



Title	苦味受容体の口腔以外の組織における発現プロファイル及び脂肪細胞における機能解析
Author(s)	木村, 駿介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14815号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14815
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86642
Type	doctoral thesis
File Information	Kimura_Shunsuke.pdf



苦味受容体の口腔以外の組織における発現プロファイル及び

脂肪細胞における機能解析

Analysis of bitter taste receptor expression in extraoral tissues

and their function in adipocytes

北海道大学 大学院農学院

生命フロンティアコース 博士後期課程

木村 駿介

目次

要約.....	1
図表目次.....	3
第1章 序論.....	5
1-1. 味覚と味覚受容体.....	5
1-2. 口腔で味覚を感知する意義.....	9
1-3. 口腔以外における味覚受容体の発現とその役割.....	11
1-3-1. 口腔以外における甘味受容体の発現とその役割.....	13
1-3-2. 口腔以外の上皮性組織と非上皮性組織における苦味受容体 (T2R) の発現とその役割.....	14
1-3-3. T2R と肥満や糖尿病、糖・脂質代謝.....	18
1-4. 非上皮性組織に発現する T2R の機能を調べる意義.....	20
1-5. 本研究の目的.....	20
第2章 実験材料及び方法.....	21
2-1. 機器類.....	21
2-2. 細胞培養.....	22
2-3. 細胞生存率試験.....	25
2-4. 3T3-L1 細胞の分化阻害試験.....	25
2-5. 動物実験.....	26
2-6. mRNA 発現解析.....	27
2-6-1. total RNA の抽出と逆転写.....	27
2-6-2. PCR による遺伝子発現解析.....	27
2-6-3. RT-qPCR による遺伝子発現の定量解析.....	30
2-7. 3T3-L1 細胞へのプラスミドベクターのトランスフェクション.....	31
2-8. マウス組織と細胞株の T2R 発現解析.....	31
2-8-1. マウス組織の T2R 発現解析.....	31
2-8-2. マウス細胞株の T2R 発現解析.....	31
2-9. T2R の発現レベルに影響を与える因子の解析.....	32
2-9-1. マウス細胞株での T2R 発現変動解析.....	32

2-9-2. マウス組織での T2R 発現変動解析	33
2-10. RNAseq による遺伝子発現解析	34
2-11. T2R 過剰発現株の作製	35
2-12. T2R の過剰発現がエピカテキンの 3T3-L1 分化阻害に与える影響の 解析	35
2-13. 統計解析.....	36
 第 3 章 マウス組織に発現する T2R プロファイル.....	37
3-1. マウス非上皮性組織に発現する T2R プロファイル.....	37
3-2. マウス細胞株に発現する T2R プロファイル	44
3-3. C57BL/6J マウスと 3T3-L1 細胞に発現する T2R の塩基配列比較....	48
3-4. まとめ	49
 第 4 章 マウス脂肪組織の T2R 発現レベルに影響を与える因子	50
4-1. マウス細胞株での T2R 発現変動	51
4-1-1. 細胞分化による T2R 発現変動	51
4-1-2. 苦味化合物刺激による T2R 発現変動.....	54
4-1-3. 培養条件の違いによる T2R 発現変動.....	58
4-2. マウス脂肪組織での T2R 発現変動.....	59
4-2-1. 絶食による T2R 発現変動	59
4-2-2. 苦味化合物刺激による T2R 発現変動.....	61
4-3. まとめ	63
 第 5 章 3T3-L1 脂肪細胞における T2R の機能	64
5-1. キニーネやエピカテキンで刺激した 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子発現プ ロファイル	65
5-2. T2R が 3T3-L1 細胞の分化に与える影響	80
5-3. まとめ	85
 第 6 章 総合考察	86
6-1. マウス組織に発現する T2R プロファイルに関して.....	86

6-1-1. 先行報告との T2R 発現解析結果の比較	86
6-1-2. マウス組織と細胞株に共通して発現する T2R の機能推定	90
6-2. T2R の発現レベルに影響を与える因子に関して	92
6-3. RNAseq による網羅的遺伝子発現解析に関して	95
6-4. 3T3-L1 脂肪細胞における T2r126、108 の機能.....	97
第7章 結語	98
参考文献.....	101
付録.....	110
謝辞.....	112

略号表

AHL	N-acyl homoserine lactone
AITC	allyl isothiocyanate
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATP	adenosine tri-phosphate
CALMH1	calcium homeostasis modulator 1
CALMH1/3	calcium homeostasis modulator1/3
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CA	camphor
CCK	cholecystokinin
CCK-8	cell counting kit - 8
C/EBP α	C-terminal enhancer binding protein alpha
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DAG	diacylglycerol
DB	denatonium benzoate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
EC	epicatechin
EDTA2Na	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
EGCG	epigallocatechin gallate
EM	emetine
ENaC	epithelial sodium channel
ERK/S6	extracellular-signal-regulated kinase/ribosomal protein S6
eWAT	epididymal white adipose tissue
FBS	fetal bovine serum
FPKM	fragments per kilobase of exon per million mapped fragments

G α gust	α -gustducin
gDNA	genome deoxyribonucleic acid
GIP	glucose dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLUT4	glucose transporter type 4
GO	gene ontology
GPCR	G protein-coupled receptor
HS	horse serum
HSV	herpes simplex virus
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IPA	ingenuity pathway analysis
IP ₃	inositol triphosphate
iWAT	inguinal white adipose tissue
mRNA	messenger ribonucleic acid
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
OTOP1	otopetrin 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PIP ₂	phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate
PKD1L3	polycystic kidney disease 1-like 3
PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1
PKG	protein kinase G
PLC β 2	phospholipase C β 2
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PROP	6-propyl-2-thiouracil
Q	quinine
RE	resveratrol

RT-qPCR	real time quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNAseq	ribonucleic acid sequencing
SAT	subcutaneous adipose tissue
SGLT1	sodium glucose cotransporter 1
SNP	single nucleotide polymorphism
TAE	tris acetate EDTA
T1R1	taste 1 receptor 1
T1R2	taste 1 receptor 2
T1R3	taste 1 receptor 3
T2R	taste 2 receptor
TRPM5	transient receptor potential melastatin 5
TNF α	tumor necrosis factor- α
VR-1	vanilloid receptor 1
VAT	visceral adipose tissue
WAT	white adipose tissue

要約

苦味受容体 (T2Rs) は気道や消化管などの上皮性組織では外来の毒物・異物を検知して排除する役割を担っている。しかしながら、非上皮性組織に発現している T2R は上述したような役割とは異なる役割を担っていることが示唆されている。また、T2R のリガンドとなる苦味成分が糖や脂質の代謝機能調節に関わっている可能性を示唆する報告も複数あることから、非上皮性組織に発現している T2R は代謝機能調節に関わっているのではないかと仮説を立て、本研究に着手した。

本研究では、非上皮性組織に発現している T2R の役割解明を目的として、まず、非上皮性組織とそのモデル細胞株を対象として T2R 発現プロファイルを解析し、その後、脂肪組織や脂肪細胞株の T2R 発現に影響を与える因子や、脂肪細胞の分化における T2R の役割について解析した。

マウスにおいて 4 種類の非上皮性組織 (褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋、肝臓) に加えて小腸の T2R の発現プロファイルを RT-PCR 法を用いて解析した。白色脂肪のモデルである 3T3-L1 細胞と骨格筋のモデル細胞である C2C12 細胞についても同様に解析した結果、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* がマウスの組織・細胞株に共通して他の T2R と比較して高レベルで発現していた。

T2R の発現レベルは細胞分化や外部環境からの刺激により変動することが知られているため、3T3-L1 細胞と C2C12 細胞に発現している T2R の発現レベルに細胞分化が与える影響を解析した。その結果、細胞分化による T2R 発現レベルの上昇を確認した。また、脂肪細胞における T2R 発現レベルの変動に影響する因子を探索したところ、3T3-L1 脂肪細胞では苦味化合物刺激や血清飢餓により、マウス脂肪組織では苦味化合物刺激や絶食により、T2R の発現が上昇することが明らかになった。

さらに、苦味化合物であるエピカテキンで刺激した 3T3-L1 脂肪細胞のトランスクリプトーム解析において、分化に関わる転写因子である *Egr2*、*Nr4a* の発現が上昇していた。

また、T2r126、108 を過剰発現させた 3T3-L1 細胞では、3T3-L1 の分化が阻害された。したがって、T2r126、108 は、3T3-L1 細胞の分化調節に関わっていることを示した。

以上のように本研究では、T2R が脂肪細胞においても機能していることを示し、T2r126、108 が脂肪細胞の分化調節に関わっていることを明らかにした。

図表目次

図 1 -1. 甘味、旨味、苦味を司る G タンパク質共役型の味覚受容体とそのシグナル伝達経路.....	7
図 1 -2. 酸味、塩味を司るイオンチャネル型の味覚受容体	8
図 1 -3. 基本味と対応する味物質、受容体分子、生理的意義	10
図 1 -4. 口腔および口腔以外の組織における甘味受容体 T1R2/T1R3 もしくは Gα gust、甘味受容体と苦味受容体 (T2R) の発現部位	12
図 1 -5. T2R によるヒト副鼻腔上皮細胞における自然免疫の調節機構	15
図 3 -1. C57BL/6N マウスの褐色脂肪組織における T2R 発現	39
図 3 -2. C57BL/6N マウスの精巣上体周囲白色脂肪組織 (eWAT) における T2R 発現.....	40
図 3 -3. C57BL/6N マウスの骨格筋 (大腿筋) における T2R 発現	41
図 3 -4. C57BL/6N マウスの小腸 (十二指腸、回腸、空腸) における T2R 発現.....	42
図 3 -5. C57BL/6N マウスの肝臓における T2R 発現	43
図 3 -6. 未分化 3T3-L1 細胞における T2R 発現.....	45
図 3 -7. 分化後 3T3-L1 細胞における T2R 発現.....	45
図 3 -8. 未分化 C2C12 細胞における T2R 発現.....	46
図 3 -9. 分化後 C2C12 細胞における T2R 発現.....	46
図 4 -1. 3T3-L1 細胞の分化における T2R 発現の変動.....	52
図 4 -2. 3T3-L1 細胞の分化による分化マーカー遺伝子の変化	52
図 4 -3. C2C12 細胞の分化における T2R 発現の変動.....	53
図 4 -4. C2C12 細胞の分化による分化マーカー遺伝子の変化	53
図 4 -5. T2r108、126、135、137 のリガンド化合物の化学構造式.....	55
図 4 -6. 抗肥満効果が複数報告されている T2R リガンド化合物の化学構造式	56
図 4 -7. 各苦味化合物に対する 3T3-L1 細胞の生存率.....	56
図 4 -8. 苦味刺激による 3T3-L1 細胞の T2R 発現の変化	57
図 4 -9. 血清飢餓やアミノ酸飢餓による 3T3-L1 細胞の T2R 発現変化.....	58
図 4 -10. 一晩絶食が C57BL/6J マウスの eWAT の T2R 発現レベルに与える影響.....	60

図4-11. 一晩絶食が C57BL/6J マウスの iWAT の T2R 発現レベルに与える影響.....	60
図4-12. エピカテキンが C57BL/6J マウスの eWAT の T2R 発現レベルに与える影響	61
図4-13. エピカテキンが C57BL/6J マウスの iWAT の T2R 発現レベルに与える影響	62
図5-1. 階層的クラスタリング解析の結果.....	66
図5-2. 主成分分析の結果.....	66
図5-3. キニーネ刺激により発現変動した遺伝子のボルケーノプロット... 69	69
図5-4. キニーネ刺激により発現が上昇した遺伝子の GO ターム ($ \log_2FC >1$)	72
図5-5. キニーネ刺激により発現が減少した遺伝子の GO ターム ($ \log_2FC >1$)	72
図5-6. エピカテキン刺激により発現が上昇した遺伝子の GO ターム ($P<0.05$)	73
図5-7. エピカテキン刺激により発現が減少した遺伝子の GO ターム ($P<0.05$)	73
図5-8. エピカテキン刺激により発現変動した遺伝子のボルケーノプロット	74
図5-9. エピカテキン刺激による <i>Lepr</i> , <i>Egr2</i> , <i>Nr4a</i> 遺伝子発現への影響	79
図5-10. エピカテキンの 3T3-L1 細胞に対する分化阻害作用.....	81
図5-11. エピカテキンの 3T3-L1 細胞に対する分化阻害試験の際の細胞生存率	81
図5-12. RT-qPCR 法による T2R 過剰発現の確認.....	83
図5-13. T2R 過剰発現が 3T3-L1 の分化に与える影響と、エピカテキンの分化阻害に与える影響.....	84
図6-1. マウスとヒトの苦味受容体オーソログのリガンド認識性	88

第1章 序論

1-1. 味覚と味覚受容体

哺乳動物にとっての味には、甘味・旨味・苦味・酸味・塩味のいわゆる 5 基本味が存在する (Chandrashekar et al. 2006; Gravina et al. 2013)。基本味の味覚受容体には 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型の味覚受容体とイオンチャネル型の味覚受容体が存在し、前者は甘味・旨味・苦味の受容に、後者は酸味・塩味の感知にそれぞれ関わっている (Gravina et al. 2013)。

甘味受容体は Taste 1 receptor 2 (T1R2) と Taste 1 receptor 3 (T1R3) の、旨味受容体は Taste 1 receptor 1 (T1R1) と T1R3 のヘテロダイマーとして 1 種類ずつ同定されており、甘味・旨味の味受容を担う (Nelson et al. 2001, 2002)。一方で苦味受容体を担っている Taste 2 receptor (T2R) はヒトで 25 種類、マウスで 35 種類のサブタイプが存在し、それぞれが異なるリガンド特異性を持つことにより数多くの苦味物質の受容を可能としている (Meyerhof et al. 2009; Lossow et al. 2016)。酸味受容体は酸味受容体チャネル複合体 (polycystic kidney disease 1-like 3/polycystic kidney disease 2-like 1 : PKD1L3/PKD2L1) とオトペトリン 1 (otopetrin 1 : OTOP1) であり (Huang et al. 2006; Zhang et al. 2019)、塩味受容体は上皮性ナトリウムチャネル (epithelial sodium channel : ENaC) が低濃度の塩味の受容を担い (Chandrashekar et al. 2010)、バニロイド受容体 (vanilloid receptor 1 : VR-1) が高濃度の塩味の受容に関与する (Lyall et al. 2004)。

これらの味覚受容体は、口腔内では主に舌、軟口蓋、咽頭蓋に存在する蕾状の器官である味蕾中の味細胞に発現している (Ahmad and Dalziel 2020)。味覚受容体は、対応する味物質が作用することで活性化される。味覚シグナルの伝達機構は甘味、旨味、苦味の受容を担う G タンパク質共役型受容体 (G protein coupled receptor : GPCR) と酸味、塩味の受容を担うイオンチャネル型の味覚受容体の間で異なっている。

甘味、旨味、苦味の受容を担う GPCR の場合、味物質が受容体に結合すると G タンパク質 α サブユニットであるガストデュシン (α -gustducin : $G\alpha_{gust}$) へとシグナルが伝わる(図 1-1)。次に $G\alpha_{gust}$ から $\beta\gamma$ サブユニットが分離し、ホスホリパーゼ $C\beta 2$ (phospholipase $C\beta 2$: $PLC\beta 2$) を活性化する。 $PLC\beta 2$ はホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate : PIP_2) を切断することでジアシルグリセロール (diacylglycerol : DAG) 及びイノシトール三リン酸 (inositol trisphosphate : IP_3) を生成する。 IP_3 は小胞体膜に存在する IP_3 受容体に結合し、小胞体から細胞質へのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 放出を誘導する。その結果、細胞内カルシウム濃度が上昇するため、イオンチャネルである transient receptor potential melastatin 5 (TRPM5) が開口し、ナトリウムイオン (Na^+) が細胞内に流入することで細胞膜電位が正の方向へ変化する。続いてその膜電位の変化により電位依存性ナトリウムチャネルが開口することでさらなる Na^+ が流入し、活動電位が発生する。最終的にアデノシン三リン酸 (adenosine tri-phosphate : ATP) 透過性イオンチャネルである calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) が開口することで神経伝達物質として ATP が細胞外に放出される。放出された ATP は味神経に受容され、脳の味覚野へと味情報を伝達することで、動物は味を認識する。

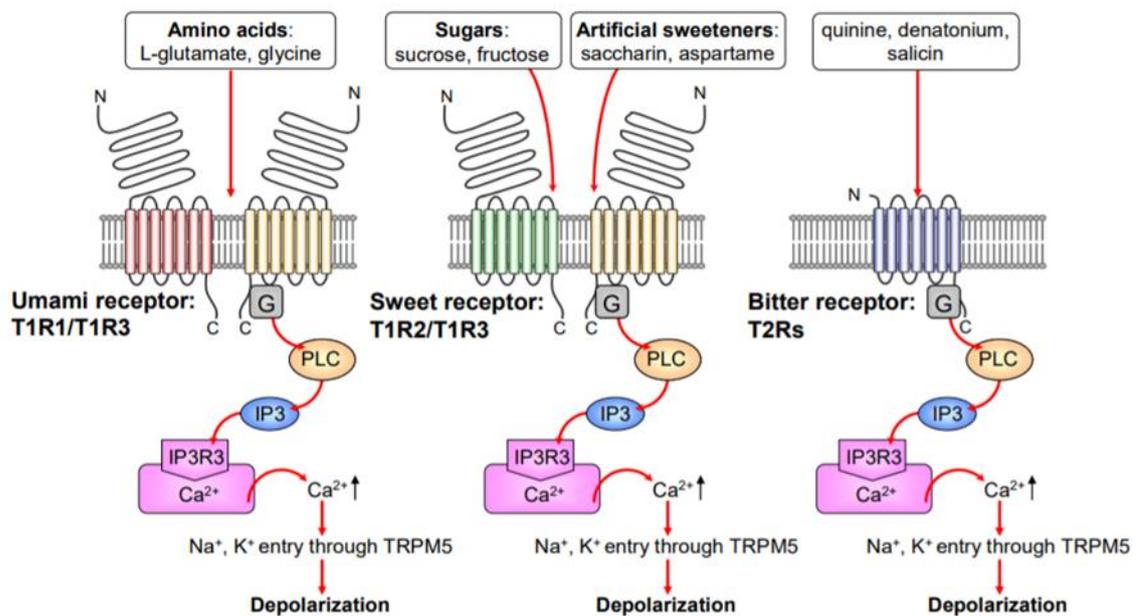


図 1-1. 甘味、旨味、苦味を司る G タンパク質共役型の味覚受容体とそのシグナル伝達経路

(Kobayashi et al. 2010)

イオンチャネル型の味覚受容体（酸味・塩味）のシグナル伝達機構は、GPCR の場合と異なり、酸味・塩味共にいくつか候補となっている受容体分子が報告されている（図 1-2）。

酸味の場合、Transient receptor potential channel (TRP channel) の 1 種である PKD2L1 を欠損させると酸味に対する応答がなくなることがマウスを用いた実験で明らかにされており (Huang et al. 2006)、PKD2L1 の膜局在に必須な PKD1L3 を欠損させたマウスでは酸味に対する応答に変化がないことが確認されている (Nelson et al. 2010)。しかしながら、PKD2L1/PKD1L3 を共発現させた細胞は酸刺激直後でなく、酸刺激を止めたときにのみ応答することから (Inada et al. 2008)、PKD 以外の酸味受容体の存在も示唆されていた。一方で、味細胞に発現しているプロトンに選択性のあるイオンチャネルを形成する OTOPI も酸味の受容に関わることが示された (Zhang et al. 2019)。OTOPI がプロトンを輸送すると細胞内の pH が低下し、内向き整流性 K⁺チャネルを遮断し、脱分極を引き起こす。その後の活動電位の発生は電位依存性カルシウムチャネルの開口を誘導し、神経伝達物質が放出されて、味神経へとシグナルが伝達される (Teng et al. 2019)。

塩味の場合、低濃度の塩味においてはナトリウムチャンネル遮断薬であるアミロライドによってマウスの塩味に対する嗜好性が抑制されるため、ENaC が低濃度の塩味の受容を担っていると考えられている (Chandrashekar et al. 2010)。しかし、高濃度の塩味に対する嫌悪はアミロライドによって抑制されないため、高濃度の塩味の受容には ENaC ではなく別の受容体が関与していると考えられていた (Lyall et al. 2004)。その一方で、高濃度の塩味に対する感受性はバニロイド受容体 (VR-1) のノックアウトにより消失するため、VR-1 が高濃度の塩味を受容すると考えられているが (Lyall et al. 2004)、そのシグナル伝達機構はわかっていない。

低濃度の塩味は、塩味細胞の表面に発現している ENaC がナトリウムイオンを取り込むことで膜の脱分極が起こり、活動電位を惹起する。すると活動電位による膜電位の変化に応答して calcium homeostasis modulator 1 and 3 (CALHM1/3) が活性化し、塩味細胞から CALHM1/3 チャンネルを通して ATP が放出され、塩味の味神経を活性化する (Nomura et al. 2020)。

以上のように、各味覚受容体は味細胞からの神経伝達物質の放出を誘導することで、味覚受容による化学的なシグナルを電気的なシグナルとして伝えている。

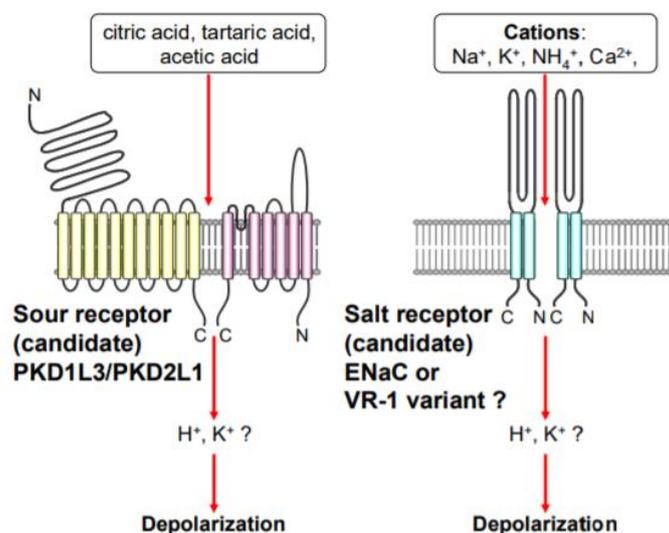


図 1-2. 酸味、塩味を司るイオンチャンネル型の味覚受容体 (Kobayashi et al. 2010)

1-2. 口腔で味覚を感知する意義

動物が口腔内において味覚受容体を通じて味覚を感知する意義は、生存に必要な食物を摂取し、毒物や腐敗物などを忌避するためであると考えられている (Callaway 2012)。例えば甘味は、解糖系により代謝されエネルギーとなる糖類 (スクロース、フルクトース、グルコースなど) を摂取しているというシグナルを伝えている (Meyers and Brewer 2008)。旨味は、グルタミン酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウムなどの味であり、タンパク質の生合成に必要なアミノ酸を摂取しているという情報を伝えている (Bachmanov et al. 2016)。塩味は、塩化ナトリウムが代表であり、細胞外液の浸透圧の調節に加え、神経細胞や筋細胞の収縮に必要なミネラルが食物に含まれていることを感知し、高濃度の塩味は忌避されるが、体液の濃度に等しい 1%前後の濃度では好まれる (Bigiani 2020)。

一方で、苦味や酸味は基本的には毒や腐敗物に由来する味として忌避される (Callaway 2012)。酸味はプロトンにより生じる味であり、食品中の有機酸が主な酸味の原因である (Neta et al. 2007)。苦味は、主に植物に由来するアルカロイドやテルペノイドなどの味であり、苦味を呈する成分は毒物であることが多い (Danielle and Antti 2010)。このように、口腔内において味覚受容体はそれぞれの味を感知し、甘味・旨味・塩味の場合は生存に必要なものを体の中に取り入れ、酸味・苦味の場合は不必要なものを体の中に入れないように促すためのセンサーとして働くと考えられている (図 1-3)。

Basic Taste	Typical Substances	Receptor Molecules	Physiological Meaning
Sweetness	Sugars, sweet peptides	GPCR (T1R2 + T1R3)	Energy intake (carbohydrate)
Saltiness	Salts (NaCl, KCl)	ENaC	Mineral intake (sodium, potassium)
Sourness	Proton (acetic acid, citric acid)	TRP channel (PKD1L3 + PKD2L1)	Harmful alarm (decomposition)
Bitterness	Plant alkaloids, pharmacological active agents	GPCR (T2Rs)(~30)	Harmful alarm (toxins)
Umami taste	Monosodium glutamate 5'-nucleotides	GPCR (T1R1 + T1R3)	Protein intake (amino acids)

図 1 -3. 基本味と対応する味物質、受容体分子、生理的意義
(Sakai et al. 2016)

1-3. 口腔以外における味覚受容体の発現とその役割

口腔の味細胞で発見された味覚受容体は、1-2 節に記したように口腔内では味の感知を担い、体にとって必要なものかそうでないかを判断するためのセンサーとして働く。しかし、最近の研究において味覚受容体が体の様々な組織に発現していることが報告され、それらの機能に注目が集まっている(図 1-4)。旨味受容体 (T1R1/T1R3) はマウス小腸の内分泌細胞にも発現しており、リガンドであるアミノ酸を受容すると、コレシストキニン (cholecystokinin : CCK) を分泌することで食欲の調節を行っている(Daly et al. 2013)。塩味受容体である ENaC は上皮細胞膜に発現しており、特に腎臓、肺、皮膚、生殖器、結腸においてナトリウムイオンの再吸収を担っている(Hanukoglu and Hanukoglu 2016; Hanukoglu et al. 2017; Enuka et al. 2012; Sharma et al. 2018)。甘味受容体 (T1R2/T1R3) や苦味受容体 (T2R) は他の味覚受容体と比較して発現が報告されている組織が多く、一部組織ではその発現意義についても解明されている。これらについては 1-3-1 から 1-3-3 項で詳しく記述する。酸味受容体については現在までに口腔以外の組織における発現は報告されていないため、ここでは割愛する。

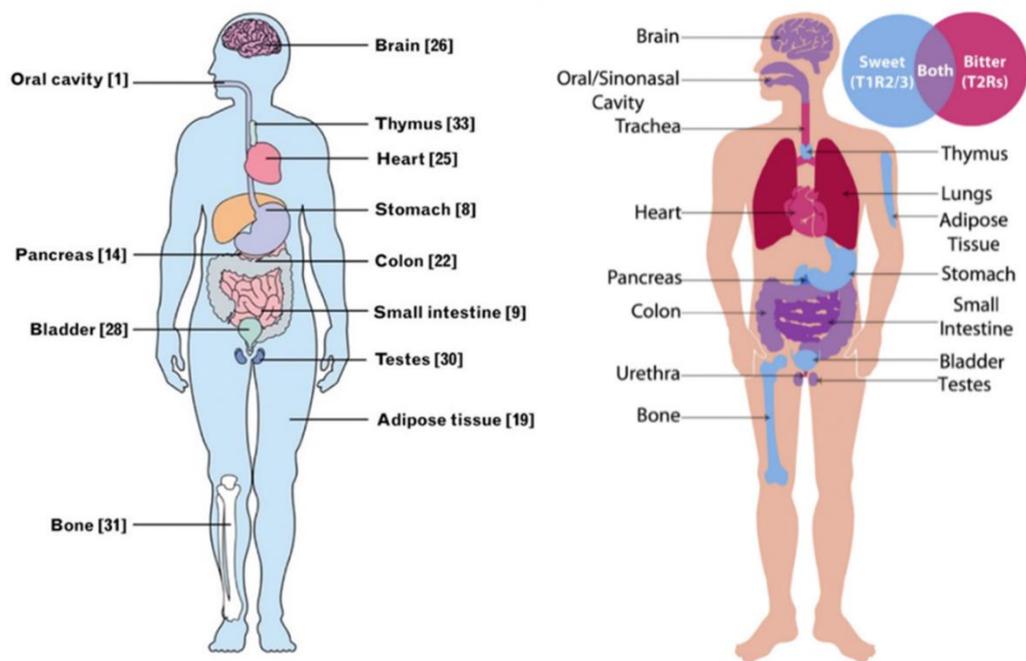


図 1-4. 口腔および口腔以外の組織における甘味受容体 T1R2/T1R3 もしくは $G\alpha_{\text{gust}}$ 、甘味受容体と苦味受容体 (T2R) の発現部位

左図は Laffitte らの報告より引用して一部改変(Laffitte et al. 2014)、右図は Freund らの報告より引用(Freund and Lee 2018)。

1-3-1. 口腔以外における甘味受容体の発現とその役割

甘味受容体 (T1R2/T1R3) は様々な組織に発現しているとともに、多様な機能の調節に寄与することがわかってきている (図 1-4)。

腸管内分泌細胞における甘味アゴニストであるスクラロースによる刺激は、グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon like peptide 1 : GLP-1) 及びグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (glucose dependent insulintropic polypeptide : GIP) のようなインクレチンの放出を促し、腸上皮細胞においてナトリウム依存性グルコース輸送体 (sodium glucose cotransporter 1 : SGLT1) の発現を増加させることで、腸管腔からのグルコース吸収を促進する (Margolskee et al. 2007; Jang et al. 2007)。Margolskee らは、こういった SGLT1 の発現上昇は $G\alpha_{\text{gust}}$ や T1R3 のノックアウトによって抑えられることを併せて報告しており、甘味受容体が関与していることを示している。

マウスのランゲルハンス島や β 細胞の株化細胞 MIN6 にも T1R2/T1R3 は発現しており、甘味アゴニストであるスクラロースやグルコースの刺激により、細胞内 Ca^{2+} 及び環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate : cAMP) 濃度を増加させ、インスリン分泌を誘発することが知られている (Nakagawa et al. 2009)。

脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞では、T1R2/T1R3 のヘテロダイマーではなく、T1R3 のみのホモダイマーが発現している (Masubuchi et al. 2013)。同報告では、この T1R3 ホモダイマーをスクラロースやサッカリンなどで刺激すると、 G_s タンパク質を介した経路で脂肪分化を抑制していることが明らかになっている。

1-3-2. 口腔以外の上皮性組織と非上皮性組織における苦味受容体

(T2R) の発現とその役割

T2R も、生体内の様々な組織（脳、気道、胃、心臓、脂肪組織、小腸、肝臓、大腸、精巣など）において発現が確認されており、一部の組織ではその発現意義を推定できるほど解析が進んでいる (Lu et al. 2017; Freund and Lee 2018)。以下に T2R の発現が確認されている組織と、役割がわかっている場合にはその役割について述べる。

気道では、鼻腔や副鼻腔の粘膜上皮において、T2R38 の発現が確認されている (R. J. Lee et al. 2012)。T2R38 は、グラム陰性菌がクオラムセンシング分子として分泌するキノロンやアシルホモセリンラクトン (N-acyl homoserine lactone : AHL) を認識すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) を活性化させる (R. J. Lee et al. 2012)。NOS から産生された一酸化窒素 (nitric oxide : NO) の増加は抗菌効果をもたらす他、環状グアノシンーリン酸 (cyclic guanosine monophosphate : cGMP) を活性化させ、さらにプロテインキナーゼ G (protein kinase G : PKG) を活性化させる。活性化された PKG は繊毛運動を活発化させることで細菌を排除し、鼻腔や副鼻腔内のクリアランス機能を担っている (図 1-5)。

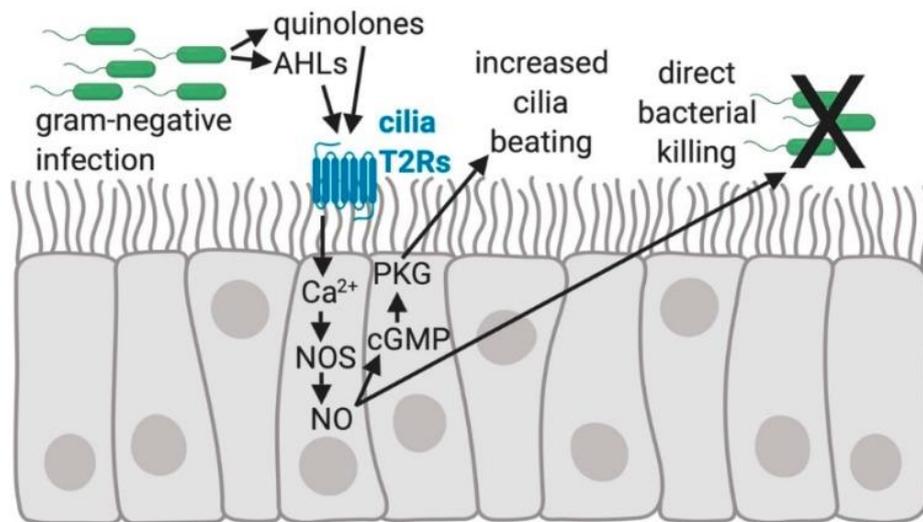


図 1-5. T2R によるヒト副鼻腔上皮細胞における自然免疫の調節機構
(Carey and Lee 2019)

胃には T2R10 が発現しており、またメッセンジャーRNA (messenger ribonucleic acid : mRNA) レベルでは T2R8、45、60 を除きほとんど全ての T2R が発現していることが、ヒト胃癌細胞株である HGT-1 を用いた解析試験で明らかになっている (Liszt et al. 2017)。この報告では、カフェインをカプセルに入れて被験者に経口投与すると、胃酸分泌が促進されることを示しており、HGT-1 細胞を用いた試験では、カフェインの胃酸分泌効果が T2R43 とアデニル酸シクラーゼに依存して起こることが示されている。

気道平滑筋には T2R31、10、14、19 が発現しており、mRNA レベルでも T2R5、4、3、20 など複数の発現が確認されている (Deshpande et al. 2010)。ここでは、T2R の関与は直接調べられてはいないが、アゴニストであるキニーネ投与によって気道平滑筋の弛緩効果を誘起し、気管支の拡張を促すことでマウスの喘息モデルの気道閉塞を改善させることがわかっている。

マウスの消化管では複数の T2R の mRNA 発現が確認されているが、胃から大腸までの各管腔部位で発現パターンに差異が存在している (Prandi et al. 2018)。例えば、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*138*、*143* は消化管各所に共通して発現しているが、*Tas2r129* は回腸に特異的に発現しており、*Tas2r119* は盲腸にのみ

発現が見られない。また、大腸には上述の共通して発現しているものに加え、*Tas2r113*、*117*、*125*、*131*、*140* が発現している。腸管の刷子細胞には *Tas2r102*、*104*、*107*、*108*、*109*、*110*、*114*、*115*、*117*、*119*、*120*、*122*、*125*、*129*、*130*、*131*、*136*、*139*、*140*、*143*、*144* の発現が確認されており、寄生虫の分泌物に応答しインターロイキン 25 を放出することで、2 型の免疫応答を誘導し寄生虫の排除を行っている (Luo et al. 2019)。また、小腸上皮細胞であるパネート細胞においても T2r131 の発現が確認されているが (Prandi et al. 2018)、T2r131 はオーファン受容体ということもあり、その役割としては気道の T2R のようなクリアランス機能を発揮するために発現しているのではないかと Prandi らは推定している。

このように、気道や消化管などの上皮性組織に発現する T2R とその機能に関しては複数の報告があり、これらは一般的に考えられている T2R の役割である毒物・異物の検知とそれらの排除という点で一致する。一方で、脳、心臓、脂肪組織、肝臓、精巣など非上皮性組織の場合には、以下のような関連報告がある。

脳の場合、脳幹、小脳、大脳皮質、側坐核など複数の部位において T2R4、mRNA レベルでは *T2R10*、*T2R38* の発現が確認できており、このうち T2R4 はキニーネやデナトニウムなどの外因性のリガンドに応答することが確認されているが、その機能については CCK などのペプチドホルモンの分泌を促し、摂食行動やその他の生理機能に関わっているのではないかと推測されている (Singh et al. 2011)。

ラットの心臓には *Tas2r108*、*120*、*121*、*126*、*135*、*137*、*143* が、ヒトの心臓では *T2R1*、*3* がそれぞれ mRNA レベルで発現している。これらのうち *Tas2r126*、*135*、*143* の発現レベルは飢餓条件に曝すことで上昇することが *in vitro* 及び *in vivo* でも確認されている (Foster et al. 2013)。このことから Foster らは、心臓に発現している T2R は栄養に対するセンサーとして働いているのではないかと推測しているが、詳細はまだわかっていない。

脂肪組織では、*T2R38* が皮下脂肪組織 (subcutaneous adipose tissue : SAT)

と内臓脂肪組織 (visceral adipose tissue : VAT) 両方に発現している (Cancello et al. 2020)。また、この報告では、SAT/VAT から調製した細胞サンプルに苦味化合物である 6-n-プロピルチオウラシルを共存させることで脂肪酸合成酵素や *Glut4*、*Pparg* の発現が低下し、脂肪蓄積が抑制されることも併せて確認している。ただし、6-n-プロピルチオウラシルが T2R38 のリガンドであることを示す報告はなく、T2R との関わりは示されていない。

肝臓には、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*138*、*143* の発現が報告されている (Prandi et al. 2018)。同報告では腸管や胃の T2R との発現量の比較も併せて行っており、肝臓における *Tas2r138* は腸管や胃のものと比較して発現量が高いことから、肝臓の生理機能において最も重要なのは *Tas2r138* ではないかと推定されているが、肝臓での T2R の役割は詳しくわかっていない (Prandi et al. 2018)。

精巣では T2R5 の発現が免疫染色により確認されており、T2R5 陽性細胞を除去することで精巣自体が小さくなり、ほとんどの精細管から精巣相が除去されたことから、精巣の T2R5 は精子の形成に関わっていることが示唆されている (Li and Zhou 2012)。

このように、非上皮性組織に発現する T2R の機能は、上皮性組織とは異なる可能性がある。

1-3-3. T2R と肥満や糖尿病、糖・脂質代謝

非上皮性組織に発現している T2R の機能と直接関連付けることは現在のところできないが、個体の遺伝子型が肥満や糖尿病の発症と関係していることを示唆している報告がいくつか存在する。

ヒト T2R38 の主要なハプロタイプは 3 カ所の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP、rs713598、rs1726866、rs10246939) を含むことからこれらの変異によるアミノ酸置換により、PAV 型、AVI 型 (A49P、V262A 及び I296V) と表される 2 型のアレルがある。この 2 型性で生じるホモの遺伝子型 AVI/AVI は、他のホモの遺伝子型 PAV/PAV 及びヘテロの遺伝子型 PAV/AVI よりも肥満になりやすい (Ortega et al. 2016)。また、T2R の 4 つの SNP (rs2588350、rs619381、rs3741845、rs648833) が二型糖尿病の発症と関連することがジェノタイピングにより解析されており、T2R がグルコースの恒常性に影響することが示唆されている (Dotson et al. 2008)。

また T2R のリガンドである苦味成分が、糖や脂質の代謝機能を調節するという報告は複数ある。緑茶に含まれる代表的な茶カテキンであるエピガロカテキンガレート (epigallocatechin gallate : EGCG) は、マウスの肝細胞において主要な糖新生遺伝子の発現抑制を介してグルコース産生を阻害し、これは AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated protein kinase : AMPK) 経路を介するものであることが報告されている (Collins et al. 2007)。ブドウの果皮や赤ワインなどに含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールは、マウス脂肪細胞のグリセロール放出を抑え、脂肪分解を抑制する効果がある (Gomez-Zorita et al. 2017)。グレープフルーツに含まれる苦味成分であるノミリンは、マウスの食餌誘導性肥満と高血糖を改善することが知られている (Ono et al. 2011)。

また、細胞レベルでも苦味成分が代謝と関連している可能性を示唆する報告がある。キナの樹皮に含まれるアルカロイド化合物であり、代表的な苦味成分でもあるキニーネは extracellular-signal-regulated kinase/ribosomal protein S6 (ERK/S6) シグナル経路の活性化を通じて 3T3-L1 脂肪細胞の分化を促進し、こ

れには T2r106 が部分的に関与していることがわかっている (Ning et al. 2016)。フラボノイドの一種であるイソラムネチンは、3T3-L1 細胞の分化を抑制し、トリグリセリドの蓄積やグリセロール三リン酸デヒドロゲナーゼの活性を減少させる (J. Lee et al. 2009)。またウコンに含まれるクルクミンが、AMPK の活性化を通じて 3T3-L1 細胞の分化を抑えることが報告されている (Y. K. Lee et al. 2009)。

このように、T2R の遺伝子型の違いと肥満が関連していることや、T2R リガンドが個体レベル・細胞レベル両方においても肥満や糖尿病を改善するような効果が複数報告されているため、非上皮性組織に発現する T2R は肥満や糖尿病に関連した糖や脂質代謝の機能調節に関わっている可能性がある。

1-4. 非上皮性組織に発現する T2R の機能を調べる意義

非上皮性組織に発現する T2R は、1-3-2 項に記した気道や消化管などの上皮組織に発現している T2R のように毒物・異物の検知とその排除のために発現しているとは考えにくく、別の意義があることが考えられる。そして 1-3-3 項に記したように、T2R は肥満や糖尿病、糖・脂質代謝に関わっている可能性がある。非上皮性組織に発現している T2R が、これら代謝機能に関わることを明らかにすれば、苦味の持つ別の生理的意義についての有用な手がかりとなる。また、T2R が糖・脂質代謝を調節するための標的分子であると分かれば、そのリガンド化合物には肥満や糖尿病の予防や改善効果が期待できることとなり、保健機能成分として苦味化合物を含んだ機能性食品の開発などが期待できる。このように非上皮性組織に発現している T2R を調べることで、それらの T2R が発現する意義とともに、食品科学分野の発展に大きく寄与すると考えられる。

1-5. 本研究の目的

非上皮性組織に発現している T2R は上皮組織に発現する T2R と異なる機能を持つ可能性が示唆されており、苦味成分は代謝機能調節に関与している報告が複数ある。苦味成分は T2R のリガンドであるため、T2R が代謝機能調節に関わる可能性があるが、これを直接的に調べた例は現在までになく、非上皮性組織に発現する T2R は発現プロファイルさえも詳細に解析されていない。そこで、本研究では、非上皮性組織に発現する T2R のうち、代謝調節に関係のある組織における T2R の発現プロファイルを明らかにし、それらが代謝調節にどのようにかかわっているかについての新たな知見を得ることを目的とした。

第2章 実験材料及び方法

2-1. 機器類

本研究で用いた機器は以下の通りである。

- ◇ サーマルサイクラー：T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- ◇ サブマリン型電気泳動装置：Mupid-exU (株式会社ミューピッド)
- ◇ LED トランスイルミネーターゲルみえーる (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ◇ リアルタイム PCR：Thermal Cycler Dice Real Time TP800 (タカラバイオ株式会社)
- ◇ 蛍光顕微鏡：ZOE™ 蛍光セルイメージャー (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- ◇ マイクロプレートリーダー：Synergy™ MX (BioTek Instruments, Inc.)
- ◇ 遠心分離機：テーブルトップマイクロ冷却遠心機 Model 3520 (久保田商事株式会社)
- ◇ 卓上小型遠心機：ファストジーン 卓上小型遠心機 Mini Centrifuge (日本ジェネティクス株式会社)
- ◇ サーモミキサー：Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf, Inc.)
- ◇ マイクロプレート用小型低速遠心機：PLATE SPINNER PS-020 (トミー工業株式会社)
- ◇ CO₂ インキュベータ：MCO-18AC (パナソニック株式会社)
- ◇ アイキューブカルチャーインキュベーター (アズワン株式会社)
- ◇ ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA AG)

2-2. 細胞培養

2-2-1. 試薬類

- ◇ 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) /ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM、富士フィルム和光純薬株式会社/High Glucose/品番 044-29765) 500 mL に対し FBS 55 mL と抗生物質ストック溶液 500 μ L を加え、冷蔵保存した。

- ◇ 2%ウマ血清 (horse serum : HS) /DMEM : DMEM (High Glucose)培地 500 mL に HS を 10 mL と抗生物質ストック溶液 500 μ L を加え、冷蔵保存した。

- ◇ 抗生物質ストック溶液 : ストレプトマイシン硫酸塩 100 mg、ゲンタマイシン硫酸塩 200 mg、ペニシリン G カリウム塩 100,000 units を超純水 2 mL に溶解し、0.20 μ m フィルターで滅菌し冷凍保存した。

- ◇ 10 \times リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS(-)) : 塩化ナトリウム 80 g、塩化カリウム 2 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 29 g、リン酸二水素カリウム 2 g を超純水 1 L に溶解し、室温で保存した。

- ◇ PBS : 10 \times PBS (-) 50 mL に超純水 450 mL を加えてオートクレーブ滅菌 (121 $^{\circ}$ C、15 分) した後、冷蔵保存した。

- ◇ 0.1%トリプシン溶液 : PBS 40 mL にトリプシン (ブタ膵臓由来、富士フィルム和光純薬株式会社 201-19181) 40 mg、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate : EDTA2Na) 4 mg を加えて溶解した後、ろ過滅菌 (0.20 μ m) して冷蔵保存した。

- ☆ インスリン保存溶液：インスリン（ヒト組換え体、富士フィルム和光純薬株式会社 097-06474）を PBS に懸濁し、1M 塩酸を加えて溶解することで 10 mg/mL 溶液を作成した。溶液はろ過滅菌（0.20 μm ）後、冷凍保存した。

- ☆ 分化誘導用培地：50 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（3-isobutyl-1-methylxanthine：IBMX）/0.1M KOH 溶液 500 μL と、0.5 mM デキサメタゾン/ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide：DMSO）溶液 25 μL 、インスリン保存溶液 50 μL をそれぞれ 10%FBS/DMEM 50 mL に加えた。

- ☆ インスリン培地：インスリン保存溶液 25 μL を 10%FBS/DMEM 50 mL に加えた。

2-2-2. 3T3-L1 細胞培養法

3T3-L1 細胞 (JCRB9014) は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所より入手した。

3T3-L1 細胞をプレートに播種し、10%FBS/DMEM 中で 37°C、10%CO₂ 下コンフルエントに達するまで培養した。コンフルエントに達してから 2 日以内に培地を分化誘導培地に交換して脂肪細胞への分化を誘導した (day 0)。Day 2 及び day 4 にそれぞれインスリン培地へ交換し、day 6 及び day 8 に 10%FBS/DMEM に交換し day 10 まで培養した。Day 10 に顕微鏡で細胞が線維芽様の形態から球形に変化し、細胞内部に脂肪滴が蓄積していることを確認した後、各種試験に使用した。

2-2-3. C2C12 細胞培養法

C2C12 細胞 (RCB0987) は国立研究開発法人理化学研究所より入手した。

C2C12 細胞をプレートに播種し、10%FBS/DMEM 中で 37°C、10%CO₂ 下 60~70%コンフルエントに達するまで培養した。培地を 2%HS/DMEM に交換し (day 0)、以降 day 2、day 4、day 6 及び day 8 にそれぞれ新しい 2%HS/DMEM 培地に交換し、day 10 まで培養した。Day 10 に顕微鏡で細胞が融合し、筋管細胞を形成したことを確認した後、各種試験に使用した。

2-3. 細胞生存率試験

培養細胞の細胞生存率は、Cell Counting Kit 8 (CCK-8：株式会社同仁化学研究所 CK04) を用い、付属のプロトコルに従って測定した。細胞に培地で希釈した Cell Counting Kit 8 溶液を加え、直後に 450 nm の吸光度をバックグラウンドとして測定した。細胞を 37°C、10%CO₂ 下 20 分インキュベートした後、再度測定を行った。バックグラウンドの吸光度を引き、被験物質を含まない溶媒を加えたコントロールの値を 100%としたときの値を生存率とした。

2-4. 3T3-L1 細胞の分化阻害試験

3T3-L1 細胞を 48 ウェルプレートに播種してコンフルエントになるまで培養した。その後、分化誘導培地に 50%DMSO 水溶液に溶解したエピカテキンを 100 倍希釈で添加して分化誘導を行った (day 0)。インスリン培地にも同様にエピカテキンを添加し、day 6 まで培養した。コントロールには 50%DMSO 水溶液を添加した。細胞を Adipored™ アッセイ試薬 (ロンザ株式会社：カタログ番号 PT-7009) を用い、付属のプロトコルに従って染色した。PBS で細胞を洗浄後、48 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 12 μL の Adipored™ アッセイ試薬を含む PBS を 400 μL/well 加え、暗所で 10 分間静置後、励起波長 485 nm、蛍光波長 572 nm で測定を行った。測定された蛍光強度は分化に伴う脂肪蓄積の量に比例するため、コントロールの脂肪蓄積量を 100%としたときのサンプルの脂肪蓄積量を算出することで、分化に対する影響を評価した。

2-5. 動物実験

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「北海道大学動物実験に関する規定」にしたがって研究計画書を作成し、北海道大学実験動物委員会の審査・承認のもと行った（承認番号 19-0163）。

マウスは C57BL/6J 雄性マウス（三協ラボ）を使用した。これらのマウスは 12 時間毎の明暗サイクル条件下、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に室温が制御された動物飼育室で飼料と水は自由に摂取させ飼育した。MF 固形飼料（オリエンタル酵母工業）を用いて 3 日間の馴化飼育を行った後、脂肪組織における mRNA 発現解析に用いるための十分な RNA 量を確保するため、Rodent Diet With 60 kcal% Fat（リサーチダイエット社、D12492）を与えて 8~10 週飼育した。解剖時は、セボフルラン（和光純薬工業）麻酔下で頸椎脱臼を行い安楽死させた。マウスを開腹後、精巣上体周囲白色脂肪組織（epididymal white adipose tissue : eWAT）、鼠径部白色脂肪組織（inguinal white adipose tissue : iWAT）を摘出し、各種試験に用いた。

2-6. mRNA 発現解析

2-6-1. total RNA の抽出と逆転写

培養細胞からの total RNA 抽出は RNA 抽出キット (ReliaPrep RNA cell Miniprep System、Promega もしくは FastGene RNA Premium Kit, 日本ジェネティクス) を用いて、付属のプロトコルに従って行った。Total RNA からの相補的 DNA (complementary deoxyribonucleic acid : cDNA) の合成は逆転写反応キット (ReverTra Ace qPCR Master Mix with gDNA Remover、東洋紡) を用いて、付属のプロトコルに従って行った。

マウスの脂肪組織 (eWAT、iWAT) からの total RNA の抽出は RNA 抽出キット (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, QIAGEN) を用いて、付属のプロトコルに従って行った。組織の破碎にはポリトロンホモジナイザーを用いた。Total RNA からの cDNA の合成は培養細胞の場合と同様に行った。

2-6-2. PCR による遺伝子発現解析

T2R の遺伝子発現解析は、表 1 に記したプライマーを用いて行った。Go Taq G2 Hot Start Polymerase Green Mastermix (Promega KK, Tokyo) を用いて PCR 反応を行った。反応条件は、95°C-2 分のインキュベートの後、95°C-30 秒および 60°C-30 秒 (*Tas2r102*、*109*、*118*、*138*、*140*、*143* については 65°C-30 秒)、続いて 72°C-60 秒の伸長反応を 35 サイクル繰り返した。*Actb*、*Gnat1*、*Gnat2*、*Gnat3* については 95°C-30 秒、60°C-30 秒、72°C-60 秒の反応を 30 サイクル繰り返すことで伸長させた。それぞれの反応は最後に 72°C-5 分間の最終伸長を行った。

PCR 後の反応液は 2%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、核酸染色試薬 (GelGreen™ Nucleic acid gel stain, Biotium Inc. もしくは Midori Green Xtra, 日本ジェネティクス) を用いて DNA を染色した。染色後の DNA バンドはゲルみえーる (富士フィルム和光純薬株式会社) により蛍光観察を行い、得られたバンドについて ImageJ を用いた画像解析を行い、*Actb* のバンド強度を 1

とした時のターゲットのバンド強度が 0.1 以上の場合に○、0.01 から 0.1 の間の場合に◦として評価した。

表 1. T2R 遺伝子発現解析に用いたプライマー

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	bp
Actb	GTACCACCATGTACCCAGGC	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC	247
Gnat1	GGCTGGTCAAGGTATGCTGT	GGTTGTGCCCTAGTCTTGCT	346
Gnat2	GGACAAAGAACTTGCCAGGAGG	CAAAGCAGGCTTGAACTCCACC	398
Gnat3	ACTGCCCAGCCACTAACATC	TTGTTCTTGGTCCTCTCGGC	343
Tas2r102	GCGACGCTGTTATATGCCAA	AAGACGCTGAGAGTTGTGGC	347
Tas2r103	AGTGTCTGGTTTGC AACATGC	GGGGTGAGTGTAACCCAGT	272
Tas2r104	TGAAGCCATGCTGGGAGTTT	GGCTGGTGCTAAACCAAACG	263
Tas2r105	GGCATCCTCCTTCCATT	ACCGTCCTTCATCACCTTC	447
Tas2r106	GCACAGAAATGTTTCTGGCA	CCTGCTTCAGCTGACTGTTT	392
Tas2r107	GGCTTGCGATTCCAGAAT	CGATGATTGAGTGACCGCAG	685
Tas2r108	GGGTCAACAGTCGCAGAATTG	AGAGTGGTGAGGGCTGAAATC	328
Tas2r109	ACTGGTGTCTCTGGTCCTCTT	TTGCAAGGCTTTGAAGTGGG	298
Tas2r110	AACCATTTTCAGCGTTTGGCT	TGGTGCTGGCATCTCTAGGT	445
Tas2r113	GTGGCAGTTCTACAGAGCACA	GCGGTGTGCTGCATATTCTT	644
Tas2r114	CTGGGCATTGTAGGGAACACA	ACTCCCCATTGGTGAAAACA	497
Tas2r115	AGACTGTGGTTGCCTTCTC	AGGTTTTCTCACGCTTGAC	231
Tas2r116	GGCCATCTCCAGAATTGCAC	ATGGGCACTGTGTTGCATCT	496
Tas2r117	AATGGGTTTCATGGTCCGGTC	TGTCCACATGTCGGTTTCCA	399
Tas2r118	TCACCGGTGGAGACGATTCT	CTCAGCCAGAGGAAGATGGG	230
Tas2r119	CTGATCCTGGCATCTGTGGT	GAGGGCATGTCTGCTAGGTT	279
Tas2r120	TTGGCTGGGGACCATACTGA	GAGACCACAGTTTGC AAGGC	411
Tas2r121	CAGTCTCTGGCTTGCCACTAT	GGGCCACTGTGAATGGTGTT	299
Tas2r122	CAATTGCTGGTGCCTCTCTC	TCAAGAATGGAGCTTGCCACA	595
Tas2r123	ATGATCAGTTCTCAATTGCTGC	GTA CTGACATCTCTAGGTTGTTTGG	268
Tas2r124	AGCTTGGTGTTCTTGGTTGC	GCCGTAGCACTAGGGTCTCT	269
Tas2r125	CACCACCACAGCTGCACATA	CAGGGAACCAACATCCGTACA	270
Tas2r126	CTCCATCTGGTTGAGTACTCC	GATAGAGCCCAACAAGAACC	204
Tas2r129	TGGTTTCAGGGACTTTGCTCA	TTGTGCATGCTGTTGCATCT	269
Tas2r130	GCTGTTGGTGAGGCCTTAGT	GACAGAGGCATGTCCAGCTT	510
Tas2r131	AGTAGCCACATTTCCCATCC	GGGAGTGTTTCACCAAGGACA	299
Tas2r134	ATGGCGGCCTGTGAAAATA	GTGAGCCTGGGTGCTGTAAT	207
Tas2r135	GAGTGGCCATCAACCTTGGA	GCAGAACTGAGTACCAGCGT	288
Tas2r136	AAATGGACACCAGGGCAACTT	TGGCAAATCAGGTGGATTGGT	327
Tas2r137	AAACCACTTCAGTATTTGGC	TGAGGGCAGAATAGATCTTA	200
Tas2r137_2	ATTACCAGCTTGCCCTCTTC	AGCTCTCCATTTGAGCCAGAG	237
Tas2r138	AGCTTTCTGGTTTCTCTCGG	GGGAGGAACCTTGTGGACTG	367
Tas2r139	AAGTGGGATTGTCATGGCTGT	GAAGAGTAGCTGTTGCGACG	539
Tas2r140	TCTTTCCCTAAGGTGGAGGGT	GGCCTTAATATGGGCTGTGGT	334
Tas2r143	AGAGTGGATGAGGAACCGGA	GCCATGGTATGTGCCTGAGT	585
Tas2r144	CACGTGGGTGCCATCAAATC	TGAACATGGTGCTGAAACCG	221

2-6-3. RT-qPCR による遺伝子発現の定量解析

cDNA を鋳型として、Thermal Cycler Dice TP800（タカラバイオ株式会社）を用いて、10 μ L の反応溶液（5 μ L の KAPA SYBR Master Mix；日本ジェネテイクス、0.4 μ L の 10 μ M 各プライマー、1 μ L の cDNA および 3.6 μ L の水）で RT-qPCR を行い、mRNA 発現レベルを測定した。測定条件は、95°C-3 分のインキュベーションの後、95°C-3 秒および 60°C-20 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル行い、最後に解離曲線を確認するために、95°C-15 秒、60°C-30 秒および 95°C-15 秒のインキュベーションを行った。内部標準としては *Actb* を用いた。各遺伝子特異的なプライマー配列は表 2 に示した。

表 2. T2R 発現の定量解析に用いたプライマー

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	bp
<i>Actb</i>	TACGACCAGAGGCATACAG	GCCAACCGTGAAAAGATGAC	103
<i>Tas2r108</i>	AACAGGACCAGCTTTTGGAAATC	GAGGAAACAGATCATCAGCCTCAT	72
<i>Tas2r126</i>	GCTCAGCGTCCTGTTCTGTA	CAACGCTGGGAATCTCCACT	82
<i>Tas2r135</i>	GAACTTCGGGATGTCTGGGC	TATGGTGTGTTGCTGGCAGA	122
<i>Tas2r137</i>	TTCTACTGCCTGAAAATAGCCAGT T	AACAACCACTCTAGAAGCTCTCCAT T	78
<i>Tas2r143</i>	TCCCAGTTAGTTCCCAGGCT	AAGTTCCCGGTGGCTGAAAT	80
<i>Trpm5</i>	TATGGCTTGTGGCCTATGGT	CGTGCTTTAGGAGGTAGCCACT	216
<i>Plcb2</i>	TGCTGGATGTCAGATGGTTGCC	ACCGTCCTTCATCACCTTC	110
<i>Pparg</i>	GTACTGTCGGTTTCAGAAAGTGCC	ATCTCCGCCAACAGCTTCTCCT	102
<i>Cebpa</i>	GCAAAGCCAAGAAGTCGGTGGA	CCTTCTGTTGCGTCTCCACGTT	126
<i>Myod1</i>	GCACTACAGTGGCGACTCAGAT	TAGTAGGCGGTGTCGTAGCCAT	120
<i>Myog</i>	CTTGCTCAGCTCCCTCAACC	GTTGGGACCGAACTCCAGTG	145
<i>Ckm</i>	CATGGAGAAGGGAGGCAATA	GACGAAGGCGAGTGAGAATC	233
<i>Lepr</i>	CTTTCCTGTGGACAGAACCAGC	AGCACTGAGTGAAGTCCACAGCA	134
<i>Egr2</i>	CCTTTGACCAGATGAACGGAGTG	CTGGTTTCTAGGTGCAGAGATGG	125
<i>Nr4a1</i>	GTGCAGTCTGTGGTGACAATGC	CAGGCAGATGTACTTGGCGCTT	113
<i>Nr4a2</i>	CCGCCGAAATCGTTGTCAAGTAC	TTCGGCTTCGAGGGTAAACGAC	120
<i>Nr4a3</i>	ACGCCGAAACCGATGTCAGTAC	CTCCTGTTGTAGTGGGCTCTTTG	139

2-7. 3T3-L1 細胞へのプラスミドベクターのトランスフェクション

12 ウェルプレートに 5×10^4 cells/mL の濃度で各ウェル 1 mL ずつ細胞を播種し、翌日にトランスフェクションを行った。0.6 mL チューブを 2 本用意し（それぞれチューブ 1、チューブ 2 とする）、チューブ 1 には 25 μ L の Opti-MEM (Gibco™) を加え、1.5 μ L の Lipofectamine3000 reagent (Invitrogen™) を加えピペッティングにより混合した。チューブ 2 には 25 μ L の Opti-MEM を加え、プラスミドベクターを 0.5 μ g と 1 μ L の P3000 reagent を加えてピペッティングを行い混合した。チューブ 2 の溶液をチューブ 1 に全量加え、ピペッティングで混合した後、15 分間室温でインキュベートを行い、全量をウェルに添加した。トランスフェクションのコントロールとしては、Zsreen をサブクロニングした pcDNA3.1(+)を用い、3 日後の蛍光を観察することでトランスフェクション成功の指標とした。

2-8. マウス組織と細胞株の T2R 発現解析

2-8-1. マウス組織の T2R 発現解析

マウスの 4 種類の非上皮性組織（褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋、肝臓）と小腸由来の total RNA (C57BL/6N、8 週齢、雄性) として、ジェノスタッフ株式会社の total RNA パネル（型番：MTP-10）を使用した。それぞれの total RNA は 2-6-1、2-6-2 項に記した RT-PCR 法を用いて T2R 発現を解析した。

2-8-2. マウス細胞株の T2R 発現解析

3T3-L1 細胞と C2C12 細胞はそれぞれ 2-2-2、2-2-3 項に記した方法で分化誘導し、day 0 を未分化のサンプル、day 10 を分化後のサンプルとして total RNA を調製し、2-6-1、2-6-2 項に記した RT-PCR 法を用いて T2R 発現を解析した。

2-9. T2R の発現レベルに影響を与える因子の解析

2-9-1. マウス細胞株での T2R 発現変動解析

細胞分化による T2R 発現変動解析

2-8-2 項と同様の方法で調製した total RNA を用いて、RT-qPCR 法で T2R 発現変化を解析した。

苦味化合物刺激による T2R 発現変動解析

3T3-L1 細胞を 2-2-2 項に記した方法で day 10 まで分化させ、苦味化合物を添加した 10%FBS/DMEM 培地に交換後、37°C、10%CO₂ 下で 1 時間のインキュベーションを行い、total RNA を抽出した。抽出した total RNA は RT-qPCR 法により mRNA 発現の解析を行った。被験物質は水、50%DMSO 水溶液または DMSO に溶解しておき、培地で 100~200 倍希釈して DMSO の最終濃度が 0.5% になるように細胞に添加した。コントロールは 50%DMSO 水溶液を培地に 100 倍希釈で加え、DMSO の最終濃度を 0.5% としたものを使用した。

培養条件の違いによる T2R 発現変動解析

3T3-L1 細胞を 2-2-2 項に記した方法で day 10 まで分化させ、1)DMEM 培地に 10%FBS を添加したもの、2)DMEM (アミノ酸不含、富士フィルム和光純薬、製品番号 048-33575) に 10%FBS を添加したもの、3)DMEM 培地のみのもの、4)DMEM (アミノ酸不含) のみのものの 4 種類の培地を調製し、細胞をそれぞれの培地に交換した。その後、37°C、10%CO₂ 下で 1 時間のインキュベーションを行い、total RNA を抽出した。抽出した total RNA は RT-qPCR 法により mRNA 発現の解析を行った。

2-9-2. マウス組織での T2R 発現変動解析

絶食による T2R 発現変動解析

2-5 節に記したように飼育したマウスを用いた。解剖前日の夕方から解剖当日まで16時間の絶食を行い、セボフルラン麻酔下、頸椎脱臼により安楽死させて eWAT、iWAT をそれぞれ 100 mg ずつ摘出した。摘出した組織は十分量の QIAZOL 存在下、ポリトロンホモジナイザーを用いて十分に破碎し、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) の付属のプロトコルにしたがって total RNA を抽出した。抽出した total RNA は RT-qPCR 法により mRNA 発現の解析を行った。

苦味化合物刺激による T2R 発現変動解析

2-5 節に記したように飼育したマウスを用いた。絶食は前項と同様に行い、eWAT、iWAT をそれぞれ 100 mg ずつ摘出後、50%DMSO 水溶液に溶解したエピカテキンを最終濃度 2.5 mM で添加した 10%FBS/DMEM 培地 (DMSO の最終濃度は 0.5%) 2 mL に浸漬し、37°C、10%CO₂ 条件下で3時間のインキュベートを行った。コントロールとしては、50%DMSO 水溶液を培地に 100 倍希釈で加え、DMSO の最終濃度が 0.5%としたものを用いた。その後、PBS を用いて組織を洗浄し、QIAZOL 存在下、ポリトロンホモジナイザーを用いて十分に破碎し、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) の付属のプロトコルにしたがって total RNA を抽出した。抽出した total RNA は RT-qPCR 法により mRNA 発現の解析を行った。

2-10. RNAseq による遺伝子発現解析

RNAseq によるトランスクリプトーム解析は株式会社レリクサ (Rhelixa) に受託解析を依頼した。

サンプルはコントロール群、キニーネ刺激群、エピカテキン刺激群の 3 群をそれぞれ $n=3$ で用意した。分化させた 3T3-L1 にキニーネ 50 μM 、エピカテキン 2.5 mM をそれぞれ添加した 10%FBS/DMEM で 1 時間刺激した後に total RNA を抽出した。コントロールとしては、0.5%DMSO を添加した 10%FBS/DMEM を用いた。total RNA は Bioanalyzer による電気泳動で評価し、全て RNA integrity number (RIN) 値が 9 以上のものを用いた。

Trimmomatic を用いてシーケンスリードのトリミングを行い、ソフトウェア HISAT2 を用いてトリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノムにマッピングを行った。ソフトウェア featureCounts を用いて、既知エクソン領域にマッピングされた raw リード数を算出、マッピングされたフラグメント数のカウントから fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM) 値を算出した。ソフトウェア stats を用いて、検出された全遺伝子について、raw リード数、FPKM 値によるサンプルの階層的クラスタリング解析及び主成分分析を行った。ソフトウェア DESeq2 を用いてサンプル間の発現量差 [$\log_2(\text{fold change})$] を算出し、発現変動遺伝子の抽出を行った。発現変動遺伝子は $P < 0.05$ 及び $|\log_2\text{FC}| > 1$ として抽出した。抽出したデータを基にボルケーノプロットによる可視化も併せて行った。抽出して得られた発現変動遺伝子をそれぞれ上昇遺伝子群・減少遺伝子群に分け、プログラム DAVIDWebservice にて遺伝子オントロジー (gene ontology : GO) のエンリッチメント解析を行った。次に、抽出された発現変動遺伝子が生体内でどのような機能・疾患に関わるかを詳しく調べるため、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いた解析を行った。

2-11. T2R 過剰発現株の作製

プラスミドベクターである pcDNA3.1/hygro(+) のマルチクローニングサイトに T2R108 (NM_020502.1)、126 (NM_207028.1) のタンパク質コード領域の N 末端に rat somatostatin receptor 3 の膜移行シグナル 45 アミノ酸(Meyerhof et al. 2009) と C 末端にタグとして HSV glycoprotein epitope tag を付加した配列を In-fusion 法でサブクローニングし、大腸菌 (Stellar™ Competent Cells : タカラバイオ) を形質転換した。インサートの挿入はコロニーPCR で確認後、アンピシリン (100 µg/mL) を含む LB 培地中で一晩培養し、プラスミド精製キット (NucleoSpin Plasmid Transfection-grade : タカラバイオ) を用いて T2R108pcDNA3.1/hygro(+) 及び T2R126pcDNA3.1/hygro(+) を精製した。それぞれのベクターを 3T3-L1 細胞に 2-7 節に記した方法を用いてトランスフェクションし、3 日間培養後、ハイグロマイシン 500 µg/mL 入りの 10%FBS/DMEM に培地を交換し、3 日に一度新しい培地に交換しながら 1 週間かけて選抜した。選抜後の細胞は RT-qPCR により目的の T2R が過剰発現できているかを確認し、実験に使用した。

2-12. T2R の過剰発現がエピカテキンの 3T3-L1 分化阻害に与える影響の解析

2-11 節で作成した細胞を用いて、2-4 節の方法により行った。Day 6 に、Adipored 試薬により細胞の脂肪滴を染色後に測定した蛍光強度を分化の指標とした。コントロールとしては T2R の過剰発現していない 3T3-L1 細胞を用いた。Adipored 試薬による試験後、細胞を PBS で洗浄し、CCK-8 試薬を用いた細胞生存率試験を行った。

2-13. 統計解析

データは2群間の比較を行う場合には Student's t-test を用いた。多群間の平均値の比較には GraphPad Prism software (version 9)を用い、単一の対照群に対する複数の処理群との比較を行う場合には one-way ANOVA を実施後に Dunnett's multiple comparison test を行った。多重比較を行う場合は Tukey's test を行った。各統計解析の結果、 $P < 0.05$ の時に統計的な有意差があるとみなした。

第3章 マウス組織に発現する T2R プロファイル

3-1. マウス非上皮性組織に発現する T2R プロファイル

非上皮性組織に発現している T2R の機能を調べるためには、どの T2R がどの組織に発現しているのかを明らかにする必要がある。そのため、まず初めに各組織での T2R の発現プロファイルを調べることにした。被験動物としては、*in vivo* での検証がしやすいこと及び一部組織に対応する細胞株が利用可能であるという点からマウスを選択した。解析対象とする組織としては、非上皮性組織のうち糖代謝や脂質代謝と関係の深い脂肪組織、骨格筋、肝臓を選定した。また、上皮性組織ではあるが食事由来の成分を取り込む入口であることから、発現している T2R には異物の排除以外の機能も期待できるため、小腸についても併せて調べた。方法としては C57BL/6N マウスの 5 種類の正常組織（褐色脂肪：肩甲骨付近より採取、白色脂肪：精巣付近より採取、骨格筋：大腿筋より採取、小腸：十二指腸から回腸までを採取、肝臓：外側左葉より採取）由来の total RNA(マウス一般組織 total RNA Panel、製品番号 MTP-10、ジェノスタッフ株式会社より購入)を用いて逆転写 PCR 法によりマウス T2R (35 種類および G タンパク質) の発現プロファイルを調べた (図 3-1 から図 3-5)。評価方法としては、アガロースゲル電気泳動により検出されたバンド強度を *Actb* で標準化し、二段階で評価した (○, ○)。実験はそれぞれ独立したサンプルを用いて 3 回繰り返し、3 つのサンプルのうち 2 つ以上バンドが確認されたものを発現ありとした。

その結果、褐色脂肪組織では 9 種類 (*Tas2r108*, *110*, *118*, *126*, *134*, *135*, *137*, *140*, *143*)、白色脂肪組織では 11 種類 (*Tas2r108*, *113*, *118*, *119*, *126*, *135*, *137*, *138*, *140*, *143*, *144*)、骨格筋では 8 種類 (*Tas2r108*, *126*, *134*, *135*, *137*, *140*, *143*, *144*)、小腸では 8 種類 (*Tas2r108*, *109*, *119*, *126*, *135*, *137*, *138*, *140*, *143*, *144*)、肝臓では 8 種類 (*Tas2r108*, *109*, *126*, *130*, *135*, *137*, *138*, *143*) の T2R の発現が確認された (表 3)。本研究にお

いて調べた組織のうち褐色脂肪組織、白色脂肪組織、骨格筋においては発現レベルが他の組織と比較して高いものが多く、また発現している T2R の種類も多く見受けられた。そのため、まずは脂肪組織と骨格筋に発現している T2R の機能について調べることを目標とした。しかし、詳細な解析試験を行うためには動物個体を用いるよりも細胞株を用いた試験がより簡便である。白色脂肪組織と骨格筋については対応した細胞株である 3T3-L1 と C2C12 がモデル細胞としてよく使われている。このことから、白色脂肪組織と骨格筋に発現している T2R の機能を調べる上で、3T3-L1 細胞と C2C12 細胞がモデルとして使えるかどうかを確かめるため、これらの細胞株での T2R 発現も併せて調べることとした。

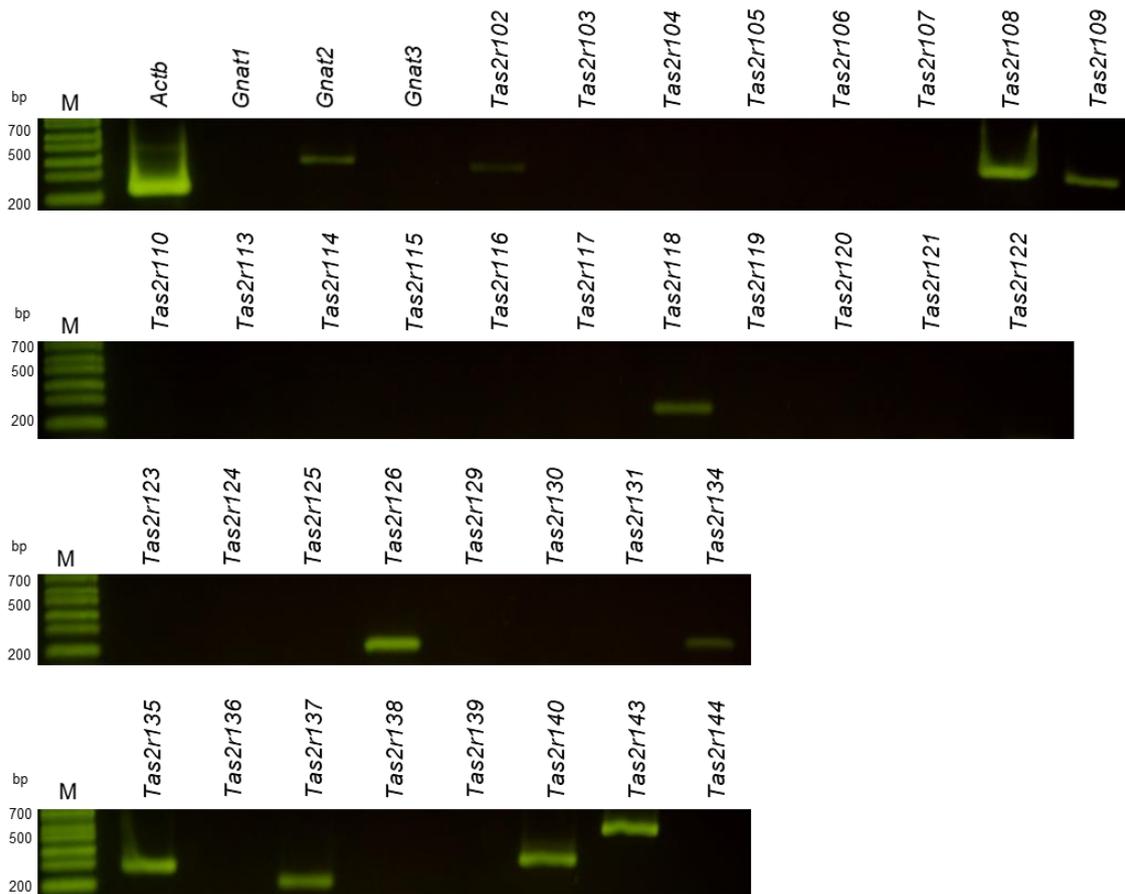


図 3-1. C57BL/6N マウスの褐色脂肪組織における T2R 発現

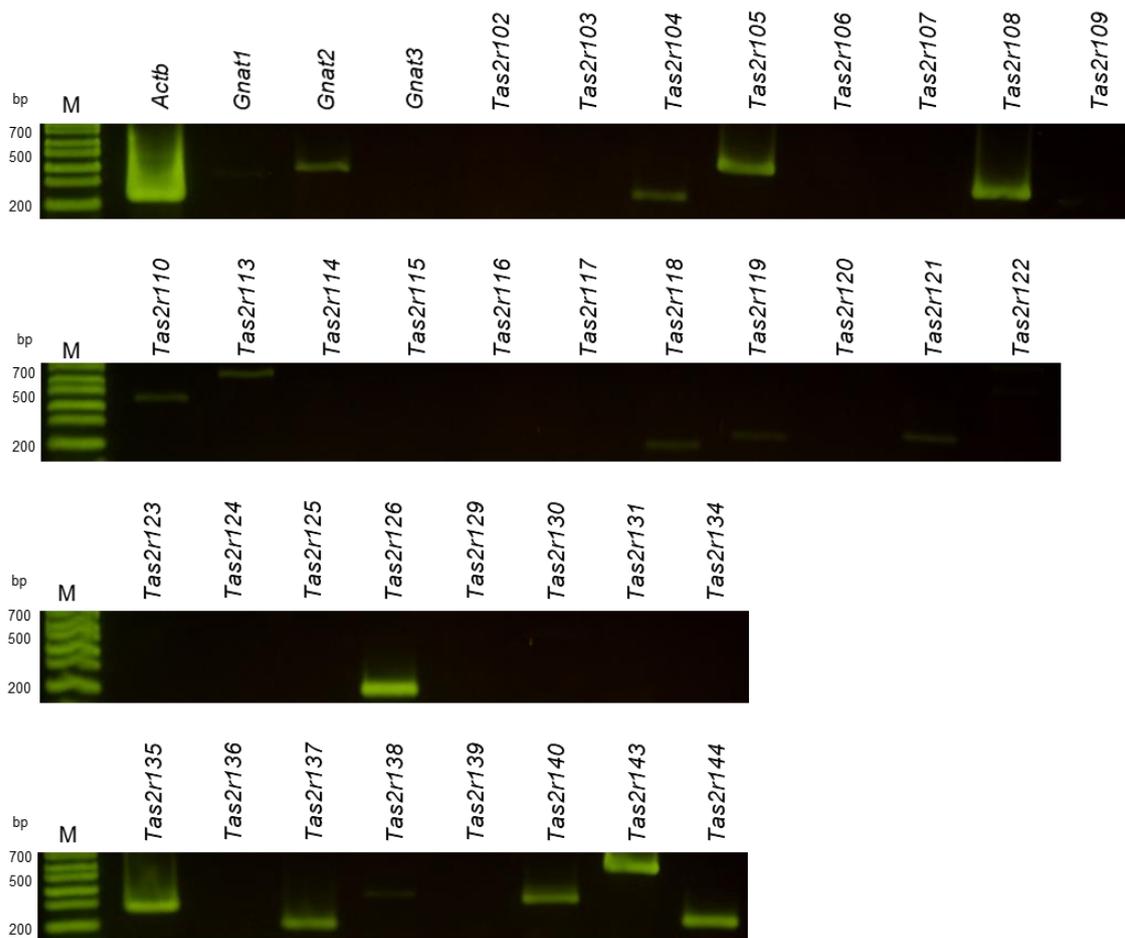


図 3-2. C57BL/6N マウスの精巣上体周囲白色脂肪組織 (eWAT) における T2R 発現



図 3-3. C57BL/6N マウスの骨格筋（大腿筋）における T2R 発現

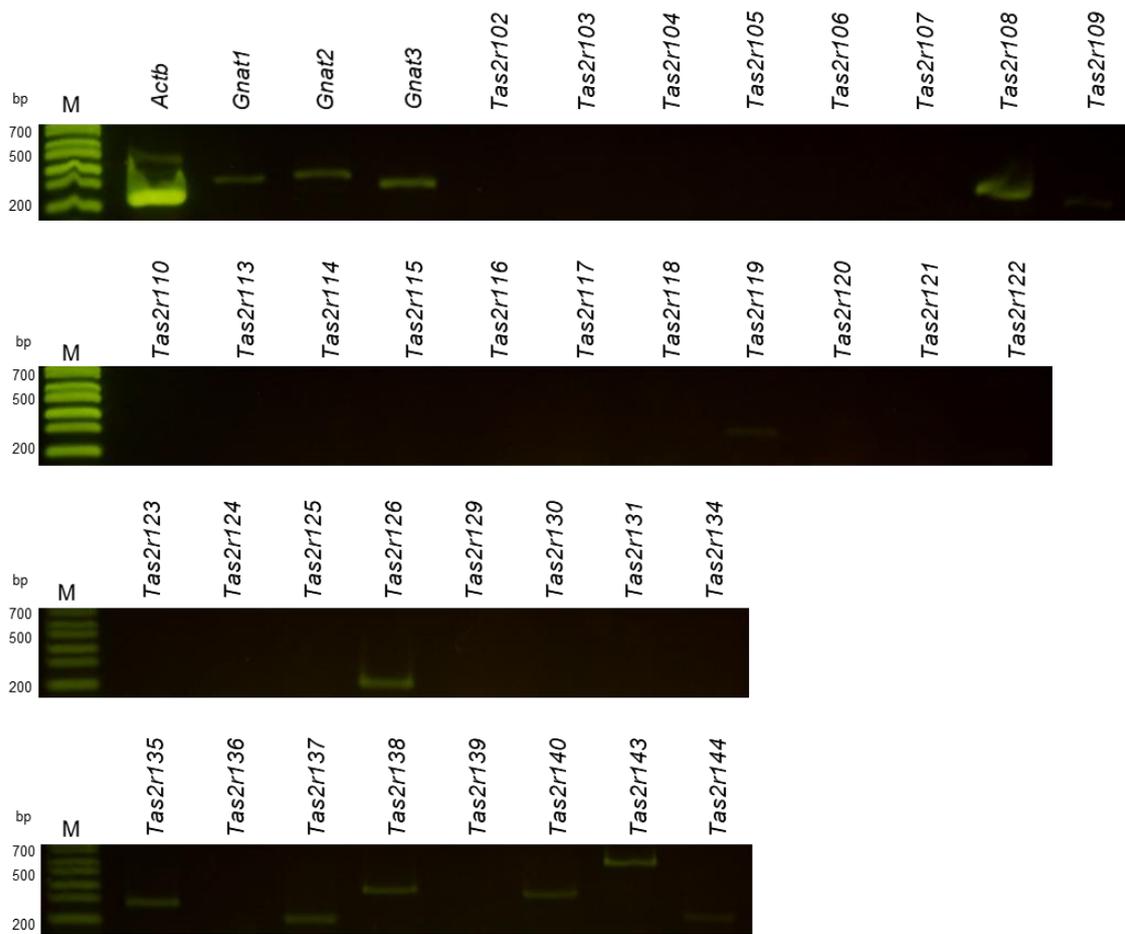


図 3-4. C57BL/6N マウスの小腸（十二指腸、回腸、空腸）における T2R 発現

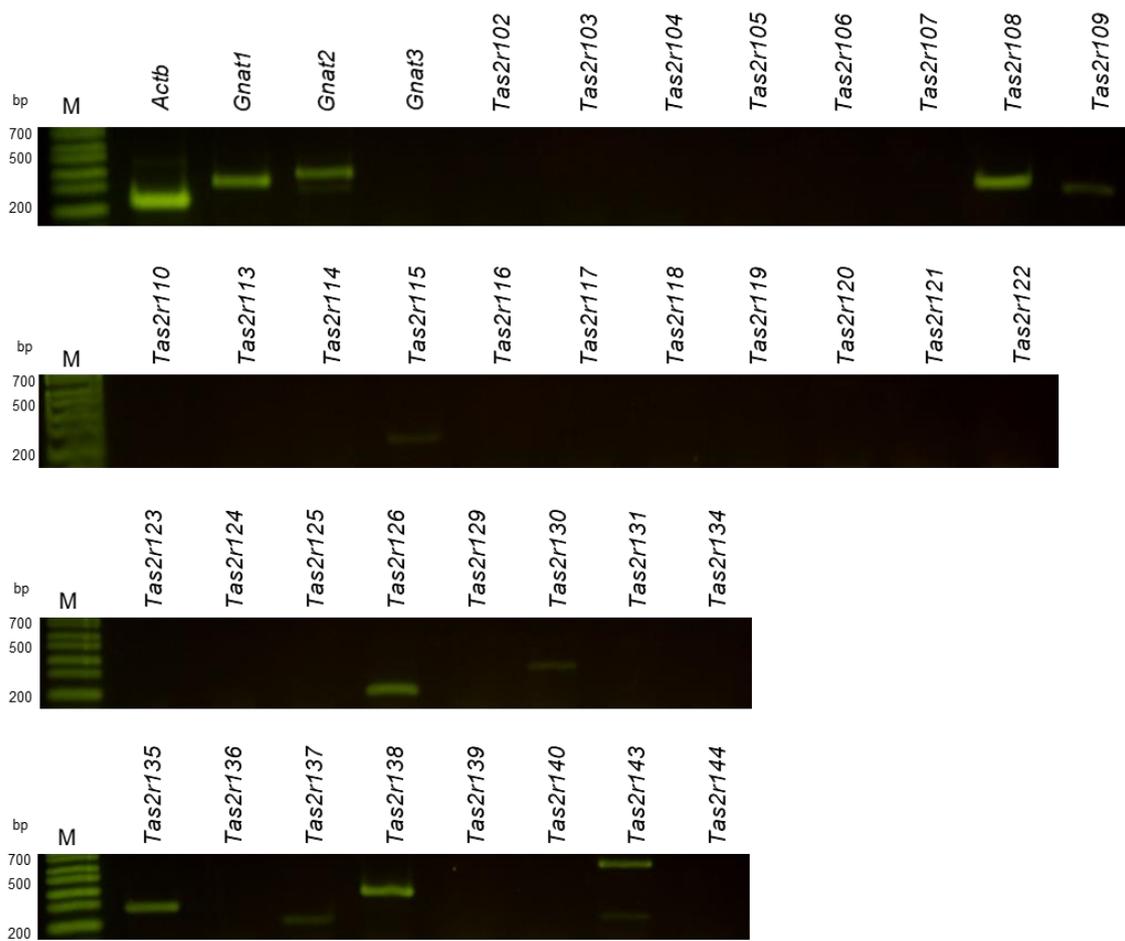


図 3-5. C57BL/6N マウスの肝臓における T2R 発現

3-2. マウス細胞株に発現する T2R プロファイル

3T3-L1 細胞および C2C12 細胞は脂質代謝や骨格筋代謝の研究においてモデルとしてよく使用されている。これらは適切な条件で培養することで白色脂肪組織様および骨格筋様に分化する。ここでは、3T3-L1 細胞および C2C12 細胞が T2R の機能解析試験を行うにあたってモデルとして用いることができるかどうかを確認するため、これらの細胞における T2R の遺伝子発現を 3-1 節と同様に調べた (図 3-6 から図 3-9、表 3)。分化の状態での T2R の発現プロファイルに差異がある可能性を考慮し、未分化の細胞、分化後の細胞両方とも解析を行った。

その結果、3T3-L1 及び C2C12 両者とも未分化・分化後に関わらず、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* が発現しており、これら是对応するマウス組織において比較的高発現していたものと一致した。そのため、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* の 5 種類を解析対象として詳細な解析試験を行うこととした。

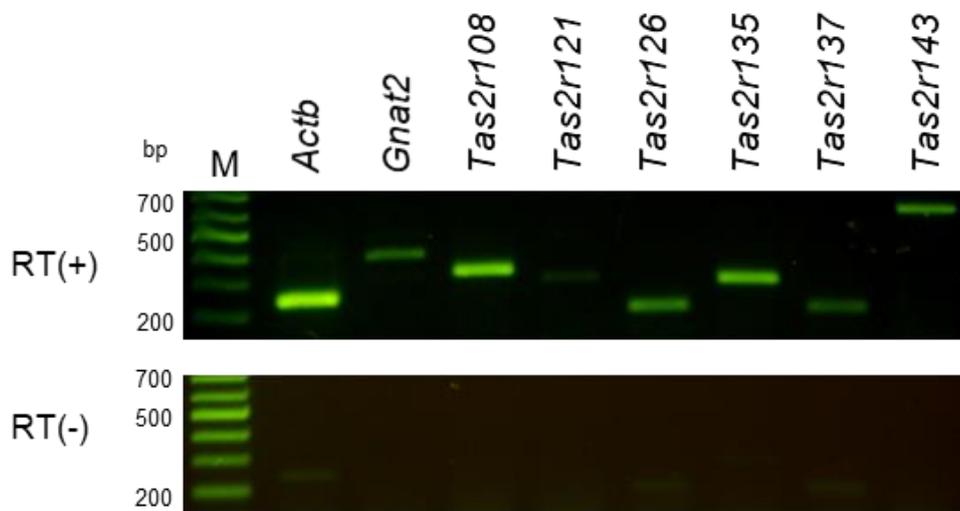


図 3-6. 未分化 3T3-L1 細胞における T2R 発現

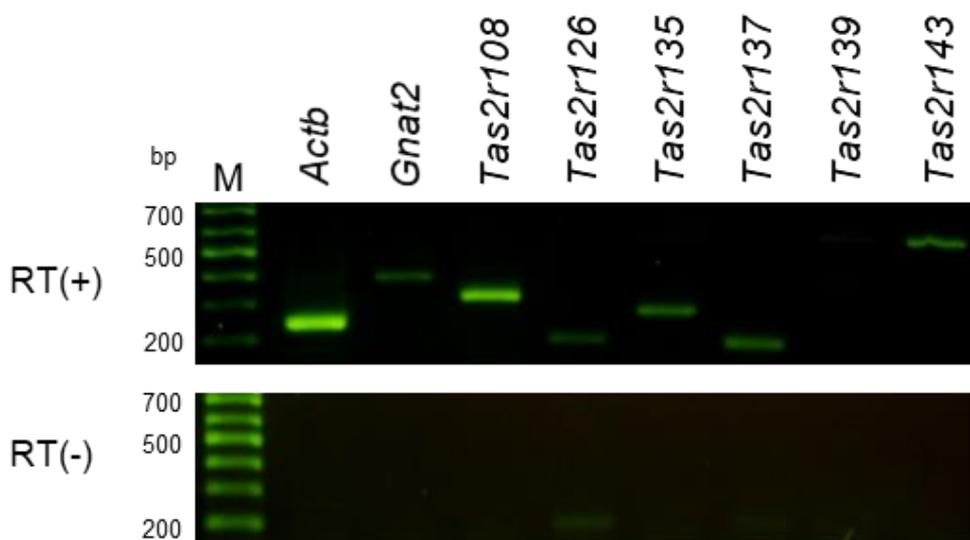


図 3-7. 分化後 3T3-L1 細胞における T2R 発現

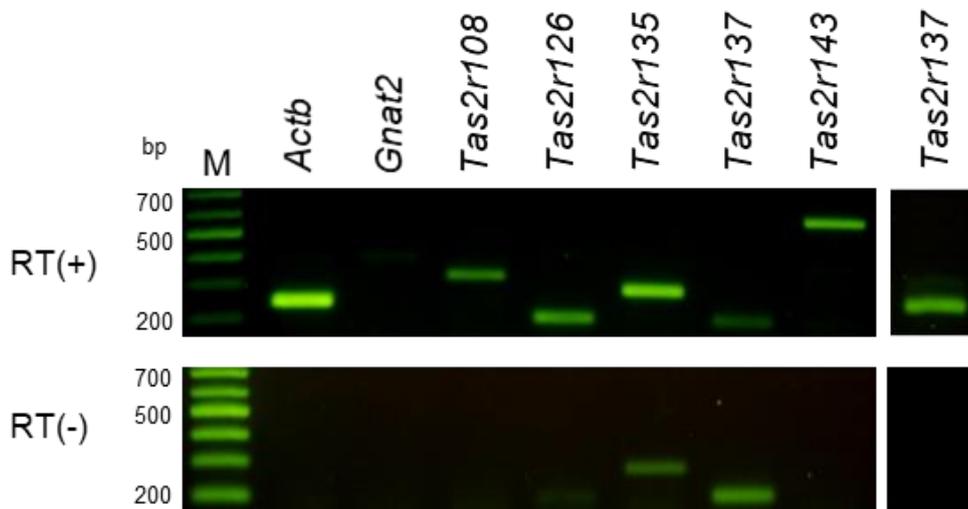


図 3-8. 未分化 C2C12 細胞における T2R 発現
 右端の *Tas2r137* は mRNA 由来の増幅産物であることを確認するため、表 1 に示した *Tas2r137_2* のプライマーを用いて増幅した。

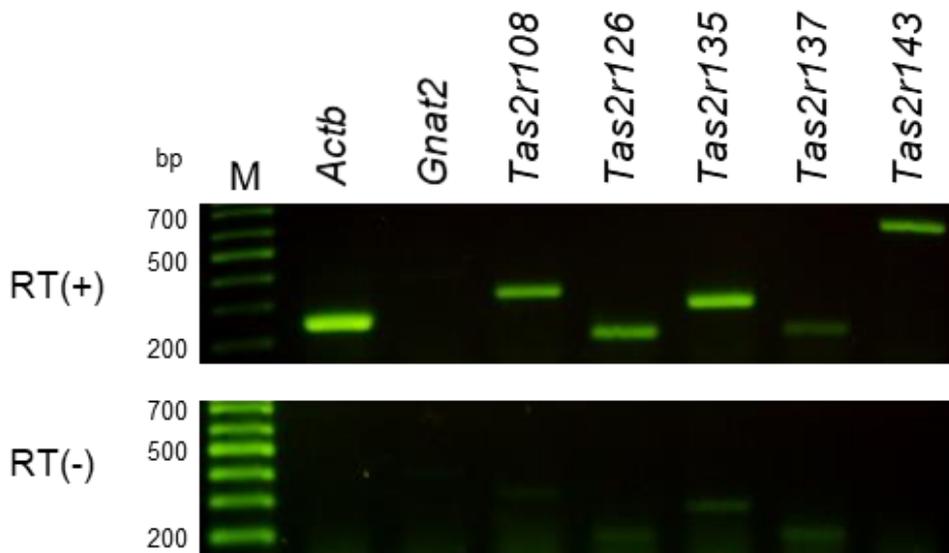


図 3-9. 分化後 C2C12 細胞における T2R 発現

表 3. C57BL/6N マウスの口腔以外の組織 5 種及びマウス由来細胞株 2 種における T2R 発現のプロファイル

Genes	Mice extraoral tissues															Cell lines				
	Brown adipose			White adipose			Skeletal muscle			Small intestine			Liver			3T3-L1		C2C12		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	BD	AD	BD	AD	
<i>Gnat1</i>	○			○	°	°					○	°	°	○	○	○				
<i>Gnat2</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	°	°
<i>Gnat3</i>											○	○	○							
<i>Tas2r102</i>		°			°					○										
<i>Tas2r103</i>	○																			°
<i>Tas2r104</i>										○										
<i>Tas2r105</i>																○				
<i>Tas2r106</i>																				°
<i>Tas2r108</i>	○	○	○		○	○	○	○	○	°	○	○	°	○	○	○	○	○	○	○
<i>Tas2r109</i>		○			○				○				○	°		○	○			
<i>Tas2r110</i>	°		°																	
<i>Tas2r113</i>	°			°	○	○							°							°
<i>Tas2r115</i>																				°
<i>Tas2r116</i>																				°
<i>Tas2r118</i>	°	○		○	○	°	°						°							
<i>Tas2r119</i>	°			°		°	°						°							
<i>Tas2r120</i>																				°
<i>Tas2r121</i>																				°
<i>Tas2r122</i>																				°
<i>Tas2r123</i>																				°
<i>Tas2r125</i>																				°
<i>Tas2r126</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	°	○	○	○	○	°	○	○
<i>Tas2r130</i>																				°
<i>Tas2r134</i>	○	○	○		°		°	○	○											
<i>Tas2r135</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
<i>Tas2r137</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		°	°	○	○	°	○	○
<i>Tas2r138</i>				○	○	°							○	○	○	○	○	○		
<i>Tas2r139</i>				○																°
<i>Tas2r140</i>	°	○	○	°	○	○			○	°			○	○		°				
<i>Tas2r143</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Tas2r144</i>				○	○				○	○			°	°						

BD: Before differentiation; AD: After differentiation; ○:バンド強度 > 0.1, ° :0.1>バンド強度>0.01 (*Actb* のバンド強度を 1 とする). *Tas2r107*, *114*, *117*, *124*, *129*, *131*, *136* は検出されなかったため、表中に示していない。

3-3. C57BL/6J マウスと 3T3-L1 細胞に発現する T2R の塩基配列比較

3-1 節と 3-2 節では、マウス非上皮性組織 4 種類（褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋、肝臓）及び小腸に加えて、白色脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞と骨格筋細胞のモデルである C2C12 細胞の T2R 発現プロファイルを解析した。その結果、マウスの組織や細胞株では *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* が共通して発現していた。

しかし、マウスの細胞株を T2R 機能解析のモデルとして用いた場合に、組織に対する結果と同様に考えることができるのかという疑問があった。そこで、T2R 遺伝子における変異の有無を DNA シーケンス解析により調べた。その結果、C57BL/6J マウスと 3T3-L1 細胞の *Tas2r108* (NM_020502.1)、*126* (NM_207028.1)、*135* (NM_199159.1)、*137* (NM_001025385.1)、*143* (NM_001001452.1) は同一の塩基配列を持っていることを確認した。このことから、3T3-L1 細胞は C57BL/6J マウスの脂肪組織モデルとして T2R 機能の解析に用いることができると考えられた。なお、C57BL/6J マウスについては、35 種類の T2R の DNA シーケンス解析を行っており、*Tas2r107*、*130* についてはデータベースと一致しなかった（付録、表 6）。

3-4. まとめ

本章では、マウスの非上皮性組織 4 種類（褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋、肝臓）および小腸に加えて、白色脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞と骨格筋細胞のモデルである C2C12 細胞の T2R 発現プロファイルを解析した。その結果、調べた全てのマウス組織および細胞株には、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* が共通して発現していた。

次に、脂肪細胞に発現している T2R の機能解析に 3T3-L1 細胞を用いることができるか確認するため、C57BL/6J マウスと 3T3-L1 細胞の *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* の DNA シーケンス解析を行った。その結果、C57BL/6J マウスと 3T3-L1 細胞の *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* は同一の塩基配列を有していた。したがって、3T3-L1 細胞は脂肪細胞に発現している *T2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* の機能解析を行うための有用なモデル細胞であることを示した。

第 4 章 マウス脂肪組織の T2R 発現レベルに影響を与える因子

第 3 章で、マウスの 4 種類の非上皮性組織（褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋、肝臓）と小腸に加えて白色脂肪組織のモデルである 3T3-L1 細胞および骨格筋細胞のモデルである C2C12 細胞における T2R の発現プロファイルを明らかにした。

T2R は外部環境からの様々な刺激により発現変動することが報告されている。各種刺激に対して T2R が応答し、遺伝子発現レベルの変化が起これば、上記の組織に発現している T2R を介したシグナル経路の活性化が期待できる。また、どのような刺激を受けた場合にどの T2R が応答するのかが明らかになれば、それらの T2R の機能についても推定することができる。

このことから、3T3-L1 細胞と C2C12 細胞に発現している *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* を標的とし、これらの発現が分化により上昇するか（4-1-1 項）、発現している T2R のリガンド化合物で刺激した場合に T2R 発現が変動するか（4-1-2 項）、血清やアミノ酸の有無により T2R 発現に影響があるのか（4-1-3 項）をそれぞれ調べるため、RT-qPCR 法を用いた T2R の発現変動解析試験を行った。

4-1. マウス細胞株での T2R 発現変動

4-1-1. 細胞分化による T2R 発現変動

3T3-L1 の未分化 (day 0) と分化後 (day 10) での T2R 発現量をリアルタイム PCR により測定し、分化が T2R 発現量に与える影響を解析した (図 4-1)。細胞が分化していること示すため、脂肪細胞の分化マーカーである *Pparg*、*Cebpa* についても併せて定量した (図 4-2)。その結果、10 日間の分化誘導により分化マーカー遺伝子の発現が上昇し、*Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* の発現量も有意に上昇した。

また、C2C12 の未分化 (day 0) と分化後 (day 10) での T2R 発現量をリアルタイム PCR により同様に測定し、解析した (図 4-3)。細胞が分化していることを示すため、骨格筋細胞の分化マーカーである *Myod1*、*Myog*、*Ckm* についても併せて定量した (図 4-4)。その結果、10 日間の分化誘導により分化マーカー遺伝子の発現が上昇し、*Tas2r126*、*135* の発現も上昇した。また、*Tas2r143* は上昇傾向にあった ($P=0.078$)。

これらの結果から、3T3-L1 細胞の方が分化により発現が変動する T2R が多く、発現変動も大きかったことから、後の細胞株を用いた解析は全て 3T3-L1 細胞のみで行った。

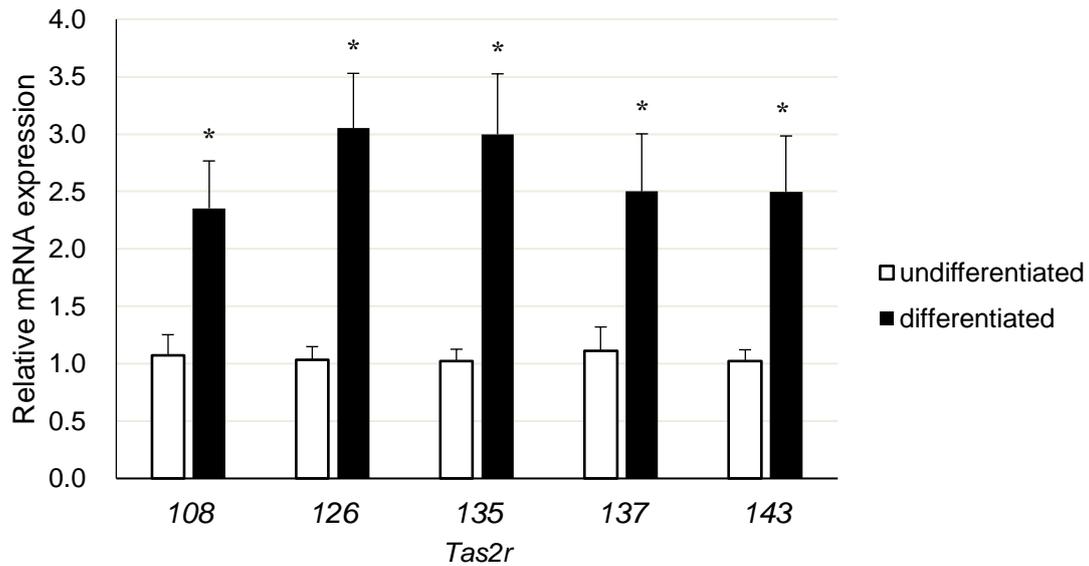


図 4-1. 3T3-L1 細胞の分化における T2R 発現の変動

未分化のものは分化誘導をかける直前の細胞、分化後のものは分化誘導後 10 日目の細胞から total RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって mRNA の発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, * $P < 0.05$ v.s. undifferentiated control.

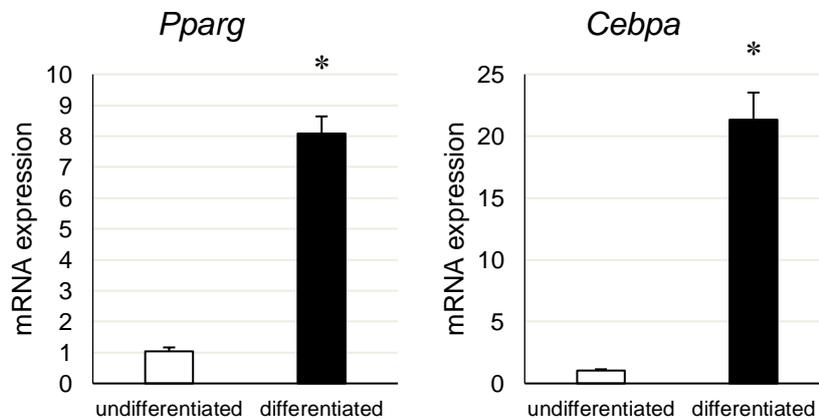


図 4-2. 3T3-L1 細胞の分化による分化マーカー遺伝子の変化

未分化のものは分化誘導をかける直前の細胞、分化後のものは分化誘導後 10 日目の細胞から total RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって mRNA の発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, * $P < 0.05$ v.s. undifferentiated control.

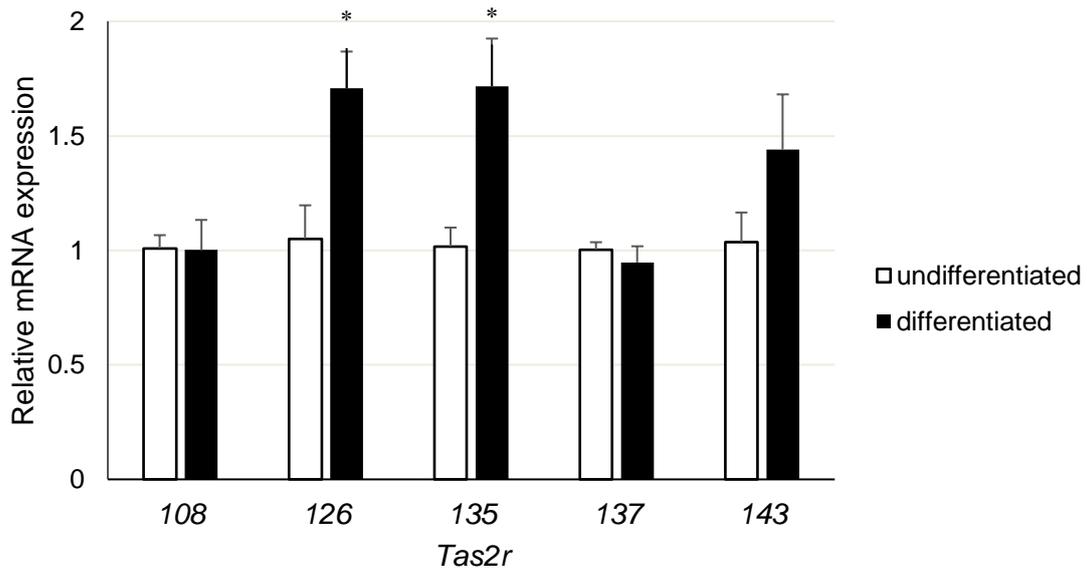


図 4-3. C2C12 細胞の分化における T2R 発現の変動

未分化のものは分化誘導をかける直前の細胞、分化後のものは分化誘導後 10 日目の細胞から total RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって mRNA の発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. undifferentiated control.

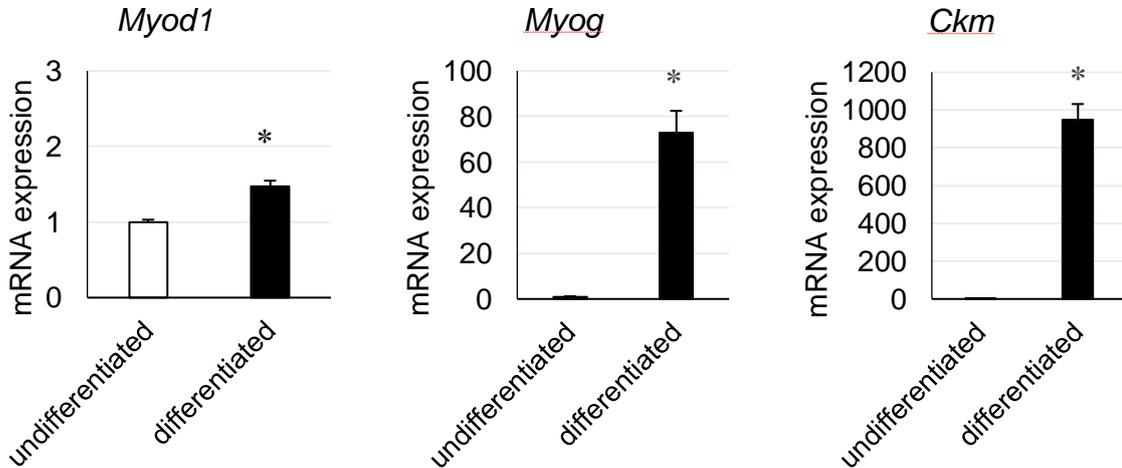


図 4-4. C2C12 細胞の分化による分化マーカー遺伝子の変化

未分化のものは分化誘導をかける直前の細胞、分化後のものは分化誘導後 10 日目の細胞から total RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって mRNA の発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. undifferentiated control.

4-1-2. 苦味化合物刺激による T2R 発現変動

3T3-L1 を苦味化合物で刺激した際の T2R 発現の変動を解析した。3T3-L1 に発現している *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143*のうち、*Tas2r143*以外についてはリガンド化合物がカルシウムイメージング法による閾値と共に既に報告されている(Lossow et al. 2016)。そこで、報告されているリガンド化合物で細胞を刺激した時に T2R の発現が変動するかどうかを調べた。試験に用いるリガンド化合物としては、4 種類の T2R について 2 つ以上かつ化学構造が類似していないものを選定した(表 4、図 4-5)。また、*T2R108*、*126*、*135*、*137*、*143*のいずれのリガンド化合物でもないが、抗肥満効果が報告されている EGCG 及びレスベラトロール(RE)についても同様に解析対象とした(図 4-6)。細胞を刺激する化合物濃度としては、閾値が報告されているものについては閾値と同じ濃度だとあまり変化が見られない可能性を考慮し、閾値の 5 倍濃度を試験濃度として設定した。EGCG とレスベラトロールは抗肥満効果が確認されている濃度を参考に(Moon et al. 2007; Rayalam et al. 2008)、化合物濃度を設定した。

次に、上記のように設定した化合物濃度で細胞を刺激したときに、細胞死に影響がないかを調べるため、CCK-8 試薬を用いた細胞生存率試験を行った(図 4-7)。サンプルを添加した細胞の生存率がコントロールと比較して減少していた場合、濃度を半分にしていき、細胞生存率に影響しない濃度を試験濃度として決定した。

細胞生存率試験により決定した化合物濃度で分化誘導後 10 日目の 3T3-L1 を一時間刺激し、T2R 発現の変動解析を行った(図 4-8)。その結果、エメチン、エピカテキン、カンファー、アリルイソチオシアネートでの刺激により、*Tas2r126*、*135*、*143*の発現が上昇した。特にエピカテキン、カンファー、アリルイソチオシアネートでは顕著な上昇が見られた。

表 4. T2r108, 126, 135, 137 のリガンド化合物とその閾値濃度(Losow et al. 2016)

対応する T2R	化合物名	閾値濃度
T2r108, 126, 137	Quinine (Q)	10 μ M
T2r108	Emetine (EM)	30 μ M
T2r108, 135, 137	6-propyl-2-thiouracil (PROP)	1 mM
T2r126	Epicatechin (EC)	1 mM
T2r135	denatonium benzoate (DB)	100 μ M
T2r135	allyl isothiocyanate (AITC)	300 μ M
T2r137	Camphor (CA)	1 mM

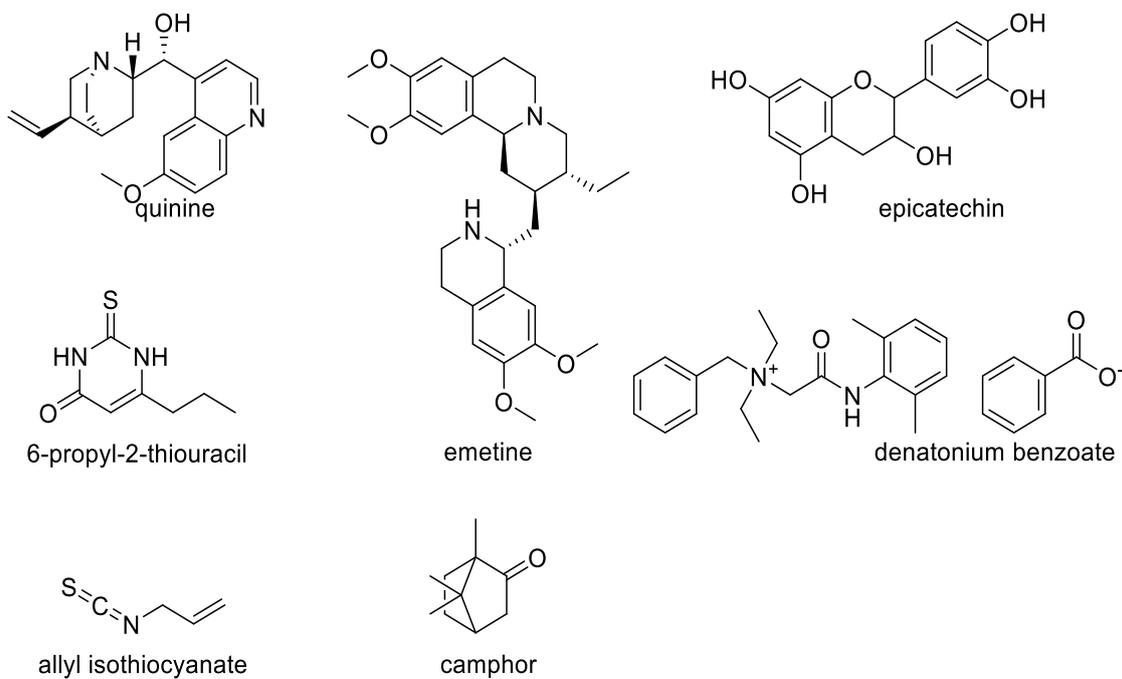


図 4-5. T2r108, 126, 135, 137 のリガンド化合物の化学構造式

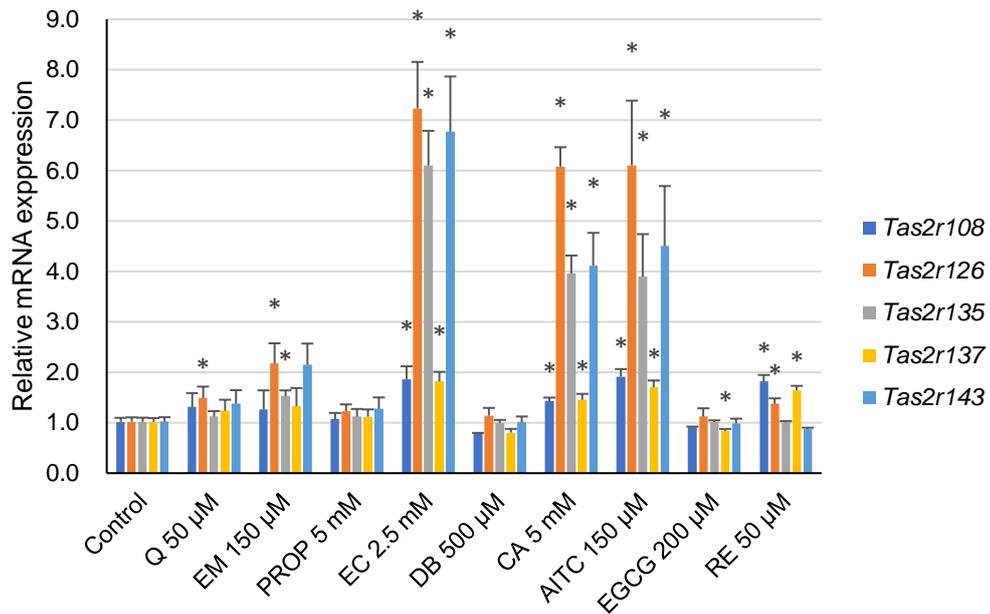


図 4-8. 苦味刺激による 3T3-L1 細胞の T2R 発現の変化

分化誘導後 10 日目の 3T3-L1 細胞を苦味化合物で 1 時間刺激後、total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により T2R の mRNA 発現量を測定した。データは平均値 ± SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. control.

4-1-3. 培養条件の違いによる T2R 発現変動

3T3-L1 細胞を分化させ、血清やアミノ酸を除いた培地で 1 時間の培養を行うことで、T2R 発現に変化が見られるかどうかを解析した(図 4-9)。1 時間の血清飢餓を行うことで、*Tas2r108*、*126*、*137* の発現と共に *Trpm5* と *Plcb2* の発現が上昇した。これらのうち最も発現レベルの上昇が大きかった *Tas2r108*、*137* は苦味刺激した場合に発現量に変化がなかったものであるため、苦味刺激をした場合と別の現象に参与している可能性がある。苦味を持つアミノ酸は 11 種類あり、アミノ酸の有無により *Tas2r* の発現変化が起こることを期待したが、アミノ酸飢餓では T2R 発現に変化は見られなかった。

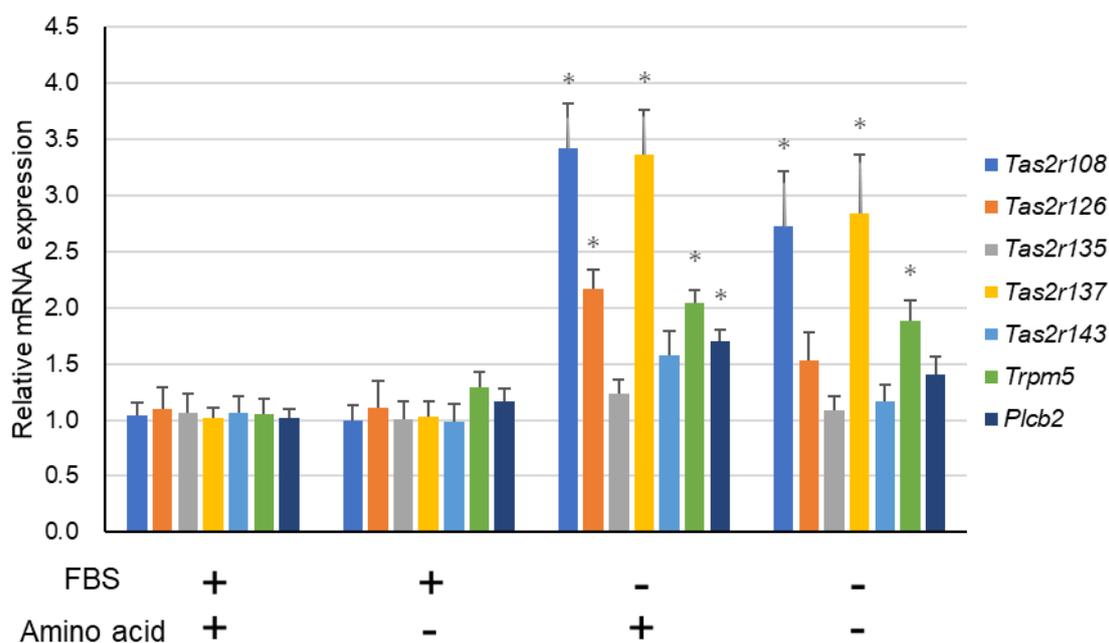


図 4-9. 血清飢餓やアミノ酸飢餓による 3T3-L1 細胞の T2R 発現変化

分化誘導後 10 日目の 3T3-L1 細胞を異なる条件で 1 時間培養し、total RNA を抽出後、RT-qPCR 法により T2R および T2R シグナル関連タンパク質の mRNA 発現を定量した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, * $P < 0.05$ v.s. FBS とアミノ酸を添加した培地を用いたコントロール

4-2. マウス脂肪組織での T2R 発現変動

4-1 節で、細胞の分化 (4-1-1 項)、苦味刺激 (4-1-2 項)、培養条件の違い (4-1-3 項) により T2R の発現が大きく変動した。このような遺伝子レベルでの発現変化は T2R を介したシグナル経路の活性化に影響を与えている可能性が考えられるが、個体レベルでも同様の変化が起こるかは明らかではない。そこで、個体レベルでも苦味刺激や給餌条件などで T2R の発現変動が起こるかを確かめるために、C57BL/6J マウスを用いて以下の解析試験を行った。

4-2-1. 絶食による T2R 発現変動

被験マウスを解剖前日の夕方から 16 時間絶食させ、eWAT、iWAT を摘出後に各 WAT から total RNA を調製し、RT-qPCR で絶食による T2R の発現変化を解析した(図 4-10、11)。その結果、絶食することで eWAT の T2R 発現レベルに変化はなかったが (図 4-10)、iWAT の *Tas2r108*、*137* の発現が上昇した (図 4-11)。

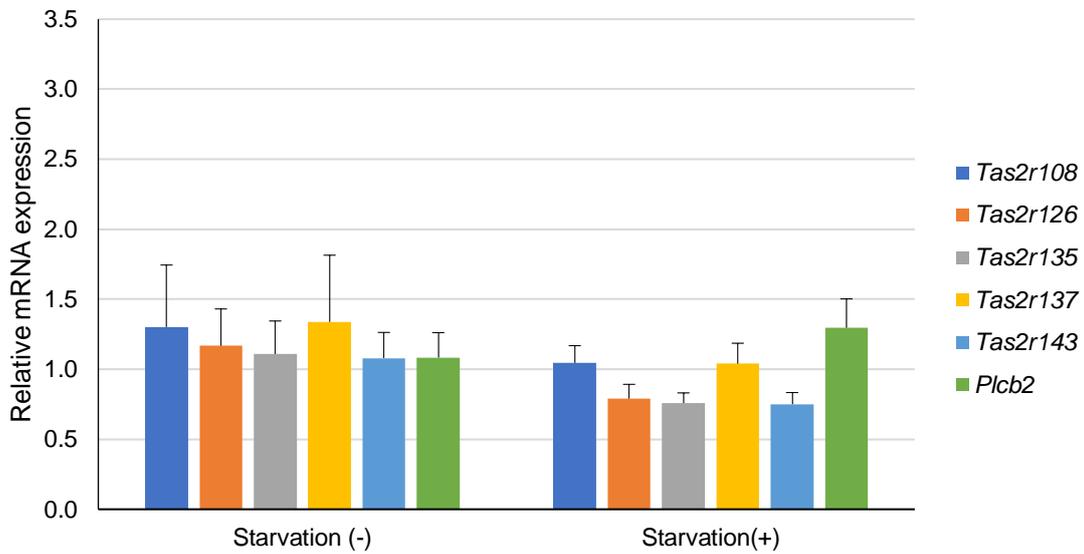


図 4-10. 一晩絶食が C57BL/6J マウスの eWAT の T2R 発現レベルに与える影響
解剖前日から一晩の絶食を行ったマウスと非絶食マウスの eWAT を摘出して total RNA を抽出後、RT-qPCR 法により T2R の mRNA 発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. starvation (-)

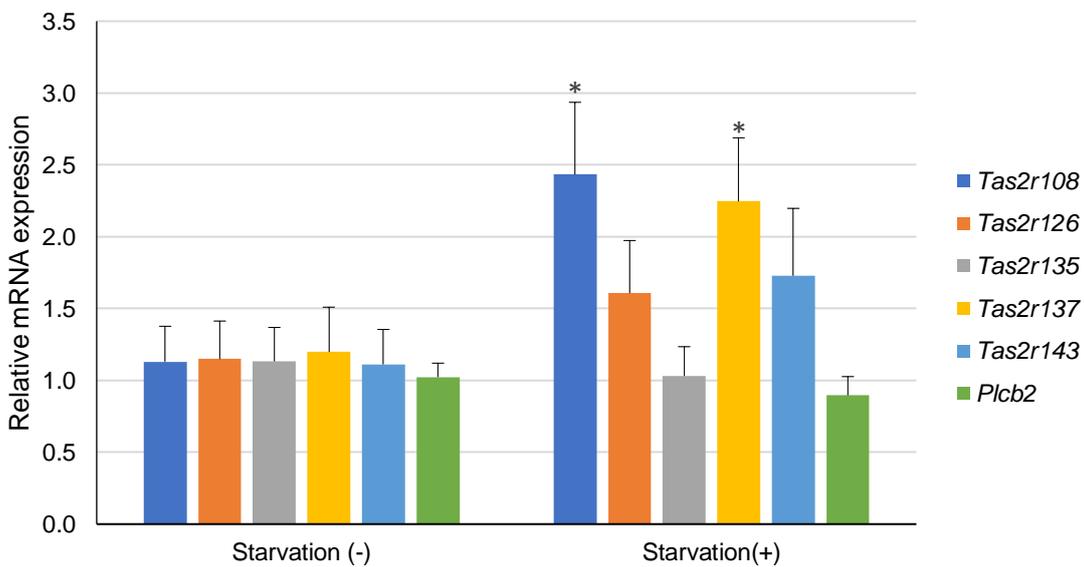


図 4-11. 一晩絶食が C57BL/6J マウスの iWAT の T2R 発現レベルに与える影響
解剖前日から一晩の絶食を行ったマウスと非絶食マウスの iWAT を摘出して total RNA を抽出後、RT-qPCR 法により T2R の mRNA 発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. starvation (-)

4-2-2. 苦味化合物刺激による T2R 発現変動

食餌による T2R 発現への影響を除くため、解剖前日から 16 時間の絶食を行ったマウスから eWAT、iWAT を摘出し、それらをエピカテキン 2.5 mM を含む 10%FBS/DMEM 培地で 3 時間培養した。その後 total RNA を抽出し、eWAT、iWAT の *Tas2r* 発現変化を RT-qPCR で解析した。その結果、eWAT、iWAT 共に、*Tas2r108*、*137* の発現が有意に上昇した (図 4-12、4-13)。

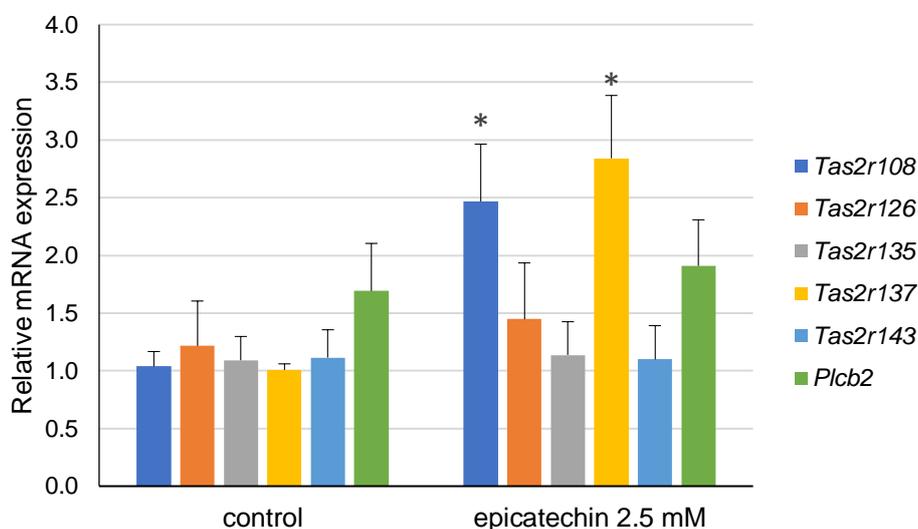


図 4-12. エピカテキンが C57BL/6J マウスの eWAT の T2R 発現レベルに与える影響
組織は摘出後、2.5 mM のエピカテキンを含む 10%FBS/DMEM で 3 時間培養し、total RNA を抽出後、RT-qPCR 法で T2R の mRNA 発現量を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, * $P < 0.05$ v.s. control.

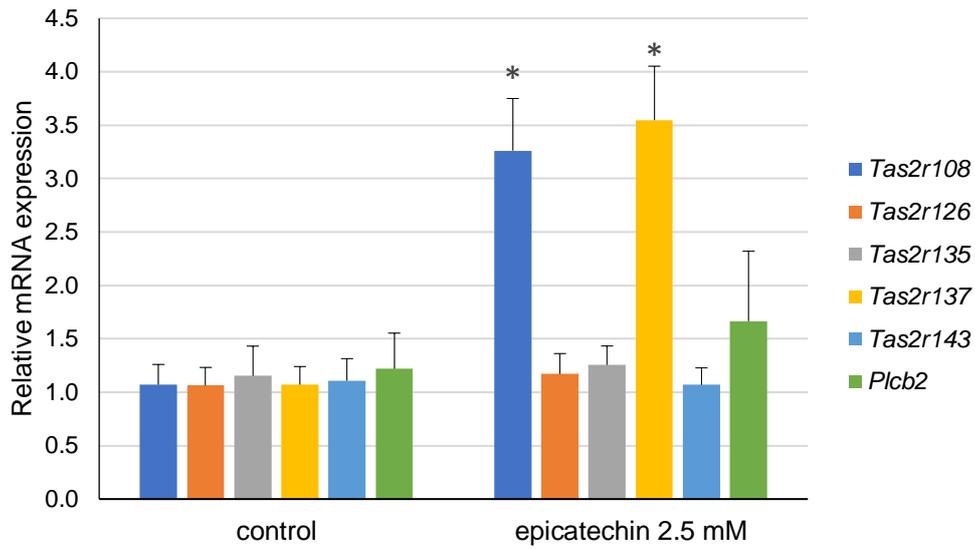


図 4-13. エピカテキンが C57BL/6J マウスの iWAT の T2R 発現レベルに与える影響
 組織は摘出後、2.5 mM のエピカテキンを含む 10%FBS/DMEM で 3 時間培養し、total
 RNA を抽出後、RT-qPCR 法で T2R の mRNA 発現量を測定した。データは平均値±SEM
 で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. control.

4-3. まとめ

本章では、1)3T3-L1 細胞および C2C12 細胞の分化が T2R 発現に影響を与えるか、2)3T3-L1 細胞とマウス脂肪組織に発現する T2R がどのような苦味化合物刺激、血清飢餓、絶食などの刺激を受けた場合に発現変動するか、の2点について解析を行った。1)の解析試験の結果、3T3-L1 細胞及び C2C12 細胞共に分化により *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*143* (解析した5種全て) の発現が上昇した。2)の解析試験の結果、3T3-L1 細胞では苦味化合物刺激を行うことで主に *Tas2r126*、*135*、*143* の発現が上昇し、血清飢餓では *Tas2r108*、*137* の発現が上昇することを確認した。マウスでは絶食することおよび絶食後のマウスから摘出した脂肪細胞をエピカテキンで刺激することにより *Tas2r108*、*137* の発現が上昇した。

このように、脂肪組織や骨格筋に発現している T2R は、これらの組織において苦味化合物や血清飢餓、絶食などの刺激により発現上昇し、T2R を介したシグナリングを活性化させている可能性が示された。

第 5 章 3T3-L1 脂肪細胞における T2R の機能

第 4 章では、マウス脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞を用いた発現変動解析を行い、発現している T2R に対するリガンドである苦味化合物での刺激や、血清を除去した条件で培養することで、T2R の発現レベルが変化することを確認した。さらに、C57BL/6J マウスの白色脂肪組織を用いた試験では、一晚絶食を行うことで、*Tas2r108* および *137* の発現レベルが上昇し、それらはエピカテキン刺激でも発現レベルが上昇することが明らかになった。

本章では、こういった各種刺激に対する T2R の発現変化がどのような生命現象に関わっているのかを調べるため、RNA シーケンシング (ribonucleic acid sequencing : RNAseq) を用いたトランスクリプトーム解析を行った。

5-1. キニーネやエピカテキンで刺激した 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子

発現プロファイル

苦味成分の投与により発現が変動する遺伝子を解析することで、T2R の機能候補を抽出することが期待できる。そこで、3T3-L1 細胞に発現している T2R のリガンド化合物で細胞を刺激し、その発現変動遺伝子をトランスクリプトーム解析により調べることにした。細胞を刺激する苦味成分は 2 種類選定した。1 つ目は、T2R 発現レベルに大きな影響は示さなかったが (図 4-8)、T2R を介した 3T3-L1 細胞の分化促進作用が報告されているキニーネとした (Ning et al. 2016)。2 つ目は、3T3-L1 細胞の *Tas2r126*, *135*, *143* 発現を大きく上昇させ (図 4-8)、またマウス白色脂肪組織でも *Tas2r108*, *137* の発現を上昇させたエピカテキンとした (図 4-12、4-13)。

サンプルの調製や解析試験は 2-10 節に記した方法で行い、検出された全遺伝子を基にした階層的クラスタリング解析の結果、キニーネ刺激群はコントロール群と同一のクラスターに属しており、エピカテキン刺激群はクラスターが別であった (図 5-1)。また、主成分分析の結果でも、キニーネ刺激群はコントロール群と近い、つまり比較的遺伝子の類似性が高く、エピカテキン刺激群はコントロール群やキニーネ刺激群と離れている、つまり比較的遺伝子の類似性が低かった (図 5-2)。これらのことから、キニーネ刺激群とエピカテキン刺激群は両方ともコントロール群と比較して発現が変動した遺伝子が見られたが、エピカテキン刺激群ではより顕著に変動していることが分かった。

表 5. 発現変動遺伝子の抽出時に使用した閾値と抽出された候補遺伝子数

閾値条件	コントロール群 vs キニーネ刺激群	コントロール群 vs エピカテキン刺激群
P<0.05	58	95
$ \log_2FC1 >1$	2855	3007

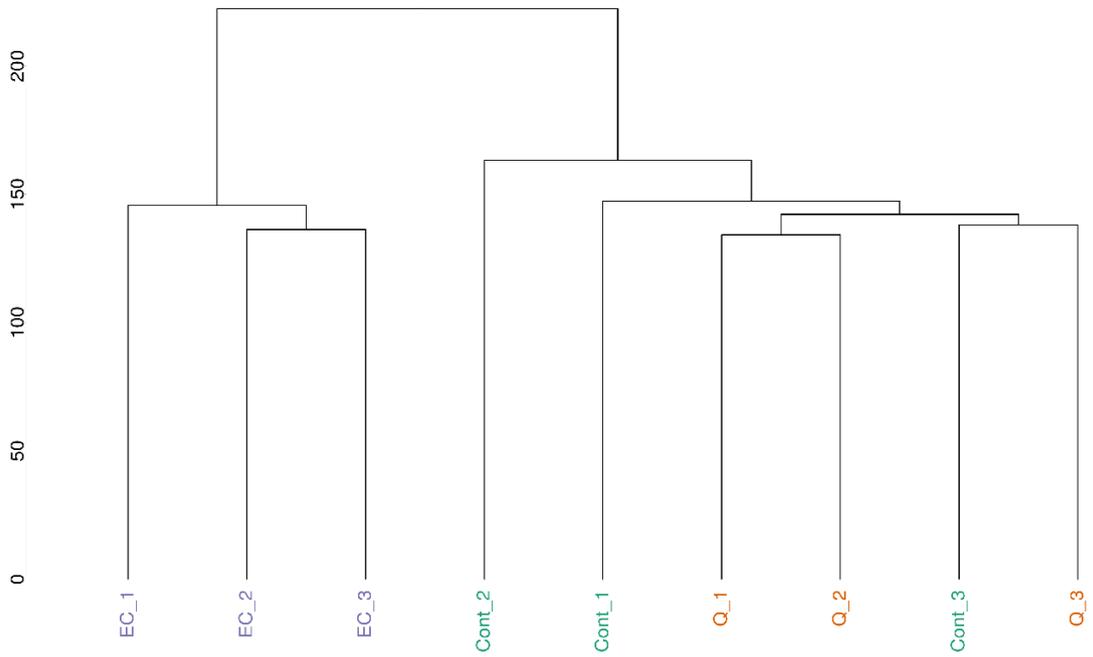


図 5-1. 階層的クラスタリング解析の結果

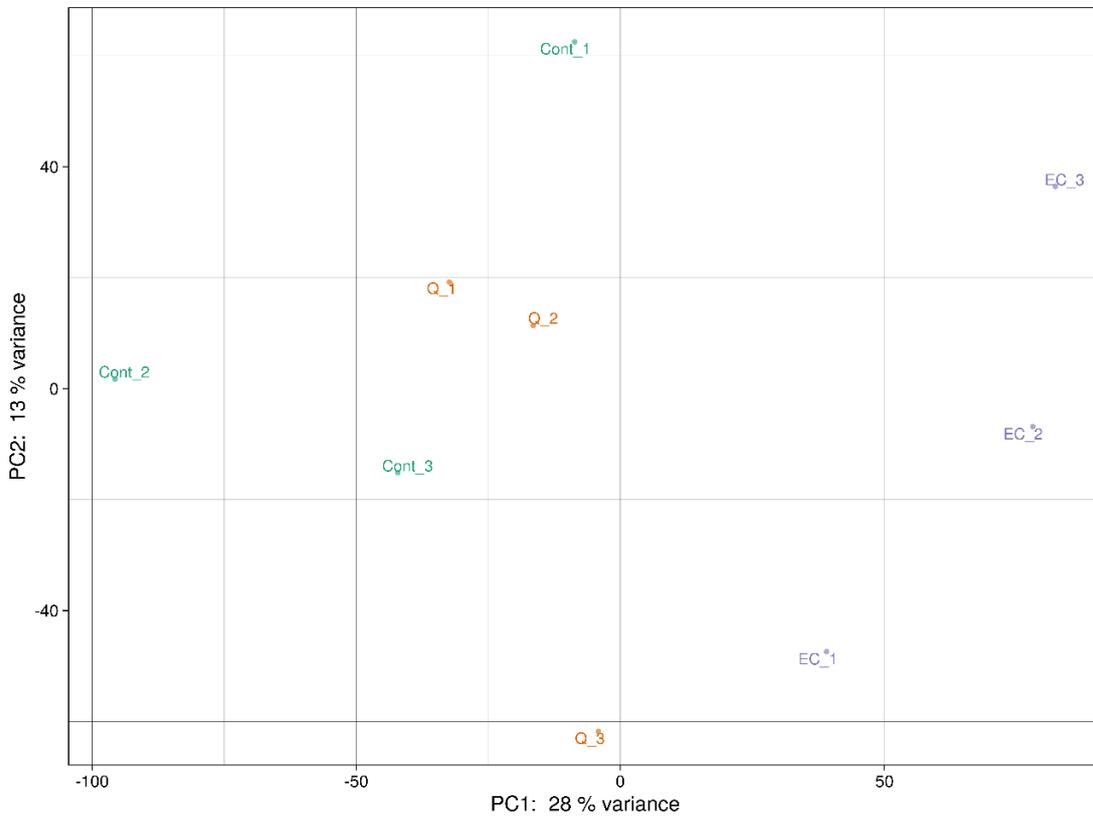


図 5-2. 主成分分析の結果

本研究では脂肪細胞に発現している T2R が何等かの細胞機能調節、特に代謝制御に関わっている可能性を前提にしているため、発現変動遺伝子の中から特に代謝に関連しそうなものを抜粋して詳しい解析に移ることとした。

キニーネ刺激により発現が上昇した遺伝子及び減少した全遺伝子について閾値 $P < 0.05$ で抽出した遺伝子（表 6、7）とそれを基に作図したボルケーノプロット（図 5-3）を見るとわかるように、有意に発現変動した遺伝子数が 58 と少ないため（表 5）、発現変動遺伝子から関与する機能を推定するのは困難であった。そこで、発現変動遺伝子の抽出条件を閾値 $|\log_2FC| > 1$ に変更して再度発現変動遺伝子の抽出を行った。すると、この条件では 2855 の発現変動遺伝子が抽出された（表 5）。次に、抽出された発現変動遺伝子のデータを基にプログラム DAVIDWebservice にて GO のエンリッチメント解析を行った。その結果、閾値の条件を $|\log_2FC| > 1$ とした場合に発現変動したものの上位 10 個の GO biological process terms のうち、フォスファチジルコリン代謝、痛覚刺激、炎症、免疫応答に関連する遺伝子発現が比較的多く上昇していた（図 5-4）。また、減少したものでは炎症応答、膜タンパクチロシンキナーゼシグナル経路、DNA のメチル化に関係する遺伝子が比較的多く検出された（図 5-5）。このようにキニーネ刺激では炎症・免疫応答に関与する遺伝子発現の変動が比較的多く検出された。

一方で、エピカテキン刺激により発現変動した遺伝子は閾値 $P < 0.05$ の条件では全部で 95 種類あり（表 5）、そのうち発現上昇が起きた遺伝子は、cAMP への応答や脂肪細胞分化に関連する遺伝子群が特に多く発現上昇していた（図 5-6、表 8）。減少した遺伝子群はコラーゲン生合成経路やストレスファイバーアセンブリの正方制御などが上位にランクしていたが（図 5-7、表 9）、これらは脂肪細胞の代謝機能には関係がなく、また検出された遺伝子数も少なかった。

これらの結果よりキニーネよりもエピカテキンの方が脂肪細胞の代謝調節に関わっている可能性が高いと考え、エピカテキン刺激により発現が上昇した遺伝子に注目した。GO エンリッチメント解析の結果から、エピカテキン刺激により脂肪細胞分化や cAMP への応答に関連する遺伝子の発現が上昇しているこ

とが示唆されたので (図 5-6)、上位 10 個の GO biological process terms のうち、「fat cell differentiation」および「response to cAMP」に含まれる遺伝子を確認したところ、「fat cell differentiation」には *Nr4a1*、*Nr4a2*、*Nr4a3*、*Egr2* が、「response to cAMP」には *Duox1*、*Dusp1*、*Mat2a*、*Fosb* が含まれていた。また、発現上昇遺伝子の中からカテゴリー「lipid metabolism」で検索すると、先ほどの *Nr4a* に加え、*Lepr* の発現も上昇していることがわかった。これらの遺伝子のうち *Nr4a* と *Egr2* は脂肪細胞の分化を調節する転写因子であることが知られていることから (Chao et al. 2008; Duszka et al. 2013; Boyle et al. 2009; Chen et al. 2005)、脂肪細胞に発現している T2R はエピカテキンを受容することで細胞分化を調節している可能性が考えられた。また、*Lepr* は飽食ホルモンであるレプチンの受容体をコードする遺伝子であることから、脂肪細胞に発現している T2R はエピカテキンを受容して脂質代謝調節に関与している可能性も考えられた。以上のことから *Lepr*、*Egr2*、*Nr4a* の発現上昇に注目した。なお、これらの注目した 3 つの遺伝子に加え、*Tas2r135* の発現が上昇していることも併せて確認できた (図 5-8、表 8)。

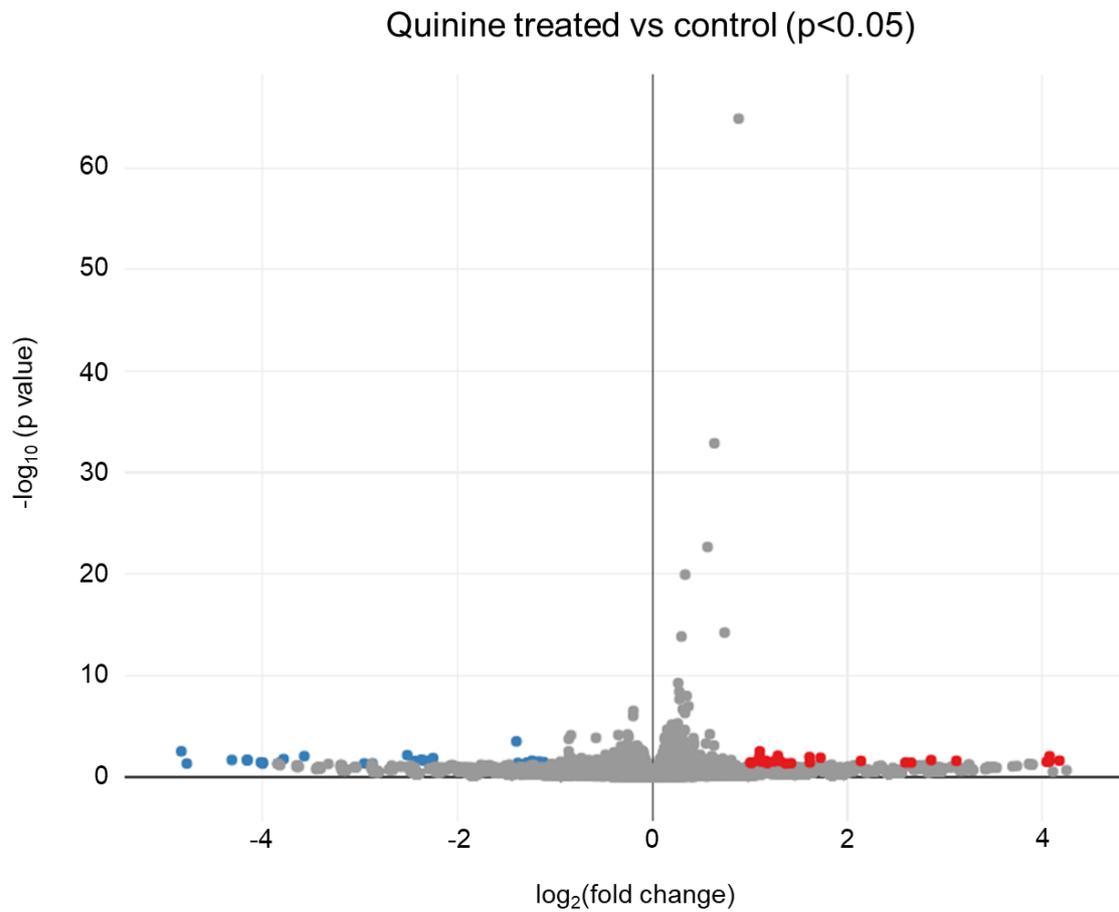


図 5-3. キニーネ刺激により発現変動した遺伝子のボルケーノプロット
 赤色の丸は有意に発現上昇した遺伝子を、青色の丸は有意に発現減少した遺伝子を、灰色の丸は有意な発現変動がみられなかった遺伝子をそれぞれ示す。 $P < 0.05$

表 6. キニーネ刺激により発現が上昇した 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子 ($P < 0.05$)

GeneID	log ₂ FoldChange(B/A)	p value	gene_sym
ENSMUSG00000004748	1.017	0.041	<i>Mtfp1</i>
ENSMUSG00000014158	4.072	0.009	<i>Trpv4</i>
ENSMUSG00000024210	1.369	0.047	<i>Ip6k3</i>
ENSMUSG00000026479	1.098	0.008	<i>Lamc2</i>
ENSMUSG00000027855	1.614	0.037	<i>Sycp1</i>
ENSMUSG00000028555	1.162	0.025	<i>Ttc39a</i>
ENSMUSG00000042549	1.088	0.019	<i>Map2k3os</i>
ENSMUSG00000042604	1.118	0.030	<i>Kcna4</i>
ENSMUSG00000048498	4.173	0.025	<i>Cd300e</i>
ENSMUSG00000050368	4.043	0.032	<i>Hoxd10</i>
ENSMUSG00000051920	1.308	0.026	<i>Rspo2</i>
ENSMUSG00000054556	1.247	0.028	<i>Gm4876</i>
ENSMUSG00000055629	1.421	0.044	<i>B4galnt4</i>
ENSMUSG00000061082	2.594	0.038	<i>Plac1</i>
ENSMUSG00000068762	2.138	0.026	<i>Gstm6</i>
ENSMUSG00000078875	1.286	0.008	<i>Gm14419</i>
ENSMUSG00000083817	1.178	0.043	<i>Gm14400</i>
ENSMUSG00000085689	1.100	0.003	<i>Gm16838</i>
ENSMUSG00000086773	1.091	0.025	<i>Gm16192</i>
ENSMUSG00000087266	1.610	0.011	<i>Gm15991</i>
ENSMUSG00000087400	1.003	0.038	<i>Gm15270</i>
ENSMUSG00000092312	3.117	0.026	<i>Zfp419</i>
ENSMUSG00000097300	1.723	0.013	<i>Gm26835</i>
ENSMUSG00000097911	2.858	0.021	<i>Gm26691</i>
ENSMUSG00000099126	4.069	0.031	<i>Gm27321</i>
ENSMUSG00000109102	2.653	0.038	<i>1700019A23Rik</i>

表 7. キニーネ刺激により発現が減少した 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子 ($P < 0.05$)

GeneID	log ₂ FoldChange(B/A)	p value	gene_sym
ENSMUSG00000022066	-2.514	0.007	<i>Gm21685</i>
ENSMUSG00000027356	-3.995	0.038	<i>Fermt1</i>
ENSMUSG00000030336	-2.250	0.014	<i>Cd27</i>
ENSMUSG00000035041	-3.835	0.048	<i>Creb3l3</i>
ENSMUSG00000036641	-3.835	0.048	<i>Ccdc148</i>
ENSMUSG00000036655	-3.841	0.048	<i>Colec11</i>
ENSMUSG00000038155	-2.369	0.019	<i>Gstp2</i>
ENSMUSG00000039492	-1.380	0.041	<i>Ccdc27</i>
ENSMUSG00000050821	-1.290	0.041	<i>Fam131a</i>
ENSMUSG00000051373	-4.313	0.021	<i>Plpp7</i>
ENSMUSG00000054863	-2.956	0.046	<i>Fam19a5</i>
ENSMUSG00000059511	-3.570	0.009	<i>Gm20563</i>
ENSMUSG00000078365	-3.829	0.049	<i>Mos</i>
ENSMUSG00000079499	-4.156	0.022	<i>6530402F18Rik</i>
ENSMUSG00000080932	-2.872	0.045	<i>Gm10224</i>
ENSMUSG00000082051	-2.307	0.025	<i>Gm16072</i>
ENSMUSG00000086513	-4.016	0.036	<i>9130208D14Rik</i>
ENSMUSG00000089781	-2.436	0.026	<i>Gm15756</i>
ENSMUSG00000090674	-2.348	0.024	<i>Gm17082</i>
ENSMUSG00000090839	-3.998	0.048	<i>Gm17094</i>
ENSMUSG00000096922	-4.156	0.022	<i>Gm17308</i>
ENSMUSG00000097098	-4.154	0.022	<i>9330111N05Rik</i>
ENSMUSG00000097251	-3.783	0.017	<i>5033417F24Rik</i>
ENSMUSG00000097855	-1.116	0.034	<i>A930007I19Rik</i>
ENSMUSG00000099027	-4.775	0.047	<i>Gm27176</i>
ENSMUSG00000099779	-1.283	0.039	<i>Gm8228</i>
ENSMUSG00000100261	-1.236	0.025	<i>Gm6473</i>
ENSMUSG00000102038	-1.229	0.032	<i>Gm12345</i>
ENSMUSG00000105135	-1.165	0.030	<i>Gm43667</i>
ENSMUSG00000105517	-4.832	0.003	<i>Gm42436</i>
ENSMUSG00000107770	-1.396	0.000	<i>Gm44126</i>

GO biological process terms (top 10)

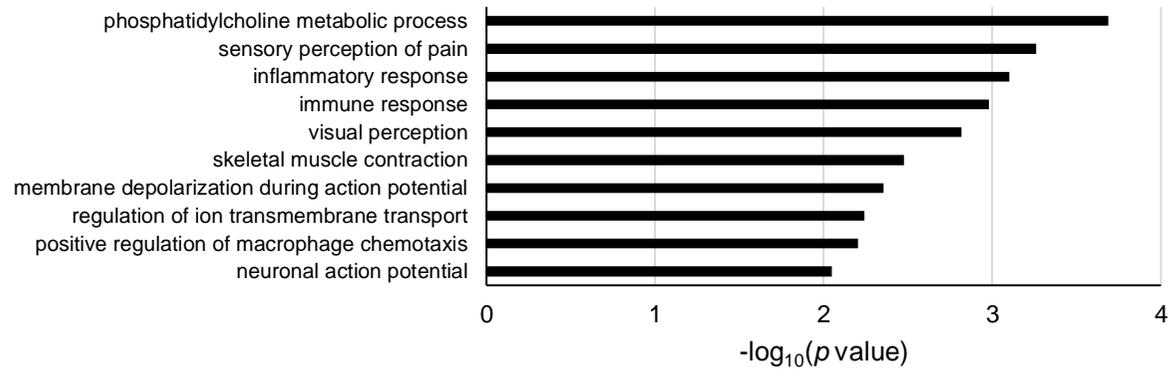


図 5-4. キニーネ刺激により発現が上昇した遺伝子の GO ターム ($|\log_2FC| > 1$)

GO biological process terms (top 10)

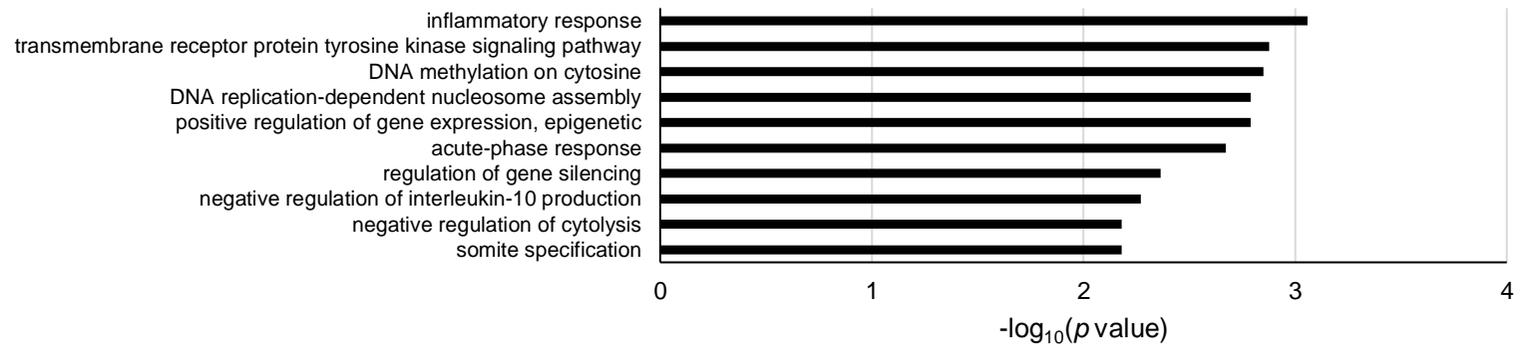


図 5-5. キニーネ刺激により発現が減少した遺伝子の GO ターム ($|\log_2FC| > 1$)

GO biological process terms (top 10)

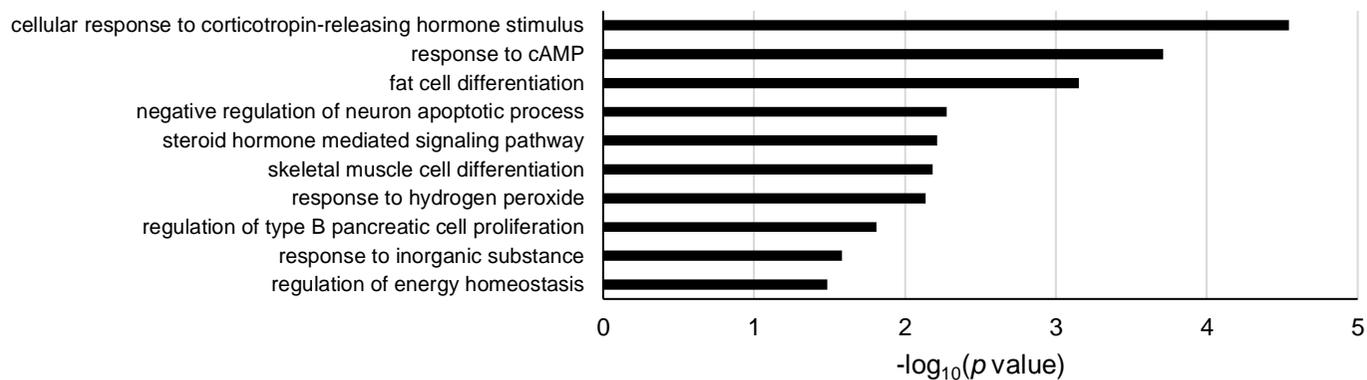


図 5-6. エピカテキン刺激により発現が上昇した遺伝子の GO ターム ($P < 0.05$)

GO biological process terms (top 6)

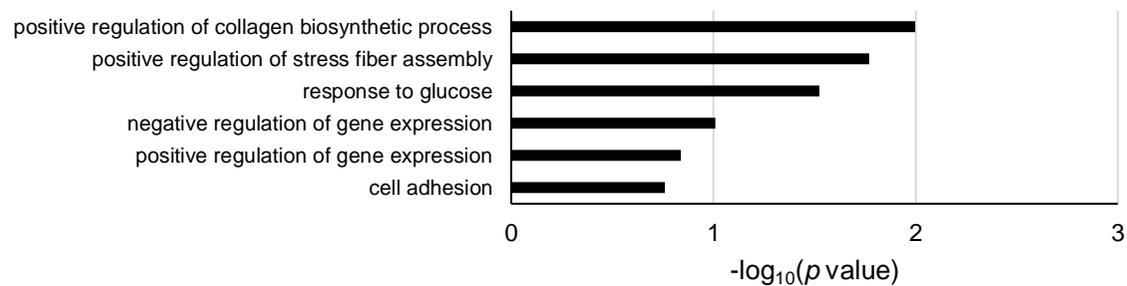


図 5-7. エピカテキン刺激により発現が減少した遺伝子の GO ターム ($P < 0.05$)

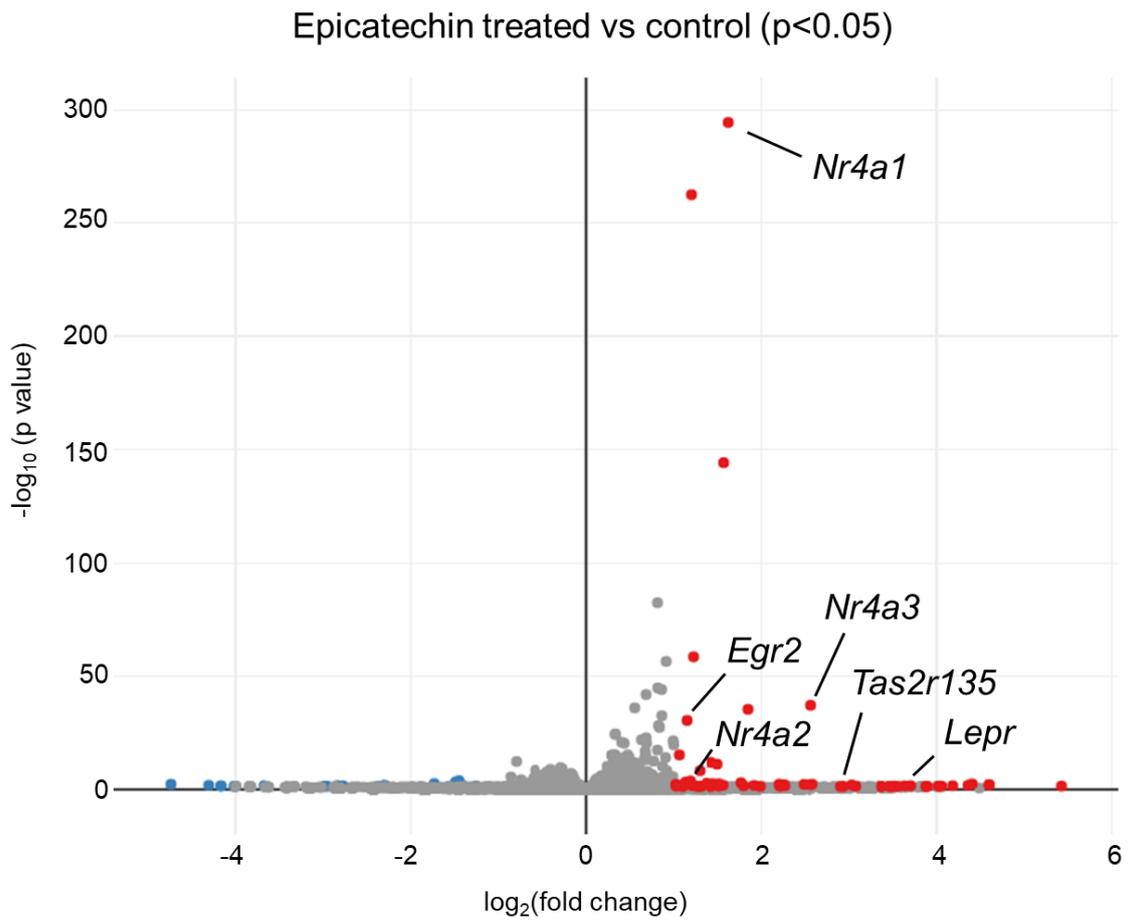


図 5-8. エピカテキン刺激により発現変動した遺伝子のボルケーノプロット
 赤色の丸は有意に発現上昇した遺伝子を、青色の丸は有意に発現減少した遺伝子を、灰色の丸は有意な発現変動がみられなかった遺伝子をそれぞれ示す。図中に記載されている遺伝子は本研究で注目した遺伝子を示す。P<0.05

表 8. エピカテキン刺激により発現が上昇した 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子 ($P < 0.05$)

GeneID	log ₂ FoldChange(C/A)	pvalue	gene_sym*
ENSMUSG00000003545	1.291	0.000	<i>Fosb</i>
ENSMUSG00000005413	1.360	0.000	<i>Hmox1</i>
ENSMUSG00000008348	1.499	0.000	<i>Ubc</i>
ENSMUSG00000017300	3.470	0.044	<i>Tnnc2</i>
ENSMUSG00000020423	1.574	0.000	<i>Btg2</i>
ENSMUSG00000021640	4.023	0.037	<i>Naip1</i>
ENSMUSG00000023034	1.626	0.000	<i>Nr4a1</i>
ENSMUSG00000024190	1.056	0.000	<i>Dusp1</i>
ENSMUSG00000026418	2.259	0.009	<i>Tnni1</i>
ENSMUSG00000026692	3.562	0.047	<i>Fmo4</i>
ENSMUSG00000026826	1.182	0.000	<i>Nr4a2</i>
ENSMUSG00000026833	1.432	0.035	<i>Olfm1</i>
ENSMUSG00000027173	1.770	0.001	<i>Depdc7</i>
ENSMUSG00000027692	3.364	0.050	<i>Tnik</i>
ENSMUSG00000028217	2.210	0.036	<i>Cdh17</i>
ENSMUSG00000028341	2.559	0.000	<i>Nr4a3</i>
ENSMUSG00000028475	1.086	0.041	<i>5430416O09Rik</i>
ENSMUSG00000028946	3.880	0.047	<i>Hes3</i>
ENSMUSG00000030344	4.040	0.033	<i>Akap3</i>
ENSMUSG00000030431	3.898	0.048	<i>Tmem238</i>
ENSMUSG00000032523	3.708	0.024	<i>Hhat1</i>
ENSMUSG00000032589	2.486	0.006	<i>Bsn</i>
ENSMUSG00000033007	1.800	0.029	<i>Asic4</i>
ENSMUSG00000033268	3.070	0.041	<i>Duox1</i>
ENSMUSG00000034845	1.253	0.049	<i>Plvap</i>
ENSMUSG00000034936	1.129	0.001	<i>Arl4d</i>
ENSMUSG00000036067	4.405	0.004	<i>Slc2a6</i>
ENSMUSG00000037868	1.144	0.000	<i>Egr2</i>
ENSMUSG00000040473	1.020	0.038	<i>Cfap69</i>
ENSMUSG00000042417	1.196	0.007	<i>Ccno</i>
ENSMUSG00000042549	1.369	0.002	<i>Map2k3os</i>

ENSMUSG00000044041	1.990	0.048	<i>Krt13</i>
ENSMUSG00000053907	1.193	0.000	<i>Mat2a</i>
ENSMUSG00000055494	3.377	0.048	<i>Gm14168</i>
ENSMUSG00000055629	1.425	0.047	<i>B4galnt4</i>
ENSMUSG00000056155	3.528	0.036	<i>Nanos3</i>
ENSMUSG00000056203	2.898	0.050	<i>Tas2r135</i>
ENSMUSG00000056313	1.016	0.006	<i>1810011O10Rik</i>
ENSMUSG00000057722	3.477	0.040	<i>Lepr</i>
ENSMUSG00000058297	4.184	0.026	<i>Spock2</i>
ENSMUSG00000058900	1.302	0.048	<i>Rsl1</i>
ENSMUSG00000061082	3.025	0.011	<i>Plac1</i>
ENSMUSG00000061531	3.641	0.028	<i>Tmem236</i>
ENSMUSG00000062461	2.928	0.049	<i>Gm5453</i>
ENSMUSG00000069184	1.566	0.015	<i>Zfp72</i>
ENSMUSG00000070526	1.097	0.045	<i>Peg12</i>
ENSMUSG00000071181	3.503	0.038	<i>3830408C21Rik</i>
ENSMUSG00000072612	1.428	0.000	<i>Gm10382</i>
ENSMUSG00000074063	1.850	0.000	<i>Osgin1</i>
ENSMUSG00000081021	1.518	0.038	<i>Gm11964</i>
ENSMUSG00000081673	2.575	0.005	<i>Gm14794</i>
ENSMUSG00000082029	1.520	0.003	<i>H3f3c</i>
ENSMUSG00000082274	1.452	0.003	<i>Gm14026</i>
ENSMUSG00000087530	4.597	0.009	<i>Gm15533</i>
ENSMUSG00000092074	1.405	0.004	<i>Dynlt1a</i>
ENSMUSG00000092284	1.206	0.020	<i>Gm8801</i>
ENSMUSG00000094475	2.267	0.024	<i>Gm11007</i>
ENSMUSG00000095717	2.229	0.030	<i>Gm2056</i>
ENSMUSG00000096959	4.359	0.016	<i>4930509G22Rik</i>
ENSMUSG00000097723	5.433	0.036	<i>Gm26848</i>
ENSMUSG00000097754	1.281	0.032	<i>Ptgs2os2</i>
ENSMUSG00000097787	1.399	0.015	<i>2700046G09Rik</i>
ENSMUSG00000098590	4.597	0.009	<i>Gm1113</i>
ENSMUSG00000098975	2.204	0.005	<i>Gm27177</i>
ENSMUSG00000106181	1.035	0.013	<i>Gm9523</i>

ENSMUSG00000108591	1.217	0.000	<i>Particl</i>
ENSMUSG00000109006	4.060	0.045	B230209E15Rik
ENSMUSG00000110030	1.920	0.018	Gm45546
ENSMUSG00000110622	2.558	0.009	KIAA1683

*本研究で注目した遺伝子を太字で示す。

表9. エピカテキン刺激により発現が減少した 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子($P < 0.05$)

GeneID	log ₂ FoldChange(C/A)	p value	gene_sym
ENSMUSG00000003934	-2.316	0.027	<i>Efnb3</i>
ENSMUSG00000019997	-1.455	0.000	<i>Ctgf</i>
ENSMUSG00000022018	-1.263	0.033	<i>Rgcc</i>
ENSMUSG00000027356	-3.998	0.040	<i>Fermt1</i>
ENSMUSG00000027861	-2.993	0.037	<i>Casq2</i>
ENSMUSG00000032988	-2.374	0.043	<i>Slc16a8</i>
ENSMUSG00000043085	-1.538	0.028	<i>Tmem82</i>
ENSMUSG00000045868	-1.457	0.049	<i>Gvin1</i>
ENSMUSG00000049699	-4.306	0.017	<i>Ucn2</i>
ENSMUSG00000054957	-1.728	0.041	<i>Gm9959</i>
ENSMUSG00000067786	-2.787	0.026	<i>Nnat</i>
ENSMUSG00000075276	-4.020	0.048	<i>Gm13653</i>
ENSMUSG00000087292	-2.309	0.023	<i>Gm13832</i>
ENSMUSG00000089781	-2.852	0.022	<i>Gm15756</i>
ENSMUSG00000090863	-4.749	0.005	<i>A530084C06Rik</i>
ENSMUSG00000094103	-1.495	0.001	<i>1700047I17Rik2</i>
ENSMUSG00000096945	-1.522	0.034	<i>Gm26546</i>
ENSMUSG00000096946	-3.679	0.024	<i>Fmr1os</i>
ENSMUSG00000100261	-1.735	0.003	<i>Gm6473</i>
ENSMUSG00000103574	-2.291	0.020	<i>Gm37116</i>
ENSMUSG00000105135	-1.417	0.014	<i>Gm43667</i>
ENSMUSG00000105517	-2.963	0.041	<i>Gm42436</i>
ENSMUSG00000108859	-4.166	0.035	<i>Gm44776</i>
ENSMUSG00000109179	-2.349	0.041	<i>Gm35339</i>
ENSMUSG00000109821	-4.168	0.026	<i>Gm6593</i>

次に、実際に *Lepr*、*Egr2*、*Nr4a* の遺伝子発現がエピカテキン刺激により上昇しているのかどうかを調べるために、エピカテキン 2.5 mM で 1 時間刺激した 3T3-L1 脂肪細胞より total RNA を抽出し、RT-qPCR 法によりそれぞれの遺伝子発現を解析した。その結果、エピカテキン刺激により *Egr2*、*Nr4a1*、*Nr4a2*、*Nr4a3* の発現が有意に上昇することを確認した(図 5-9)。*Lepr* はエピカテキン刺激により遺伝子発現に変化がなかった。

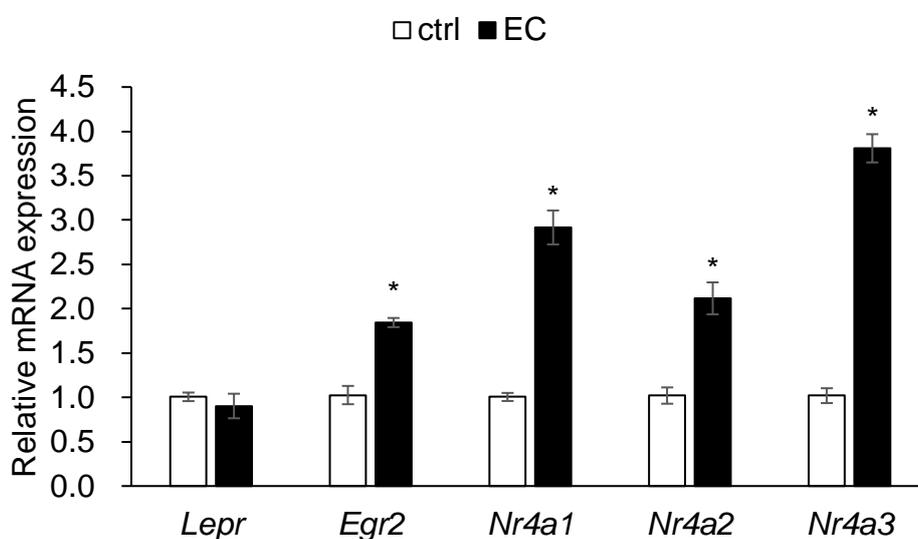


図 5-9. エピカテキン刺激による *Lepr*、*Egr2*、*Nr4a* 遺伝子発現への影響

3T3-L1 を 10 日間の分化誘導後、最終濃度 2.5 mM のエピカテキンを含む培地に交換し 1 時間培養後に total RNA を抽出し、RT-qPCR 法で解析した。データは平均値±SEM で示した。n=6, Student's *t*-test, **P*<0.05 v.s. control

5-2. T2R が 3T3-L1 細胞の分化に与える影響

5-1 節より、エピカテキン刺激が 3T3-L1 脂肪細胞の *Egr2* と *Nr4a* の発現を上昇させることが分かった。*Egr2* と *Nr4a* は、脂肪細胞分化の際に働く転写因子として知られている (Boyle et al. 2009; Chen et al. 2005; Chao et al. 2008; Duszka et al. 2013)。つまり、これら遺伝子発現の変化が T2R を介しているならば、T2R は 3T3-L1 細胞の分化を調節する機能を有する可能性が考えられる。

エピカテキンには、その標的分子は明らかでないが、3T3-L1 細胞の分化阻害効果が報告されている (Mohamed et al. 2016)。エピカテキンは T2r126 のリガンドであるため、T2r126 は 3T3-L1 細胞の分化阻害に関わっている可能性がある。そこで、エピカテキンの 3T3-L1 細胞に対する分化阻害効果を確認した上で、T2R の過剰発現がそれに与える影響を解析した。

はじめに、エピカテキンの 3T3-L1 細胞に対する作用を確認するため、3T3-L1 細胞の分化誘導の際にエピカテキンを共存させ、脂肪蓄積量を指標として分化阻害効果を確認した。その結果、400 μ M 以上の濃度で有意に 3T3-L1 の分化阻害効果を確認した (図 5-10)。また、その際に細胞生存率に影響は見られなかった (図 5-11)。

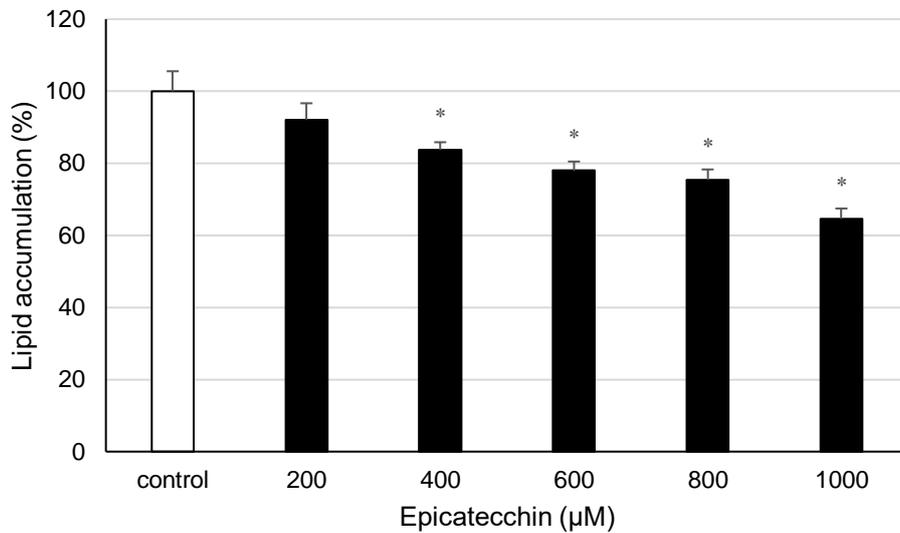


図 5-10. エピカテキンの 3T3-L1 細胞に対する分化阻害作用

3T3-L1 の分化誘導の際にエピカテキンを図中の濃度になるように培地に加え、6 日間培養した後、Adipored 試薬により染色した脂肪滴の蛍光強度を指標に分化に対する影響を調べた。データは平均値±SEM で示した。n=6, one-way ANOVA に続く Dunnet's multiple comparison test, * $P < 0.05$

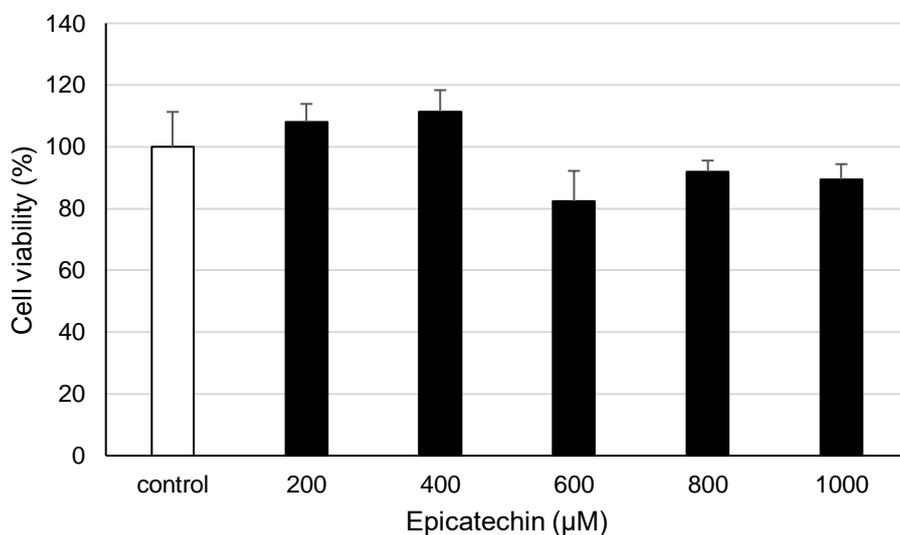


図 5-11. エピカテキンの 3T3-L1 細胞に対する分化阻害試験の際の細胞生存率

3T3-L1 の分化誘導の際にエピカテキンを図中の濃度になるように培地に加え、6 日間培養した後、CCK-8 試薬により細胞生存率を測定した。データは平均値±SEM で示した。n=6, one-way ANOVA に続く Dunnet's multiple comparison test, * $P < 0.05$

次に、エピカテキンによる 3T3-L1 細胞の分化阻害効果が、T2R と関与しているかどうかを確認するため、3T3-L1 に T2R を過剰発現させ、分化に与える影響、およびエピカテキンの分化阻害に与える影響を解析した。過剰発現させる T2R としては、エピカテキンをリガンドとする T2r126 に加え、エピカテキン刺激での発現変化が *Tas2r126*、*135*、*143* と比較して小さかった (図 4-8) T2r108 とした。

T2R 過剰発現株の作製は T2r108、126 それぞれの全タンパクコード領域を pcDNA3.1/hygro(+)プラスミドベクターに Infusion 法でサブクローニングしたものを 3T3-L1 細胞にトランスフェクションし、ハイグロマイシンにより選抜することで行った。作製した過剰発現株は RT-qPCR 法により T2R の過剰発現を確認後 (図 5-12)、T2R の過剰発現がエピカテキンの 3T3-L1 の分化阻害に与える影響の解析を行った。方法としては、T2r108、126 をそれぞれ過剰発現させた 3T3-L1 を分化誘導したのち、蓄積した脂肪滴を染色した際の蛍光強度を分化の指標として評価した。また分化誘導中にエピカテキンを添加した際の影響も評価した。

その結果、T2r126、108 の過剰発現によりコントロールと比較して分化が有意に抑制された (図 5-13)。また、750 μ M および 1 mM のエピカテキン投与により、コントロールではそれぞれ 15% および 40% の分化阻害が確認され、T2r126、108 を過剰発現させたものでは更に分化が抑制されていた。

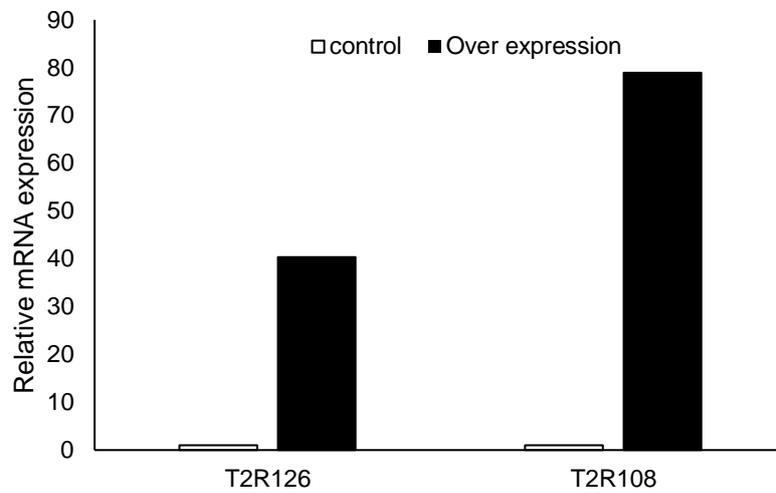
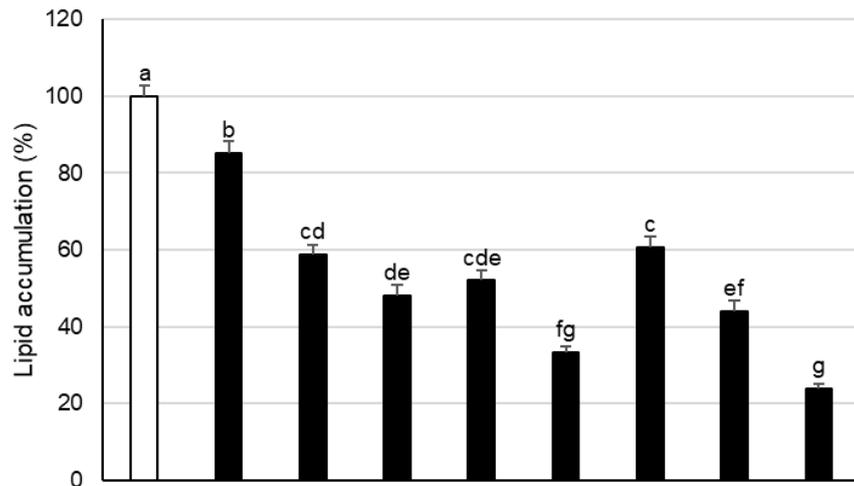


図 5 -12. RT-qPCR 法による T2R 過剰発現の確認

T2R108 または T2R126pcDNA3.1/hygro(+) を 3T3-L1 にトランスフェクションし、3 日間の培養後、ハイグロマイシン入りの培地で培養することで恒常的に目的の T2R を発現する細胞を選抜後、RT-qPCR 法にて過剰発現の確認を行った。コントロールとしては、トランスフェクションを行っていない 3T3-L1 を用いた。



T2r108 overexpression	-	-	-	+	+	+	-	-	-
T2r126 overexpression	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Epicatechin 750 μM	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Epicatechin 1 mM	-	-	+	-	-	+	-	-	+

図 5-13. T2R 過剰発現が 3T3-L1 の分化に与える影響と、エピカテキンの分化阻害に与える影響

T2r108 を過剰発現する 3T3-L1 細胞、T2r126 を過剰発現する 3T3-L1 細胞、コントロールとして過剰発現をしていない 3T3-L1 細胞をプレートに播種し、それぞれ 6 日間の分化誘導を行った。分化誘導の際には最終濃度 1 mM でエピカテキンを添加した培地 (DMSO の最終濃度は 0.5%) と、コントロールとして最終濃度 0.5% DMSO を添加した培地を用いた。6 日間の分化誘導後、Adipored 試薬により染色した脂肪滴の蛍光強度を測定し、コントロールの値を 100% としたときのサンプルの蛍光強度を分化の指標とした。データは平均値 ± SEM で示した。異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示す。n=6, Tukey's test, $P < 0.05$.

5-3. まとめ

キニーネとエピカテキンでそれぞれ刺激した 3T3-L1 脂肪細胞のトランスクリプトーム解析の結果、キニーネで刺激した場合とエピカテキンで刺激した場合とでは異なる遺伝子群の発現が変動していることが明らかになった。エピカテキンで刺激した場合に、脂肪細胞の分化や cAMP の応答など、脂肪細胞分化の調節に関わる遺伝子発現の変動が起きていた。RT-qPCR 法に発現変動した遺伝子について再解析した結果、エピカテキン刺激により脂肪細胞の分化に関わる転写因子である *Egr2*、*Nr4a* の発現が上昇していることが確認された。

エピカテキンには 3T3-L1 細胞の分化阻害効果が知られていたため (Mohamed et al. 2016)、T2R の関与を調べるために T2r126、108 をそれぞれ過剰発現した 3T3-L1 を用いて、T2R の過剰発現が脂肪細胞分化に与える影響及びエピカテキンの分化阻害に与える影響を解析した。その結果、T2r126、108 の過剰発現により、3T3-L1 細胞の分化が抑制された。このことから、脂肪細胞に発現している T2r126、108 は脂肪細胞の分化調節に関わっていることが示された。

第6章 総合考察

6-1. マウス組織に発現する T2R プロファイルに関して

6-1-1. 先行報告との T2R 発現解析結果の比較

マウスの口腔以外の組織における T2R 発現については、小腸や肝臓において調べた報告がある(Prandi et al. 2018)。その報告によると、小腸では *Tas2r108*、*119*、*126*、*129*、*135*、*137*、*138* 及び *143* が、肝臓では *Tas2r108*、*126*、*135*、*137*、*138* および *143* の発現が報告されている。これに対し今回の結果では小腸において *Tas2r129* は発現しておらず、*Tas2r109*、*140*、*144* が発現していた(図 3-4)。肝臓の場合は、報告と同じ T2R に加え *Tas2r109* 及び *Tas2r130* の発現を確認した(図 3-5)。さらに Mouse Gene Expression Database (MXD) によると、肝臓、十二指腸、回腸、空腸には *Tas2r108* と *Tas2r138* が発現しており、空腸には *Tas2r119* が、小腸上皮には *Gnat3* が発現していることが示されており、これは今回の結果と一致していた。対照的に、MXD では *Tas2r118* も発現していると掲載されていたが、今回の結果では *Tas2r118* の発現は確認できなかった。

こうした遺伝子発現プロファイルの違いは、生育環境によって生じる個体差があることや、苦味に対する感受性に個体差があることなどから説明できる(Wooding 2006)。T2R の発現は、寄生虫の分泌する化合物刺激(Luo et al. 2019)やヒトにおける喫煙習慣の違い(Aoki et al. 2014)など、様々な環境刺激により変動することが報告されている。したがって、ブリーダーによる生育条件の違いや環境刺激などの因子がそれぞれ若しくは複合的に影響した結果、このような発現プロファイルの差異を生んだ可能性が考えられる。また、①今回の解析結果は C57BL/6N マウスのものであり、他系統種では異なる遺伝子発現プロファイルを示す可能性があること、②T2R の発現はタンパク質レベルではなく全て mRNA レベルで解析していること、以上の2点の理由によりまだ解析の余地が残されている。

マウスの白色脂肪組織、褐色脂肪組織及び骨格筋の T2R 発現については、現在までに報告がなく、今回の結果が最初の報告となった (図 3-1 から 3-3)。ヒトの脂肪組織や気道平滑筋における T2R 発現パターンは既に報告がある。例えば、Amisten らは *T2R3*, 7, 14, 19, 20, 31, 43, 45 及び 46 がヒト脂肪組織に発現していることを (Amisten et al. 2015)、Deshpande らは *T2R1*, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 19, 20, 30, 31, 42, 45, 46 お及び 50 がヒト平滑筋に発現していることを (Deshpande et al., 2010) それぞれ報告している。また、Genotype-Tissue Expression (GTEx) データベースによると、*T2R3*, 4, 5, 10, 13, 14, 40, 42, 43, 46, 50, 60 がヒトの脂肪組織に、*T2R3*, 4, 5, 10, 13, 14, 43, 46, 50, 60 がヒト骨格筋に発現していることが示されている。このように、脂肪組織や筋組織においてもそれぞれデータベースや報告毎に遺伝子発現パターンに差異があるが、これも前述したような生育条件や環境刺激による違いであると考えられる。

Tas2r108, 126, 135, 137, 143 はマウスの組織および細胞株ともに共通して発現していた (表 3)。*T2r108*, 126, 135, 137 はヒト *T2R4*, 41, 60, 3 のオーソログであることから (Lossow et al. 2016)、マウスの組織に発現する T2R を活性化するリガンドはヒトの組織に発現する T2R も活性化できることを期待した。しかしながら、Lossow らはこれらのオーソログ間でリガンドに対する特異性が異なることを報告しているため、ヒトとマウスの T2R は必ずしも同じ機能を有していない可能性もある (図 6-1)。このように、ヒトとマウスの T2R はオーソログのペア間でリガンド認識性が異なるため、ヒトとマウスの T2R 機能を結びつけるのは難しいと考えられる。

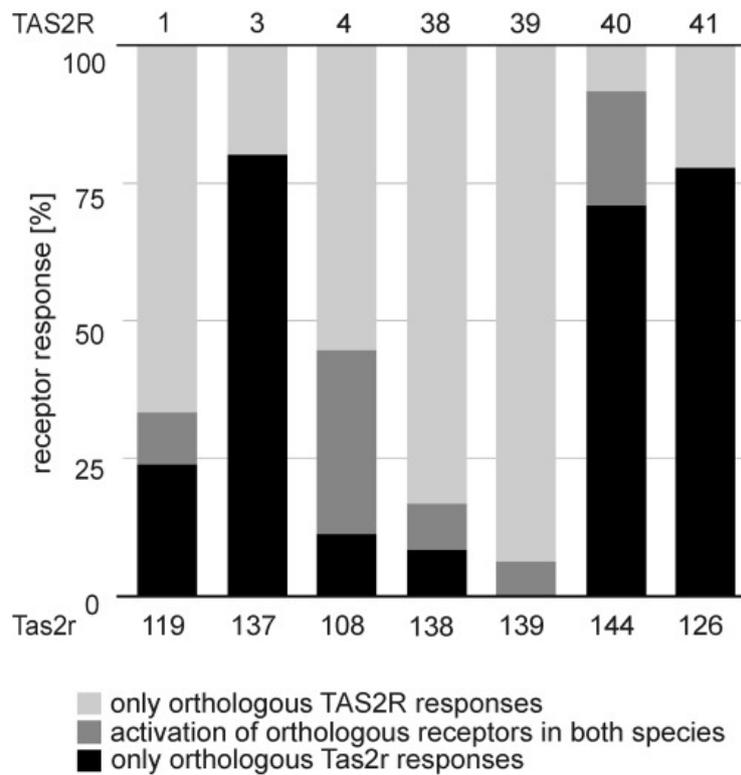


図 6-1. マウスとヒトの苦味受容体オーソログのリガンド認識性

図の上の数字はヒト T2R (TAS2R と表記) を示し、下の数字はマウス T2R (Tas2r と表記) を示しており、上下は対応するオーソログであることを表す。縦軸は各オーソログペアが認識するアゴニストのうち、ヒト T2R のみに認識されるものを薄灰色のバー、マウス T2R のみに認識されるものを黒色のバー、両方に認識されるものを濃灰色のバーで示す。(Lossow et al. 2016)より引用して改変。

脂肪組織や骨格筋およびそれらの細胞株において共通の T2R が発現していた。また、C57BL/6J マウスと 3T3-L1 に発現している *Tas2r108*, *126*, *135*, *137*, *143* 遺伝子の塩基配列は DNA シーケンス解析の結果、完全に一致していた。C57BL/6J マウスについては 35 種類全ての T2R の DNA シーケンスを解析したが、*T2R107*, *130* はデータベースと一部一致しない配列が存在した（付録、表 10）。これは苦味の感受性に影響を与える可能性があるが、これを詳しく調べるには更なる解析試験を行う必要がある。しかし、今回の結果から、*Tas2r108*, *126*, *135*, *137*, *143* の 5 種類においては、3T3-L1 細胞株をマウス組織のモデルとして解析することで、マウス組織に発現している T2R 機能解析の足掛かりになる可能性がある。

6-1-3. マウス組織と細胞株に共通して発現する T2R の機能推定

今回調べた 5 種類のマウス組織および 2 種類の細胞株には共通して *Tas2r108*, *126*, *135*, *137*, *143* が発現していたが、これらの T2R が実際に組織や細胞でどのような機能を担っているかについては、それぞれのリガンドが組織や細胞に与える効果から推定することができる。

T2r108、126、135、137、143 は、143 を除いてリガンド化合物が既に報告されている(Lossow et al. 2016)。それらのリガンドのうち、キニーネ (T2r108、126、137 のリガンド)、エメチンやヨヒンビン (T2r108 のリガンド)、安息香酸デナトニウム (T2r135 のリガンド)、アリルイソチオシアネート (T2r135 のリガンド)、サリチル酸 (T2r135 のリガンド)、エピカテキンやコルヒチン (T2r126 のリガンド) は、動物実験や臨床試験により、肥満や糖尿病に影響することが示唆されており、以下にそれらについて詳しく述べる。

キニーネの経口投与は、肥満マウスの食餌摂取量に影響を与えずに体重を減少させ、デナトニウムも食餌摂取量が減少したものの、体重の減少効果を示すことが報告されている(Avau et al. 2015)。エメチンは、1 型糖尿病を誘導したマウスに投与すると膵臓からの tumor necrosis factor- α (TNF α) の放出を抑えて血糖値の低下作用を示す(Hudson et al. 2016)。ヨヒンビンは、マウスに腹腔内投与を行うことで血中のグルコース量、コレステロールやトリグリセリドなどを低下させることが報告されている(Kotańska et al. 2018)。アリルイソチオシアネートは、食餌誘導性肥満マウスの肥満を改善し、インスリン抵抗性を誘導した C2C12 細胞の糖取り込みを促進する(Ahn et al. 2014)。サリチル酸は糖尿病患者の血糖値を下げる事が知られ(Rumore and Kim 2010)、エピカテキンは高脂肪食摂取マウスのインスリン感受性を改善し、体重を減少させること(Cremonini et al. 2016; Hoek-van den Hil et al. 2015) や、ミトコンドリアの生合成を促進することで脂肪細胞の褐色化を誘導することが知られている(Varela et al. 2017)。また、痛風の治療薬として用いられているコルヒチンはヒトにおける臨床試験において血中グルコースやインスリン抵抗性に有意ではないが改善効果が確認されている(Demidowich et al. 2019)。また、今回 WAT

や骨格筋で発現が確認された T2R144 のリガンドである EGCG も、抗肥満効果や抗糖尿病効果が報告されている。

このように、本研究で確認したマウス組織や細胞株に共通して発現していた T2R のリガンド化合物には、抗肥満効果や抗糖尿病効果が複数報告されている。こういった作用はリガンド化合物が T2R に作用した結果起こったものかどうかは確認されていないが、脂肪組織や骨格筋における T2R の働きを示唆するものである。

なお、ヒト脂肪組織にも T2R が発現しており (Amisten et al. 2015)、それらはキニーネ (T2R7、14、43、46) やデナトニウム (T2R43、46) をリガンドとしている。このことから、ヒト T2R もまた、代謝機能に関わっている可能性が考えられる。

6-2. T2R の発現レベルに影響を与える因子に関して

3T3-L1 脂肪細胞において、苦味化合物による刺激により発現が上昇した T2R は *Tas2r126*, *135*, *143* であり (図 4-8)、血清飢餓を行った場合に発現が上昇した T2R は *Tas2r108*, *137* であった (図 4-9)。また、当研究室で行われた別の研究では、マウス肝細胞である NCTC1469 において、苦味刺激した場合に *Tas2r108*, *137* の発現が上昇し、血清飢餓処理により *Tas2r126*, *135*, *143* の発現が上昇することを確認している。また、*Tas2r126*, *135*, *143* の 3 つと *Tas2r108*, *137* の 2 つは共にマウスの第 6 染色体上にコードされており、グループ毎に近隣に存在していることから、T2r126、135、143 の 3 つと T2r108、137 の 2 つは発現の制御機構が異なり、それぞれ異なる機能を有している可能性を示唆している。

3T3-L1 脂肪細胞の *Tas2r126*, *135*, *143* の発現上昇を誘導した化合物は、エピカテキン、カンファー、アリルイソチオシアネートの 3 種類である。エピカテキンは T2r126 のリガンド、カンファーは T2r137 のリガンド、アリルイソチオシアネートは T2r135 のリガンドであることから、*Tas2r126*, *135*, *143* の発現上昇には T2r126、135、137 が関与していると考えられた。しかしながら、T2r108、126、137 のリガンドであるキニーネや、T2r108、135、137 のリガンドである 6-プロピル-2-チオウラシルではほとんど T2R の発現量に変化が見られなかった。これは前述したように、T2r126、135、143 と T2r108、137 の 2 グループの機能が異なり、リガンドが両グループの T2R に作用した結果、変化が見えにくくなった可能性が考えられる。ただし、アリルイソチオシアネートと同様に T2r135 のリガンドであるデナトニウムでも T2R 発現の変化は見られなかったことから、T2R の刺激とは無関係に、T2R 発現が変化している可能性もある。また、今回細胞に添加した苦味化合物の濃度は、文献記載の閾値を参考にしている (Lossow et al. 2016)。しかしながらこの文献では、G α 16 タンパク質の C 末端側 44 アミノ酸残基をガストデュシンに置換したキメラタンパク質 G α 16gust44 と、T2R の N 末端に膜移行シグナルである rat somatostatin receptor 3 および C 末端に herpes simplex virus (HSV)

glycoprotein epitope tag を接続したキメラタンパク質を HEK293T 細胞に共発現させたものを用いている。そのため、動物における実際の味覚シグナル応答の検出とは異なっている可能性も考えられる。したがって、この系で決定した閾値は、3T3-L1 脂肪細胞に発現している T2R に対する閾値と差異があり、リガンドの標的 T2R に対する濃度が適していないため、T2R 発現に変化が見られなかった可能性も考えられる。

次に、3T3-L1 細胞において、血清を除くことで発現が上昇した T2R は *Tas2r108*、*137* であり、苦味化合物による刺激により発現上昇した T2R とは異なるものであった。血清には様々な成長因子・増殖因子に加え未知の成分が含まれているため、これらが T2R 発現に影響を与えていると考えられる。また、血清飢餓条件に曝された細胞は、細胞周期が G0/G1 期に同調されることが知られている (Khammanit et al. 2008; Baghdadchi 2013)。そのため、*Tas2r108*、*137* の上昇は細胞周期に関係している可能性がある。ただし、今回の 3T3-L1 細胞の血清飢餓処理は 1 時間で行っており、これに対し一般的な細胞周期の同期化には血清飢餓処理を十数時間行っているため、今回解析した全ての細胞の細胞周期が同期化されているかについては疑問がある。

アミノ酸飢餓による T2R 発現に対する影響については、20 種類のアミノ酸のうち、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、アルギニン、ロイシン、バリン、システイン、メチオニン、リジン、ヒスチジン、チロシンの 11 種類は苦味を呈することが知られているため (Schiffman et al. 1981)、アミノ酸の有無により T2R 発現変化が起こることを期待したが、変化は起こらなかった。アミノ酸をリガンドとする T2R については調べた例があり、L-フェニルアラニンと L-トリプトファンがそれぞれ T2R1 と T2R4 を、D-トリプトファンが T2R4 と T2R39 を活性化することが知られている (Kohl et al. 2013)。しかし、これらは全てヒトの T2R についてであり、マウスのどの T2R をどのアミノ酸が活性化するかについて調べた報告は現在までにない。また、前述したように *Tas2r108*、*137* の 2 つと *Tas2r126*、*135*、*143* の 3 つは異なる環境刺激に対して応答することから、今回の結果は、複数種類のアミノ酸の影響が混在してい

る可能性が考えられる。そのため、アミノ酸が T2R 発現に与える影響を解析するには、それぞれの T2R のリガンドがどのアミノ酸なのかを明らかにした上で、無血清培地による処理後に単体のアミノ酸を投与した際の影響を調べることや、単体もしくは特定のいくつかのアミノ酸の飢餓処理を行うなどの実験が必要である。

また、エピカテキン刺激により 3T3-L1 では *Tas2r126*、*135*、*143* が発現上昇したのに対し、マウス脂肪組織 (eWAT および iWAT) では *Tas2r108*、*137* の発現が上昇した (図 4-12、4-13)。これについては細胞株と組織では条件を揃えて実験できないため、直接比較する事は難しいが、マウスは絶食させていることで既に *Tas2r108*、*137* の発現上昇が起こっていることによる影響なのかもしれない。

このように、脂肪細胞に発現している T2R は細胞レベルでは苦味化合物刺激や血清飢餓により、マウス個体レベルでは苦味化合物刺激や絶食により発現量が増加することが明らかになった。これは、脂肪細胞に発現している T2R を介したシグナリングに、苦味化合物や血清飢餓および絶食が影響していることを示唆する結果である。

6-3. RNAseq による網羅的遺伝子発現解析に関して

階層的クラスタリング解析 (図 5-1) や、主成分分析の結果 (図 5-2) が示しているようにキニーネ刺激群とエピカテキン刺激群では、影響を受けた遺伝子が大きく異なっていた。これは、キニーネ刺激とエピカテキン刺激では細胞機能に与える影響が異なることを示唆する。キニーネ刺激により発現変動している遺伝子は免疫応答に関わる遺伝子が多かった (図 5-4、5)。免疫は宿主の防御応答であるため、キニーネが T2R を介して遺伝子発現を変化させているとするならば、これは毒物を感知するという一般的な T2R の機能に沿っているといえる。

一方で、エピカテキン刺激では、脂肪細胞の分化や cAMP に関する遺伝子の発現変動が起こっていることが GO 解析の結果により示唆された (図 5-6)。エピカテキンが T2R を介してこの変化を誘導しているならば、この結果は T2R が異物の検知や排除を行うという一般的な機能ではなく、脂肪細胞の代謝調節に関わっている可能性を示唆する結果である。

エピカテキン刺激により発現が上昇した遺伝子のうち、今回注目したのは *Lepr*、*Egr2*、*Nr4a* である (図 5-8、表 8)。これを RT-qPCR 法で再解析すると、*Lepr* はエピカテキン刺激により発現変化は見られなかったが、*Egr2* 及び *Nr4a* は発現上昇を確認できた (図 5-9)。以下では、それぞれについて発現変動したことにより推定できる機能について述べる。

Egr2 (early growth response 2) は脂肪細胞分化の初期段階に関わる転写因子である (Boyle et al. 2009)。*Nr4a* (nuclear receptor 4A) には *Nr4a1* (*Nur77*)、*Nr4a2* (*Nurr1*)、*Nr4a3* (*NOR1*) と 3 種類のアイソタイプが知られ、分化の初期段階に発現が上昇するが、過剰発現を行うと分化抑制する方向に働く制御因子であることが報告されている (Chao et al. 2008)。これらのことに、エピカテキンで 3T3-L1 を 1 時間刺激することで *Tas2r126*、*135*、*143* の発現が上昇した点 (図 4-8) を加味すると、脂肪細胞に発現している T2R は *Egr2* や *Nr4a* の発現レベルを調節することで、分化を調節している可能性が考えられる。

また、本研究で行った RNAseq の結果では、キニーネ刺激群もエピカテキン

刺激群も全体的にみると閾値 $P < 0.05$ の条件だと有意に発現変動した遺伝子がそれぞれ 58、95 と決して多いとは言えないものであった (表 5)。これは苦味刺激時間が 1 時間という短時間であることから、T2R シグナルや他のシグナル経路に影響は与えているものの、シグナル経路の初期段階にしか影響していないことや、T2R の発現量が低いため、変化が見えにくくなっているなどの可能性が考えられる。そのため、注目した遺伝子の経路の下流が活性化されているかどうかは、エピカテキン刺激時間や濃度の検討など、更なる解析試験が必要である。

6-4. 3T3-L1 脂肪細胞における T2r126、108 の機能

3T3-L1 細胞への T2r126、108 の過剰発現により、脂肪細胞への分化が抑制された (図 5-14)。これは、T2r126、108 が脂肪細胞の分化調節に関わっていることを示唆する結果である。なお、リガンドを添加していないにも関わらずこのような変化が起きたことは、疑問点である。この点は、培地に含まれるアミノ酸、血清、もしくは分化誘導に用いている試薬、それらが T2r126、108 に作用している可能性が考えられる。

T2r126、108 の過剰発現株にエピカテキンを添加することにより、エピカテキン処理を行っていない細胞と比較して分化が有意に抑えられた。これは、エピカテキンによる分化阻害作用と T2R の過剰発現による分化阻害作用の相加効果である可能性もあるが、T2r126 についてはエピカテキンの標的であるため、T2r126 がエピカテキンをリガンドとして受容したことで T2r126 を介したシグナルが活性化したことによる影響を含んでいる可能性も考えられる。また、T2r108 がエピカテキンをリガンドとして認識するという報告はないが、直接確認したわけではないため、T2r108 もエピカテキンを受容している可能性がある。

RNAseq 解析と RT-qPCR の結果において、エピカテキン刺激により発現の上昇を確認した遺伝子である *Egr2*、*Nr4a* は、脂肪細胞の分化調節を担う転写因子である (Boyle et al. 2009; Chao et al. 2008)。そのため、今後は T2r126 過剰発現株をエピカテキン刺激した場合に、転写因子である *Egr2*、*Nr4a* に加え脂肪細胞の分化マーカーである *Pparg* や *Cebpa* の発現量が変化しているかについても解析する必要がある。

上述のように、検討すべき課題は残されているが、脂肪細胞に発現している T2r126、108 は細胞分化の調節に関わっていることを示した。

第7章 結語

苦味受容体 (T2Rs) は 1-2 節および 1-3-2 項で記述したように、口腔内だけでなく体中の様々な組織に発現しており、気道や消化管をはじめとした上皮性組織においては、毒物・異物の検知とその排除を担っている。一方で、非上皮性組織に発現している T2R の機能は、前述したものとは異なる可能性がある。また、苦味成分が代謝機能調節に関わっている報告から、非上皮性組織に発現している T2R が代謝に関与しているのではないかと考えられた。しかし、非上皮性組織に発現している T2R の役割についてはほとんど知られておらず、発現プロファイルさえも詳細に解析されていなかった。本研究では、非上皮性組織に発現している T2R の機能について新たな知見を得ることを目的とした。

第 3 章では、T2R のマウスの非上皮性組織（褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋、肝臓）と小腸に加え、白色脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞及び骨格筋細胞のモデルである C2C12 細胞の発現プロファイルを明らかにした。これは、いままで発現プロファイルさえも詳細にわかっていなかった非上皮性組織のうち脂肪組織や骨格筋に発現する T2R についての重要な知見を提供するものであり、3T3-L1、C2C12 細胞については脂肪細胞や骨格筋細胞に発現している T2R 機能解析におけるモデルとしての有用性を示すことができた。今後はこれらの細胞を用いて、脂肪組織や骨格筋に発現する T2R の機能に関する更なる研究が期待できる。

第 4 章では、3T3-L1 や C2C12 細胞に発現している T2R が細胞分化により発現上昇することを確認した。この結果は脂肪細胞や骨格筋に発現している T2R がこれらの細胞の分化形質に関わっている可能性を示唆するものである。さらに、3T3-L1 脂肪細胞においては、苦味化合物刺激、血清飢餓により T2R 発現量が増加した。また、C57BL/6J マウスの脂肪組織を用いた試験では、苦味化合物刺激や絶食によって T2R 発現が増加した。こうした結果は、脂肪細胞に発現している T2R の発現レベルは外部環境からの刺激により変動することを示しており、脂肪細胞に発現している T2R を介したシグナリングに苦味化合物、血清飢餓や絶食が影響を与えることを示唆している。

第 5 章では、3T3-L1 脂肪細胞を苦味化合物で刺激した時のトランスクリプトーム解析を行い、エピカテキンによる刺激で *Egr2* や *Nr4a* などの脂肪細胞分化に関わる転写因子が活性化していることを確認した。さらに T2r126、108 の過剰発現により 3T3-L1 細胞の分化が抑制されたことから、T2r126、108 が 3T3-L1 細胞の分化に関わっていることを示した。

しかしながら、1) 今回の T2R 発現解析試験は全て RT-PCR 法で行っており、タンパク質レベルでの発現を確認していないこと、2) 用いた苦味化合物の添加による T2R の活性化を確かめられていないこと、3) 脂肪細胞に発現している T2R がどのように分化を調節しているのかを明らかにできていないこと、等の課題が残っている。そのため、今後は 1) T2R 抗体を用いたタンパク質レベルでの T2R 発現の確認、2) T2R の活性化を検出できる系の構築とそれを用いたリガンド特性試験、3) T2R の細胞分化制御機構解明のための詳細な解析試験が必要である。

また、今回は C2C12 細胞については T2R 発現変動解析や苦味化合物刺激時のトランスクリプトーム解析を行っていない。しかし、C2C12 細胞についても分化することで *Tas2r126*、*135* の発現が上昇しているため (図 4-3)、こちらについても同様な解析試験を行うことで骨格筋に発現している T2R の機能について何か新たな知見が得られるかもしれない。

基本味のうち苦味は味覚の嗜好性という観点からも甘味や旨味と比較して、我々消費者が忌避しがちな味であるため、食品や飲料の加工においてしばしば問題となる。これに対処するため、食品・飲料メーカーでは苦味のマスキング技術の開発や苦味成分を加工段階で何らかの方法を用いて除去するなどの工夫を凝らしてきた。例えば、グレープフルーツや八朔などの柑橘類に含まれる苦味成分であるナリンギンは、これら柑橘類を利用した飲料への加工段階において、風味の改善を目的としてナリンギナーゼ処理により除かれる (Yadav et al. 2018)。また、紅茶やワイン、お茶などには苦味成分であるタンニンが含まれるが、これも同様の理由でタンナーゼ処理により除かれる場合がある (Raghuwanshi et al. 2013)。しかしながら、本研究での成果を礎に、脂肪細胞や

骨格筋に発現している T2R が苦味成分の標的となって脂質・糖代謝の調節を行っていることが明らかになれば、それら組織に発現している T2R を標的とした苦味成分を保健機能成分として含んだ食品や飲料の開発が可能となる。現時点では前述したように様々な解決すべき課題が残されているが、本研究が非上皮性組織で苦味を感知する意義の理解と、それを応用した食品科学研究の一助になることを期待する。

参考文献

- Ahmad Raise, and Julie E. Dalziel. 2020. "G Protein-Coupled Receptors in Taste Physiology and Pharmacology." *Frontiers in Pharmacology* 11 (November): 587664. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.587664>.
- Ahn Jiyun, Hyunjung Lee, Sung Won Im, Chang Hwa Jung, and Tae Youl Ha. 2014. "Allyl Isothiocyanate Ameliorates Insulin Resistance through the Regulation of Mitochondrial Function." *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (10): 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.006>.
- Amisten Stefan, Matt Neville, Ross Hawkes, Shanta J. Persaud, Fredrik Karpe, and Albert Salehi. 2015. "An Atlas of G-Protein Coupled Receptor Expression and Function in Human Subcutaneous Adipose Tissue." *Pharmacology and Therapeutics* 146: 61–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.007>.
- Aoki Mieko, Tetsuya Takao, Kyoichi Takao, Fumihiko Koike, and Narufumi Suganuma. 2014. "Lower Expressions of the Human Bitter Taste Receptor TAS2R in Smokers: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis." *Tobacco Induced Diseases* 12 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/1617-9625-12-12>.
- Avau Bert, Dries Bauters, Sandra Steensels, Laurien Vancleef, Jorien Laermans, Jens Lesuisse, Johan Buyse, H. Roger Lijnen, Jan Tack, and Inge Depoortere. 2015. "The Gustatory Signaling Pathway and Bitter Taste Receptors Affect the Development of Obesity and Adipocyte Metabolism in Mice." *PLoS ONE* 10 (12): e0145538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145538>.
- Bachmanov Alexander A., Natalia P. Bosak, John I. Glendinning, Masashi Inoue, Xia Li, Satoshi Manita, Stuart A. McCaughey, et al. 2016. "Genetics of Amino Acid Taste and Appetite." *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 7 (4): 806S-822S. <https://doi.org/10.3945/an.115.011270>.
- Baghdadchi Negin. 2013. "The Effects of Serum Starvation on Cell Cycle Synchronization." *OSR Journal of Student Research* 1 (1). <http://scholarworks.lib.csusb.edu/osr%0Ahttp://scholarworks.lib.csusb.edu/osr/vol1/iss1/4>.
- Bigiani Albertino. 2020. "Salt Taste, Nutrition, and Health." *Nutrients* 12 (5): 1–6. <https://doi.org/10.3390/nu12051537>.
- Boyle K. B., D. Hadaschik, S. Virtue, W. P. Cawthorn, S. H. Ridley, S. O’Rahilly, and K. Siddle. 2009. "The Transcription Factors Egr1 and Egr2 Have Opposing Influences on Adipocyte Differentiation." *Cell Death and Differentiation* 16 (5): 782–789. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.11>.

- Callaway Ewan. 2012. "The Lost Appetites." *Nature* 486: S16–17.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr293>.
- Cancello Raffaella, Giancarlo Micheletto, Dorela Meta, Rosalia Lavagno, Emanuele Bevilacqua, Valerio Panizzo, and Cecilia Invitti. 2020. "Expanding the Role of Bitter Taste Receptor in Extra Oral Tissues: TAS2R38 Is Expressed in Human Adipocytes." *Adipocyte* 9 (1): 7–15.
<https://doi.org/10.1080/21623945.2019.1709253>.
- Carey Ryan M., and Robert J. Lee. 2019. "Taste Receptors in Upper Airway Innate Immunity." *Nutrients* 11 (9): 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu11092017>.
- Chandrashekar Jayaram, Mark A. Hoon, Nicholas J. P. Ryba, and Charles S. Zuker. 2006. "The Receptors and Cells for Mammalian Taste." *Nature* 444 (7117): 288–294. <https://doi.org/10.1038/nature05401>.
- Chandrashekar Jayaram, Christina Kuhn, Yuki Oka, David A. Yarmolinsky, Edith Hummler, Nicholas J.P. Ryba, and Charles S. Zuker. 2010. "The Cells and Peripheral Representation of Sodium Taste in Mice." *Nature* 464 (7286): 297–301. <https://doi.org/10.1038/nature08783>.
- Chao Lily C., Steven J. Bensinger, Claudio J. Villanueva, Kevin Wroblewski, and Peter Tontonoz. 2008. "Inhibition of Adipocyte Differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1." *Molecular Endocrinology* 22 (12): 2596–2608.
<https://doi.org/10.1210/me.2008-0161>.
- Chen Zhu, Javier I. Torrens, Ashim Anand, Bruce M. Spiegelman, and Jeffrey M. Friedman. 2005. "Krox20 Stimulates Adipogenesis via C/EBP β -Dependent and -Independent Mechanisms." *Cell Metabolism* 1 (2): 93–106.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.009>.
- Collins Qu Fan, Hui-Yu Liu, Jingbo Pi, Zhenqi Liu, Michael J. Quon, and Wenhong Cao. 2007. "Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), A Green Tea Polyphenol, Suppresses Hepatic Gluconeogenesis through 5'-AMP-Activated Protein Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 282 (41): 30143–30149.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702390200>.
- Cremonini Eleonora, Ahmed Bettaieb, Fawaz G. Haj, Cesar G. Fraga, and Patricia I. Oteiza. 2016. "(-)-Epicatechin Improves Insulin Sensitivity in High Fat Diet-Fed Mice." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 599: 13–21.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.006>.
- Daly Kristian, Miran Al-Rammahi, Andrew Moran, Marco Marcello, Yuzo Ninomiya, and Soraya P. Shirazi-Beechey. 2013. "Sensing of Amino Acids by the Gut-Expressed Taste Receptor T1R1-T1R3 Stimulates CCK Secretion." *American*

- Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 304 (3): 271–282.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2012>.
- Danielle Reed, and Knaapila Antti. 2010. “Genetics of Taste and Smell: Poisons and Pleasures.” *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 94: 213–240.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375003-7.00008-X>.
- Demidowich Andrew P., Jordan A. Levine, Ginikanwa I. Onyekaba, Shahzaib M. Khan, Kong Y. Chen, Sheila M. Brady, Miranda M. Broadney, and Jack A. Yanovski. 2019. “Effects of Colchicine in Adults with Metabolic Syndrome: A Pilot Randomized Controlled Trial.” *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21 (7): 1642–1651. <https://doi.org/10.1111/dom.13702>.
- Deshpande Deepak A., Wayne C.H. Wang, Elizabeth L. McIlmoyle, Kathryn S. Robinett, Rachel M. Schillinger, Steven S. An, James S.K. Sham, and Stephen B. Liggett. 2010. “Bitter Taste Receptors on Airway Smooth Muscle Bronchodilate by Localized Calcium Signaling and Reverse Obstruction.” *Nature Medicine* 16 (11): 1299–1304. <https://doi.org/10.1038/nm.2237>.
- Dotson Cedrick D., Lan Zhang, Hong Xu, Yu Kyong Shin, Stephan Vignes, Sandra H. Ott, Amanda E.T. Elson, et al. 2008. “Bitter Taste Receptors Influence Glucose Homeostasis.” *PLoS ONE* 3 (12):e3974.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003974>.
- Duszka Kalina, Juliane G. Bogner-Strauss, Hubert Hackl, Dietmar Rieder, Claudia Neuhold, Andreas Prokesch, Zlatko Trajanoski, and Anne M. Krogsdam. 2013. “Nr4a1 Is Required for Fasting-Induced down-Regulation of Ppar γ 2 in White Adipose Tissue.” *Molecular Endocrinology* 27 (1): 135–149.
<https://doi.org/10.1210/me.2012-1248>.
- Enuka Yehoshua, Israel Hanukoglu, Oded Edelheit, Hananya Vaknine, and Aaron Hanukoglu. 2012. “Epithelial Sodium Channels (ENaC) Are Uniformly Distributed on Motile Cilia in the Oviduct and the Respiratory Airways.” *Histochemistry and Cell Biology* 137 (3): 339–353.
<https://doi.org/10.1007/s00418-011-0904-1>.
- Foster Simon R., Enzo R. Porrello, Brooke Purdue, Hsiu Wen Chan, Anja Voigt, Sabine Frenzel, Ross D. Hannan, et al. 2013. “Expression, Regulation and Putative Nutrient-Sensing Function of Taste GPCRs in the Heart.” *PLoS ONE* 8 (5):e64579.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064579>.
- Freund Jenna R., and Robert J. Lee. 2018. “Taste Receptors in the Upper Airway.” *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 4 (1): 67–76.
<https://doi.org/10.1016/j.wjorl.2018.02.004>.

- Gomez-Zorita Saioa, Chloé Belles, Anaïs Briot, Alfredo Fernández-Quintela, Maria P. Portillo, and Christian Carpéné. 2017. “Pterostilbene Inhibits Lipogenic Activity Similar to Resveratrol or Caffeine but Differently Modulates Lipolysis in Adipocytes.” *Phytotherapy Research* 31 (8): 1273–1282. <https://doi.org/10.1002/ptr.5852>.
- Gravina Stephen A., Gregory L. Yep, and Mehmood Khan. 2013. “Human Biology of Taste.” *Annals of Saudi Medicine* 33 (3): 217–222. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2013.217>.
- Hanukoglu Israel, Vijay R. Boggula, Hananya Vaknine, Sachin Sharma, Thomas Kleyman, and Aaron Hanukoglu. 2017. “Expression of Epithelial Sodium Channel (ENaC) and CFTR in the Human Epidermis and Epidermal Appendages.” *Histochemistry and Cell Biology* 147 (6): 733–748. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1535-3>.
- Hanukoglu Israel, and Aaron Hanukoglu. 2016. “Epithelial Sodium Channel (ENaC) Family: Phylogeny, Structure-Function, Tissue Distribution, and Associated Inherited Diseases.” *Gene* 579 (2): 95–132. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.061>.
- Hoek-van den Hil Elise F., Evert M. van Schothorst, Inge van der Stelt, Hans J.M. Swarts, Marjanne van Vliet, Tom Amolo, Jacques J.M. Vervoort, et al. 2015. “Direct Comparison of Metabolic Health Effects of the Flavonoids Quercetin, Hesperetin, Epicatechin, Apigenin and Anthocyanins in High-Fat-Diet-Fed Mice.” *Genes and Nutrition* 10 (4): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0469-z>.
- Huang Angela L., Xiaoke Chen, Mark A. Hoon, Jayaram Chandrashekar, Wei Guo, Dimitri Tränkner, Nicholas J.P. Ryba, and Charles S. Zuker. 2006. “The Cells and Logic for Mammalian Sour Taste Detection.” *Nature* 442 (7105): 934–938. <https://doi.org/10.1038/nature05084>.
- Hudson Laqueta K., Meghan E. Dancho, Jianhua Li, Johanna B. Bruchfeld, Ahmed A. Ragab, Mingzhu M. He, Meaghan Bragg, et al. 2016. “Emetine Di-HCL Attenuates Type 1 Diabetes Mellitus in Mice.” *Molecular Medicine* 22 (10): 585–596. <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00082>.
- Inada Hitoshi, Fuminori Kawabata, Yoshiro Ishimaru, Tohru Fushiki, Hiroaki Matsunami, and Makoto Tominaga. 2008. “Off-Response Property of an Acid-Activated Cation Channel Complex PKD1L3-PKD2L1.” *EMBO Reports* 9 (7): 690–697. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.89>.
- Jang Hyeung Jin, Zaza Kokrashvili, Michael J. Theodorakis, Olga D. Carlson, Byung Joon Kim, Jie Zhou, Ho Kim Hyeon, et al. 2007. “Gut-Expressed Gustducin and

- Taste Receptors Regulate Secretion of Glucagon-like Peptide-1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38): 15069–15074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706890104>.
- Khammanit R., S. Chantakru, Y. Kitiyanant, and J. Saikhun. 2008. “Effect of Serum Starvation and Chemical Inhibitors on Cell Cycle Synchronization of Canine Dermal Fibroblasts.” *Theriogenology* 70 (1): 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.02.015>.
- Kobayashi Yoshikazu, Masaaki Habara, Hidekazu Ikezaki, Ronggang Chen, Yoshinobu Naito, and Kiyoshi Toko. 2010. “Advanced Taste Sensors Based on Artificial Lipids with Global Selectivity to Basic Taste Qualities and High Correlation to Sensory Scores.” *Sensors* 10 (4): 3411–3443. <https://doi.org/10.3390/s100403411>.
- Kohl Susann, Maik Behrens, Andreas Dunkel, Thomas Hofmann, and Wolfgang Meyerhof. 2013. “Amino Acids and Peptides Activate at Least Five Members of the Human Bitter Taste Receptor Family.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (1): 53–60. <https://doi.org/10.1021/jf303146h>.
- Kotańska Magdalena, Monika Marcinkowska, Joanna Knutelska, Małgorzata Zygmunt, and Jacek Sapa. 2018. “Yohimbine Improves Lipid and Carbohydrate Profiles without Reduction in Body Weight in Obese Leptin-Deficient Ob/Ob Mice.” *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 12 (2): 67–71. <https://doi.org/10.26444/jpcpr/91404>.
- Laffitte Anni, Fabrice Neiers, and Loïc Briand. 2014. “Functional Roles of the Sweet Taste Receptor in Oral and Extraoral Tissues.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17 (4): 379–385. <https://doi.org/10.1097/MCO.000000000000058>.
- Lee Jongsung, Eunsun Jung, Jienny Lee, Saebom Kim, Sungran Huh, Youngsoo Kim, Yongwoo Kim, Sang Yo Byun, Yeong Shik Kim, and Deokhoon Park. 2009. “Isorhamnetin Represses Adipogenesis in 3T3-L1 Cells.” *Obesity* 17 (2): 226–232. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.472>.
- Lee Robert J., Guoxiang Xiong, Jennifer M. Kofonow, Bei Chen, Anna Lysenko, Peihua Jiang, Valsamma Abraham, et al. 2012. “T2R38 Taste Receptor Polymorphisms Underlie Susceptibility to Upper Respiratory Infection.” *Journal of Clinical Investigation* 122 (11): 4145–4159. <https://doi.org/10.1172/JCI64240>.
- Lee Yun K., Ock J. Park, Won S. Lee, Jin T. Hwang, Dae Y. Kwon, and Young J. Surh. 2009. “Curcumin Exerts Antidifferentiation Effect through AMPK α -PPAR- γ in 3T3-L1 Adipocytes and Antiproliferatory Effect through AMPK α -COX-2 in

- Cancer Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (1): 305–310.
<https://doi.org/10.1021/jf802737z>.
- Li Feng, and Minliang Zhou. 2012. “Depletion of Bitter Taste Transduction Leads to Massive Spermatid Loss in Transgenic Mice.” *Molecular Human Reproduction* 18 (6): 289–297. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas005>.
- Liszt Kathrin Ingrid, Jakob Peter Ley, Barbara Lieder, Maik Behrens, Verena Stöger, Angelika Reiner, Christina Maria Hochkogler, et al. 2017. “Caffeine Induces Gastric Acid Secretion via Bitter Taste Signaling in Gastric Parietal Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (30): E6260–6269.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1703728114>.
- Lossow Kristina, Sandra Hübner, Natacha Roudnitzky, Jay P. Slack, Federica Pollastro, Maik Behrens, and Wolfgang Meyerhof. 2016. “Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans.” *Journal of Biological Chemistry* 291 (29): 15358–15377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718544>.
- Lu Ping, Cheng-Hai Zhang, Lawrence M. Lifshitz, and Ronghua ZhuGe. 2017. “Extraoral Bitter Taste Receptors in Health and Disease.” *The Journal of General Physiology* 149 (2): 181–197. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611637>.
- Luo Xiao-Cui, Zhen-Huang Chen, Jian-Bo Xue, Dong-Xiao Zhao, Chen Lu, Yi-Hong Li, Song-Min Li, et al. 2019. “Infection by the Parasitic Helminth *Trichinella Spiralis* Activates a Tas2r-Mediated Signaling Pathway in Intestinal Tuft Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (12): 5564–5569.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1812901116>.
- Lyall Vijay, Gerard L. Heck, Anna K. Vinnikova, Shobha Ghosh, Tam Hao T. Phan, Rammy I. Alam, Oneal F. Russell, Shahbaz A. Malik, John W. Bigbee, and John A. DeSimone. 2004. “The Mammalian Amiloride-Insensitive Non-Specific Salt Taste Receptor Is a Vanilloid Receptor-1 Variant.” *Journal of Physiology* 558 (1): 147–159. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065656>.
- Margolskee Robert F., Jane Dyer, Zaza Kokrashvili, Kieron S.H. Salmon, Erwin Ilegems, Kristian Daly, Emeline L. Maillet, Yuzo Ninomiya, Bedrich Mosinger, and Soraya P. Shirazi-Beechey. 2007. “T1R3 and Gustducin in Gut Sense Sugars to Regulate Expression of Na⁺-Glucose Cotransporter 1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38): 15075–15080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706678104>.
- Masubuchi Yosuke, Yuko Nakagawa, Jinhui Ma, Tsutomu Sasaki, Tadahiro Kitamura, Yoritsuna Yamamoto, Hitoshi Kurose, Itaru Kojima, and Hiroshi Shibata. 2013.

- “A Novel Regulatory Function of Sweet Taste-Sensing Receptor in Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells.” Edited by Xing-Ming Shi. *PLoS ONE* 8 (1): e54500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054500>.
- Meyerhof Wolfgang, Claudia Batram, Christina Kuhn, Anne Brockhoff, Elke Chudoba, Bernd Bufe, Giovanni Appendino, and Maik Behrens. 2009. “The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors.” *Chemical Senses* 35 (2): 157–170. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjp092>.
- Meyers B., and M. S. Brewer. 2008. “Sweet Taste in Man: A Review.” *Journal of Food Science* 73 (6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00832.x>.
- Mohamed Rashid Asyifah, Kaihui Lu, Yew Mun Yip, and Dawei Zhang. 2016. “Averrhoa Carambola L. Peel Extract Suppresses Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells.” *Food and Function* 7 (2): 881–892. <https://doi.org/10.1039/c5fo01208b>.
- Moon Hyun Seuk, Chung Soo Chung, Hong Gu Lee, Tae Gyu Kim, Yun Jaie Choi, and Chong Su Cho. 2007. “Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Cells.” *Obesity* 15 (11): 2571–2582. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.309>.
- Nakagawa Yuko, Masahiro Nagasawa, Satoko Yamada, Akemi Hara, Hideo Mogami, Viacheslav O. Nikolaev, Martin J. Lohse, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya, and Itaru Kojima. 2009. “Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion.” *PLoS ONE* 4 (4):e5106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005106>.
- Nelson Greg, Jayaram Chandrashekar, Mark A Hoon, and Luxin Feng. 2002. “An Amino-Acid Taste Receptor” 5124 (1999): 199–202.
- Nelson Greg, Mark A Hoon, Jayaram Chandrashekar, Yifeng Zhang, Nicholas J P Ryba, and Charles S Zuker. 2001. “Mammalian Sweet Taste Receptors” 106: 381–390.
- Nelson Theodore M., Nelson D. LopezJimenez, Lino Tessarollo, Masashi Inoue, Alexander A. Bachmanov, and Susan L. Sullivan. 2010. “Taste Function in Mice with a Targeted Mutation of the Pkd113 Gene.” *Chemical Senses* 35 (7): 565–577. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq070>.
- Neta Edith Ramos Da Conceicao, Suzanne D. Johanningsmeier, and Roger F. McFeeters. 2007. “The Chemistry and Physiology of Sour Taste - A Review.” *Journal of Food Science* 72 (2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00282.x>.
- Ning Xiaomin, Jingjing He, Xin'E Shi, and Gongshe Yang. 2016. “Regulation of Adipogenesis by Quinine through the ERK/S6 Pathway.” *International Journal of*

- Molecular Sciences* 17 (4): 504. <https://doi.org/10.3390/ijms17040504>.
- Nomura Kengo, Miho Nakanishi, Fumiyo Ishidate, Kazumi Iwata, and Akiyuki Taruno. 2020. “All-Electrical Ca²⁺-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds.” *Neuron* 106 (5): 816-829.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.006>.
- Ono Eri, Jun Inoue, Tsutomu Hashidume, Makoto Shimizu, and Ryuichiro Sato. 2011. “Anti-Obesity and Anti-Hyperglycemic Effects of the Dietary Citrus Limonoid Nomilin in Mice Fed a High-Fat Diet.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410 (3): 677–681. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.055>.
- Ortega Francisco J., Zaida Agüera, Mònica Sabater, José M. Moreno-Navarrete, Isabel Alonso-Ledesma, Gemma Xifra, Patricia Botas, et al. 2016. “Genetic Variations of the Bitter Taste Receptor TAS2R38 Are Associated with Obesity and Impact on Single Immune Traits.” *Molecular Nutrition and Food Research* 60 (7): 1673–1683. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500804>.
- Prandi Simone, Anja Voigt, Wolfgang Meyerhof, and Maik Behrens. 2018. “Expression Profiling of Tas2r Genes Reveals a Complex Pattern along the Mouse GI Tract and the Presence of Tas2r131 in a Subset of Intestinal Paneth Cells.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (1): 49–65. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2621-y>.
- Raghuwanshi Shailendra, Swati Misra, and Rajendra Kumar Saxena. 2013. “Enzymatic Treatment of Black Tea (Ctc and Kangra Orthodox) Using Penicillium Charlesii Tannase to Improve the Quality of Tea.” *Journal of Food Processing and Preservation* 37 (5): 855–863. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00721.x>.
- Rayalam S, J.Y. Yang, S Ambati, M.A. Della-Fera, and C.A Baile. 2008. “Resveratrol Induces Apoptosis and Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes.” *Phytotherapy Research* 22 (4): 1367–1371. <https://doi.org/10.1002/ptr>.
- Rumore Martha M., and Katelynn S. Kim. 2010. “Potential Role of Salicylates in Type 2 Diabetes.” *Annals of Pharmacotherapy* 44 (7–8): 1207–1221. <https://doi.org/10.1345/aph.1M483>.
- Sakai Nobuyuki, Hisaoyuki Uneyama, and Visith Chavasit. 2016. “Psychological and Physiological Bases of Umami Taste Perception as Related to Nutrition.” *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*, no. September 2017: 697–723. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804308-0.00020-0>.
- Schiffman Susan S., Karen Sennewald, and Jean Gagnon. 1981. “Comparison of Taste Qualities and Thresholds of D- and L-Amino Acids.” *Physiology and Behavior* 27 (1): 51–59. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90298-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90298-5).

- Sharma Sachin, Aaron Hanukoglu, and Israel Hanukoglu. 2018. "Localization of Epithelial Sodium Channel (ENaC) and CFTR in the Germinal Epithelium of the Testis, Sertoli Cells, and Spermatozoa." *Journal of Molecular Histology* 49 (2): 195–208. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9759-2>.
- Singh Nisha, Maria Vrontakis, Fiona Parkinson, and Prashen Chelikani. 2011. "Functional Bitter Taste Receptors Are Expressed in Brain Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406 (1): 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.016>.
- Teng Bochuan, Courtney E. Wilson, Yu Hsiang Tu, Narendra R. Joshi, Sue C. Kinnamon, and Emily R. Liman. 2019. "Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1." *Current Biology* 29 (21): 3647-3656.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.077>.
- Varela Claudia Elena, Alonso Rodriguez, Mirza Romero-Valdovinos, Patricia Mendoza-Lorenzo, Christina Mansour, Guillermo Ceballos, Francisco Villarreal, and Israel Ramirez-Sanchez. 2017. "Browning Effects of (-)-Epicatechin on Adipocytes and White Adipose Tissue." *European Journal of Pharmacology* 811 (May): 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.051>.
- Wooding Stephen. 2006. "Phenylthiocarbamide: A 75-Year Adventure in Genetics and Natural Selection." *Genetics* 172 (4): 2015–2023.
- Yadav Mukesh, Nirmala Sehrawat, Anil K. Sharma, Vikas Kumar, and Amit Kumar. 2018. "Naringinase: Microbial Sources, Production and Applications in Food Processing Industry." *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 8 (1): 717–20. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.1.717-720>.
- Zhang Jin, Hao Jin, Wenyi Zhang, Cheng Ding, Sean O’Keeffe, Mingyu Ye, and Charles S. Zuker. 2019. "Sour Sensing from the Tongue to the Brain." *Cell* 179 (2): 392-402.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.031>.

付録

表 10. C57BL/6J マウスの T2R の塩基配列をデータベースと比較した結果

T2R	Database と一致しているか (Yes/No)	Database との違い	accession number
102	Yes		NM_199153.2
103	Yes		NM_053211.1
104	Yes		NM_207011.1
105	Yes		NM_020501.1
106	Yes		NM_207016.1
107	No	c. 924A>C	NM_199154.2
108	Yes		NM_020502.1
109	Yes		NM_207017.1
110	Yes		NM_199155.2
113	Yes		NM_207018.1
114	Yes		NM_207019.1
115	Yes		NM_207020.1
116	Yes		NM_053212.1
117	Yes		NM_207021.1
118	Yes		NM_207022.1
119	Yes		NM_020503.3
120	Yes		NM_207023.1
121	Yes		NM_207024.1
122	Yes		NM_001039128.1
123	Yes		NM_207025.1
124	Yes		NM_207026.1
125	Yes		NM_207027.1
126	Yes		NM_207028.1
129	Yes		NM_207029.1
130	No	c. 353delT	NM_199156.1
131	Yes		NM_207030.1
134	Yes		NM_199158.1
135	Yes		NM_199159.1
136	Yes		NM_181276.1
137	Yes		NM_001025385.1

138	Yes		NM_001001451.1
139	Yes		NM_181275.1
140	Yes		NM_021562.1
143	Yes		NM_001001452.1
144	Yes		NM_001001453.1

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始にわたり丁寧なご指導・ご助言を頂き、本論文のご校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究院 加藤英介准教授に深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、ご校閲を賜りました同研究院の園山慶教授、石塚敏教授、比良徹准教授に深く感謝致します。

実験動物の飼育や解剖、組織の摘出などについてのご指導、また研究全般について様々なご指導を賜りました園山慶教授に重ねて深く感謝致します。

動物実験や細胞実験におけるご助言を頂きました同研究院の逢坂文那助教に深く感謝致します。

マウスの飼育全般や解剖の際にご助力頂いた鶴間あい氏、リアルタイム PCR やプラスミドベクターの作製などの実験にご助力頂いた長世智朗氏に感謝致します。

最後に、長い間苦楽を共にした食品機能化学研究室のメンバー、そして研究室の生活をサポートして頂いた事務員の方々に感謝致します。