

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450162

研究課題名(和文) 消化管分泌細胞の細胞膜機能変化を介しインクレチン分泌量を変化させる食品成分の研究

研究課題名(英文) Study on the dietary components which affect incretin secretion by regulating the function of plasma membrane in enteroendocrine cells

研究代表者

光武 進 (Mitsutake, Susumu)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：10344475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品に含まれるスフィンゴ脂質やポリフェノール、多糖が消化管内分泌細胞の細胞膜機能をどの様に変化させるのか、また、食品成分受容体の活性化キネティクスにどのような影響を与えるのかを細胞レベル、分子レベルで明らかにする事を目的とした。具体的には長鎖脂肪酸受容体GPR120に焦点をあて、まず簡便で、定量性の高いアッセイ方法の確立を目指し、「TGF 切断アッセイ」を導入した新規方法を確立した。この方法を用いて、1. 新規リガンド探索と、2. リノレン酸/GPR120シグナリングに影響を与える分子の探索、を行い、いくつかの新規リガンド、シグナル制御分子を見出す事に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined how the sphingolipids, polyphenols, or polysaccharide in food affect the function of plasma membrane on enteroendocrine cells. We focused on the receptor of long-chain fatty acid, GPR120, and developed a new method to assay fatty acid/GPR120 signaling employing TGF alpha- shedding assay. The method was convenient and showed high quantity. Using this method, we found several new ligand and molecules which affect alpha linolenic acid/GPR120 signaling.

研究分野：生化学

キーワード：GPR120 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで細胞膜に存在するリン脂質の一つであるスフィンゴミエリン (SM) の生理機能に関する研究を行ってきた。その中で「細胞膜上に発現する受容体群がその足場である SM の代謝制御により活性調節を受けている」という重要な事実を見いだした。具体的には、SM 合成酵素の一つ SMS2 が細胞膜の構造機能調節分子として、脂肪酸受容体の一つ CD36/FAT の活性調節因子として働く事を示した。興味深い事に SMS2 遺伝子欠損マウスは、食餌誘導性の肥満 / 耐糖能異常に耐性を示し、申請者らの予備的な実験では、摂餌量の減少と、インクレチンの分泌量に変化が見られた。この事は、SM の合成 / 代謝制御により細胞膜機能が変化し、細胞膜上の食品成分受容体の活性が変化し、インクレチンの分泌量に影響を与えている事を示唆している。上述の様に消化管分泌細胞上の食品成分受容体群は、脂肪酸、糖、ペプチド等の食品消化物に反応してインクレチンの分泌を行う。しかし同時に、食品中に含まれ消化吸収前の雑多な食品成分に暴露され、それらの中には、細胞膜の機能変化によって受容体の活性化キネティクスに影響を与える分子が存在する事が予想される。しかし、これまで受容体の活性化様式は、リガンドと受容体の相互作用が詳細に研究されてきた。一つには受容体の活性化を高感度に高い定量性で評価する方法が少なく、非リガンド性分子の影響を正確にモニターする事が難しい状況があった。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの患者は、国内で 940 万人にのぼり、その治療 / 予防法の開発は社会保障費抑制の観点からも社会的急務と言える。近年、食事由来の糖、脂肪酸、ペプチド等が消化管分泌細胞上に発現する受容体を刺激し、インクレチンと呼ばれるホルモンを分泌する事が明らかになった。インクレチンの一つ GLP-1 は、インスリンの分泌促進や食欲抑制等に働く事が知られ、現在、GLP-1 受容体やその分解酵素が II 型糖尿病改善薬のターゲットとして注目を集め、世界的な開発競争が繰り広げられている。この GLP-1 の働きは、食事成分に反応し、過剰なエネルギー摂取を抑制し、生体恒常性を維持するフィードバックシステムがヒトに元来備わっている事を示している。つまり食事由来成分が消化管分泌細胞上の受容体群を活性化し、インクレチン分泌を促す一連の詳細なメカニズムを解析し、応用する事で、ヒトが元来持つこのフィードバックシステムを活性化し、生活習慣病の発症を未然に防げるのではないかと考えられる。

当研究では、食品に含まれるスフィンゴ脂質やリモノイド等が消化管分泌細胞の細胞膜機能をどの様に変化させるのか。それに

よって食品成分受容体の活性化キネティクスとインクレチンの分泌量等にどのような影響を与えるのかを細胞レベル、分子レベルで詳細に明らかにする事を目的とした。まずその為に脂肪酸受容体 GPR120 に焦点を当て、A. GPR120 の脂肪酸による活性化キネティクス解析実験系の確立、B. SM 合成や細胞膜機能を変化させ GPR120 の活性化キネティクスを変化させる新たな食品成分の探索、の 2 つサブテーマを設け、細胞膜機能の変化をキーワードに雑多な食品成分が実は細胞膜の機能変化を通して食品成分受容体の活性制御 / インクレチンの分泌 / 生体恒常性の維持に関与している事を示そうと考えた。

3. 研究の方法

この研究では、非リガンド性物質が受容体の活性化に及ぼす影響を研究した。よって、定量性の高い実験系の構築が必要になった。そこで、まずはじめに脂肪酸受容体 GPR120 と脂肪酸の相互作用に焦点を絞り、受容体の活性化キネティクスを定量的に評価できる実験系を構築した。この実験系を用いて、様々な食品成分を対象にスクリーニングを行い GPR120 の活性化キネティクスに影響を及ぼす食品成分群を探索した。

4. 研究成果

GPR120 は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属し、これまで、その活性評価法としては、MAP キナーゼの一つ ERK のリン酸化をウェスタンブロッティングで確認する方法、リガンド結合に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を測定する方法、等が存在した。本研究ではさらに簡便で定量性の高い活性検出法を確立する為に、TGF shedding 法を導入した。TGF shedding 法は、ゲノム創薬に代表される orphan GPCR のリガンドスクリーニングの為に考案された方法で、特に数ある G タンパク質の中で G_q と共役した受容体の活性検出に向いている。GPR120 はこの G_q と共役しており、本研究では、TGF shedding 法を導入し、その感度、定量性を確認した。その結果、本法では、5 μ M という低濃度で リノレン酸による GPR120 の活性化を有意に検出する事に成功した。さらに本法で、様々な鎖長の脂肪酸に対する応答を検討した結果、長鎖脂肪酸のみが有意に活性化し、これまでの GPR120 のリガンド特性と同じ結果を得た。

確立した GPR120 活性定量システムを用いて、リノレン酸による hGPR120 のシグナリングに影響を与える非リガンド性の食品成分のスクリーニングを行った。その結果、テアフラビンおよびタンニン酸は リノレン酸による GPR120 の活性化を抑制し、ポルフィランオリゴ糖は GPR120 活性化を増強する可能性があることが見いだされた。テアフラビンが リノレン酸による GPR120 の活性化を抑制した要因として、テアフラビン

が リノレン酸と GPR120 との結合を物理的に阻害したことが考えられた。テアフラビンについては、今後ウエスタンブロット法などで更なる分析を行う必要がある。TG α 切断アッセイにて検出されたタンニン酸による GPR120 の活性化の阻害は、タンニン酸がタンパク質と結合して不溶性の被膜を形成する性質を持つため、細胞膜に作用し、GPR120 と リノレン酸との結合を阻害したためであると考察できる。

また、ポルフィランオリゴ糖に関して、リノレン酸との共添加は リノレン酸単独添加時と比較して、活性化を増強する傾向がみられた。ポルフィランオリゴ糖が リノレン酸による GPR120 の活性化を増強するメカニズムとして、一つ目に、ポルフィランオリゴ糖が リノレン酸と hGPR120 の結合の親和性を高めた可能性が考えられる。二つ目に、ポルフィランオリゴ糖が細胞膜の脂質マイクロドメインに作用した可能性が考えられる。脂質マイクロドメイン上に発現する GPCR の多くが、その活性化に脂質マイクロドメインでの発現を必要とする。ポルフィランオリゴ糖の細胞膜への作用により、脂質マイクロドメインの組成変化が起こり GPCR の活性様式も変化することが起こったと考察する事もできる。

詳細なメカニズムに関しては、今後の研究が必要であるが、今回得られた結果は、リガンドではない食品成分が GPR120 のシグナリングに影響を与える可能性を示し、食事に含まれる非栄養成分がインクレチンシグナリングを変化させるといった、新しい機能性を持つ事を示唆している。

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9件)

1. 光武進

細胞膜スフィンゴミエリンの代謝制御による新規細胞膜ダイナミズム
生化学(Journal of Japanese Biochemical Society) (2017) 89, 86-89

2. Sakamoto H, Yoshida T, Sanaki T, Shigaki S, Morita H, Oyama M, Mitsui M, Tanaka Y, Nakano T, Mitsutake S, Igarashi Y, Takemoto H.

Possible roles of long-chain sphingomyelins and sphingomyelin synthase 2 in mouse macrophage inflammatory response.

Biochem Biophys Res Commun.

(2017) 482(2): 202-207 査読有

3. M Taniguchi, T Tasaki, H Ninomiya, Y Ueda, K Kuremoto, S Mitsutake, Y Igarashi, T Okazaki, T Takegami

Sphingomyelin generated by sphingomyelin synthase 1 is involved in attachment and infection with Japanese encephalitis virus

Scientific Reports (2016) 6, 37829 査読有

4. Hamajima H, Matsunaga H, Fujikawa A, Sato T, Mitsutake S, Yanagita T, Nagao K, Nakayama J, Kitagaki H.

Japanese traditional dietary fungus koji *Aspergillus oryzae* functions as a prebiotic for *Blautia coccoides* through glycosylceramide: Japanese dietary fungus koji is a new prebiotic.

Springerplus. (2016), 5, 1321. 査読有

5. H Hamajima, A Fujikawa, M Yamashiro, T Ogami, S Kitamura, M Tsubata, S Tan, H Matsunaga, K Sawada, S Kumagai, N Hayashi, K Nagao, T Yanagita, T Oka, S Mitsutake, H. Kitagaki

Chemical Analysis of the Sugar Moiety of Mono-hexosylceramide Contained in Koji, Japanese Traditional Rice Fermented with *Aspergillus*

Fermentation (2016), 2(1), 2 査読有

6. Sawada K, Sato T, Hamajima H, Jayakody LN, Hirata M, Yamashiro M, Tajima M, Mitsutake S, Nagao K, Tsuge K, Abe F, Hanada K, Kitagaki H.

Glucosylceramide contained in Koji mold-cultured cereal confers membrane and flavor modification and stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* during coculture fermentation

Appl. Environ. Microbiol. (2015) 81, 3688-3698 査読有

7. Y. Hayashi, Y. Nemoto-Sasaki, T. Tanigawa, S. Oka, K. Tsuchiya, S.

Mitsutake, T. Sugiura, A. Yamashita
Sphingomyelin synthase 2, but not sphingomyelin synthase 1, is involved in HIV-1 envelope-mediated membrane fusion

J. Biol. Chem. (2014) 289: 30842-30856

査読有

8. H. Hanamatsu, S. Ohnishi, S. Sakai, K. Yuyama, S. Mitsutake, H. Takeda, Y. Igarashi
Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults.
Nutrition & Diabetes (2014), 4: e141 査読有

9. K. Yuyama, H. Sun, S. Sakai, S. Mitsutake, M. Okada, H. Tahara, J. Furukawa, N. Fujitani, Y. Shinohara, Y. Igarashi
Decreased amyloid- pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice.
J. Biol. Chem. (2014) 289: 24488-24498 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 「細胞膜脂質と食品機能」
光武 進
日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会
80 周年記念シンポジウム～農芸化学の未来を拓くフロンランナー～
2016 年 9 月 15 日～16 日 長崎大学文教キャンパス、長崎

2. 「細胞膜機能を変化させる食品成分の開発を目指して」
光武 進
第 19 回 生物機能研究会 2015 年 7 月 4 日
佐賀大学本庄キャンパス、佐賀

3. 「麹のスフィンゴ脂質の機能性について」
光武 進
日本農芸化学会大会シンポジウム ～麹菌の機能性研究と育種開発の新潮流～
2015 年 3 月 27 日～29 日 岡山大学津島キャンパス、岡山

4. 「スフィンゴ脂質合成 / 代謝酵素による細胞膜機能制御」
光武 進
第 38 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
2014 年 9 月 11 日～13 日 レイクサイドホテル久山、福岡

5. 「スフィンゴ脂質合成 / 代謝制御による細胞膜機能制御とその破綻によるメタボリックシンドローム」
光武 進
第 8 回 レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会
2014 年 8 月 21 日～23 日フェニックスシーガイアリゾート、宮崎

6. 「スフィンゴ脂質研究の医薬品応用を目指して」
光武 進
日本農芸化学会大会シンポジウム ～スフィンゴ脂質研究の新展開～
2014 年 3 月 28 日～30 日 明治大学生田キャンパス、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光武 進 (Mitsutake Susumu)
佐賀大学農学部生命機能科学科 准教授
研究者番号: 10344475

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし