)と、グルコースにほとんど反応しない1種類(Red Glifon nega)の合計3種類のグルコースセンサーを獲得した。

なお、人工甘味料のスクラロースは、腸内細菌叢の組成を変調させ、消化管ホルモンの分泌機能を変調させる可能性が報告されていた。しかし、腸内分泌細胞がどのような機構でスクラロースを感知し、細胞内シグナル伝達に影響を与えているのかは不明であった。そこで腸内分泌細胞株GLUTag細胞にRed Glifon 300を発現させ、スクラロース投与時の細胞内グルコース($[Gluc]_i$)濃度変化を解析した。また、スクラロース投与時の $[Ca^{2+}]_i$ と $[cAMP]_i$ も解析した。その結果、ス

クラロースの投与により $[Gluc]_i$ が上昇するだけでなく、 $[Ca^{2+}]_i$ も $[cAMP]_i$ も上昇することが分かった。つまり、スクラロース投与によって細胞内へのグルコース取り込みが促進されることが示唆された。Gタンパク質共役型受容体的一种であるカルシウムセンシングレセプター (CaSR) や Gqタンパク質、さらにはアデニル酸シクラーゼをそれぞれ個別に阻害したところ、CaSRを介してcAMP濃度の上昇が調節されていること、CaSR以外のGタンパク質型受容体を介して Ca^{2+} 濃度の上昇が調節されていることが示唆された。この $[Ca^{2+}]_i$ と $[cAMP]_i$ 上昇によって細胞内に存在するグルコーストランスポーターの細胞膜方向への移行が促進される結果、細胞内へのグルコース取り込みが促進される可能性が示唆された。その結果、グルカゴン様ペプチド-1の分泌異常を引き起こす可能性が示唆された。

赤色蛍光タンパク質型cGMPセンサーの開発も行った。赤色蛍光タンパク質 mApple と cGMP 結合ドメイン PDE5 の間に存在するリンカーアミノ酸領域の最適化を行ったところ、cGMPの結合によって最大で約6.7倍の蛍光輝度上昇を示す変異体 (Red cGull) を獲得した。また、同様な方法で緑色蛍光タンパク質を基盤とした乳酸センサーおよびピルビン酸センサーを開発した。開発した緑色乳酸センサー (Green Lindoblum) は、乳酸存在下で蛍光輝度が約5倍に、緑色ピルビン酸センサー (Green Pegassos) は、ピルビン酸存在下で蛍光輝度が約3倍に上昇した。

腸内分泌細胞株 STC-1 細胞に Red cGull を発現させ、L-アルギニンを投与したところ、 $[cGMP]_i$ 上昇が観察された。この $[cGMP]_i$ 上昇は、一酸化窒素合成酵素阻害薬の投与によって阻害されたことから、一酸化窒素合成酵素を介して調節されていることが示唆された。しかし、一酸化窒素によって活性化される可溶性グアニル酸シクラーゼの機能を阻害しても、L-アルギニン投与によって起こる $[Ca^{2+}]_i$ や $[ATP]_i$ 上昇やグルカゴン様ペプチド-1の分泌は抑制されなかった。これらの結果から、L-アルギニン投与によるグルカゴン様ペプチド-1の分泌は、 $[cGMP]_i$ だけでなく $[Ca^{2+}]_i$ や $[ATP]_i$ 上昇の相乗効果によって起こることが示唆された。

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 4件）

1. 著者名 Takizawa Mai, Osuga Yuri, Ishida Rika, Mita Marie, Harada Kazuki, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya, Tsuboi Takashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of a red fluorescent protein-based cGMP indicator applicable for live-cell imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03790-2	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 Harada Kazuki, Takashima Maoko, Kitaguchi Tetsuya, Tsuboi Takashi	4. 巻 597
2. 論文標題 F actin determines the time dependent shift in docking dynamics of glucagon like peptide 1 granules upon stimulation of secretion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 657 ~ 671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14580	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 Osuga Yuri, Harada Kazuki, Tsuboi Takashi	4. 巻 588
2. 論文標題 Identification of a regulatory pathway of L-phenylalanine-induced GLP-1 secretion in the enteroendocrine L cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 118 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.043	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 Mita Marie, Sugawara Izumi, Harada Kazuki, Ito Motoki, Takizawa Mai, Ishida Kentaro, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya, Tsuboi Takashi	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of red genetically encoded biosensor for visualization of intracellular glucose dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 108.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2021.06.002	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 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大須賀佑里, 原田 一貴, 坪井 貴司
2. 発表標題 .L-フェニルアラニンによるグルカゴン様ペプチド-1分泌調節機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井貴司
2. 発表標題 腸内細菌叢と消化管内分泌細胞との機能連関
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井貴司
2. 発表標題 腸内細菌叢と消化管内分泌細胞との機能連関.
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021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)	
研究分担者	原田 一貴 (HARADA Kazuki) (60830734)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教 (12601)	

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
---------	---------