

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249081

研究課題名(和文) 口腔消化管味覚センサーのシグナル調節・伝達機構の解明

研究課題名(英文) Molecular and Neural Mechanisms for Detection, Transmission and Modulation of taste signals derived from the oral cavity and gut

研究代表者

二ノ宮 裕三(Ninomiya, Yuzo)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50076048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円、(間接経費) 10,890,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔消化管の味覚センサーのシグナル調節・伝達機構と食調節における役割を検索した。その結果、肥満に伴い味細胞の甘味感度調節系がレプチンによる抑制からエンドカンナビノイドによる亢進に移行すること、消化管味細胞もこの甘味感度調節系を持つこと、逆に消化管ホルモンGLP-1が味細胞の甘味情報伝達に関与し、その受容体のヒト遺伝子多型と甘味感受性が連関することを示し、口腔消化管の味受容・情報伝達の新知見と、肥満との連関など味覚の新機能を見出した。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated reception and modulation of taste signals in the oral cavity and gut and their roles in the regulation of food intake. The results showed that sweet sensitivity in lean mice was chronically inhibited by leptin, a satiety hormone, whereas in obese mice no such leptin effect was evident and instead their sweet sensitivities were enhanced by endocannabinoids, orexigenic mediators. This leptin/endocannabinoid reciprocal modulation of sweet sensitivity was also found in gut endocrine STC-1 cells. Conversely, GLP-1, a gut peptide hormone, was found to be involved in sweet signal transmission from taste cells to brain in mice and genetic variations of GLP-1 receptor gene link with sweet recognition thresholds in human. These results provide new line of evidences in taste receptor mechanisms in the oral cavity and gut and new insights for potential roles of peripheral taste signals in control of food intake, of which abnormality may possibly lead to the obesity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔消化管味覚センサー 食欲調節液性因子 レプチン エンドカンナビノイド インクレチン 遺伝子多型性 味覚感受性 肥満

### 1. 研究開始当初の背景

味覚は消化管の入り口で、食物情報をいち早く中枢に伝え、消化吸収を円滑にし、エネルギーやミネラルバランスを保つことにより健康維持に働く感覚であると考えられている。しかし、その食調節系の鍵感覚である味覚が体内の栄養要求に伴い変化するかどうかについては長らく不明であった。代表者らは、2000年に脳の摂食抑制ホルモンのレプチン(Lep)による甘味の抑制効果を発見した(Kawai et al., PNAS, 2000; Nakamura et al., Diabetes, 2008)。すなわち、食物中のエネルギー源を感じる甘味受容細胞は、体内の脂肪量の増加によるレプチン濃度の上昇に伴い感受性を低下させ、エネルギー摂取の低下に導く。さらに最近、脳で食欲促進に働き、嗜癖性誘導にも関与するエンドカンナビノイド(eCB)が味覚器においても、Lepと拮抗し甘味感度増加に働くことを見出した(Yoshida et al., PNAS, 2010)。しかし、その拮抗性に関わる細胞内機構や、その肥満に伴う変化は不明のままであった。また、我々は甘味受容体が腸内分泌細胞にも存在し、甘味受容により吸収上皮の糖吸収を促進することを示したが(Margolske et al., PNAS, 2007)、腸内分泌細胞も味細胞と同様に食欲調節因子の制御を受けるかどうかは明らかにすべき課題である。一方、味覚器と腸内分泌細胞が共通の味受容機構を持つのであれば、消化管で分泌されるペプチド類が味細胞でも分泌され、神経伝達に働いている可能性が浮上していた。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究は、口腔消化管で生理的要求により感受性を変化させ、生体のエネルギーバランスに働く甘味・うま味受容細胞に焦点を当て、(1)摂食抑制因子 Lep と促進因子 eCB の拮抗的味覚感受性調節、(2)腸管内分泌細胞の食欲制御因子による感受性調節とホルモン分泌、(3)味特異的神経伝達への消化管ホルモン(GLP-1 など)の関与、(4)甘味・うま味受容関連分子の遺伝子多型性と味覚感受性の連関、を解析し、口腔消化管の味覚センサー細胞に共通し、摂食・栄養吸収に協調して働く、シグナル調節・伝達機構について検索する。

### 3. 研究の方法

上記4課題について、(1)味細胞の食欲制御因子受容体(Ob-Rb, CB1)と甘味受容体との共発現性を組織学的に、味応答を細胞生理学的に、Ob-Rb, CB1 受容体変異マウスの味応答を薬理的・神経行動学的に調べ、両因子作用の拮抗性と細胞内機構を解析した。(2)腸管内分泌細胞培養系(STC-1 など)の食欲制御因子による甘味感受性の拮抗的調節を Ca<sup>2+</sup> 応答を指標に調べ、関連分子の阻害剤などを用い、かつ味細胞における実験結果と照らし合わせ相互補完的に検索を進め、拮抗性の細胞内機構を解析した。(3)甘味刺激による味

細胞のホルモン(GLP-1 など)分泌と、ホルモン受容体阻害による応答変化を調べ、甘味神経伝達におけるホルモンの関与を解析した。(4)ヒト甘味・うま味受容関連分子の遺伝子多型と味覚感受性の連関については、研究の過程で浮上した甘味受容における GLP-1 の関与に焦点を当て、GLP-1 受容体遺伝子の多型性と味覚認知閾値の連関を調べた。

### 4. 研究成果

(1)はじめに、味細胞における食欲制御因子

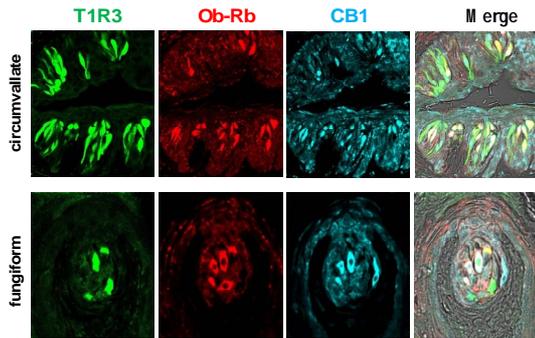


図1. T1R3-GFP細胞のOb-Rb及びCB1との共発現  
(上: 有郭乳頭; 下: 茸状乳頭)

の受容体(Lep: Ob-Rb, eCB: CB1)の共発現性について免疫組織化学的に検索した。その結果、甘味・うま味受容体コンポーネント T1R3-GFP 発現細胞の約 50% (有郭乳頭: 65%、茸状乳頭: 45%) (図1)が Ob-Rb/CB1 を共発現することが判明した。すなわち、Lep と eCB は on demand で各々の調節系を活性化できる状態になっていることが示唆された。そこで、次に Lep と eCB が慢性的・恒常的に働いているのかど

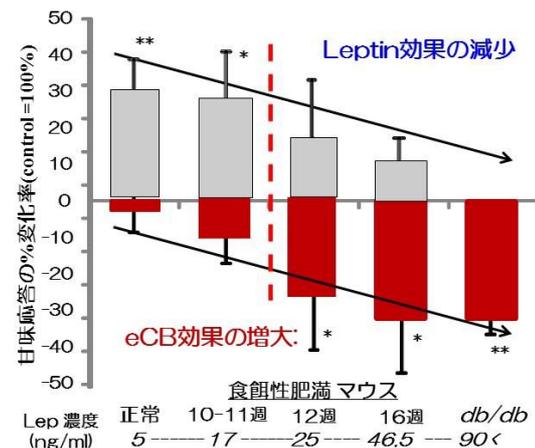


図2 Lep 及び eCB アンタゴニストの甘味応答への影響: Lep 濃度上昇に伴い Lep 効果が低下し、eCB 効果が増大する。

うかを調べるために Ob-Rb と CB1 のアンタゴニスト投与 [Lep: Lep-mutant (L39A/D40A/F41A), CB1: AM251] により鼓索神経の甘味応答が変化するかどうか調べた。その結果、正常やせマウスでは、AM251 の効果はなく Lep-mutant により応答増大が起こり通常 Lep の抑制下にあることが判明した。それに対し、Ob-Rb 変異系 db/db マウスでは

AM251 投与により抑制され、慢性的に eCB による感度増強が起こっていることが判明した。そこで、食餌誘導性肥満マウスを用い、Lep/eCB 効果の変化を調べたところ、肥満に伴い甘味感受性が Lep による抑制から eCB による増強に移行し、その移行は血中 Lep 濃度が 20ng/ml あたりで起こることが分かった(図 2)。

次に、正常やせマウスで恒常的に働く Lep の効果について味細胞・単一神経線維レベルで検索した。まず、T1R3-GFP 発現を指標に味細胞の応答を調べると、味細胞は甘味とうま味の両方とそれぞれに応答する群に分かれた。同系統マウスで神経線維応答を調べると、神経線維も同様の群に分類されることが分かった(Niki et al, Cell Mol Neurobiol, 2011; Yasumatsu et al, J Physiol, 2012; Kusuha et al, J Physiol, 2013)。そこで、T1R3-GFP 甘味応答細胞の Lep 効果を調べたところ、神経線維での解析と同様に Lep 濃度 10-20ng/ml で Lep 効果は頭落ちになること、すなわち味細胞は Lep 抵抗性が肥満の比較的早い段階で起こることが示唆された。

(2) マウス腸内分泌細胞系 STC-1 を用いて、味応答に対する Lep と eCB の影響について検索した。はじめに、RT-PCR 及び免疫組織化学法により、味覚関連分子発現について調べたところ、T1R1, T1R2, T1R3, gustducin, TRPM5, Ob-Rb, CB1, CB2 の発現と、Ob-Rb と T1R2 あるいは T1R3 の共発現が確認された。次に、カルシウムイメージング法で味応答を調べたところ、STC-1 細胞は NaCl, MSG, Saccharin, SC45647, denatonium など甘・苦・塩・酸・うま味の 5 基本味に応答することが確認された。そこで、Lep 処理に伴う変化を検索したところ、予想されたように甘味物質に対する応答のみが選択的に抑制された。濃度応答関係から類推すると Lep 効果は 20ng/ml で頭落ちとなり、味細胞とほぼ同様の結果が得られた。また、eCB の効果も味細胞と同様に甘味応答特異的に増強効果が見られることが判明した。さらに、Lep の消化管ペプチド GLP-1 の分泌に及ぼす効果を調べたところ、苦味物質 denatonium に対する GLP-1 の分泌には影響せず甘味物質刺激に対する分泌のみを有意に抑制することが分かった。加えて、Lep の細胞内標的として KATP チャネルの可能性について、アゴニストとアンタゴニストの共存下で Lep 効果を検索したところ、アンタゴニスト(KATP チャネル阻害で細胞は脱分極)共存下でその効果が消失し、KATP チャネルが標的である可能性が示唆された。また、同様の結果が味細胞においても得られている。

(3) 味覚応答における GLP-1 の関与について、GLP-1 受容体欠損マウスの味神経・行動応答を検索したところ、両実験共に野生型に比べ甘味物質に対する応答が選択的に低下していることが分かった(図 3-A: 鼓索神経応答結

果例)。さらに、甘味応答単一味細胞及び味蕾に与えた甘味刺激により濃度依存のかつ味質選択的に GLP-1 が放出されること(図 3-B)、さらに、甘味特異的な応答を示す単一

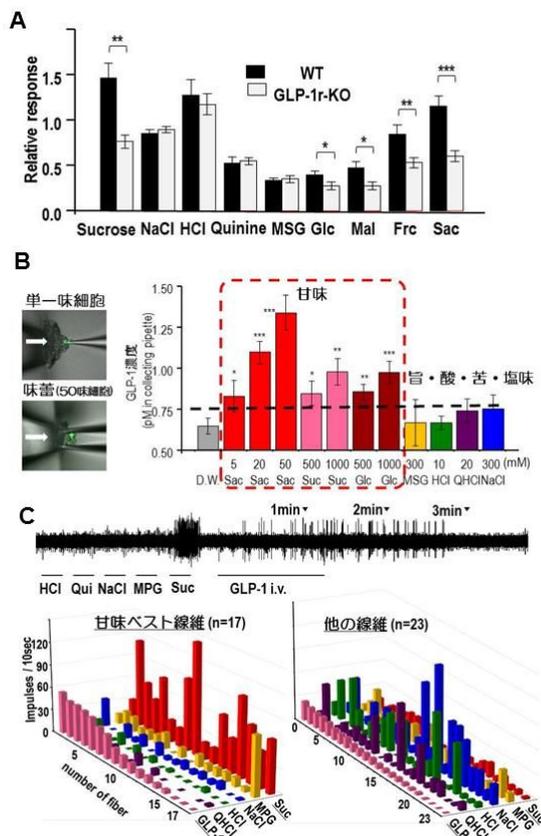


図 3 A: GLP-1 受容体欠損マウスの鼓索神経応答: 野生型に比べ甘味物質に対する応答が低下 B: 味細胞/味蕾の甘味刺激依存的 GLP-1 放出 C: 血中 GLP-1 投与に対する甘味ベスト及び他の神経線維の応答

神経線維に GLP-1 を血中投与すると、あたかも舌に甘味刺激が加わったかのように反応し、GLP-1 が直接甘味神経線維を興奮させることを見出した(図 3-C)。これらの結果から、GLP-1 は甘味受容細胞から甘味刺激特異的に分泌され、甘味伝達に關与する神経線維を興奮させ、甘味情報の伝達に寄与すること、また、GLP-1 受容体欠損マウスの甘味応答の低下の大きさから鑑み、甘味応答全体への寄与は部分的であることが示唆された。

(4) 上記のことより、味細胞からの味情報伝達に消化管ペプチド GLP-1 の関与が示唆されたので、ヒトの甘味感受性との連関を GLP-1 受容体の遺伝子多型性を調べ検討した。最初に 100 名について行った多型性解析で検出されたアミノ酸変異がある 5 か所について、味覚認知閾値と連関解析を 446 検体を用い行ったところ、そのうちの 2 ヶ所に共にマイナーアレルをもつ個体が甘味閾値と有意に連関することが認められた。以上の結果から、ヒトの甘味感受性にも GLP が関与し、甘味閾値と GLP-1 受容体遺伝子多型が連関したことが推定された。

## 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15件)すべて査読有

- 1). Horio N, Yoshida R, Yasumatsu K, Yanagawa Y, Ishimaru Y, Matsunami H, Ninomiya Y. Sour Taste Responses in Mice Lacking PKD Channels. *PLoS ONE* 6: E20007, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020007. Epub 2011 May 19.
- 2). Niki M, Takai S, Kusuhara Y, Ninomiya Y, Yoshida R. Responses to apical and basolateral application of glutamate in mouse fungiform taste cells with action potentials. *Cell Mol Neurobiol* 31: 1033-40, 2011, doi: 10.1007/s10571-011-9702-5
- 3). Nakamura Y, Goto TK, Tokumori K, Yoshiura T, Kobayashi K, Nakamura Y, Honda H, Ninomiya Y, Yoshiura K. The temporal change in the cortical activations due to salty and sweet tastes in humans. fMRI and time-intensity sensory evaluation. *Neuroreport* 23(6):400-4, 2012, doi: 10.1097/WNR.0b013e32835271b7.
- 4). Ohkuri T, Horio N, Stratford JM, Finger TE, Ninomiya Y. Residual chemoresponsiveness to acids in the superior laryngeal nerve in "taste-blind" (P2X2/P2X3 double-KO) mice. *Chem Senses*. 37(6): 523-32, 2012, doi: 10.1093/chemse/bjs004. Epub 2012 Feb 23.
- 5). Daly K, Al-Rammahi M, Arora D K, Moran AW, Proudman CJ, Ninomiya Y, Shirazi-Beechey SP. Expression of sweet receptor components in equine small intestine: relevance to intestinal glucose transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303(2):R199-208, 2012, doi: 10.1152/ajpregu.00031.2012. Epub 2012 May 2.
- 6). Nakashima K, Eddy MC, Katsukawa H, Delay ER, Ninomiya Y. Behavioral responses to glutamate receptor agonists and antagonists implicate the involvement of brain-expressed mGluR4 and mGluR1 in taste transduction for umami in mice. *Physiol Behav*, 105, 709-719, 2012, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.028. Epub 2011 Oct 8.
- 7). Yasumatsu K, Ogiwara Y, Takai S, Yoshida R, Iwatsuki K, Torii K, Margolskee RF, Ninomiya Y. Umami taste in mice uses multiple receptors and transduction pathways. *J Physiol* 590:1155-70, 2012, doi: 10.1113/jphysiol.2011.211920
- 8). Kawai M, Sekine-Hayakawa Y, Okiyama A, Ninomiya Y. Gustatory sensation of L- and D-amino acids in

humans. *Amino Acids* 43(6):2349-58, 2012, doi: 10.1007/s00726-012-1315-x. Epub 2012 May 16.

- 9). Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Semin Cell Dev Biol* 24: 226-31, 2013, doi: 10.1016/j.semcdb.2012.08.004. Epub 2012 Aug 25.
- 10). Daly K, Al-Rammahi M, Moran A W, Mrcello M, Ninomiya Y, Shirazi-Beechey S P. Sensing of amino acids by the gut expressed taste receptors, T1R1-T1R3, stimulates CCK secretion. *Am J Physiol Gastro Liver Physiol*. 304(3):G271-82, 2013, doi: 10.1152/ajpgi.00074.2012. Epub 2012 Nov 29.
- 11). Kusuhara Y, Yoshida R, Ohkuri T, Yasumatsu K, Voigt A, Hübner S, Maeda K, Boehm U, Meyerhof W, Ninomiya Y. Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *J Physiol* 591: 1967-85, 2013, doi: 10.1113/jphysiol.2012.236604.
- 12). Shigemura N, Iwata S, Yasumatsu K, Ohkuri T, Horio N, Sanematsu K, Yoshida R, Margolskee RF, Ninomiya Y. Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. *J Neurosci* 33: 6267-77, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5599-12.2013.
- 13). Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic  $\beta$ -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr J.*, 60: 1191-206. 2013, <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-028>
- 14). Godinot N, Yasumatsu K, Barcos ME, Pineau N, Ledda M, Viton F, Ninomiya Y, le Coutre J, Damak S. Activation of tongue-expressed GPR40 and GPR120 by non caloric agonists is not sufficient to drive preference in mice. *Neuroscience* 250(20-30), 2013, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.043. Epub 2013 Jul 4.
- 15). Iwata S, Yoshida R, Ninomiya Y. Taste transductions in taste receptor cells: basic tastes and moreover. *Curr Pharm Des* 20: 2684-92, 2014, doi: 10.2174/13816128113199990575

[学会発表](計18件)

- 1). Ninomiya Y, Yoshida R. Detection, modulation and transmission of gustatory sensory signals in the mouse periphery. *ECRO* 2011, sep 7-9, 2011, Manchester, UK

- 2) Ninomiya Y, Niki M, Jyotaki M, Ohkuri T, Yoshida R. Humoral modulation of sweet taste sensitivities for energy homeostasis. Neuroscience 2011, Sep 14-17, 2011, Yokohama, Japan
- 3) Ninomiya Y, Shigemura N. Taste receptors and transduction mechanisms for glutamate. 19<sup>th</sup> International Congress of Nutrition. Oct 4-9, Bangkok, Thailand.
- 4) Ninomiya Y. Receptor systems for umami taste detection. 2<sup>nd</sup> Sensory Chemistry Symposium. Nov.16, 2011, Barcelona, Spain
- 5) Ninomiya Y. Multiple receptor systems for umami taste perception in humans and mice. APPICON 57 Annual Conference. BK Anand Symposium on feeding behavior, Dec 13-17, 2011, New Dehli, India
- 6) 二ノ宮裕三. 味覚と肥満：口腔脳腸関連味覚センサーシグナルの食調節における役割. 第53回歯科基礎医学会学術大会 sep30-Oct 2, 2011, 長良川国際会議場, 岐阜
- 7) Ninomiya Y. Neural and Molecular Mechanisms of Taste Reception, Transmission and Modulation: A Sweet(Taste) Story that Began with Simple Mendel's Law. AChemS XXXIV, IFF Award Winner Lecture, April 25-28, 2012, Huntington Beach, CA, USA
- 8) Ninomiya Y, Niki M, Jyotaki M, Shigemura N, Ohkuri T, Yoshida R. Modulation of sensitivities of oral and gut taste sensors by endogenous factors. ISOT XVI, June 23-28, 2012, Stockholm, Sweden
- 9) Yoshida R, Niki M, Takai S, Ninomiya Y. Coding of taste signals in the mouse periphery. ISOT XVI, June 23-28, 2012, Stockholm, Sweden
- 10) Ninomiya Y. Modulation of sweet tastesensitivities by anorexigenic and orexigenic factors in mice. The 34 Jpn Soc. Comp Physiol Biochem., July 6, 2012, Hayama, Japan
- 11) 二ノ宮裕三 味覚と肥満：口腔・消化管における味覚受容と食調節 第22回日本歯科医学会総会, Nov. 9, 2012, 大阪
- 12) Ninomiya Y, Jyotaki M, Takai S, Niki M, Iwata S, Yasumatsu K, Yoshida R, Shigemura N. Detection, transmission and modulation of taste signals in oral cavity and gut. Linda Buck Symposium on Sensory Systems and Neural Circuit, Jan 11-12, 2013, Tokyo, Japan.
- 13) Ninomiya Y, Jyotaki M, Niki M, Yoshida R, Shigemura N. Endogenous humoral modulators of behavioral preference for sweet and salty tastes. The 90<sup>th</sup> Annual meeting of Jpn Physiol Socieity, March 27-29, 2013, Tokyo
- 14) 二ノ宮裕三 脂肪酸味覚受容と脂肪酸誘

- 導体エンドカンナビノイドによる味覚増強作用 第67回日本栄養食糧学会、May 24-26, 2013, 名古屋大学、名古屋
- 15) Ninomiya Y, Yasumatsu K, Yoshida R. Involvement of multiple populations of taste cells and afferent neurons in umami taste detection. ECRO 2013, Aug. 27~29, 2013, Leuven, Belgium
  - 16) Ninomiya Y., Neural and molecular mechanisms for detection, transmission and modulation of sweet taste. Distinguished researcher's seminar of Physiol Biophys Sch. Med, Virginia Commonwealth University, Oct 3, Richmond, Virginia, USA
  - 17) Ninomiya Y, Niki M, Jyotaki M, Yoshida R. Modulation of taste sensory signals in the oral-gut-brain system and its role in energy homeostasis The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Jpn Society for the study of obesity, Oct 12-13, Tokyo, Japan
  - 18) Takai S, Yasumatsu K, Iwata S, Inoue M, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y. GLP-1 may be involved in sweet specific taste transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. 11<sup>th</sup> ISMNTOP2013, Nov. 2-4, 2013, Fukuoka, Japan

〔図書〕(計1件)

- 1). 森本俊文、山田好秋、二ノ宮裕三、岩田幸一編、基礎歯科生理学第6版 2014 総ページ数 436

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

二ノ宮 裕三 (NINOMIYA Yuzo)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：50076048

(2)研究分担者

重村 憲徳 (SHIGEMURA Noriatsu)  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号：40336079

實松 敬介 (SANEMATSU Keisuke)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：70567502

(3)連携研究者

無し