

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380074

研究課題名（和文） 油脂受容体候補たんぱく質に関する動物行動学的研究

研究課題名（英文） Animal behavioral studies on the candidate of fat receptor protein

研究代表者 伏木 亨

(FUSHIKI TOHRU)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20135544

研究成果の概要（和文）

GPR120 を発現させた細胞のカルシウムレスポンスを指標にした油脂に対する特異性のプロフィールとリック試験による動物行動解析から得られるマウスの油脂への嗜好性を比較すると、両者はよく一致した。また、マウス舌上皮から単離した有郭乳頭味細胞を用いたカルシウムイメージング試験においても同様の長鎖不飽和脂肪酸による応答が見られた。従って GPR120 が舌上における長鎖脂肪酸の化学受容体として機能していることが支持された。

マウスは 0.25% の低濃度の長鎖不飽和脂肪酸を認識し、高嗜好性を示すことが明らかとなった。オレイン酸については 0.125% の低濃度でも希釈液と比較してマウスは好んで摂取した。このことから、極めて少量の脂肪酸を添加することによって食品の嗜好性を高めることができる可能性が示唆された。GPR120 ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて検討したところ、GPR120 単独の欠損では、油脂に対する嗜好性は抑制されなかった。これらのことから、マウスの口腔内において食品に含まれる脂肪酸は GPR120 および CD36 を含むその他の受容体との共同によって受容されている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we found that the profiles of binding specificities for dietary fatty acids obtained from GPR120 binding test *in vitro* coincided with the profiles of palatability of mice to the fatty acids evaluated by lick examination. The same profiles of the specificity of fatty acids was observed from the calcium-imaging test using isolated cells from mice taste buds in the circumvallate papilla in the tongue. These findings supported our hypothesis that GPR120 is functioning as one of the chemical receptors of long chain fatty acid on a tongue. In the animal behavioral experiments, mice have recognized 0.25% of low-concentration long-chain poly-unsaturated fatty acid in the test sample with high palatability. Especially, mice took oleic acid, one of the popular dietary fatty acids, even it was 0.125% of low-concentration, suggesting that addition of very small quantity of dietary fatty acid to the food increases in the palatability of foods. We created GPR120 knockout mice. The mice did not show the diminish of palatability of fat. These results suggest that fatty acid contained in food may be received by in cooperation with GPR120 and another mechanisms including CD36 and unknown fatty acid receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養化学

1. 研究開始当初の背景

油脂は食品のおいしさを増す重要な要素である。一方、国民の堅強を維持する検知からは油脂の摂取量を抑制することが求められていた。これら二律背反する問題の解決には、低カロリーで満足感のある油脂の開発が必要であったが、それには油脂に対する嗜好性のメカニズムの学術的な解明が必要であった。

2. 研究の目的

油脂は無味ながら食品の嗜好性を左右する最も重要な要因である。しかし、油脂に対する高い嗜好性のメカニズムは不明の点が多い。特に、摂取した油脂の口腔内での受容機構は未解明のままである。本研究では、油脂の化学的シグナルを担っている脂肪酸の口腔内受容機構について、舌の有郭乳頭に発現している7回膜貫通型Gタンパク共役受容体の1つである GPR120 の生理的な関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

7回膜貫通型Gタンパク共役型受容体の一つであるGPR120は腸管で多く発現しており、食事由来の長鎖脂肪酸刺激により、グルカゴン様ペプチド-1やコレシストキニンなどの消化管ホルモンの放出を促進すると考えられている。本受容体がラットやマウスの舌上味蕾細胞のアピカル側に発現していることを見出し、脂肪あるいはその関連物質の口腔内における化学認識において重要な役割を果たしていると考えてきた。ヒトGPR120の遺伝子を安定発現させたヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞を樹立し、リノール酸などの長鎖脂肪酸の刺激によって細胞内カルシウムイオン濃度が一過性に増加すること（以下カルシウムレスポンス）を確認し、本スクリーニング系を用いてGPR120のリガンド評価を行った。各種脂肪酸に対する動物の嗜好性は短時間リック試験により検討した。ミネラルオイルで1%に希釈した脂肪酸をマウスに呈示し、試験液を舐め始めてから最初の1分間のリック数を評価した。また、口腔内における脂肪酸が認識されているのか確認する

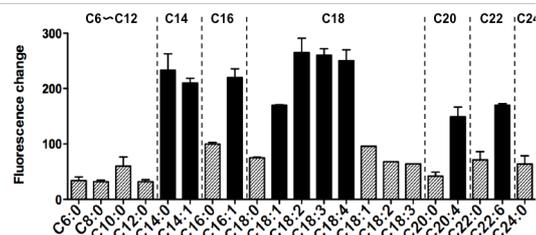
ために、マウス舌有郭乳頭から味細胞を単離し、脂肪酸刺激によって応答するか否かカルシウムイメージングにより検討した。

4. 研究成果

GPR120 安定発現細胞のスクリーニング系において、食品に含まれる油脂の主な構成脂肪酸である炭素数 18 の不飽和脂肪酸に強い Ca^{2+} 上昇作用が認められた。特にリノール酸 (C18:2)、 α -リノレン酸 (C18:3)、ステアリドン酸 (C18:4) といった多価不飽和脂肪酸に強い作用があった (図 1)。また、ミリストレイン酸 (C14:1)、パルミトレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、ステアリドン酸 (C18:4)、アラキドン酸 (C20:4)、ドコサヘキサエン酸 (C22:6) などの C14~C22 の不飽和脂肪酸にも活性が認められた (図 1)。

飽和脂肪酸では炭素数 6~12 の短~中鎖脂肪酸では活性は全く見られず、唯一 C14 のミリスチン酸が高い活性を示した。パルミチン酸 (C16:0) ではカルシウムレスポンスは微弱となり、ステアリン酸 (C18:0)、アラキジン酸 (C20:0)、ベヘン酸 (C22:0)、リグノセリン酸 (C24:0) などの長鎖飽和脂肪酸では全

図 1 GPR120 発現細胞を用いた、脂肪酸応答特異性の検討



く反応しなかった。カルシウムレスポンスが高かった脂肪酸についても、それらのカルボキシル基がメチル化されたメチルエステル体には全く活性が認められなかった。

1%濃度の脂肪酸に対するマウスのリック試験では短鎖～中鎖の脂肪酸、および長鎖飽和脂肪酸の嗜好性は低かった。オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸などの長鎖不飽和脂肪酸にはマウスは高い嗜好性を示した一方、これらのメチルエステル体には嗜好性を示さなかった (図2)。

また、パルミトレイン酸 (C16:1) やステアリン酸 (C18:0)、アラキドン酸 (C20:4)、ドコサヘキサエン酸 (C22:6) などのC16～C22の不飽和脂肪酸も高嗜好性であった。以上のことからGPR120発現HEK293細胞における各種脂肪酸のCa²⁺惹起能(図1)とマウスのリック試験における脂肪酸の嗜好度(図2)には高

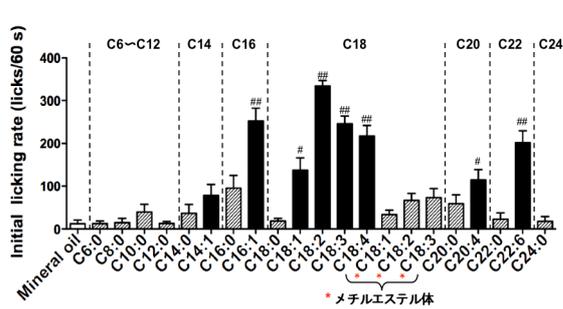


図2. リック試験による各種脂肪酸および脂肪酸

い相関性がみられることがわかった(図3)。

さらに1%以下の低濃度の脂肪酸に対するマウスの嗜好性を評価したところ、リノール酸は0.25%の低濃度でもミネラルオイルと比較して有意に好まれた(図4A)。また、オレイン酸、 α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸などその他の不飽和脂肪酸に関しても0.25%の低濃度においてもマウスは高い嗜好

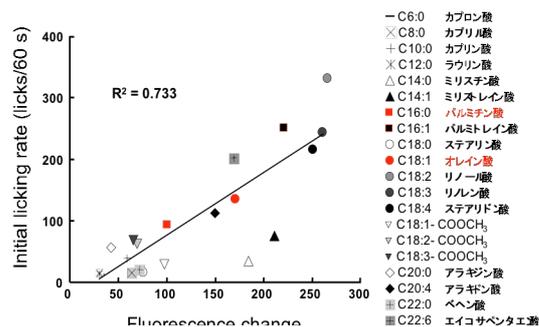


図3. GPR120発現細胞におけるカルシウム応答とマウスリック試験による嗜好性との相関性を示した(図4B)。また、10分間の短時間

2瓶選択試験では、希釈液(0.3%キサンタンガム)と比較して0.125%という低濃度からオレイン酸溶液の方を多く摂取することが確認できた。

マウス舌上皮から単離した有郭乳頭味細胞を用いたカルシウムイメージングでは、リノール酸刺激により一部の細胞でカルシウムレスポンスが確認できた(図5)。またリノール酸だけでなく α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)などの長鎖不飽和脂肪酸刺激により一部の味細胞で濃度依存的なカルシウムレスポンスが確認できた。

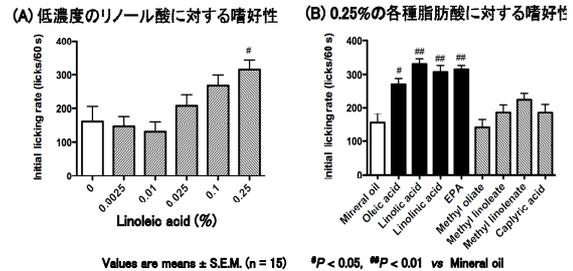


図4. 低濃度の脂肪酸に対するマウスの嗜好

また、メチルエステル体刺激では細胞は反応しないことも確認できた。

GPR120を発現させた細胞のカルシウムレスポンスを指標にした油脂に対する特異性

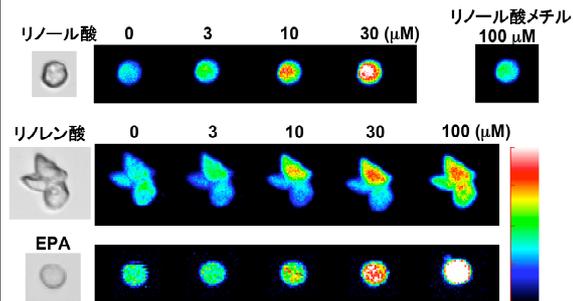


図5. 不飽和脂肪酸刺激に対するマウス単離味細胞のカルシウム応答

の解析とリック試験による動物行動解析から得られるマウスの油を比較すると、両者の特異性はよく一致していた。リック試験は試験液を消化吸収した後に得られる満足感ではなく、口にした時のおいしさを判定・評価するものである。従ってGPR120が舌上における長鎖脂肪酸の化学受容体のひとつとして機能しており、脂肪酸が好まれるのはそのGPR120刺激能によるものであることが考えられた。ミリスチン酸(C14:0)、ミリストレイン酸(C14:1)については細胞系では高い活性を示したが、リック試験ではこれらの脂肪酸に対する嗜好性は低かった。においやテクスチャーなどGPR120以外の要因が関与しているものと推察できるが詳細は不明である。

マウスは0.25%の低濃度の長鎖不飽和脂肪酸を認識し、高嗜好性を示すことが明らかとなった。オレイン酸については0.125%の低濃

度でも希釈液と比較してマウスは好んで摂取した(図9)。このことから、極めて少量の脂肪酸を添加することによって食品の嗜好性を高めることができる可能性が示唆された。

マウス舌上皮から単離した有郭乳頭味細胞を用いたカルシウムイメージングにおいても長鎖不飽和脂肪酸刺激により一部の味細胞で濃度依存的なカルシウムレスポンスが確認できた(図11)。また、脂肪酸のメチルエステル体刺激では応答しないことも確認できた(図11)。これらの結果はGPR120安定発現細胞系におけるカルシウムレスポンスと同様な傾向を示している。実際にマウスの口腔内においても脂肪酸がGPR120あるいはその他の受容体によって化学受容されていることが強く示唆された。

口腔内においてはGPR120だけが脂肪酸受容体として機能しているわけではなく、CD36や、GPR40、もしくはその他の受容体や細胞内情報伝達経路が機能している可能性が推定される。また今回のマウス摂取試験では嗅覚遮断手術などを施していないため、脂肪酸の匂いに反応した可能性もある。より詳細なメカニズムを解明するために、脂肪酸刺激に応答した単離有郭乳頭細胞からSingle Cell RT-PCR法等により、脂肪酸応答性と遺伝子発現のプロファイルなどを行なう必要があると考えられる。

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松村成暢、他 Dietary fat ingestion activates β -endorphin neurons in the hypothalamus FEBS Letters (査読有り) 586, 2012年 1232-1235
DOI: 10.10.16/j.febslet.2012.03.028

[学会発表] (計6件)

① 伏木亨 日本栄養食糧学会近畿支部会シンポジウム(特別講演) Cephalic signalとしての脂肪とその嗜好性: 油脂の口腔内需用とエネルギー信号がおいしさに与える影響 2011年 10月 奈良市

② 伏木亨 日本食品工学会シンポジウム(招待講演) 「脂肪ゼロ」の生理科学: 油脂分子とそのエネルギー量の生体内認識システム 2011年 8月 京都市

③ 伏木亨 日本農芸化学会大会 油脂の嗜好性に関する栄養生理学的研究 (農芸化学賞受賞講演) 2013年 3月 仙台市

[図書] (計1件)

①伏木亨 他、アイケイコーポレーション、応用栄養学 2013年 pp.71-92

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.nutrchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伏木 亨 (FUSHIKI TOHRU)

研究者番号: 20135544

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

