

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780118

研究課題名 (和文)

腸管における食品ペプチド受容体CaSRの機能解析と未知の食品たんぱく質受容体探索

研究課題名 (英文) Role of CaSR as dietary peptide sensor and search for dietary protein receptor in the gut

研究代表者

比良 徹 (HIRA TOHRU)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：10396301

研究成果の概要 (和文)：消化管において食品たんぱく質・ペプチドを感知する受容体はこれまでほとんど分かっていなかった。本研究課題において、細胞外カルシウムやアミノ酸の受容体として知られるカルシウム感知受容体 (CaSR) が、消化管ホルモン CCK を分泌する細胞において、多くの食品ペプチドの受容に関与し、CaSR の活性化がこのホルモンの分泌を促進することが明らかとなった。これらの結果により、消化管における栄養素認識機構の一つが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：In this research project, we have investigated the function of calcium-sensing receptor (CaSR) as the receptor for luminal dietary peptides in gastrointestinal endocrine cells. Secretions of a gut hormone CCK induced by various dietary peptides were partially inhibited by the presence of CaSR antagonists. CaSR-expressing kidney cells also responded to various dietary peptides. These results suggest that CaSR is one of the receptor for dietary peptides in the gastrointestinal tract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：カルシウム感知受容体、消化管ホルモン、コレシストキニン、食品ペプチド、食品たんぱく質

1. 研究開始当初の背景

腸管は摂取した栄養の消化吸収と同時に、むしろそれ以前に栄養素を認識する機能 (Nutrient-sensing) を有し、その中心的な役割を担うのが「消化管内分泌細胞」である。この細胞は、管腔内の種々の栄養成分を認識して、各種消化管ホルモンを基底膜側に放出し、これら消化管ホルモンは壁内神経、迷走

神経、血流等を介して全身の生理応答 (消化酵素分泌、消化管運動、食欲調節、食後血糖上昇抑制) を制御している。

ヒトや動物の腸管から特定の消化管内分泌細胞を単離することは未だ困難であるが、マウス腸管から樹立された消化管内分泌細胞株により、腸管における各種栄養素認識機構が近年明らかになりつつある。糖質を認識するグルコーストランスポーター (SGLT1,

SGLT3}や甘味受容体(T1R)、脂肪酸を認識する受容体(GPR40, GPR120)などが国内外より報告されている。

近年我々は、カルシウム感知受容体 (Calcium-sensing receptor: CaSR) が、消化管内分泌細胞株においてアミノ酸 (Phe)、ペプチド (大豆 β コングリシニン由来のペプチド β 51-63) の受容体として機能することを初めて明らかにした。また Orphan GPCR の GPR93 が食品ペプチド受容体であるとの報告もある。これらペプチド受容体の *in vivo* での機能、役割を明らかにする必要がある。

一方で食品たんぱく質の受容体は発見されていない。申請者は、牛乳カゼインの主要サブユニットである α -カゼインが、消化管内分泌細胞株において細胞内 Ca 濃度上昇と、ホルモン分泌 (コレシストキニン: CCK) を引き起こすことを見出している。またそのシグナルには G タンパクの関与を示唆する結果を得ていることから、 α -カゼイン結合性 GPCR が受容体として機能することが想定される。これまでに α -カゼイン固定化樹脂等を用いたアフィニティー精製により、消化管内分泌細胞株の膜などから α -カゼイン結合タンパクを分離したが、量的、技術的不足などからその同定は非常に困難であった。最近になり高感度での MLDI-TOF/MS 解析技術を確認し、SDS-PAGE のバンドとして検出されたタンパクの多くが同定可能となった。しかしながら、同定されたタンパクは、ミトコンドリア膜や小胞体膜などのタンパクが多く、細胞膜上で受容体として機能する可能性のあるものは現在得られていない。

2. 研究の目的

本研究課題では下記のような2つの目的を設定した。

- CaSR が食品ペプチドの受容体として機能するのか、機能するとすればどのような食品ペプチドを受容するのかを明らかにすること。
- 食品タンパク質受容体候補の一つとして、 α -カゼインをリガンドとする受容体を同定すること。

3. 研究の方法

• 材料

食品ペプチドとして、市販の各種食品たんぱく質加水分解物 (肉加水分解物、卵白アルブミン加水分解物、カゼイン加水分解物、小麦加水分解物、ジャガイモ加水分解物) を用いた。また、大豆、小豆、カゼインについては、タンパク質加水分解酵素であるペプシンを用い、これによる分解物 (ペプトン) を調製した。

• 培養細胞

本研究課題では、腸管腔内の栄養素を認識して消化管ホルモンを分泌する細胞、即ち消化管内分泌細胞のモデル細胞を用いて各種食品ペプチドによる消化管ホルモン Cholecystokinin (CCK) 分泌における CaSR の関与を検討した。また同細胞において、代表的食品たんぱく質である牛乳カゼイン (α -カゼイン) を認識する機構を解析した。CCK を分泌するモデル細胞として用いた STC-1 細胞は、マウス小腸由来の消化管内分泌細胞株であり、CCK 産生細胞の最適なモデルとして世界的に認知されている。

• CCK 分泌試験

48 ウェルプレートに培養した STC-1 細胞を、各種食品ペプチド、 α -カゼインなどを含む溶液に1時間暴露し、上清中に放出された CCK の濃度を ELISA キットを用いて測定した。

分泌試験の際に、受容体や細胞内情報伝達経路の阻害剤を添加することで、それらの関与を検討した。

• CaSR アゴニスト活性試験

各種食品ペプチドが CaSR を活性化するかどうかを検討するため、CaSR を発現していない培養細胞 (ヒト腎臓胚由来 HEK293) に、発現ベクターを用いて CaSR を強制発現させる試験系を用いた。マウス CaSR の cDNA 配列を挿入したプラスミドベクターをリポフェクション法により、HEK293 細胞に導入した。RT-PCR により CaSR の mRNA が発現することを確認した。陰性対象 (Mock) として CaSR 遺伝子を持たないプラスミドベクターを同様に HEK293 細胞に導入した。

CaSR 活性化をモニタリングするために、HEK293 細胞において細胞内カルシウム濃度を測定した。蛍光カルシウム指示薬 Fura-2AM を、カバースリップ上に培養した CaSR 導入 HEK293 細胞または Mock 処理 HEK293 細胞に導入した。細胞内イオン解析装置により、2波長励起 (340 nm, 380 nm) 1波長蛍光 (510 nm) での蛍光強度を測定し、蛍光強度比の変化を細胞内カルシウム濃度の変化とした。HEK293 細胞を各種食品ペプチドに暴露し、リアルタイムで蛍光強度比を測定した。

• ラットにおける耐糖能試験

絶食させたラット (Sprague Dawley 系、雄、8週齢) において経口グルコース負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT) を行った。フィーディングチューブにより試験サンプル溶液とグルコース溶液をラットに経口投与し、投与前および投与後 15、30、60、90、120分の尾静脈血を採取した。採取した血液より血漿を回収し、

市販の測定キットを用いて血漿中グルコース濃度を測定した。

4. 研究成果

種々の食品ペプチドに STC-1 細胞を暴露すると、ペプチドの種類に応じて異なる強度で CCK の分泌が促進された。この時、CaSR の特異的阻害剤 (CaSR アンタゴニスト) を共存させ、種々の食品ペプチドによる CCK 分泌作用への影響を調べたところ、いくつかの食品ペプチドの CCK 分泌作用が抑制された。

また、電気透析機により食品ペプチドから低分子画分を除去したところ、一部の食品ペプチドによる CCK 分泌作用は、CaSR アンタゴニストにより減弱したが、CaSR アンタゴニストの影響を受けない食品ペプチドも見られた。低分子を除去した食品ペプチドでも CCK 分泌が見られたことは、遊離アミノ酸や低分子ペプチドだけでなく、比較的高分子のペプチドが CCK 分泌作用を持つこと、さらに CaSR がアミノ酸の認識だけでなく、比較的高分子のものを含む、種々の大きさのペプチド認識に関わることを示唆すると考えられた。

さらに多くの食品ペプチドに関して、これらによる CCK 分泌が CaSR アンタゴニストによって抑制されるかを検討した。市販、および自ら調製した各種食品たんぱく質加水分解物合計 12 種類のうち、11 種の食品ペプチドによる CCK 分泌が、程度は異なるものの、CaSR アンタゴニストにより抑制された。これらの結果により、CaSR が CCK 産生細胞において各種食品ペプチドの受容体として機能することが示唆された。

消化管の上皮細胞は、食品たんぱく質の消化によって生じた低分子ペプチド (ジ、トリペプチド) をオリゴペプチド輸送担体 (PepT1) により細胞内に吸収する。この PepT1 がペプチドの認識に関与する可能性が以前報告されていた。この PepT1 の阻害剤を用いて、上記と同様の CCK 分泌試験を行ったところ、各種食品ペプチドによる CCK 分泌は抑制されなかった。このことより、種々の大きさのペプチド断片を含む食品ペプチドの認識には PepT1 は関与しないことが示唆された。

上述のように、CCK 産生細胞において CaSR 阻害剤処理が食品ペプチドによる CCK 分泌を抑制したことから、CaSR が食品ペプチドを感知することが考えられた。実際に食品ペプチドが CaSR を活性化するかどうかを確かめるために、CaSR を発現しないヒト腎臓由来 HEK293 細胞に、発現ベクターを用いて CaSR を強制発現させ、各種食品ペプチド暴露時の細胞内カルシウム濃度変動を観察した。CaSR 強制発現細胞において、細胞外のカルシウム濃度上昇に応じて、細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。これは CaSR を導入して

いない Mock の HEK293 細胞では観察されなかったことから、強制発現させた CaSR が本試験系で機能することが確かめられた。この CaSR 強制発現 HEK293 細胞を各種食品ペプチドに暴露すると、多くの食品ペプチドにより、濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。CaSR を導入していない Mock 処理の HEK293 細胞では、食品ペプチドに対する応答は見られなかったことより、各種食品ペプチドが CaSR を活性化すること、即ち CaSR が食品ペプチドを感知することが明らかとなった。

CaSR はアミノ酸の受容体として機能することから、食品ペプチドに含まれる遊離アミノ酸が CaSR を活性化する可能性も考えられた。ゲル濾過クロマトグラフィーを用い、各種食品ペプチドより約 500 Da 以下の画分を除去したところ、用いた食品ペプチドによる CCK 分泌は維持された。この時 CaSR アンタゴニスト存在下で、多くの食品ペプチドによる CCK 分泌は部分的に抑制された。

これらの結果より、CCK 産生細胞において、CaSR はアミノ酸だけでなく、種々の大きさのペプチドを認識して、CCK 分泌を誘導することが明らかとなり、CaSR が食品ペプチドとして機能することが強く示唆された。

上記 CaSR のアゴニストの一つとして知られる塩基性たんぱく質プロタミンをラットに経口投与することにより、経口グルコース負荷試験における血糖上昇が抑制されることを見出した。また、プロタミンが消化管ホルモン Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌を誘導することを確認し、腸管における CaSR の活性化が、GLP-1 分泌促進や胃排出抑制を介して血糖上昇抑制に寄与することが示唆された。

代表的食品たんぱく質の一つである牛乳 α -カゼインの消化管内分泌細胞での認識機構を明らかにするために、消化管内分泌細胞株における α -カゼインによる消化管ホルモン CCK の分泌機構を解析した。 α -カゼインを固定化した樹脂と、CCK 産生細胞株の細胞膜画分を用いたアフィニティー精製により、 α -カゼイン結合タンパクを分離し、プロテオーム解析とデータベース検索によりいくつかのタンパク質を同定したが、細胞膜に局在するタンパク質は同定されなかった。

次に候補と考えられる受容体を阻害する薬剤を用いて、 α -カゼイン受容体の特定を試みたところ、Transient Receptor Potential cation channels (TRP チャネル) に属し、辛味や冷感の受容体として知られる TRPA1 の阻害剤により、 α -カゼインによる CCK 分泌作用が抑制された。この結果により、TRPA1 が α -カゼインの認識に関わることを示唆されたが、今後さらなる検討が必要と考えられた。

腸管において消化吸收よりも前のイベントである栄養素の認識についての研究は少ない。この最も基礎的な生理現象を細胞レベルから組織、個体レベルまでを通じて明らかにすることは、高い学術的特色を有する。また、アミノ酸組成、鎖長など多様性に富む食品由来のたんぱく質、ペプチドの、どのような構造をどのような分子（受容体）が認識するのかを明らかにするという目的は、糖や脂肪酸といった限られた分子種を対象とするのに比べ挑戦的かつ独創的である。

本研究により、細胞外カルシウムや遊離アミノ酸の受容体として知られる CaSR が、食品ペプチドの受容体としても機能することが明らかとなり、これらは栄養学、食品科学、生理学的に高い学術的意義を有する。将来的には、同定された受容体分子と、栄養素の消化吸收、肥満や腸疾患、メタボリックシンドロームとの関連への研究への発展が想定される。

一方応用に関して、消化管ホルモンは消化吸收の調節に加え、食欲、糖代謝、脂質代謝など多様な機能を有することから、経口摂取した物質による消化管ホルモン分泌のコントロールが期待される。実際に、CaSR アゴニストの一つであるプロタミンが、このような経路を介して血糖上昇を抑制する可能性が示唆された。管腔側から消化管内分泌細胞に直接作用できる物質（薬品、機能性食品）は、吸収される必要がない。このことは難消化性、難吸収性の物質を利用できる上に、吸収された場合の二次的作用（副作用）の可能性を最小限に抑えられる。本研究はこのような安全性の高い薬剤、機能性食品の開発にもつながる発展性を有している。

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1件）

- ① Shingo Nakajima, Tohru Hira, Yuzuru Eto, Kozo Asano, Hiroshi Hara, Soybean β-51-63 peptide stimulates cholecystokinin secretion via a calcium-sensing receptor in enteroendocrine STC-1 cells, Regulatory Peptides, 査読有、Vol. 159 (1-3)、2010、pp. 148-155.

〔学会発表〕（計3件）

- ① Shingo Nakajima, Tohru Hira, Md Kaosar Niaz Bin Sufian, Yuzuru Eto, Hiroshi Hara, Calcium-sensing receptor is a sensor for dietary peptides to stimulate cholecystokinin secretion in the enteroendocrine cell line STC-1, The 18th

International Symposium on Regulatory Peptides, 2010年9月5日-8日、Europa Hotel Belfast (Belfast, UK)

- ② 中島 進吾、比良 徹、Sufian Kaosar、江藤 謙、原 博、CCK 産生細胞において Calcium-sensing receptor はペプトン受容体として機能する、第64回日本栄養・食糧学会大会、2010年5月23日、アスティ徳島（徳島県）

- ③ 村松 茉耶、比良 徹、江藤 謙、原 博、ラットにおいて Protamine 経口投与は血糖上昇を抑制する、平成21年度第二回合同学術講演会、2009年11月28日、帯広市十勝プラザ（帯広市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比良 徹 (HIRA TOHRU)

北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：10396301

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし