

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461325

研究課題名(和文) 脂肪細胞の分化/機能調節におけるT1R3ホモマー非定型的甘味受容体の機能解明

研究課題名(英文) Role of non-canonical T1R3 homomeric sweet receptor in adipogenesis and glucose transport

研究代表者

柴田 宏 (Shibata, Hiroshi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：20235584

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)：3T3-L1細胞に発現するT1R3ホモダイマー型甘味受容体(T1R3/T1R3)の活性化が脂肪分化を抑制するメカニズムを明らかにした。T1R3/T1R3はGsと共役して微小管脱重合を惹起し、RhoGEF(GEF-H1)の活性化を介してRho-ROCK経路を活性化し、Akt-FoxO1のリン酸化抑制によりPPAR $\alpha$ とC/EBP $\alpha$ の発現が抑制されることが示された。また同受容体は成熟脂肪細胞において、インスリンによるGLUT4のトランスロケーションと糖取り込みを抑制することが示された。またマクロファージにおいては炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ とIL-6)産生を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：3T3-L1 cells express a functional sweet taste receptor as a T1R3 homomer that negatively regulates adipogenesis by a G $\alpha$ s-mediated but cAMP-independent mechanism. In this study, we show that stimulation of this receptor induced microtubules disassembly in 3T3-L1 preadipocytes, which was attenuated by overexpression of the dominant-negative mutant of G $\alpha$ s (G $\alpha$ s-G226A) and mimicked by overexpression of the constitutively active mutant of G $\alpha$ s (G $\alpha$ s-Q227L). Sweetener also activated RhoA and Rho-associated kinase (ROCK), which was attenuated with by knockdown of GEF-H1, a microtubule-localized RhoGEF. Overexpression of the dominant-negative mutant of RhoA (RhoA-T19N) blocked sweetener-induced dephosphorylation of Akt and repression of PPAR $\alpha$  and C/EBP $\alpha$  in the early phase of adipogenic differentiation. Thus, the T1R3 homomeric sweet taste receptor negatively regulates adipogenesis through G $\alpha$ s-mediated microtubule disassembly and consequent activation of the Rho/ROCK pathway.

研究分野：細胞生物学, 代謝学

キーワード：甘味受容体 脂肪細胞 微小管 Rho サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

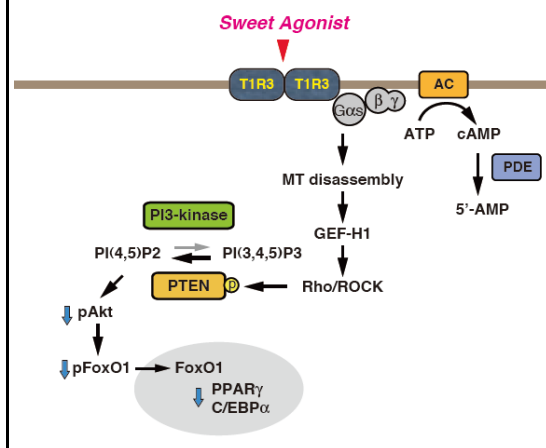
ヒトを含めた動物の食行動・食習慣と密接に関連する味覚の受容は、主として舌の味蕾に発現する味覚受容体によって行われる。2000年から2010年にかけて、5つの基本味とされる苦味、甘味、うま味、酸味、塩味を感知する受容体が次々と同定されたが、味覚受容体に関する最近の驚くべき発見は、味覚受容体が味蕾以外の組織にも発現し機能していることが相次いで報告されたことである(2012 Nature 特集 OUTLOOK 'Taste')。我々は、特に、栄養素である糖質の感知に預かる甘味受容体が小腸内分泌細胞に発現しており、インクレチン (GLP-1) の分泌や Na 共役型グルコース輸送体 (SGLT1) の発現調節を介して、糖質の吸収に関与するという報告 (Margolskee ら, 2007) に注目し、甘味受容体は単に栄養素の感知だけではなく、エネルギー代謝の調節により広範に関与しているのではないかという着想に至った。その後の膵細胞や視床下部における甘味受容体の発現の報告 (Nakagawa ら, 2009; Ren ら, 2009) や、心筋におけるうま味受容体の発現の報告 (Foster ら, 2013) は、この着想が全く誤ったものではないことを支持している。

我々は脂肪細胞における甘味受容体の発現と機能に関してこれまで検討を行い、甘味受容体が前駆脂肪細胞に発現し、脂肪細胞の分化を負に制御していることを世界で始めて明らかにし報告した (Masubuchi et al. PLOS ONE 2013)。舌の味蕾の味細胞においては、甘味受容体の分子実体は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である T1R2 と T1R3 のヘテロダイマー (T1R2/T1R3) であり、三量体型 G 蛋白 gustducin と共役し、ホスホリパーゼ C (PLC) を活性化することにより甘味シグナルを伝達すると一般には考えられている。しかし、興味深いことに、3T3-L1 細胞においては味細胞とは異なり、T1R3 が T1R1 や T1R2 と比しドミナントに発現しており、T1R3 はホモダイマーを形成し甘味受容体として機能することが想定された。また、この T1R3 ホモダイマーは gustducin その他の Gq ファミリーではなく、Gs と共役しており、Gs 活性化を介するが cAMP の増加を介さないメカニズムで脂肪分化を抑制することを明らかにした。

では cAMP 非依存性に脂肪細胞分化を抑制する Gs 以降のシグナルは何なのか、というのが本研究開始の背景・動機となった。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、申請者が得た上記の成績に基づき、この Gs 以降の cAMP 非依存性脂肪分化抑制シグナル機構を明らかにすることにある。近年、こうした非定型的 (non-canonical) な三量体型 G 蛋白の機能が報告されている (総説として Roychowdhury S, et al. 2008 等)。シカゴ大学イリノイ校の Mark Rasenick らは、そうした non-canonical な Gs の機能として、Gs によるチュブリン GTPase 活性化を介した微小管脱重合作用を報告している (Yu et al. 2009; Sarma et al. 2015)。一方、微小管脱重合は低分子量 G 蛋白 Rho の活性化因子である Rho-GEF の微小管からの遊離とそれに伴う活性化により Rho を活性化することが知られている (Krendel M et al. 2002)。Rho は脂肪分化の抑制因子であること (Sordella et al. 2003; Bryan et al. 2005; Noguchi et al. 2007; Horii et al. 2009) から、Gs 下流の分化抑制シグナル機構として図 2 に示す作業仮説モデルが考えられる。本研究においては、微小管と Rho に着目し、このモデルの検証を柱として研究を進めていく予



定である。

図 2 T1R3 甘味受容体によるシグナル機構

本研究のもう一つの目的は、前駆脂肪細胞以外の細胞、とくに成熟脂肪細胞および脂肪組織の慢性炎症に関わるマクロファージにおける T1R3 ホモダイマー受容体の機能を明らかにすることにある。我々の検討により

T1R3 ホモダイマー受容体の発現は脂肪分化に伴い著明に増加することが明らかになっている (Masubuchi et al, 2013)。したがって、上記モデルの検証と並行して、成熟脂肪細胞の機能、特にインスリンによるグルコース取込み促進作用と炎症性サイトカイン産生における T1R3 ホモダイマー受容体の機能を明らかにすることを第2の目的としている。また、T1R3 の生理的機能はまだ完全には明らかにはされていないが、T1R3 ノックアウトマウスは高脂肪・高カロリー食下において、野生型と比し、脂肪組織重量が少なく、また脂肪細胞のサイズも小さいことが報告されている (Simon et al. )。我々の予備検討の結果では、マクロファージにおいても T1R3 が T1R1, T1R2 と比しドミナントに発現していることから、マクロファージにおいても T1R3 がホモダイマー型受容体として機能している可能性が示唆された。したがって、本研究においては、マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生における T1R3 ホモダイマー受容体の機能を明らかにすることにより、脂肪組織における慢性炎症成立における T1R3 の関与を明らかにすることを第3の目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) T1R3 ホモダイマー受容体による脂肪分化抑制シグナル機構の検討。

26年度は、主として、前項図2で提示した作業仮説モデルの検証を中心に、T1R3 ホモダイマー甘味受容体による脂肪分化抑制シグナル機構の解明をすすめた。

**1-1. T1R3 ホモダイマー甘味受容体刺激の微小管細胞骨格に対する効果：**3T3-L1 細胞において T1R3 甘味受容体刺激により Gs 活性化と微小管の脱重合が起きるか検討した。その結果、3T3-L1 前駆脂肪細胞をスクラロース・サッカリンなどの人工甘味料で刺激することにより、微小管の脱重合とアクチン線維の増生が起こることを蛍光免疫法により形態学的に確認した。次に、この作用が Gas を介するものかどうかを Gas のドミナント・ネガティブ変異体 (Gas-G226A)、構成的活性化型変異体 (Gas-Q227L) およびコレラ毒素を用いて検討した。また、Gas による微小管脱重合作用が、果たして  $\beta$  アドレナリン作動性

受容体 (BAR) や GLP-1 受容体 (GLP-1R) など他の Gs 共役型受容体でも普遍的に見られるものであるかどうかを、イソプロテレノール、GLP-1 刺激により検討した。この検討は、従来 cAMP では解釈が困難な Gs 共役型受容体の作用の解明に新たな知見を与える可能性がある。

### 1-2. 微小管脱重合による Rho-ROCK 経路活性化の検討：

微小管脱重合により Rho-GEF である GEF-H1 が微小管から遊離して活性化されることが Scripps 研究所のグループにより報告されている (Krendel M et al. 2002)。まず、甘味刺激による微小管脱重合により Rho の活性化が起こるかを、Rhotekin-Rho 結合ドメイン (RBD) を用いた pull-down アッセイおよび Rho 活性プローブである Raichu1237X (京都大学・松田道行博士より供与) を用いたリアルタイム・イメージングにより検討した。さらに ROCK が活性化するかどうかに関しては、ROCK 特異的基質である MYPT1 (ミオシンホスファターゼ調節サブユニット) のリン酸化をみる。以上の検討には、コントロールとして微小管脱重合剤である nocodazole を用いた。また、甘味刺激による Rho-ROCK 経路の活性化が GEF-H1 を介するかどうかについて、3T3-L1 細胞に GEF-H1 が発現し微小管と共局在しているかどうかを免疫蛍光抗体法似寄り確認し、次に、GEF-H1 のノックダウンにより同作用が GEF-H1 を介するかどうか検討した。

### 1-3. Rho-ROCK 経路による脂肪細胞分化抑制機構の検討：

脂肪分化初期において中心的役割を担う転写因子である PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の発現は PI3 キナーゼによって活性化される Akt の基質である転写因子 FoxO1 により抑制的に調節を受ける。そこでまず、スクラロース等の甘味刺激により、脂肪分化初期 (48 時間以内) における Akt および FoxO1 のリン酸化が抑制されるか検討した。またこれらの作用が Rho-ROCK 経路に依存することを Rho ドミナント・ネガティブ変異体 (Rho-T19N)、Rho 阻害剤ボツリヌス菌 C3 酵素、ROCK 阻害剤 Y-27632 等を用いて検討した。一方、Rho 経路と PI3 キナーゼ経路を繋ぐシグナルとして、PI3 キナーゼに拮抗する脂質ホスファターゼ PTEN が ROCK による C2 ドメインのリン酸化 (S229, T232,

T319, T321)により活性化されることが知られている (Li et al. 2005)。そこで、甘味刺激による Akt および FoxO1 リン酸化抑制が PTEN のリン酸化を伴うかを pS229-PTEN 特異的抗体 (ABGENT 社) を用いて検討した。

(2) 成熟脂肪細胞における T1R3 甘味受容体の機能を明らかにする。

前駆脂肪細胞で得られた知見に基づき、成熟脂肪細胞における T1R3 甘味受容体の機能の検討を行った。我々の検討では、成熟脂肪細胞における T1R1 および T1R2 の発現は非常に僅かで、かつ T1R3 が前駆脂肪細胞よりもはるかに高レベルで発現している (Masubuchi et al. 2013)。したがって、成熟脂肪細胞においても T1R3 はホモダイマー型受容体として発現し、甘味刺激により Gs と共役して、cAMP 非依存性に微小管脱重合と Rho-ROCK 経路活性化、Akt の抑制をもたらすことが十分予想された。

**1-1 . インスリン感受性グルコース取込みにおける T1R3 甘味受容体の機能の検討:** 微小管と Akt は、共にインスリンによる GLUT4 (インスリン感受性グルコーストランスポーター) のトランスロケーションとグルコース取込み促進作用において、極めて重要な役割を担う細胞骨格とシグナル分子である。したがって、まずインスリン刺激によるグルコース取込み促進作用に対する T1R3 甘味受容体刺激の効果を検討した。甘味受容体刺激により、インスリンによる 2-デオキシグルコース (2DG) 取り込み促進作用が抑制されるならば、甘味刺激により、GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションが抑制されるかどうかを、蛍光免疫法およびシヨ糖密度勾配膜分画法により GLUT4 の細胞膜分画へのトランスロケーションに対する効果を検討する。

一方で、甘味受容体刺激によるグルコース取込み抑制機構について検討した。これに関しては前駆脂肪細胞と同様に、(1) Gs 依存性に関しては Gas ドミナント・ネガティブ変異体 (Gas-G226A) と構成的活性型変異体 (Gas-Q227L) およびを用いた検討を行った。(2) cAMP 依存性に関してはコレラ毒素とフォルスコリンの効果を検討した。

(3) 脂肪細胞-マクロファージ相互作用における T1R3 甘味受容体の機能を明らかにする。

3T3-L1 細胞における甘味受容体刺激による単球/マクロファージ遊走因子 MCP-1 の発現への効果を検討した。またマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞およびマウス腹腔マクロファージを用いて、T1R1, T1R2, T1R3, CaSR (カルシウム感受性受容体) の発現を検討した。さらに甘味受容体刺激による TNF- $\alpha$  および IL-6 の発現を検討した。さらにこれら炎症性サイトカイン産生における Rho-ROCK 経路の関与について検討した。

#### 4 . 研究成果

(1) T1R3 ホモダイマー受容体による脂肪分化抑制シグナル機構

3T3-L1 前駆脂肪細胞をスクラロース・サッカリンなどの人工甘味料で刺激することにより、微小管の脱重合とアクチン線維の増生が起こることを確認した。さらに、この作用が G<sub>s</sub> のドミナント・ネガティブ変異体 (G<sub>s</sub>-G226A) により抑制されること、また逆に構成的活性型変異体 (G<sub>s</sub>-Q227L) およびコレラ毒素により再現されることを確認した。また、アドレナリン作動性受容体 (AR) や GLP-1 受容体 (GLP-1R) など他の G<sub>s</sub> 共役型受容体刺激によっても微小管脱重合がみられることを確認した。

3T3-L1 細胞にも GEF-H1 が発現し微小管と共局在していることを確認し、甘味刺激による微小管脱重合により Rho および ROCK の活性化が起こることを、Rhotekin-Rho 結合ドメイン (RBD) を用いた pull-down アッセイおよび Rho 活性プローブである Raichu1237X を用いたリアルタイム・イメージングにより確認した。

脂肪分化に重要な転写因子である PPAR と C/EBP の発現は Akt の基質である転写因子 FoxO1 により抑制的に調節を受ける。今回、スクラロース等の甘味刺激により、脂肪分化初期において Akt および FoxO1 のリン酸化が抑制されること、またこれらの作用が Rho-ROCK 経路に依存することを確認し、さらに PI3 キナーゼに拮抗する脂質ホスファターゼ PTEN の発現量が甘味受容体刺激により増加することを確認した。

以上の結果から，我々の作業仮説モデルが正しいことが証明された。(原著論文として発表。PLoS One. 2017, 12 (5): e0176841.)

(2)成熟脂肪細胞における T1R3 甘味受容体の機能

分化した 3T3-L1 脂肪細胞を甘味受容体アゴニストであるスクラロースで刺激することにより，微小管の脱重合と Rho 活性化がみられ，インスリンによる Akt 活性化を抑制した。これらの作用は G<sub>s</sub> を活性化するイソプロテレノール，コレラ毒素あるいは G<sub>s</sub> の構成性活性型変異体である G<sub>s</sub>-Q227L の過剰発現により再現され，G<sub>s</sub> のドミナント・ネガティブ変異体 G<sub>s</sub>-G226A 過剰発現により阻害されたが，フォルスコリンは無効であった。一方，スクラロースおよびイソプロテレノール刺激はインスリンによるグルコース輸送促進および GLUT4 トランスポレーションを抑制した。以上の結果から，脂肪細胞における T1R3 ホモマー甘味受容体刺激はインスリン依存性グルコース輸送を抑制すること，またこのメカニズムとして G<sub>s</sub> を介した微小管脱重合と Rho 活性化による Akt 活性化の抑制が関与することが示された。(2014 年第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会にて発表)

(3)脂肪細胞-マクロファージ相互作用における T1R3 甘味受容体の機能

マクロファージにおける栄養素感知受容体 (T1Rs および CaSR (カルシウム感知受容体)) の発現を検討したところ，RAW264.7 細胞およびマウス腹腔マクロファージには T1R3 がドミナントに発現しており，マクロファージにおいても T1R3 ホモマーが甘味受容体として機能すると考えられた。人工甘味料であるスクラロースによる T1R3 ホモダイマー受容体の活性化により，微小管の脱重合と Rho GTPase の活性化がみられ，マクロファージの遊走が阻害された。この作用はフォルスコリンでは再現できず，脂肪細胞と同様に G<sub>s</sub> 依存性だが cAMP 非依存性シグナルによると考えられた。またスクラロース刺激は，炎症性サイトカイン (IL-6 および TNF- $\alpha$ ) の産生を促進したが，この作用は Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 により抑制された。また T1R3 ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージではスクラロースによる炎症性サ

イトカイン産生促進作用は消失した。以上の結果から，マクロファージにおいて T1R3 甘味受容体は微小管脱重合と Rho 活性化により，遊走阻害と炎症性サイトカイン産生促進に関与することが示された。同受容体の阻害薬は，炎症性サイトカインの産生抑制により慢性炎症を抑制することが期待され，生活習慣病治療薬としての可能性が示唆された。(2017 年第 60 回日本糖尿病学会年次学術総会にて発表)

## 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)

Masubuchi, Y., Nakagawa, Y., Medina, J., Nagasawa, M., Kojima, I., Rasenick, M.M., Inagaki, T., Shibata, H.  
T1R3 homomeric sweet taste receptor regulates adipogenesis through G<sub>s</sub>-mediated microtubules disassembly and Rho activation in 3T3-L1 cells. PLoS One. 2017, 12 (5): e0176841. doi: 10.1371/journal.pone.0176841. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

柴田 宏，中川祐子，小島 至  
インスリンによる過酸化水素産生亢進におけるペルオキシレドキシシン1の役割  
日本糖尿病学会年次学術集会 2016年5月  
(京都市)

Masubuchi, Y., Kojima, I., Shibata, H.  
Two Divergent Signals from the G<sub>s</sub>-Coupled T1R3 Homomeric Sweet Taste Receptor Converge at FoxO1 to Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Cells.  
米国糖尿病学会年次学術集会。2015年6月(アメリカ合衆国ボストン市)

増淵洋祐，小島 至，柴田 宏  
G<sub>s</sub>共役T1R3ホモマー甘味受容体による脱アセチル化酵素SIRT2活性化と脂肪分化抑制  
日本糖尿病学会年次学術集会 2015年5月  
(下関市)

増淵洋祐，中川祐子，馬 金輝，長澤雅裕，  
小島 至，柴田 宏

Gs共役型T1R3ホモマー甘味受容体による微小管脱重合とRho活性化を介したインスリン依存性グルコース輸送の抑制  
日本糖尿病学会年次学術集会 2014年5月  
(大阪市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 宏 (SHIBATA, Hiroshi)  
群馬大学・生体調節研究所・准教授  
研究者番号：20235584

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )