

(様式4)

学位論文の内容の要旨

増 渕 洋 祐 印

脂肪細胞における甘味受容体の機能

舌の味蕾の味細胞に発現している甘味受容体は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）であるT1R2とT1R3のヘテロダイマーで構成される。この受容体は、糖・甘味料・アミノ酸など多様なリガンドを有し、エネルギー代謝に重要な甘味を感知している。この甘味受容体は、三量体型Gタンパク質ガストデューションと共役し、ホスホリパーゼC-β2を活性化し、甘味シグナルを伝達する。近年、甘味受容体が舌の味蕾だけでなく腸管内分泌細胞・視床下部グルコース応答性ニューロン・膵β細胞などにも発現していることが明らかになった。膵β細胞では、甘味受容体刺激はCa²⁺濃度およびcAMP濃度の上昇を惹起し、インスリン分泌を増加する。従って、甘味受容体がエネルギー代謝により広範に関与している可能性が示唆される。

そこで私は、脂肪細胞における甘味受容体の発現と機能について検討を行った。脂肪細胞のモデルとしてマウス前駆脂肪細胞3T3-L1を用いた。

まず、3T3-L1細胞には甘味受容体であるT1R2およびT1R3が発現しており、分化刺激後にT1R3の発現が著明に増加した。甘味受容体アゴニストであるスクラロースおよびサッカリンを添加し脂肪細胞へと分化させると中性脂肪蓄積は減少し、脂肪細胞分化の指標であるPPARγおよびC/EBPαの発現も抑制された。この中性脂肪蓄積の抑制効果については、分化初期に甘味受容体刺激することが必要であった。脂肪細胞において甘味受容体と共役するGタンパク質を検討したところ、甘味刺激によるPPARγおよびC/EBPαの発現抑制作用はG14阻害剤であるYM-254890では阻害されず、Gαsのドミナントネガティブ変異体（Gαs-G226A）で消失した。また、スクラロース刺激により細胞内cAMP濃度の上昇がみられ、これはHEK293細胞にT1R3のみを強発現させた場合でも濃度上昇がみられた。さらに、GαsのノックダウンでPPARγおよびC/EBPαの発現が増強され、コレラ毒素刺激により発現が抑制された。しかし、アデニル酸シクラーゼを活性化しcAMPを上昇させるフォルスコリンには分化抑制効果はなかった。これらのことから、脂肪細胞において甘味受容体はGαsと共役し、Gαsの活性化は脂肪分化に対し抑制的に機能していることが明らかになった。また、この脂肪分化抑制作用はGαsを介するがcAMP非依存性であることが示された。

次に私は、この3T3-L1細胞における甘味受容体のGαs下流の分化抑制シグナルを検討した。近年、三量体型Gタンパク質の非定型な作用として、チュブリンGTPase活性化を介した微小管脱重合作用・微小管脱重合作用によるRho-GEFを介したRhoの活性化・Rhoが脂肪細胞分化を抑制的に関与していることなどが報告されている。本研究では、微小管脱重を免疫蛍光染色により検討した。その結果、甘味受容体アゴニストであるスクラロースおよびサッカリン、Gαsを活性化するイソプロテレノールおよびコレラ毒素では微小管の脱重合がみられた。しかし、cAMPを上昇させるフォルスコリンではみられなかった。この微小管脱重合作用は、Gαsのドミナントネガティブ変異体（Gαs-G226A）の過剰発現により阻害され、Gαsの構成性活性化型変異体（Gαs-Q227L）の過剰発現により再現された。また、3T3-L1細胞にはRho-GEFの一つであるGEF-H1が発現し、分化により発現量が増強した。また、Rho活性化をプルダウンアッセイおよびRho活性化プローブであるRaichu-RhoA-1237 Xにより検討したところ、甘味受容体刺激および微小管脱重合剤ノコダゾール処理でRhoの活性化がみられた。また、甘味刺激によりROCKの活性化がみられた。さらに、スクラロース刺激によりAktのリン酸化およびFox

O1のリン酸化抑制が引き起こされた。一方、甘味受容体刺激によるPPAR γ およびC/EBP α の発現抑制は、Rhoのドミナントネガティブ変異体（Rho-T19N）の過剰発現により阻害され、またC/EBP α の発現抑制はROCKの阻害剤Y-27632の添加により抑制された。このことから、T1R3ホモダイマー甘味受容体は、G α s活性化・微小管脱重合-Rho/ROCK系活性化-AktおよびFoxO1リン酸化抑制の経路で引き起こされることを示した。

本研究により、3T3-L1細胞では甘味受容体のサブユニットT1R2とT1R3が発現しているが、T1R2に比してT1R3が多く発現していること、T1R3のみでも甘味物質を感知することからT1R3のホモダイマーで機能している可能性を示した。また、甘味受容体刺激により脂肪細胞分化が抑制されることを明らかにした。そして、このシグナル伝達機構は、G α sを介し微小管脱重合によりRho/ROCK経路を活性化することでAktおよびFoxO1のリン酸化を抑制し、PPAR γ およびC/EBP α の発現を抑制することにより脂肪分化抑制を引き起こすことを示した。このRho/ROCKからPPAR γ およびC/EBP α の発現抑制について、Rhoのドミナントネガティブ変異体やROCKの阻害剤を用いた検討結果がPPAR γ とC/EBP α とで異なることから、抑制メカニズムを明らかにするためにさらに詳細な検討が今後必要である。