

脂肪細胞における甘味受容体の機能

指導教員 小島 至 教授

平成 27 年 1 月作成

群馬大学大学院医学系研究科

平成 23 年入学

臓器病態制御系・細胞調節学

増渕 洋祐

目次

第1章 序論

1-1. 味覚

1-2. 甘味受容体

1-3. 味蕾以外の甘味受容体の存在

第2章 脂肪細胞における甘味受容体の発現と機能

2-1. 目的

2-2. 材料と方法

2-3. 結果

2-4. 考察

第3章 甘味受容体を介する脂肪分化抑制機構

3-1. はじめに

3-2. 目的

3-3. 材料と方法

3-4. 結果

3-5. 考察

第4章 まとめ

謝辞

引用文献

図およびその説明

発表論文

第 1 章
序 論

1-1. 味覚

味覚は、生物が生存していくうえで欠くことの出来ない、食物摂取時に生じる化学的な感覚である。味細胞で受容される味質には、5つの基本味である甘味・塩味・酸味・辛味・苦味・そしてうま味がある。5つの基本味は、その生物学的な意味から二つに分類できる。第一は、甘味やうま味など生存するために有用な食べものを選ぶための味覚である。糖やアミノ酸などの多くは甘味を呈している。甘味は動物にとって重要なエネルギー源を得ることができる食物であることを知らせる。イノシン酸やグルタミン酸などが引き起こすうま味は、身体を作るために必要なアミノ酸がその食物にあることを知らせる。さらに、塩味は生体の塩濃度の恒常性に関与しており、高濃度では忌避されるが、低濃度では好まれる。塩味は、甘味やうま味を増強させる効果をもっている。第二は、酸味や苦味などの忌避されるものである。腐敗物や植物の産生する有毒な代謝物が酸味もしくは苦味を呈することから、危険信号として認識されている。

動物が好んで摂取する甘味を受容するタンパク質として甘味受容体が知られている。甘味受容体は、舌の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭、さらに口蓋上皮に分布する味蕾に存在する。この味蕾は、40~150個程度の受容細胞、支持細胞および基底細胞が形成する蕾状の集合体である。味蕾の上部（口腔側）には味を感知する味孔が開いている。細胞膜に存在する受容体には種々のタイプが存在するが、細胞外の情報をGタンパク質を介して細胞内へ伝達する一群の受容体が知られており、Gタンパク質共役受容体（G protein-coupled receptor: GPCR）と呼ばれている。細胞膜を7回貫通する α -ヘリックス（TM1-7）を共通な構造として、細胞内領域にはGタンパク質が結合する細胞内ループ、細胞外領域には多様な構造をもつ細胞外ループとN末端ドメインをもち、細胞膜に長鎖脂肪酸でアンカーした α -ヘリックス構造を含むC末端ドメインからなる。GPCRが細胞外のリガンドと結合すると、細胞内領域にあるGタンパク質が構造変化を引き起こすことにより細胞内へとシグナルが伝達される。ヒトでは、Gタンパク質共役受容体と分類できるものが約800種近く存在すると推定され

る。この GPCR は生体機能の調節に重要な役割を果たしている。この GPCR には、A~E の 5 つのクラスに分類されており、そのうち主要な 3 つのクラスは、A、B、および C クラスである。A クラスは、N 末端と C 末端にあるループが短いことが特徴的であり、これには早期に立体構造が明らかになった網膜に存在する光量子受容体ロドプシンが含まれ、感覚や神経伝達など重要な生理機能に関わるものが多くある。B クラスは、N 末端に 100~300 のアミノ酸残基をもつことが特徴であり、セクレチン受容体が含まれペプチドホルモンの刺激伝達を行う。C クラスは、B クラスよりもさらに大きな N 末端に 300 のアミノ酸残基を持つことが特徴であり、そこにアミノ酸などに対するリガンドが結合する結合ドメインが存在する。この C クラスには、代謝型グルタミン酸受容体が含まれ、神経伝達を行う。GPCR の多くは匂いや味覚の受容体であるが、これに限らず視覚や嗅覚にも関与しているほか、ホルモンやサイトカインのシグナル伝達にも関与している。GPCR の機能の異常はアレルギーやなどの疾患を引き起こすことが知られている。GPCR のリガンドとしては、ホルモンや神経伝達物質など多岐にわたることから、創薬の観点からも重要であり、実際臨床で用いられている医薬品の約半数が GPCR をターゲットに創薬されているといわれている。

1-2. 甘味受容体

味蕾の味覚受容体細胞に発現している甘味受容体は、クラス C の GPCR である T1R ファミリーに属する T1R2 および T1R3 の二量体からなり [1]、短い cysteine-rich domain (CRD) を経て標準的な 7 回膜貫通領域 (TMD) に繋がる大きな細胞外の venus flytrap domain (VFTD) により特徴づけられる (次項の図)。このヘテロ二量体受容体は、サッカライドやアミノ酸、甘いタンパク質および人工甘味料を含む構造的に異なる多数のアゴニストにより活性化される。代表的な甘味物質を表 1 に示す。そして異なるタイプの化合物は受容体の異なる部分に結合する [2]。一方、甘味受容体の下流のシグナル伝達機構は、ま

だ完全には明らかにされていない。現在広く受け入れられているシナグル伝達カスケードとして、**T1R2** および **T1R3** のヘテロ二量体は、味覚受容体細胞に選択的に発現しているヘテロ三量体 G タンパク質ガストデューシンと共役して、ホスホリパーゼ **C-β2 (PLCβ2)** を活性化する。これにより、ホスファチジレイノシトール-4,5-二リン酸が加水分解され、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (**IP₃**) とジアシルグリセロール (**DAG**) が生じる。**IP₃** は小胞体からのカルシウムの放出を惹起し、細胞質カルシウム濃度 (**[Ca²⁺]_c**) の上昇を引き起こす。この **[Ca²⁺]_c** の上昇は、非選択的陽イオンチャネル **TRPM5** を活性化し、ナトリウムイオンの流入が起こり細胞膜が脱分極する。この脱分極により **ATP** 透過性 **CALHM1** チャネルが活性化され **ATP** が放出される。放出された **ATP** は、感覚求心路線維を興奮させる。ノックアウトマウスを用いた研究の結果は、このモデルを裏づけている [7]-[9] が (総説については [3] を参照)、これは甘味シグナル伝達の唯一のメカニズムではない。例えば、**T1R2** もしくは **T1R3** のどちらかを欠損したマウスは、いくつかの甘い化合物への応答が減少するが消える訳ではない [4]-[6]。これらの観察結果は、他の明らかにされていない甘味感知受容体およびシグナル伝達機構が甘味刺激の認識のために存在することを示唆している。

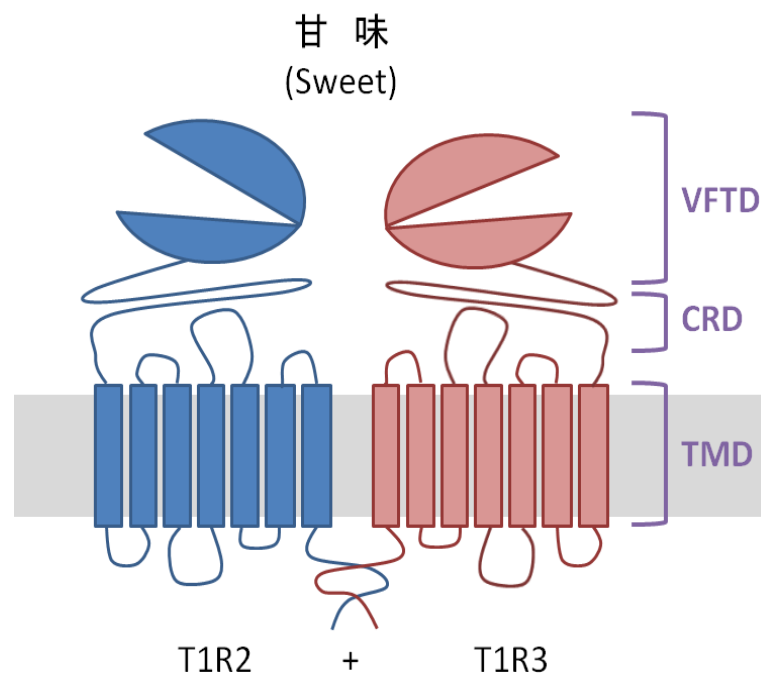


図. 甘味受容体の構造

1-3. 味蕾以外の組織における甘味受容体の発現

甘味受容体は味蕾だけでなく、腸管内分泌細胞のような味覚受容に関与しない細胞にも発現していることが明らかになっている[10]。腸管内分泌細胞における甘味受容体の刺激は、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) およびグルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド (GIP) のようなインクレチンの放出を惹起し、腸上皮細胞におけるナトリウム依存性グルコース輸送体 SGLT1 の発現を増加させ、腸管腔からのグルコースの吸収を増加させる[10][12][13]。膵β細胞における甘味受容体の刺激は、 $[Ca^{2+}]_c$ および $[cAMP]_c$ を上昇させインスリン分泌を誘発する[11]。これらの結果は、甘味受容体に味覚ではない新しい機能があることを示している。甘味受容体が糖代謝やエネルギー代謝においてより広範な役割を果たしている可能性を示唆しているものと考えられる。

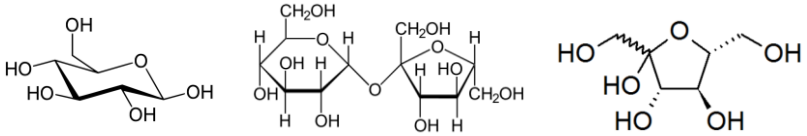
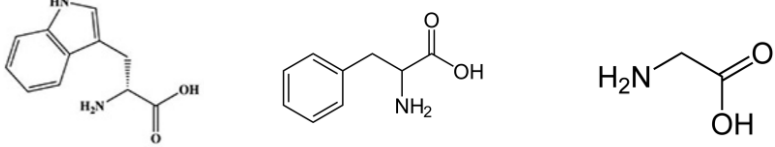

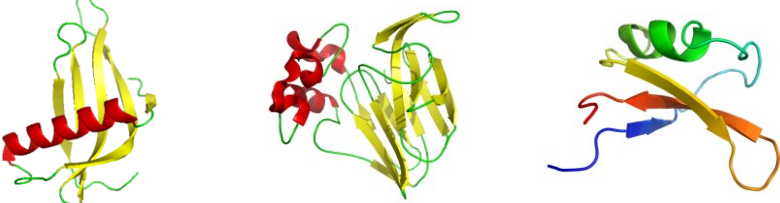
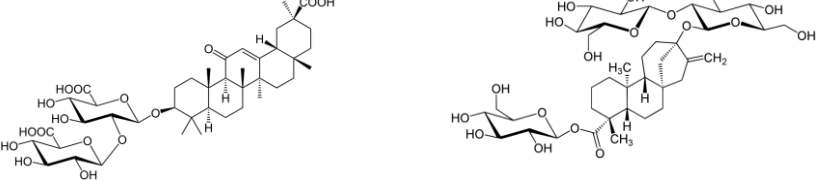
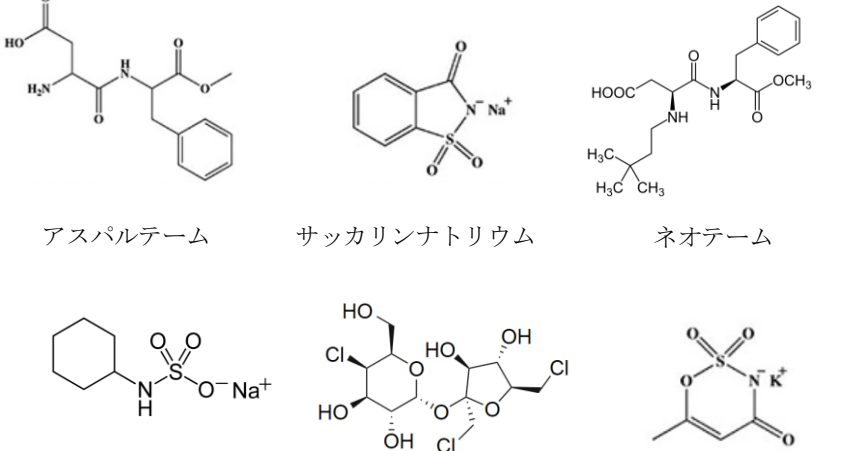
<p>Natural Sugar 天然糖</p>	 <p>グルコース スクロース フルクトース</p>
<p>Amino Acid アミノ酸</p>	 <p>D-トリプトファン フェニルアラニン グリシン</p>
<p>Sugar Alcohol 糖アルコール</p>	 <p>キシリトール ソルビトール</p>
<p>Sweet Protein 甘いタンパク質</p>	 <p>モネリン ソーマチン ブラゼイン</p>
<p>Glycoside 配糖体</p>	 <p>グリチルリチン ステビア</p>
<p>Artificial Sweetener 人工甘味料</p>	 <p>アスパルテーム サッカリンナトリウム ネオテーム</p> <p>シクラメート (サイクラミン酸ナトリウム) スクラロース アセスルファムカリウム</p>

表 1. 代表的な甘味物質

第 2 章

脂肪細胞における甘味受容体の発現と機能

2-1. 目的

本研究では、脂肪細胞における甘味受容体の発現と機能を明らかにすることを目的とした。そのために、脂肪細胞のモデル細胞としてよく知られているマウス 3T3-L1 細胞における甘味受容体の発現と機能を検討した。

2-2. 材料と方法

材料

ウサギ抗 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) 抗体、ウサギ抗 CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) 抗体、ウサギ抗 aP2/FABP4 抗体は、Cell Signaling Technologies Inc. (Danvers, MA, USA) より購入した。モルモット抗 GLUT4 抗体は、本研究室において作製した[14]。ウサギポリクローナル抗 T1R3 抗体は Abcam 社 (Cambridge, UK) より購入した。マウスモノクローナル抗 tubulin 抗体 (clone TUB 2.1)、抗 actin 抗体 (clone AC-40)、sucralose および Oil Red-O は、Sigma-Aldrich (St Louis, MO) から入手した。Sodium saccharin、D-mannitol、コレラ毒素は、和光純薬工業 (大阪, 日本) から入手した。Endothelin-1 は、ペプチド研究所 (大阪, 日本) から購入した。YM-254890 (アステラス製薬, 筑波, 日本) は、原液としてジメチルスルホキシドで溶解し 10 mM の原液として保存した。マウスの有郭乳頭および葉状乳頭の RNA[15]は、江藤譲博士 (味の素株式会社, 川崎, 日本) から提供して頂いた。

細胞培養および分化誘導法

Howard Green 教授 (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) より提供して頂いた 3T3-L1 細胞[16]は、50 μ g/ml ペニシリン、75 μ g/ml ストレプトマイシン、10% 仔牛血清 (CS) を加えた 4.5 g/L D-glucose を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-HG) を用いて 5%CO₂、37°C で継代した。

さらに、3T3-L1 細胞は以前に示した方法[17]により脂肪細胞へと分化させた。コンフルエントの細胞を、10% 牛胎児血清 (FBS)、0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、10 μ M dexamethasone、1.7 μ M インスリン、1.0 g/L D-glucose を含む新しい DMEM (DMEM-LG) 中で培養した。48 時間後、培地を 10% FBS、1.7 μ M インスリンを含む新しい DMEM-LG に交換した。さらに 48 時間後、培地からインスリンを除き、細胞は 10% FBS を含む DMEM-LG で培養した。

動物

オスの C57BL/6J マウスは、日本クレア株式会社 (東京, 日本) から購入した。これらの動物は、12 時間ごとの明暗サイクル条件のもと、自由摂餌システム下で 23°C に制御された動物実験施設で飼育した。実験動物は、群馬大学動物実験倫理委員会によって発行された動物のケアのためのガイドラインに従って行った。プロトコルは、群馬大学動物実験倫理委員会により承認された (承認番号: 09-069)。精巣上体の脂肪パッドを得るために腹部切開を含むすべての手順は、ナトリウムペンタバルビタール麻酔下で行われ、すべて苦痛を最小限にするために行われた。

脂肪細胞と間質-血管画分の調製

脂肪細胞および非脂肪細胞画分は、C57BL/6J マウス (6 週齢) の精巣上体脂肪組織からコラゲナーゼ消化法 [18] により調製した。脂肪組織は、Krebs-Henseleit HEPES 緩衝液 (118 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 2.54 mM CaCl₂, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 30 mM HEPES/NaOH, pH 7.4) に 40 mg/ml BSA (fraction V) と 3 mM ピルビン酸ナトリウム (Buffer A) を加え 2 mg/ml コラゲナーゼ (Type I, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) で 37°C にて 45 分間で消化し、そして 3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。浮遊細胞とペレットを分離し、それぞれを Buffer A で 4 回

洗浄し、成熟脂肪細胞および間質-血管画分 (SVF) とした。

脂肪組織由来間質細胞の精製と分化

初代マウス脂肪組織由来間質細胞 (ATSCs) は、以前に記載された方法[19]に若干の修正を加え、C57BL/6Jm マウス (6 週齢) の精巣上体脂肪組織から精製した。脂肪組織は、DMEM-LG で十分に洗浄し、1 mg/ml コラゲナーゼ (Type I, 和光純薬工業) で 37°C、120 分間消化させた。細胞を 40 μ m のナイロンメッシュ (Becton, Dickinson, NJ, USA) で濾過した後、3,000 rpm で遠心分離した。ペレットを 10% FBS および抗生物質 (70 μ g/ml ペニシリンと 100 μ g/ml スプレプトマイシン) を含む DMEM-LG で再懸濁し、5% CO₂、37°C で培養した。2 日後、コンフルエントの細胞に、10% FBS を加えた脂肪細胞分化培養液 (ADM) (Cellular Engineering Technologies, Inc., Coralville, IA, USA) に培地交換し、脂肪細胞へと分化させた。この培養液は、48 時間ごとに新しい ADM + 10% FBS に置き換えた。

定量的 RT-PCR

Total RNA は、TRIzol 試薬 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) を用いて細胞から抽出し、Superscript II 逆転写酵素 (Life Technologies, Inc.)、random primer (タカラバイオ社, 滋賀, 日本) および oligo (dT) 12-18 (Life Technologies, Inc.) を用いて、cDNA に転写した。定量的 PCR は、ABI ViiA7 配列検出システム (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて、first-strand cDNA template、SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) とプライマーセットを含む 20 μ l の反応液で行った。マウス T1R1, T1R2, T1R3, CaSR, G α gust, G α 14, G α s, β -actin およびリボソームタンパクの S18、ヒト T1R2, T1R3 および β -actin のオリゴヌクレオチドプライマーは、タカラバイオ社から購入した。mouse T1R1, 5'-GAGACACAGACCTCTGGTGACAA-3' (forward) and

5'-CTGAGCACACGTCATACAGTTCATA-3' (reverse); for mouse T1R2,
 5'-CTGCTTCGAGTGTGTGGACTG-3' (forward) and
 5'-GAAGCAAGCGATGTTGTTCTTGTA-3' (reverse); for mouse T1R3,
 5'-AAGGCCTGCAGTGCACAAGA-3' (forward) and
 5'-GGCCTTAGGTGGGCATAATAGGA-3' (reverse); for mouse CaSR,
 5'-TTTGGAGTAGCAGCCAAAGATCAAG-3' (forward) and
 5'-ACCATCGGAATCCACGGAAG-3' (reverse); for mouse Gαgust,
 5'-GCGGGATGCAAGAACTGTGA-3' (forward) and
 5'-ACTCCATGCATTCTTGTGTTGCTGTA-3' (reverse); for mouse Gα14,
 5'-TGAACGACGGAAATGGATTCAC-3' (forward) and
 5'-ATGGTTCTAAACAGGGCTTTGCTC-3' (reverse); for mouse Gαs,
 5'-CATTCTGAGCGTGATGAACGTG-3' (forward) and
 5'-AGTCAATCAGCTGGTACTCATTGGA-3' (reverse); and for mouse
 β-actin, 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3' (forward) and
 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (reverse); for mouse S18,
 5'-TTCTGGCCAACGGTCTAGACAAC-3' (forward) and
 5'-CCAGTGGTCTTGGTGTGCTGA-3'; for human T1R2,
 5'-CCCTATGTCCATGTGTTCCAAGAG-3' (forward) and
 5'-CAGGCCTGGCATTTCATATTCA-3' (reverse); for human T1R3,
 5'-GGGTTCCACTCCTGCTGCTA-3' (forward) and
 5'-AAGGTGCAGGCGATGTTCGT-3' (reverse); for human β-actin,
 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' (forward) and
 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' (reverse)。反応混合液は、初期
 変性のために 95°C で 10 分間インキュベートし、続いて 40 回の PCR サイクル
 を行った。各サイクルは、95°C・15 秒、60°C・60 秒からなる。全ての遺伝
 子の mRNA レベルは、β-actin およびリボソームタンパクの S18 を内在性コ
 ントロールとして用いて規準化した。

免疫ブロット法

PPAR γ 、C/EBP α および aP2 の免疫検出の為に細胞を PBS で洗浄し、Laemmli buffer 中に溶解し 5 分間煮沸した後、10,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した。上清に bromophenol blue (BPB) と dithiothreitol (DTT) を加えサンプルとし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と免疫ブロットを行った。T1R3 の免疫検出の為に細胞を complete protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) を含んだ PBS にホモジナイズし、7,500 rpm, 4°C で 5 分間遠心分離した。上清に BPB と DTT を加えサンプルとし、SDS-PAGE と免疫ブロットを行った。ブロットは、Amersham ECL 検出システム (GE Healthcare UK Ltd, Amersham, UK) および LAS-4000 発光イメージアナライザ (GE Healthcare UK Ltd) を用いて可視化した。バンドのシグナル強度は、Multi Gauge ソフトウェア (富士写真フィルム, 東京, 日本) を用いて定量化した。タンパク量は、それぞれの PVDF メンブレンを再検出するかもしくは、同じサンプルを抗 β -tubulin 抗体または抗 actin 抗体で免疫ブロットすることにより内在性コントロールとして β -tubulin または actin の量で規準化した。

免疫染色

前述の様に[17]、カバーガラス上で分化した 3T3-L1 細胞を、3% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、抗 T1R3 および抗 GLUT4 一次抗体、Alexa Fluor 568 または Alexa Fluor488 で標識された二次抗体を用いて免疫染色した。細胞は、核を可視化するために DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) でも染色した。免疫蛍光画像は、FluoView FV1000 共焦点顕微鏡システム (Olympus, 東京, 日本) を用いて得た。

Oil Red-O 染色

分化6日目の3T3-L1細胞およびATSCsをPBSで2回洗浄した後、3% (w/v) パラホルムアルデヒド/PBSで10分間、室温で固定した。PBSで2回洗浄後、細胞を60% isopropanol溶液に1分間置換し、そしてOil Red-O染色液(3 mg/mL 60% (v/v) isopropanol)で20分間染色した。細胞を60% (v/v) isopropanolで1回洗浄後、さらにPBSで2回洗浄し、顕微鏡により観察した。Oil Red-Oの量を定量化するために、染料を100% isopropanolで20分間震盪することで抽出し、518 nmにおける吸光度を測定した。

siRNA またはプラスミド DNA の遺伝子導入

マウス *Gas* を標的にした低分子干渉 RNA (siRNA) 二本鎖 (表 2) は、Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から Dharmacon siGENOME SMARTpool として購入した。100 mm 培養ディッシュにて増殖させた 3T3-L1 前駆脂肪細胞を、0.05% トリプシン/PBS を用いて剥がした。PBS で 3 回洗浄した後、細胞を Electroporation Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) に再懸濁した。0.4 cm-gap cuvette に細胞溶液の一定量 (0.55 ml) を 4 つの siRNA 二本鎖 (各 5 nmole) の混合液 0.2 ml に懸濁し、200 V, 500 microfarads に設定した Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてシングルパルスで遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞を 10% CS を含む DMEM-HG に再懸濁し、12-well の培養プレートに播き、コンフルエントになるまで培養した (通常は 2 日間)。そして上記のように分化誘導した。

マウス T1R3 を標的にした低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) (表 2) または、non-silencing shRNA を含む pGIPz 発現ベクターは、Thermo Fisher Scientific Inc. から購入した。この発現プラスミド (30 µg) を、電気穿孔法により 3T3-L1 前駆脂肪細胞に遺伝子導入し、12-well の培養プレートに播き、分化誘導した。

野生型ラット *Gas* の cDNA は、Randall R. Reed 博士[20] (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) に提供して頂き、pCMV5 発現ベクターに

サブクローニングした。G α s-G226A 変異体[21][22]の cDNA は、QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて作製した。野生型または G α s-G226A 変異体の発現プラスミド (20 μ g) を、3T3-L1 前駆脂肪細胞に電気穿孔法により遺伝子導入し、12-well の培養プレートに播き、分化誘導した。マウス T1R2 および T1R3 の cDNA を含む pcDNA3.1 発現ベクターは、丸山豊博士 (味の素株式会社) に提供して頂いた。発現プラスミド (20 μ g) は、上記同様に電気穿孔法により HEK293 細胞に遺伝子導入し、細胞内 cAMP 含有量測定用に 12-well の培養プレートに播いた。また [cAMP]_c のリアルタイム測定用に 35 mm ガラス底の培養プレートに播き、アッセイの前に 24 時間培養した。

Target	Gene symbol	Target sequence of mRNA
T1R3	Tas1r3	ACAUCACCAAUGCAAUGUU (2216-2234)
G α s	Gnas1	GCUUAGAUGUCCAAAUUU (1551-1569)
		GAUCAACACCGCAACCUUU (1486-1504)
		GGACUACUUUCCAGAGUUC (1134-1152)
		GAACAUCGCGGUGUCUUC (1317-1336)

表 2. shRNA および siRNA の標的配列

細胞内 cAMP 含有量の測定

cAMP の細胞含有量は、メーカーの使用説明書に従い AlphaScreen cAMP assay kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA) を用いて測定した。12-well 培養プレート上の細胞を 3 時間無血清培地で培養し、そして Hanks' balanced salt solution (HBSS: 138 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.38 mM MgSO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM D-glucose, 20 mM, Hepes/NaOH, pH 7.4) 中に 37°C で 30 分間培養した後、0.5 mM IBMX 存在下に甘味料で 30 分間刺激した。培養の終わりに、0.5 M HCl の 0.2 vol. を加え、細胞を -30°C で凍結および解凍することにより溶解させ、4°C で 10 分

間、15,000xg で遠心分離した。得られた上清を 200 mM HEPES/NaOH, pH 7.4 の等量で希釈し、アッセイに使用した。

細胞質 cAMP 濃度のリアルタイム測定

細胞質のサイクリック AMP 濃度 ($[cAMP]_c$) は、Epac-based cAMP sensor [23]を少し改良した方法[11]の Epac1-camp を用いて測定した。Epac1-camp は、強化シアン蛍光タンパク質 (ECFP) と強化黄色蛍光タンパク質 (EYFP) との間で融合した Epac1 のシングルサイクリックヌクレオチド結合ドメインから構成されている。cAMP が結合すると、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) の減少として測定されるフルオロフォア間の距離の増加による構造変化が誘導される。従って、FRET 発光比 (EYFP/ECFP) の減少は、 $[cAMP]_c$ の増加を示す。電気穿孔法により Epac1-camp をコードしたプラスミド (30 μ g) を遺伝子導入し、そして 35 mm ガラス底の培養プレートに播いた。24 時間培養後、培地を取り除き、HBSS で置き換えた。 $[cAMP]_c$ を測定するために、Epac1-camp は、440 nm の波長で励起し、ECFP と EYFP の 2 つの発光イメージは、AQUACOSMOS/ASHURA 蛍光共鳴エネルギー移動イメージングシステム (浜松ホトニクス, 浜松, 日本) を用いて得た。 $[cAMP]_c$ のデータは、EYFP/ECFP (i.e. ECFP/EYFP) の発光比の逆数として示された。

統計解析

データは、スチューデントの t 検定により解析し、 $P < 0.05$ が統計学的に有意とみなした。

2-3. 結果

私は、まず 3T3-L1 細胞の分化過程における T1R ファミリーGPCR の発現プロファイルを定量的 RT-PCR により検討した。表 3 に示す様に、マウス有郭

乳頭および葉状乳頭と比較して、3T3-L1 前駆脂肪細胞では、すべての T1R GPCR の発現が非常に低値であった。β-actin に対する比率に基づいて、前駆脂肪細胞における T1R1, T1R2, T1R3 の mRNA レベルは、有郭乳頭における T1R3 発現のそれぞれ 0.03, 0.01 および 0.6% であった。

	circumvallate papillae	foliate papillae	SVF	adipocyte	3T3-L1 Day 0	3T3-L1 Day 6
T1R1	19.7	6.7	0.03	ND	0.03	2.40
T1R2	147.8	44.1	0.06	10.9	0.01	0.27
T1R3	100.0	54.2	1.58	4579.1	0.63	148.4

表 3 T1R ファミリーGPCR の相対的発現量

しかし T1R3 の発現は、分化誘導で劇的に発現増加した (Day2 では 12.4 倍、Day6 では 83.0 倍)。一方、T1R2 は、わずかな増加が認められたのみである (Day6 で 3.8 倍) (図 1A)。従って T1R3 発現は、Day2 と Day6 の T1R2 と比較してそれぞれ 17.7 倍、46.2 倍と増加していた。同様に、分化により T1R3 のタンパク量が著明に増加することが明らかになった (図 1B)。また免疫蛍光染色によっても、分化による T1R3 および GLUT4 の増加が明らかになった。さらにこの 2 つのタンパク質は、Day7 の細胞において共存していた (図 1C,a-d)。図 1C (e) 中の矢印で示すように、一部の細胞では Day7 において T1R3 が細胞の周辺部に局在していた。T1R3 のシグナルは細胞質にも存在した。これらの細胞質シグナルは、他の相互作用するタンパク質により細胞内に補足された成熟 T1R3 タンパク質、もしくは未熟 T1R3 タンパク質を示しているのかもしれない。しかし、現時点ではこれらのシグナルが非特異的なものであるという可能性も排除できない。より正確な方法、またはより特異的な抗体を用いることでこれらを明確にできるかもしれない。3T3-L1 細胞におけるこれらの発現プロファイルが生理学的な意義をもつかどうかを明らかにするために、次に私はマウス脂肪組織での T1R の発現レベルを検討した。表 3 に示すように、T1R2

と T1R3 はマウスの有郭乳頭および葉状乳頭においては同等レベルに発現していた。それとは対照的に、C57BL/6J マウスの精巢上体脂肪細胞における T1R3 発現量は、T1R2 に比べて著明に高値であった。実際、T1R3 発現は T1R2 の 420 倍であった。一方、間質-血管画分 (SVF) での発現レベルは、3T3-L1 前駆脂肪細胞での発現と同等であった。これらの結果から、T1R3 はホモダイマーもしくは、他の未知の受容体とのヘテロダイマーとして主に発現していること、そして分化した 3T3-L1 細胞や成熟脂肪細胞においてはごく少数の T1R3 が T1R2 とヘテロダイマーを形成している可能性が示唆された。これに関連して、味蕾に発現しているカルシウム感知受容体 (CaSR)、他のクラス C の GPCR などは検出できなかった[24]-[26]。

次に、これらの T1Rs が 3T3-L1 細胞において甘味物質に対する受容体として機能しているかどうか、またもしそうであれば、どのようなシグナル伝達機構なのかを検討した。図 2A に示すように、分化の最初の 48 時間にスクラロースもしくはサッカリンを添加すると、Day2 における PPAR γ と C/EBP α の発現は抑制された。さらに、スクラロースとサッカリンは、Day4 における aP2 の発現も抑制し (図 2B)、さらに Day6 におけるトリグリセリドの蓄積を減少させた (図 2C)。これとは対照的に、Day3 および Day4 もしくは、Day5 および Day6 に甘味料を添加すると、Day6 におけるトリグリセリドの蓄積はあまり変化しなかった (図 2C 左のパネル)。これらの結果は、3T3-L1 細胞には甘味を感知する受容体が発現し機能していること、そしてそれは、脂肪分化に抑制的に作用することを示唆している。3T3-L1 細胞におけるこれらの結果の生理学的意義をさらに明らかにするために、C57BL/6J マウス由来の初代脂肪組織由来間質細胞 (ATSCs) の分化に対するスクラロースおよびサッカリンの効果を検討した。図 2D に示すように、分化培地への甘味料の添加により、ATSCs のトリグリセリド蓄積は有意に抑制された。これは、甘味料が脂肪細胞の初期分化を抑制するという考えと一致している。

これらの結果は、T1R3 のホモダイマー、もしくは T1R3 と他の未知の GPCR とのヘテロダイマーは、3T3-L1 細胞において甘味を感知する受容体として機能していることを示している。脂肪細胞分化抑制効果を媒介する T1R3 の役割をさらに明らかにするために、私は、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) を用いて、T1R3 の発現を減少させる実験を行った。図 2E に示すように、T1R3 を標的とする shRNA 配列を含むプラスミドの遺伝子導入は、80 % の効率で T1R3 の発現を減少させ、Day2 における甘味料による PPAR γ と C/EBP α の減少を有意に抑制し、さらに Day6 におけるトリグリセリドの蓄積も抑制した。これらの結果は、T1R3 が甘味料の脂肪細胞分化抑制効果に関与していることを示唆している。

甘味感知受容体の下流シグナル伝達機構を探求するために、私は次に、甘味受容体と結合する可能性がある三量体 G タンパク質の α サブユニット、即ちガストデュシン (Gagust), G14 (G α 14), Gs (Gas) の発現を検討した。前述したように、ガストデュシンは甘味受容体と共役する G タンパク質であると考えられている。Gq ファミリーの G タンパク質に属している G14 は、舌の後部の味覚受容体細胞において T1R2 と T1R3 と共発現しており、甘味受容体と共役する G タンパク質の一つの候補と考えられている[27][28]。甘味応答における Gas の役割は明らかにされていないが、Gas とアデニル酸シクラーゼが味蕾に発現していることが報告されている[29][30]。さらにスクラロースとサッカリンは、味蕾において cAMP 濃度を上昇させ、アデニル酸シクラーゼを活性化することが示されている[30]-[33]。さらに我々は最近、マウスインスリノーマ MIN6 細胞において、スクラロースもしくはサッカリン刺激により cAMP 濃度の上昇が起こることを報告してきた[11]。そしてこの効果は Gas の siRNA によるノックダウンにより減弱した (中川による未発表の知見)。これらの事実は、甘味受容体と Gas が共役することを示唆している。図 3A に示すように、

定量的 RT-PCR の解析により、分化過程において $G\alpha_{ust}$ は検出されなかった。一方、 $G\alpha_{14}$ と $G\alpha_s$ は連続的に発現していた。しかし、 $G\alpha_{14}$ の発現レベルは $G\alpha_s$ の 0.2 % 以下であった。

3T3-L1 細胞において甘味感知受容体の下流シグナルを媒介する G タンパク質をさらに明らかにするために、まず私は、阻害剤により G14 の機能を阻害した。図 3B に示すように、Gq や G11, G14 のような Gq ファミリーの G タンパク質の阻害剤である YM-254890 [34][35] の培養液への添加により、Day2 におけるエンドセリン-1 による $PPAR\gamma$ および $C/EBP\alpha$ の発現抑制は解除された。しかし、スクラロースおよびサッカリンの効果は解除されなかった。この結果は、エンドセリン-1 が、おそらく Gq のような YM-254890 感受性 G タンパク質 [36]-[40] の活性化を介して、3T3-L1 細胞の分化を抑制していることを示唆している。従って、G14 を含むこれら Gq ファミリータンパク質は、甘味感知受容体からの脂肪細胞分化抑制シグナルを媒介していない。一方、 $G\alpha_s$ のドミナントネガティブ変異体 ($G\alpha_s$ -G226A) [21][22] の過剰発現により、 $PPAR\gamma$ および $C/EBP\alpha$ での甘味料の抑制効果は著しく減弱した (図 3C)。このことから、甘味料の脂肪細胞分化抑制シグナルは、 $G\alpha_s$ を介したものであることが強く示唆された。

次に 3T3-L1 細胞において甘味感知受容体が $G\alpha_s$ と共役しているかどうかを検討した。図 4A に示すように、スクラロースおよびサッカリンは、Day2 および Day6 の分化した 3T3-L1 細胞の cAMP コンテンツを増加させた。3T3-L1 細胞における $[cAMP]_c$ のリアルタイム測定により、スクラロース刺激により $[cAMP]_c$ も急速に増加することが明らかになった (図 4B)。これらの結果は、甘味感知受容体はおそらく $G\alpha_s$ と共役しており、アデニル酸シクラーゼを活性化することを示している。しかし、Day6 にける甘味料による cAMP 増作は、Day2 よりも Day6 において T1R3 の発現量が高いにもかかわらず小さいもの

であった (図 4A)。この理由は不明であるが、T1R3 の発現量の増加はそれだけで、アデニル酸シクラーゼを活性化し、甘味料の影響を鈍らせる可能性がある[41]。また内在性アデノシンによるアデニル酸シクラーゼの持続的な抑制が、甘味料の効果を調節する可能性があるかもしれない[42]。

3T3-L1 細胞の甘味感知受容体の分子実体を特定するために、私はマウス T1R3 を発現する HEK293 細胞での cAMP 応答を調べた。図 4C に示すように、スクラロースおよびサッカリンは、T1R3 のみを遺伝子導入した HEK293 細胞において細胞内 cAMP 含量を増加させた。[cAMP]_c のリアルタイム測定において、スクラロースは T1R3 を発現させた HEK293 細胞において [cAMP]_c を増加させた。一方、T1R2 のみを遺伝子導入した細胞、および T1R2 と T1R3 の両方を遺伝子導入した細胞では [cAMP]_c 上昇が見られなかった (図 4D)。内在性 T1R2 および T1R3 は、HEK293 細胞において無視できるレベル (それぞれアクチン mRNA との比で、 $1.40 \pm 0.49 \times 10^{-6}$ および $22.5 \pm 6.6 \times 10^{-6}$) なので、内在性受容体の発現が過剰発現実験の結果に影響を与えることはありえない。従って、マウス T1R3 のホモマーが HEK293 細胞内の cAMP を上昇させ甘味感知受容体として機能することが示された。

cAMP に依存する過程は脂肪細胞分化の初期段階で極めて重要である。このことは、ホスホジエステラーゼの阻害剤であり細胞内 cAMP を上昇させる IBMX を分化用培養液に入れていることから明白である。しかし、脂肪細胞分化の抑制には G α s 活性化が関与するという結果とは一見矛盾する[43][44]。これに関して、これまでの報告では、脂肪細胞分化における G α s の負の作用が明らかにされている[45]-[48]。そこで我々は、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における G α s の役割を再検討した。コレラ毒素による G α s の活性化は、Day2 における PPAR γ および C/EBP α の発現を抑制した。一方、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンは、これらの転写因子の発現への効果はわずか

であった (図 5A)。これとは対照的に、*Gαs* の siRNA によるノックダウンは、Day2 における PPAR γ および C/EBP α の発現を著しく増強した (図 5B)。これらの結果は、これまでの報告と合致しており、脂肪細胞分化における *Gαs* の負の調節の役割を確認することができた。

2-4. 考 察

本研究において、我々は脂肪細胞における甘味感知受容体の発現を明らかにし、それが 3T3-L1 細胞の分化を負に調節することを明らかにした。味覚ではない甘味感知受容体の新しい機能を示すことができた。しかし、3T3-L1 細胞における甘味感知受容体の分子実体は、味蕾に発現している T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーとは異なっていた。脂肪細胞において T1R2 と T1R3 の発現量は等量ではなく、Day2 と Day6 において T1R3 は T1R2 の 17.7 倍、46.2 倍と大量であった (図 1A)。さらに、SVF において T1R2 と T1R3 の発現量は、3T3-L1 前駆脂肪細胞と同様に低値であったのに対して、成熟脂肪細胞における T1R3 は、T1R2 よりも有意に高いレベルで発現していた (表 3)。これらの結果は、分化した成熟脂肪細胞において T1R3 の大部分は、ホモダイマーもしくは他の未知の GPCR とのヘテロダイマーとして発現していることを示唆している。Nelson ら[1]は、T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーだけでなく、これ以外の非定型的な味覚受容体が存在し得ることを形態学的観察から予測していた。今回の検討では、これとは対照的に T1R3 を単独導入した HEK293 細胞に甘味刺激を行うと cAMP が増加したことから、T1R3 ホモダイマーが甘味感知受容体のような機能をもつことが明らかになった (図 4)。T1R3 ホモダイマーは、*Gαs*-アデニル酸シクラーゼ-cAMP のシグナル経路を活性化することができる (作業モデルについては図 6 を参照)。

本研究の結果によれば、T1R3 ホモダイマーは YM-254890 感受性 G14 を含

む Gq ファミリータンパク質ではなく、おそらく G α s と共役し G α s の活性化を介して脂肪細胞分化抑制シグナルを伝達している。その根拠として第一に、スクラロースおよびサッカリン刺激は、3T3-L1 細胞だけでなくマウス T1R3 を発現させた HEK293 細胞においても cAMP を上昇させたこと (図 4)。第二に、G α s のドミナントネガティブ変異体の過剰発現が、PPAR γ および C/EBP α の発現に対する甘味料の阻害効果を有意に減弱したこと (図 3)。第三に、G α s をコレラ毒素処理で活性化することにより、スクラロースおよびサッカリンによる脂肪細胞分化抑制効果を再現し、逆に siRNA による G α s のノックダウンが、これら脂肪分化に関連する転写因子の発現を増強したことがあげられる (図 5)。一方、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンは PPAR γ および C/EBP α の発現を抑制しなかった。甘味感知受容体の脂肪細胞分化抑制シグナルは、G α s 活性化を介するものの cAMP を介するわけではない (図 5)。

これらの結果は、G α s の脂肪細胞分化抑制作用への関与を明らかにしたこれまでの報告[45]-[48]と一致したものの、現時点で下流のエフェクターは不明のままである。Zhang ら[48]は、TSH 受容体もしくは G α s の恒常的活性化型変異体の過剰発現は、cAMP の上昇および CREB のリン酸化に関わらず、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を抑制することを示した。彼らは、恒常的活性化型 G α s は、WD リピートおよび FYVE domain-containing protein 2 (WDFY2) の転写阻害による FoxO1 のリン酸化の抑制を介して PPAR γ の発現量を減少させ、リン酸化 Akt への結合を介して Akt により FoxO1 のリン酸化を促進することを明らかにした。過去 10 年間、ヘテロ三量体 G タンパク質のいくつかの非定型的な作用が報告されている[49]。これらは、チューブリン GTPase の促進を介した、微小管の不安定化[50]および、エンドソーム選別機構の重要な構成要素である肝細胞増殖因子調節チロシンキナーゼ基質 (Hrs) との G α s の相互作用を介する EGF 受容体の分解[51]などが含まれる。Rho-GEF のあるタイプ (例えば、

GEF-H1) は、微小管の分解を介し活性化されること[52]や、Rho は脂肪細胞分化の負の制御因子であること[53]などから、甘味刺激が、微小管の分解および Rho を介したシグナル伝達経路の活性化を引き起こすかは大変興味深い。この点については次章で述べる。

最後に、本研究の結果は cAMP を上昇させる味蕾の甘味受容体の分子実体への示唆を与える。前述したように、cAMP を上昇させる甘味受容体の分子実体は曖昧なままであるが、甘味受容体のシグナル伝達経路の下流で G α s およびアデニル酸シクラーゼの関与が示唆されている。HEK293 細胞を用いた私の検討では、T1R3 ホモダイマーが cAMP を上昇させることが明快に示された。従って、味覚受容体細胞においても T1R3 ホモダイマーが cAMP を上昇させる甘味受容体として機能している可能性がある。

3T3-L1 細胞における甘味感知受容体のシグナル伝達機構の作業モデルを図 6 に示す。味細胞 (左側) において T1R2 と T1R3 のヘテロ二量体の甘味受容体は、ガストデュージン (Gagust) もしくは他の G タンパク質を介して PLC β を活性化し、[Ca²⁺]_c の上昇および膜脱分極を惹起する (詳細は序論を参照)。3T3-L1 細胞(右側)においては、T1R3 のホモダイマーが G α s と共役し、アデニル酸シクラーゼ-cAMP 依存の脂肪細胞分化促進および cAMP 非依存性の脂肪細胞分化抑制シグナルの両方を産生する可能性が示唆される。

要約すると、3T3-L1 細胞は、味蕾に発現している T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーとは異なり、T1R3 ホモダイマーからなるユニークな甘味感知受容体を発現している。この非定型的な甘味感知受容体は、G α s 依存性であるが cAMP には依存しないメカニズムにより脂肪細胞分化を負に調節する。この受容体の生理学的意義を明らかにするには、脂肪細胞特異的 T1R3 ノックアウトマウスなどを用いた更なる研究が必要である。

第 3 章

甘味受容体を介する脂肪分化抑制機構

3-1. はじめに

第二章において、マウス 3T3-L1 細胞には T1R3 が T1R2 よりも優位に発現していることを示した。また、甘味受容体アゴニストであるスクラロースやサッカリンなどの甘味料は、脂肪細胞分化に抑制的に関与していることを示した。

本章では、この甘味受容体アゴニストが脂肪細胞分化抑制をきたす細胞内シグナルについてさらに明らかにする。まず私は、3T3-L1 細胞にスクラロースを添加した場合、分化誘導初期の細胞増殖期間 (clonal expansion) に、細胞の接着性が低下し、形態が球状変化を起こすとともに培養ディッシュから剥がれ易くなることに着目した。この観察結果から、T1R3 ホモダイマー受容体が細胞骨格機能の調節に関与している可能性が考えられた。

近年、アデニル酸シクラーゼ活性化以外の非定型的 G α s 作用として、G α s がチューブリンと複合体を形成し、チューブリン GTPase 活性化により微小管脱重合を起こすことが報告されている[54]-[57]。一方で、微小管脱重合により微小管に局在している Rho-GEF の 1 つである GEF-H1 (ARHGEF2) が微小管から遊離されて活性化され、これにより低分子量 G タンパク質 RhoA が GTP 型となり活性化されることが知られており[52]、GEF-H1 はチューブリン細胞骨格の動的な変化を RhoA 依存性シグナル経路に伝える制御因子であると考えられる[58]。脂肪細胞分化における Rho の役割として、Rho が脂肪細胞分化を抑制的に調節していることが報告されている[53][59]。また、Rho 活性化により Rho 結合キナーゼである Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) が活性化される。これらは、甘味受容体アゴニストが G α s を活性化し、チューブリン GTPase 活性化・Rho 活性化を介して脂肪分化抑制作用を発揮する可能性があることを示唆している。また、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化には、PI3-kinase も重要な役割を果たしており、この PI3-kinase は細胞骨格形成、細胞増殖、代謝などの作用に広く関与していることが知られている[60]-[62]。また、細胞骨格の形成においても役割があり[61]、低分子量 G タンパク質 Rho を活性化すると細胞が球状化し細胞接着が弱まること[63]などが明らかにされている。さら

には、PI3-kinase-Akt-FoxO1 系は脂肪細胞分化の調節因子であることが知られている[64]。そして、PI3-kinase と拮抗する PTEN が Rho/ROCK 経路に関与すること[65][66][67]から、私の分化抑制シグナルのモデルにも Rho/ROCK 経路を介した経路が関与していることが想像される。

3-2. 目的

3T3-L1 細胞におけるスクラロースおよびサッカリンの分化抑制シグナルとして、甘味受容体アゴニストによる Gαs の活性化に伴い、微小管脱重合が起こることで GEF-H1 の活性化、Rho の活性化を介して、Akt および FoxO1 のリン酸化が抑制される可能性がある。そしてこれにより、Akt および FoxO1 が核内に留まり、PPARγ および C/EBPα が発現抑制され、脂肪細胞分化抑制が生じることが考えられる。そこで、本研究においては、この脂肪細胞分化抑制の Gαs 下流シグナルを検討した。

3-3. 材料と方法

材料

ウサギ抗 PPARγ 抗体、ウサギ抗 C/EBPα 抗体、ウサギ抗 GEF-H1 抗体、ウサギ抗 MYPT1 抗体、ウサギ抗 Phospho-MYPT1 (Thr853)、ウサギ抗 PTEN 抗体、ウサギ抗 Akt 抗体、ウサギ抗 Phospho-Akt (Ser473)、ウサギ抗 FoxO1 抗体、ウサギ抗 Phospho-FoxO1 (Ser256) は、Cell Signaling Technologies Inc. より購入した。マウスモノクローナル抗 tubulin 抗体、sucralose、forskolin、isoproterenol、phalloidin は、Sigma-Aldorich から購入した。Sodium saccharin、コレラ毒素、Y-27632 は和光純薬工業から購入した。

細胞培養と分化誘導法

継代用培養液の D-MEM (High Glucose)、分化用培養液の D-MEM (Low

Glucose) は、和光純薬工業より購入した。3T3-L1 細胞は、10% CS を加えた、penicillin-streptomycin solution (x100) を含む D-MEM (High Glucose) を用いて、5% CO₂、37°C で継代した。継代したおよそ 2 日後にコンフルエントになった細胞に、10% FBS、0.5 mM IBMX、10 μM dexamethasone、1.7 μM インスリンを加え penicillin-streptomycin solution (x100) を含む D-MEM (Low Glucose) で置き換えた。その 48 時間後、培地を 10% FBS、1.7 μM インスリンを加え、penicillin-streptomycin solution (x100) を含む新しい D-MEM (Low Glucose) に交換した。さらに 48 時間後インスリンを含まない 10% FBS および penicillin-streptomycin solution (x100) を含む新しい D-MEM (Low Glucose) のみで培養した。

免疫染色法

カバーガラスを入れた 6-well 培養プレートに細胞を播き、コンフルエントになった 3T3-L1 細胞を 3% パラホルムアルデヒドで 10 分間・室温、もしくは氷冷したメタノールで 2 分間・-30°C で固定し、抗 tubulin、抗 phalloidin もしくは抗 GEF-H1 一次抗体、さらに Alexa Fluor568 または Alexa Fluor488 で標識された二次抗体で免疫染色を行った。細胞は、核を可視化するために DAPI でも染色した。免疫蛍光画像は、FluoView FV1000 共焦点顕微鏡システム (Olympus) を用いて得た。

免疫ブロット法

GEF-H1、FoxO1、リン酸化 FoxO1、PPAR γ 、C/EBP α の免疫検出のために、細胞を PBS で洗浄し、Laemmli buffer 中に溶解し、5 分間煮沸した後、氷冷してから 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。上清に BPB と DTT を加えサンプルとし、SDS-PAGE と免疫ブロットを行った。MYPT1、リン酸化 MYPT1、Akt、リン酸化 Akt、PTEN の免疫検出のために、細胞を complete protease inhibitor cocktail (Roche) を含んだ PBS にホモジナイズし、7,500

rpm, 4°Cで5分間遠心分離した。上清にBPBとDTTを加えサンプルとし、SDS-PAGEと免疫ブロットを行った。ブロットは、Amersham ECL検出システム (GE Healthcare) およびLAS-4000発光イメージアナライザ (GE Healthcare) を用いて可視化した。バンドのシグナル強度は、Multi Gaugeソフトウェア (富士写真フィルム) を用いて定量化した。タンパク量は、それぞれのPVDFメンブレンを再検出するかもしくは、同じサンプルを抗 β -tubulin抗体で免疫ブロットすることにより内在性コントロールとして β -tubulinの量で規準化した。

プラスミドDNAの遺伝子導入

100 mm培養ディッシュで増殖させた3T3-L1前駆脂肪細胞を、0.05%トリプシン/PBSを用いて剥がした。PBSで3回洗浄した後、細胞をElectroporation Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に再懸濁した。0.4 cm-gap cuvetteに細胞の0.55 mlの一定量を各発現ベクター (20 μ g) 0.2 mlに懸濁し、220 V, 28 milli secondに設定したGene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてシングルパルスで遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞を10% CSを含むD-MEM (High Glucose) に再懸濁し、12-wellの培養プレートに播き、コンフルエントになるまで培養した (通常は2日間)。そして、上記のように分化誘導した。

Rho活性化の測定

Rhoの活性化測定は、メーカーの使用説明書に従いActive Rho Detection Kit (Cell Signaling Technologies Inc.) を用いて測定した。3T3-L1細胞をD-MEM (High Glucose) で100 mmディッシュに継代し、コンフルエントになるまで培養した (通常2日間)。そして、各ディッシュをスクラロース、サッカリンおよびノコダゾールで2時間刺激した後、細胞を氷冷したPBSで1回洗浄し、検出キットを用いてRho-GTPのサンプルを作製した。得られたサンプルを5

分間煮沸し、7,500 rpm, 4°Cで10分間遠心分離した。上清を SDS-PAGE と免疫ブロットに使用した。また、Rho loading のサンプルとして残りのアッセイ液を Laemmli buffer に溶解し、5分間煮沸し、7,500 rpm, 4°Cで10分間遠心分離した。この上清に BPB と DTT を加えサンプルとし、SDS-PAGE と免疫ブロットをした。抗体は、ウサギ抗 RhoA 抗体 (Cell Signaling Technologies Inc.) を使用した。ブロットは、Amersham ECL 検出システム (GE Healthcare) および LAS-4000 発光イメージアナライザ (GE Healthcare) を用いて可視化した。バンドのシグナル強度は、Multi Gauge ソフトウェア (富士写真フィルム) を用いて定量化した。

Rho の継時的変化の測定

RhoA の活性化測定は、既に知られた方法[68]である FRET ベースのプロローブの Raichu-RhoA-1237X (WT) を用いて検討した。Raichu-RhoA-1237X は、RhoA の結合ドメインをもち、エフェクタータンパクへの活性化型 RhoA-GTP の結合分子が CFP から YFP への FRET の増加をもたらす。従って、FRET 発光比 (YFP/CFP) の増加は、RhoA の活性化を示す。細胞を上記のような電気穿孔法を用いて、Raichu-RhoA-1237X をコードしたプラスミドを 30 µg で遺伝子導入し、そして 35 mm のガラス底の培養プレートに播いた。24 時間培養後、培地を取り除き、HBSS で置き換えた。RhoA の活性化を測定するために、Raichu-RhoA-1237X を 433 nm の波長で励起し、YFP および CFP の 2 つの発光イメージは、AQUACOSMOS/ASHURA 蛍光共鳴エネルギー移動イメージングシステム (浜松ホトニクス) を用いて得た。

3-4. 結果

まず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で微小管脱重合が引き起こされるかどうかを免疫染色法により検討した。図 7 に示すよう

に、分化刺激のみでは微小管脱重合は認められず、スクラロースもしくはサッカリンを添加した場合に微小管脱重合が認められた。また、微小管脱重合がみられる細胞では phalloidin 染色により染色されているアクチンストレスファイバーの増加が観察された。さらに、G α s を活性化するイソプロテレノールやコレラ毒素によっても微小管脱重合が起こることが再現されたが、G α s とは無関係に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では、微小管脱重合は再現されなかった。

次にこの甘味受容体アゴニストによる微小管脱重合が G α s を介した作用であるかをドミナントネガティブ変異体である G α s-G226A を用いて検討した。図 8 に示すように、G α s-野生型を発現した細胞へのスクラロースおよびサッカリン刺激では、微小管脱重合が観察された。しかしながら、G α s のドミナントネガティブ変異体を発現した細胞では、この甘味受容体アゴニストによる微小管脱重合作用は阻害された。また、恒常的活性化型変異体である G α s-Q227L の発現により再現された。これらの結果から、G α s の活性化により微小管脱重合が起こり、甘味受容体アゴニスト刺激が、G α s を介して微小管脱重合を引き起こすことが示唆された。

次に私は、甘味受容体アゴニストによる微小管脱重合が Rho を活性化するかどうかを検討した。まず、微小管脱重合で活性化される Rho-GEF の 1 つである GEF-H1 が 3T3-L1 細胞に発現し、この GEF-H1 は微小管と共局在していることを確認した (結果は、図 9A)。さらに、Rho の活性化をプルダウンアッセイにより検討したところスクラロースおよびサッカリン刺激により Rho が活性化されること、およびこの Rho の活性化は微小管脱重合剤であるノコダゾールでも同様に起こることが明らかになった (図 9B)。このように Rho が甘味受容体刺激により活性化されることから、Rho/ROCK 経路が活性化されることが予測されるので、ROCK の活性化を免疫ブロットで検討した。この ROCK

の活性化は、ROCKの基質であるMYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) がリン酸化されるかどうかを免疫ブロットで検討した。その結果、スクラロースおよびサッカリン刺激により、MYPT1のリン酸化が亢進することが明らかになった (図 9C)。このことから、甘味受容体アゴニスト刺激でROCKが活性化されることが示された。さらに、Rho活性化の時間経過をRhoのプロープであるRaichu-RhoA-1237Xを用いて検討したところ、スクラロース刺激10分後以降に徐々にRhoが活性化していることが示された (図 9D)。

さらに3T3-L1細胞におけるこの甘味受容体刺激によるRhoの活性化の脂肪細胞分化に対する効果を検討した。RhoAのドミナントネガティブ変異体であるRhoA-T19Nを3T3-L1細胞に電気穿孔法により強発現させた細胞では、甘味受容体アゴニストによるDay2 (48時間後) でのPPAR γ およびC/EBP α の発現抑制の阻害が見られ、その上流シグナル分子であるAktのリン酸化抑制の阻害も明らかになった (図 10A)。また、ROCK阻害剤であるY-27632の存在下においてスクラロースによるAktのリン酸化抑制が阻害された (図 10B 上)。また、スクラロースおよびサッカリンによるC/EBP α の発現抑制が阻害された (図 10B 下)。これらの結果から、甘味受容体アゴニストによる3T3-L1細胞に対する脂肪分化抑制作用は、Rho-ROCK経路を介することが示唆された。

PPAR γ およびC/EBP α の上流シグナル分子であるAktおよびFoxO1に対する甘味受容体アゴニストの効果を検討した。その結果、スクラロース刺激によりAktのリン酸化を抑制すること、そしてこれによりFoxO1のリン酸化の抑制が示された (図 11A)。さらに、Rho/ROCK経路からこのAktのリン酸化抑制を介するカスケードとしてPTENが脂肪細胞分化に関与していることから、PTENの変化を検討した。その結果、PTENの量がスクラロース刺激により増加することが示された (図 11B)。このことから、甘味受容体アゴニスト刺激は、PTENを介し、Aktのリン酸化抑制、およびFoxO1のリン酸化抑制により

PPAR γ および C/EBP α の発現抑制作用を引き起こしていることが示唆された。

3-5. 考察

第二章では、脂肪細胞に発現する甘味受容体として、T1R3 ホモダイマーが機能していること、これが脂肪細胞分化に抑制的に働くことを明らかにした。T1R3 と共役する G タンパク質として G α s が活性化されることから、T1R3 刺激により cAMP 濃度の上昇をきたすが、T1R3 刺激は cAMP に非依存的な経路により脂肪細胞分化を抑制することを示した。本章では、この G α s を介する甘味受容体アゴニストの脂肪細胞分化抑制シグナルを検討した結果、まず甘味受容体アゴニストであるスクラロースやサッカリン刺激により微小管の脱重合が起こることを免疫蛍光染色により明らかにした。またこの作用は、G α s を活性化させるイソプロテレノールやコレラ毒素で再現され、アデニル酸シクラーゼを直接活性化させ cAMP を上昇させるフォルスコリンには微小管脱重合作用がなかった。さらに、この作用は G α s のドミナントネガティブ変異体の G α s-G226A で解除された。従って、G α s 活性化により微小管脱重合が起こること、また甘味料は G α s を活性化し、微小管脱重合作用を引き起こすことが明らかになった。

また、微小管と共局在している Rho-GEF の 1 つである GEF-H1 が分化した脂肪細胞では発現が増強していることが明らかになった。さらに甘味受容体アゴニスト刺激により Rho/ROCK 系が活性化することが明らかになった。このことは、以前の報告と一致する [52]。Rho 活性化の時間経過を考察すると、Racichu-RhoA-1237X の結果から、甘味受容体刺激から短時間 (10 分間) で Rho が活性化された。しかし、免疫蛍光染色により微小管脱重合が観察されるのは数時間後からであり、少なくとも 1 時間後から脱重合が起こりはじめ、どの細胞でも一様に脱重合作用がみられるには更に数時間が必要であった。観察

結果は、2時間(図7)および3時間(図8)刺激を行った。このことから、完全な微小管脱重合が Rho の活性化に必要ではなく、Gαs を介した微小管脱重合作用が少しでも生じることでシグナル伝達され Rho が活性化する可能性が考えられる。そしてこの甘味刺激による Rho 活性化が脂肪細胞分化抑制に関与すると思われる。さらに、Rho のドミナントネガティブ変異体を遺伝子導入した際に脂肪分化特異的な転写因子である PPAR γ および C/EBP α の発現抑制が解除されたことから、Rho が分化に対して抑制的に関与していることを明らかにした以前の報告[59]を裏付ける。しかし、以前の報告では、ROCK がインスリン受容体基質-1 (IRS-1) をブロックし、インスリンによる PI3K を介した Akt のリン酸化抑制が脂肪分化を抑制しているとしているが、私は彼らとは異なるシグナル経路で脂肪分化抑制が引き起こされると考えている(作業モデルについては図12を参照)。

これらの結果から、Gαs を介した微小管脱重合から Rho/ROCK 系の活性化、それによる Akt および FoxO1 のリン酸化抑制による脂肪細胞分化抑制が生じると考えられるが、GEF-H1 の活性化による Rho 活性化が生じている報告[52]が私のモデルにも適応できるかは、まだ明確な証拠がない。現時点では、GEF-H1 が微小管と共局在しており分化した脂肪細胞では発現が増強するということだけである。これを明らかにするためにも、甘味受容体アゴニスト添加による GEF-H1 の活性化を測定する必要がある、またその活性化が GEF-H1 の siRNA などを用いた場合に阻害されるというような検討がさらに必要である。また、Rho のドミナントネガティブ変異体を用いた結果から、Rho 活性化が PPAR γ および C/EBP α の発現抑制を引き起こすことが示されたが、ROCK の阻害剤である Y-27632 の検討において、PPAR γ では甘味受容体による抑制作用が阻害されず C/EBP α は阻害されたことから、Rho-ROCK-Akt-FoxO1 の経路は C/EBP α のみであり PPAR γ に関しては Rho-ROCK-Akt までは同様の経路であることを示したが、他にシグナル経路が存在し発現抑制に関与している

可能性を示唆している。これらを明らかにするためにも更なる研究が必要である。

第 4 章

まとめ

第一章に述べたように、これまで舌の味蕾に発現する甘味受容体は、大きな細胞外領域をもつ C タイプの GPCR である T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーであると考えられてきた。これに結合する甘味料は多様であり、人工甘味料であるスクラロースおよびサッカリンもこの甘味受容体に感知されることが知られている。この受容体は近年、味蕾以外にも発現していることが明らかになっている。

第二章に述べたように、本研究ではマウス脂肪細胞である 3T3-L1 細胞に甘味受容体が発現していること、また分化前後において T1R2 の発現量は非常に低値に推移するのに対して、T1R3 の発現量は分化後に著明に増加することを明らかにした。この甘味受容体の機能として、人工甘味料であるスクラロースおよびサッカリンを感知し、脂肪細胞分化の指標である PPAR γ および C/EBP α の発現抑制を濃度依存的にもたらした。また、スクラロースおよびサッカリン刺激により脂肪蓄積が抑制されること、この効果は、分化初期における甘味受容体アゴニストの添加が重要であることを見出した。また、この甘味受容体と共役する G タンパク質の検討の結果、G α s が共役している可能性が示唆され、脂肪分化に対して抑制的に関与していることを明らかにした。そしてこの作用は、cAMP に非依存的であることを明らかにした。さらに T1R3 のみを強発現させた HEK293 細胞においてスクラロース刺激に反応し、cAMP の上昇をきたすことから、T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーではなく T1R3 のみのホモダイマーでも甘味を感知することを明らかにした。従って、3T3-L1 細胞では、T1R3 のホモダイマーが G α s と共役し cAMP 非依存的経路により脂肪分化を抑制していることを示した。

第三章に示したように、この甘味受容体アゴニストによる脂肪分化抑制シグナルは、G α s を介して微小管脱重合を引き起こし、微小管と共局在している GEF \cdot H1 を活性化し、Rho/ROCK 系を活性化した。ただし、GEF \cdot H1 活性化については明確な結果はないが、これまでの報告からおそらく活性化されるであろうと考えられる。そして Akt のリン酸化抑制および FoxO1 のリン酸化抑制を

引き起こすことで FoxO1 が核内に留まり、PPAR γ および C/EBP α の発現が抑制されることを明らかにした。この Rho/ROCK から Akt のリン酸化抑制の間にはおそらく PTEN が関与していることが予想され、このことを明らかにすることは抑制シグナルを明確にするうえでも重要である。この点については、現在詳細検討を行っている。

要約すると、3T3-L1 細胞には甘味受容体が発現しており、甘味受容体アゴニスト刺激は、脂肪分化を抑制することを明らかにした。この 3T3-L1 細胞において甘味を受容する受容体は、これまでに知られている T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーではなく T1R3 ホモダイマーであり、この受容体で甘味を感知すること、この受容体は G α s を介することを示した。G α s 下流のシグナル伝達機構は、

G α s-微小管脱重合-Rho/ROCK 系の活性化-Akt および FoxO1 のリン酸化抑制-PPAR γ および C/EBP α の発現抑制が連鎖的に引き起こる結果、脂肪細胞分化が抑制されることを明らかにした（シグナル伝達機構のモデルについては図 12 を参照）。

脂肪細胞に発現するこの甘味感知受容体は、2 型糖尿病やメタボリックシンドロームのような肥満関連疾病の治療のための標的となる可能性がある。

謝 辞

本研究は、群馬大学生体調節研究所細胞調節分野で行ったものである。本研究を行う場を与えて頂き、また、本研究の遂行に当たり終始ご指導とご助言を頂き、さらには本論文の御校閲を賜りました群馬大学生体調節研究所細胞調節分野教授 小島至先生に心よりお礼を申し上げますとともに、深く感謝いたします。

常に研究を進めるにあたりいつも示唆に富んだご助言を頂き、また本論文を完成させる上でも親切で熱心なご指導を頂きました群馬大学生体調節研究所細胞調節分野准教授 柴田宏先生に心より感謝いたします。

日頃から有益な討論とご助言を頂きました群馬大学生体調節研究所細胞調節分野助教 長澤雅裕先生に厚く御礼申し上げます。

常に本研究において有益な情報や方法を熱心に教えて頂き、また本論文を書き上げるにあたりご協力を頂きました群馬大学生体調節研究所細胞調節分野助教 中川祐子先生に心より感謝いたします。

そして、有意義なご助言を頂きました群馬大学生体調節研究所細胞調節分野小暮公孝さん、ヨハン・メディナさん、李龍飛さん、濱野邦久さんに感謝いたします。さらに日々の研究室の生活をより楽しいものにして下さいました群馬大学生体調節研究所細胞調節分野 小田切真由美さん、沼田俊子さんに感謝いたします。

最後に、群馬大学大学院で学ぶ機会を与えてくださっただけでなく、精神面・健康面また経済面で常に支えて下さいました、両親に感謝いたします。また、どのような状況においても応援してくれ、心の支えになってくれた妻と多くの友人に感謝いたします。

皆様に支えられてこのように博士論文を仕上げる事が出来ましたこと大変嬉しく、また誇りに思います。誠にありがとうございました。

2015年1月

引用文献

1. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, et al. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390.
2. Kojima I, Nakagawa Y (2011) The Role of the Sweet Taste Receptor in Enteroendocrine Cells and Pancreatic beta-Cells. *Diabetes Metab J* 35: 451-457.
3. Roper SD (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch* 454: 759-776.
4. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, et al. (2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301: 850-853.
5. Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, et al. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-266.
6. Delay ER, Hernandez NP, Bromley K, Margolskee RF (2006) Sucrose and monosodium glutamate taste thresholds and discrimination ability of T1R3 knockout mice. *Chem Senses* 31: 351-357.
7. Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381: 796-800.

8. Danilova V, Damak S, Margolskee RF, Hellekant G (2006) Taste responses to sweet stimuli in alpha-gustducin knockout and wild-type mice. *Chem Senses* 31: 573-580.
9. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Perez CA, et al. (2006) *Trpm5* null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* 31: 253-264.
10. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, et al. (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15075-15080.
11. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, et al. (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One* 4: e5106.
12. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, et al. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15069-15074.
13. Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF (2009) Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr* 90: 822S-825S.

14. Shibata H, Suzuki Y, Omata W, Tanaka S, Kojima I (1995) Dissection of GLUT4 recycling pathway into exocytosis and endocytosis in rat adipocytes. Evidence that GTP-binding proteins are involved in both processes. *J Biol Chem* 270: 11489-11495.
15. Maruyama Y, Yasuda R, Kuroda M, Eto Y (2012) Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. *PLoS One* 7: e34489.
16. Djian P, Phillips M, Green H (1985) The activation of specific gene transcription in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Cell Physiol* 124: 554-556.
17. Liu LB, Omata W, Kojima I, Shibata H (2007) The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is a regulator of GLUT4 turnover and targeting to the insulin-responsive storage compartment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 56: 1977-1985.
18. Rodbell M (1964) Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-380.
19. Hattori H, Ishihara M, Fukuda T, Suda T, Katagiri T (2006) Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 1118-1123.

20. Jones DT, Reed RR (1987) Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J Biol Chem* 262: 14241-14249.
21. Miller RT, Masters SB, Sullivan KA, Beiderman B, Bourne HR (1988) A mutation that prevents GTP-dependent activation of the alpha chain of Gs. *Nature* 334: 712-715.
22. Lee E, Taussig R, Gilman AG (1992) The G226A mutant of Gs alpha highlights the requirement for dissociation of G protein subunits. *J Biol Chem* 267: 1212-1218.
23. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279: 37215-37218.
24. Bystrova MF, Romanov RA, Rogachevskaja OA, Churbanov GD, Kolesnikov SS (2010) Functional expression of the extracellular-Ca²⁺-sensing receptor in mouse taste cells. *J Cell Sci* 123: 972-982.
25. Ohsu T, Amino Y, Nagasaki H, Yamanaka T, Takeshita S, et al. (2010) Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception. *J Biol Chem* 285: 1016-1022.
26. San Gabriel A, Uneyama H, Maekawa T, Torii K (2009) The calcium-sensing receptor in taste tissue. *Biochem Biophys Res Commun*

378: 414-418.

27. Shindo Y, Miura H, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, et al. (2008) G α 14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 504-508.
28. Tizzano M, Dvoryanchikov G, Barrows JK, Kim S, Chaudhari N, et al. (2008) Expression of G α 14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci* 9: 110.
29. Kusakabe Y, Yasuoka A, Asano-Miyoshi M, Iwabuchi K, Matsumoto I, et al. (2000) Comprehensive study on G protein α -subunits in taste bud cells, with special reference to the occurrence of G α 2 as a major G α species. *Chem Senses* 25: 525-531.
30. Trubey KR, Culpepper S, Maruyama Y, Kinnamon SC, Chaudhari N (2006) Tastants evoke cAMP signal in taste buds that is independent of calcium signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C237-244.
31. Striem BJ, Pace U, Zehavi U, Naim M, Lancet D (1989) Sweet tastants stimulate adenylate cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue membranes. *Biochem J* 260: 121-126.
32. Naim M, Ronen T, Striem BJ, Levinson M, Zehavi U (1991) Adenylate cyclase responses to sucrose stimulation in membranes of pig circumvallate taste papillae. *Comp Biochem Physiol B* 100: 455-458.

33. Nakashima K, Ninomiya Y (1999) Transduction for sweet taste of saccharin may involve both inositol 1,4,5-trisphosphate and cAMP pathways in the fungiform taste buds in C57BL mice. *Cell Physiol Biochem* 9: 90-98.
34. Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, et al. (2010) Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13666-13671.
35. Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, et al. (2004) A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* 279: 47438-47445.
36. Tanahashi T, Yamaguchi K, Ishikawa S, Kusuhara M, Adachi I, et al. (1991) Endothelin-1 inhibits adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 854-860.
37. Bhattacharya I, Ullrich A (2006) Endothelin-1 inhibits adipogenesis: role of phosphorylation of Akt and ERK1/2. *FEBS Lett* 580: 5765-5771.
38. Imamura T, Ishibashi K, Dalle S, Ugi S, Olefsky JM (1999) Endothelin-1-induced GLUT4 translocation is mediated via Galpha(q/11) protein and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 274: 33691-33695.
39. Bose A, Cherniack AD, Langille SE, Nicoloso SM, Buxton JM, et al. (2001) G(alpha)11 signaling through ARF6 regulates F-actin

- mobilization and GLUT4 glucose transporter translocation to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 21: 5262-5275.
40. Lawrence JT, Birnbaum MJ (2001) ADP-ribosylation factor 6 delineates separate pathways used by endothelin 1 and insulin for stimulating glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 21: 5276-5285.
41. Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21: 90-113.
42. Olansky L, Myers GA, Pohl SL, Hewlett EL (1983) Promotion of lipolysis in rat adipocytes by pertussis toxin: reversal of endogenous inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 6547-6551.
43. Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ (2000) CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* 20: 1008-1020.
44. Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, et al. (2008) Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* 28: 3804-3816.
45. Wang HY, Watkins DC, Malbon CC (1992) Antisense oligodeoxynucleotides to GS protein alpha-subunit sequence accelerate differentiation of fibroblasts to adipocytes. *Nature* 358: 334-337.

46. Liu X, Malbon CC, Wang HY (1998) Identification of amino acid residues of G α critical to repression of adipogenesis. *J Biol Chem* 273: 11685-11694.
47. Wang H, Johnson GL, Liu X, Malbon CC (1996) Repression of adipogenesis by adenylyl cyclase stimulatory G-protein α subunit is expressed within region 146-220. *J Biol Chem* 271: 22022-22029.
48. Zhang L, Paddon C, Lewis MD, Grennan-Jones F, Ludgate M (2009) G α signalling suppresses PPAR γ 2 generation and inhibits 3T3L1 adipogenesis. *J Endocrinol* 202: 207-215.
49. Hewavitharana T, Wedegaertner PB (2012) Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* 24: 25-34.
50. Dave RH, Saengsawang W, Yu JZ, Donati R, Rasenick MM (2009) Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. *Neurosignals* 17: 100-108.
51. Zheng B, Lavoie C, Tang TD, Ma P, Meerloo T, et al. (2004) Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by heterotrimeric G α protein. *Mol Biol Cell* 15: 5538-5550.
52. Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM (2002) Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4: 294-301.

53. Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J (2003) Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 113: 147-158.
54. Sukla Roychowdhury, Dulal Panda, Leslie Wilson, Mark M. Rasenick (1999) G Protein α Subunits Activate Tubulin GTPase and Modulate Microtubule Polymerization Dynamics. *J Biol Chem.* 274(19): 13485-90
55. Sukla Roychowdhury, Liliana Martinez, Lucy Salgado, Siddhartha Das, Mark M. Rasenick (2006) G protein activation is prerequisite for functional coupling between $G\alpha/G\beta\gamma$ and tubulin/microtubules. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(2): 441-8
56. Sukla Roychowdhury, Mark M. Rasenick (2008) Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric G proteins. *FEBS J.* 275(19): 4654-63.
57. Rahul H. Dave, Witchuda Saengsawang, Jiang-Zhou Yu, Robert Donati, Mark M. Rasenick (2009) Heterotrimeric G-Proteins Interact Directly with Cytoskeletal Components to Modify Microtubule-Dependent Cellular Processes. *Neurosignals* 17: 100-108.
58. Jorg Birkenfeld, Perihan Nalbant, Soon-Hee Yoon, Gary M. Bokoch (2008) Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol.* 18(5): 210-9.
59. Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, et al. (2007)

Genetic and Pharmacological Inhibition of Rho-associated Kinase II Enhances Adipogenesis. *J Biol Chem.* 282(40): 29574-83.

60. Toker A, Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 387(6634): 673-6.
61. Kotani K, Yonezawa K, Hara K, Ueda H, Kitamura Y, et al. (1994) Involvement of Phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* 13: 2313-21.
62. Kovacsovics TJ, Bachelot C, Toker A, Vlahos CJ, Duckworth B, et al. (1995) Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem.* 270: 11358-66.
63. Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, et al. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *L Cell Biol.* 111: 1001-7
64. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, et al. (2003) The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 4: 119-29
65. Meili R, Sasaki AT, Firtel RA (2005) Rho Rocks PTEN. *Nat Cell Biol.* 7(4): 334-5.
66. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, et al. (2005) Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol.* 7(4): 399-404.
67. Yang S, Kim HM (2012) The RhoA-ROCK-PTEN pathway as a molecular

switch for anchorage dependent cell behavior. *Biomaterials*. 33: 2902-15

68. Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, et al. (2003)
Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with
FRET-based probes. *J Cell Biol*. 162: 223-32.

図およびその説明

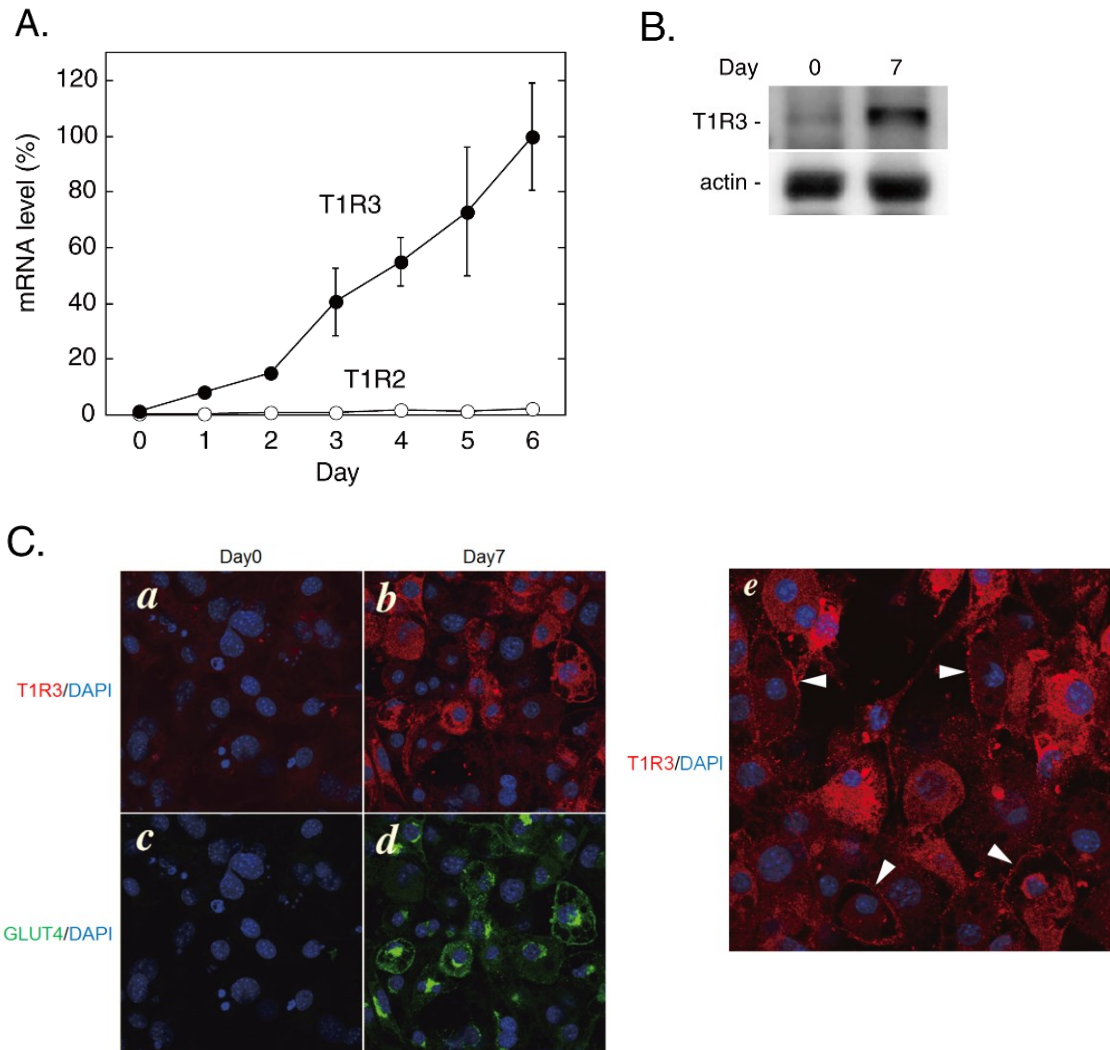


図 1. 3T3-L1 細胞の分化過程における T1R の発現変化

A. 3T3-L1 細胞を様々な時間培養し、RNA を調製した。内在性コントロールとしてマウスリボソームタンパク質の S18 を用いて定量的 RT-PCR を行った。T1R2 と T1R3 の mRNA レベルは、Day6 における T1R3 量に対する割合として示した。結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ ($n=3-6$) で示されている。

B. 未分化 (Day0) と分化した (Day7) 3T3-L1 細胞における T1R3 およびアクチンの発現変化を免疫ブロット法で測定した。

C. 未分化 (Day0, *a* と *c*) および分化した (Day7, *b* と *d*) 3T3-L1 細胞における T1R3 (*a* と *b*, 赤) および GLUT4 (*c* と *d*, 緑) の免疫蛍光染色画像。核は、DAPI (青) で可視化した。e は、Day7 の細胞における T1R3 (赤) の細胞内分布を示す。矢じりは T1R3 の細胞膜周辺への局在化を示している。

2.

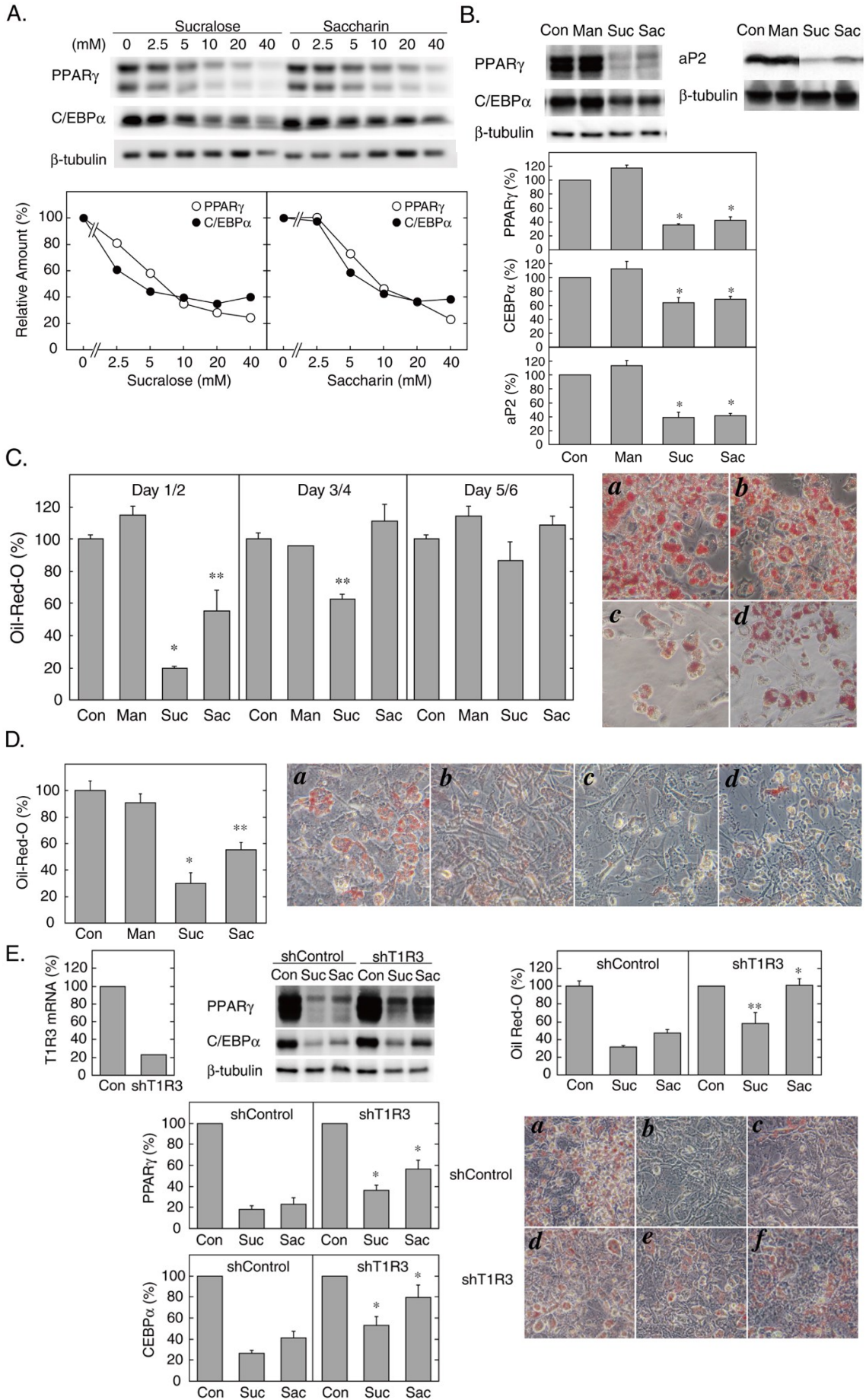


図 2. 脂肪細胞分化に対する甘味料の効果

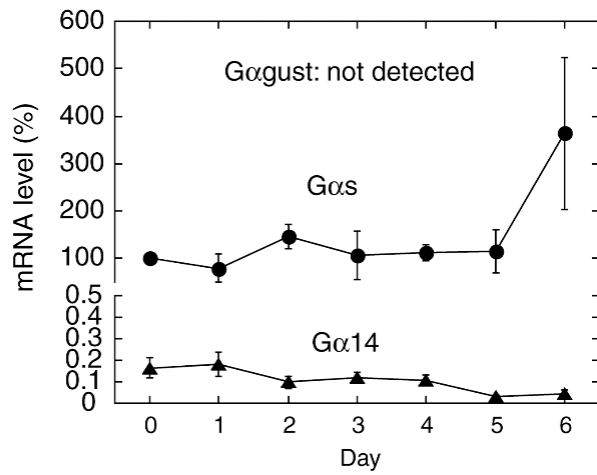
- A. 3T3-L1 細胞を、様々な濃度のスクラロースおよびサッカリン存在下で分化させ、Day2 (48 時間) における PPAR γ および C/EBP α の発現量を免疫ブロット法で検討した。PPAR γ および C/EBP α の典型的な免疫ブロットデータ (パネル上段) および、 β -tubulin で規準化したタンパク質の相対的な量 (パネル下段) を示す。結果は、2 つの独立した実験の平均値として示した。
- B. 3T3-L1 細胞を、分化の始めの 48 時間に、刺激なし (コントロール: Con)、20 mM D-マニトール (Man)、20 mM スクラロース (Suc)、20 mM サッカリン (Sac) の存在下に分化させた。Day2 における PPAR γ および C/EBP α の発現量と Day4 における aP2 の発現量を免疫ブロットにより検討した。典型的な免疫ブロットデータ (パネル上段) および、 β -tubulin で規準化したタンパク質の相対的な量 (パネル下段) を示す。結果は、mean \pm SE (n=3) で示した。*は、P<0.05 (vs. Con) である。
- C. 3T3-L1 細胞を、分化の最初の 48 時間 (Day1 および Day2)、2 番目の 48 時間 (Day3 および Day4)、3 番目の 48 時間 (Day5 および Day6) に、20 mM D-マニトール (Man)、20 mM スクラロース (Suc)、20 mM サッカリン (Sac) 存在下および刺激なし (コントロール: Con) で分化させ、Day6 に Oil Red-O で染色した。色素の量を定量化した (パネル左側)。結果は、mean \pm SE (n=3) として示した。*は P<0.005、**は P<0.05 (vs. Con) である。初期の 48 時間の期間に、刺激なし (コントロール) (a)、20 mM D-マニトール (b)、20 mM スクラロース (c)、もしくは 20 mM サッカリン (d) を添加し分化させた細胞の Oil Red-O 染色した顕微鏡画像を示した (パネル右側)。
- D. 幹細胞由来脂肪組織は、刺激なし (コントロール: Con) (a)、20 mM D-マニトール (Man) (b)、20 mM スクラロース (Suc) (c)、20 mM サッカリン (Sac) (d) 存在下で材料と方法に示した方法にて 6 日間脂肪細胞へ分化させ、Oil Red-O で染色した。Oil Red-O の量 (パネル左側) および顕微鏡画像 (パ

ネル右側)を示した。結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ ($n=3$)で示した。*は $P < 0.001$ 、**は $P < 0.01$ (vs. Con)である。

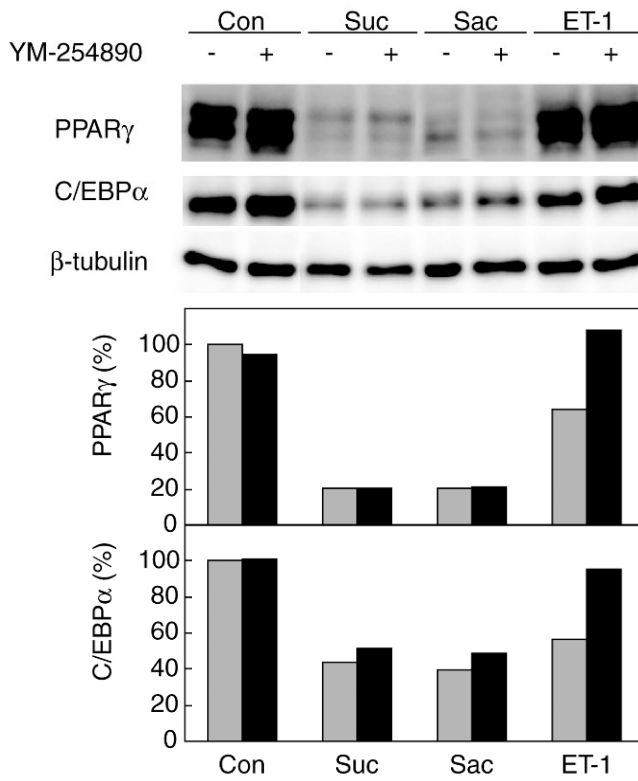
- E. 未分化の 3T3-L1 細胞に電気穿孔法により non-silencing (shControl) もしくは、T1R3-targeting shRNA 配列 (shT1R3) (各 30 μg) を含む pGIPz 発現ベクターで遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を、12-well 培養ディッシュに播き、刺激なし (コントロール: Con)、20 mM スクラロース (Suc)、20 mM サッカリン (Sac) を添加して分化誘導する前にコンフルエントまで培養した。T1R3 の発現量は、分化導入前 (Day0) に即座に定量的 RT-PCR で測定した (パネル左側)。Day2 (48 時間) における PPAR γ および C/EBP α の発現量を、免疫ブロットにより測定した。代表的な免疫ブロットデータおよび、 β -tubulin で規準化したタンパク質の相対的な量を示した (パネル中央)。結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ ($n=3$) として示した。*は $P < 0.05$ (vs. Con) である。Oil Red-O の量および Day6 の染色した細胞の顕微鏡画像を示した (パネル右側)。non-silencing (shControl) (a-c) もしくは T1R3-targeting shRNA (shT1R3) (d-f) を遺伝子導入した細胞を初期の 48 時間に 20 mM スクラロース (Suc) (b および e)、20 mM サッカリン (Sac) (c および f) の条件下もしくは、刺激なし (a および d) で分化させた。結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ ($n=3$) で示した。*は $P < 0.01$ 、**は $P < 0.05$ (vs. shControl) である。

☒ 3.

A.



B.



C.

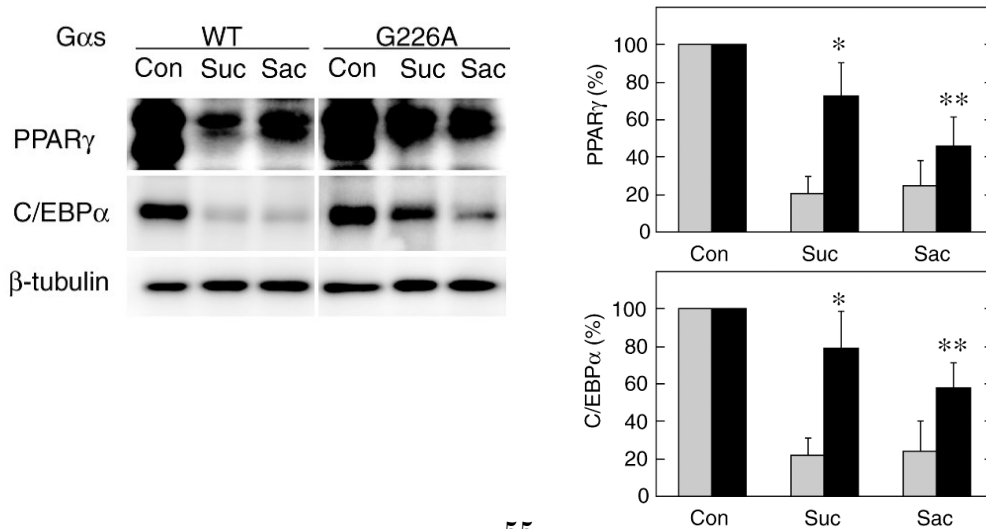


図 3. 3T3L1 細胞分化への甘味料の効果における G タンパク質の役割

A. 3T3-L1 細胞の分化過程における Gα_{ust}、Gα₁₄ および Gα_s の発現変化。

図 1 で示した 3T3-L1 細胞から調製した total RNA を用い Gα_{ust}、Gα₁₄、Gα_s の mRNA を定量的 RT-PCR により測定した。マウスリボソームタンパク質 S18 を内在性コントロールとして用いた。結果は、mean ± SE (n=3) として示した。

B. 3T3-L1 細胞を YM-254890 (10 μM) の条件下もしくは非存在下 (0.1%

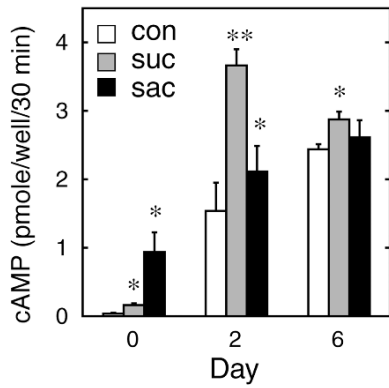
DMSO) に、20 mM スクラロース (Suc)、20 mM サッカリン (Sac)、20 nM エンドセリン-1 (ET-1) の添加もしくは、刺激なし (コントロール: Con) で分化させた。Day2 (48 時間) における PPAR_γ および C/EBPα の発現量を免疫ブロットにより測定した。代表的な免疫ブロットデータ (パネル下段) および、β-tubulin で規準化したタンパク質の相対的量 (パネル下段) を示す。灰色および黒色の棒は、それぞれコントロールおよび YM-254890 を添加したデータである。結果は、2 つの独立した実験からの平均値として示した。

C. 未分化の 3T3-L1 細胞を剥離させ、電気穿孔法により Gα_s-野生型 (WT) も

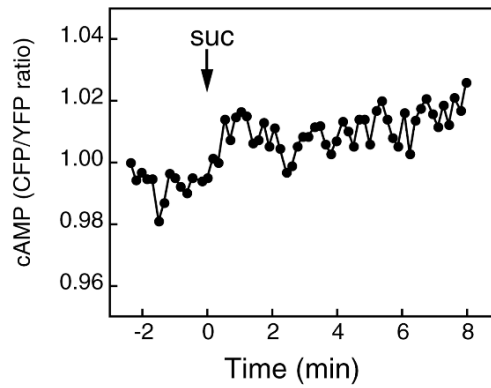
しくは Gα_s ドミナントネガティブ変異体 G226A (G226A) の cDNA (各 20 μg) を含む発現ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞は、6-well 培養ディッシュに播きコンフルエントになるまで培養した。20 mM スクラロース (Suc) もしくは 20 mM サッカリン (Sac) もしくは、刺激なし (コントロール: Con) の条件下で分化誘導を行った。PPAR_γ および C/EBPα の発現量は、Day2 (48 時間) における免疫ブロットにより測定した。代表的な免疫ブロットデータ (パネル上段) および、β-tubulin で規準化したタンパク質の相対的量 (パネル下段) を示す。灰色および黒色の棒は、それぞれ Gα_s-WT (灰色) および Gα_s-G226A (黒色) のデータを示した。結果は、mean ± SE (n=3) として示した。*は P<0.01、**は P<0.05 (vs. WT) である。

☒ 4.

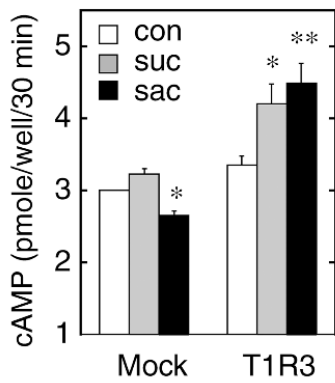
A. cAMP content in 3T3-L1



B. [cAMP]_C in 3T3-L1



C. cAMP content in HEK293



D. [cAMP]_C in HEK293 cells

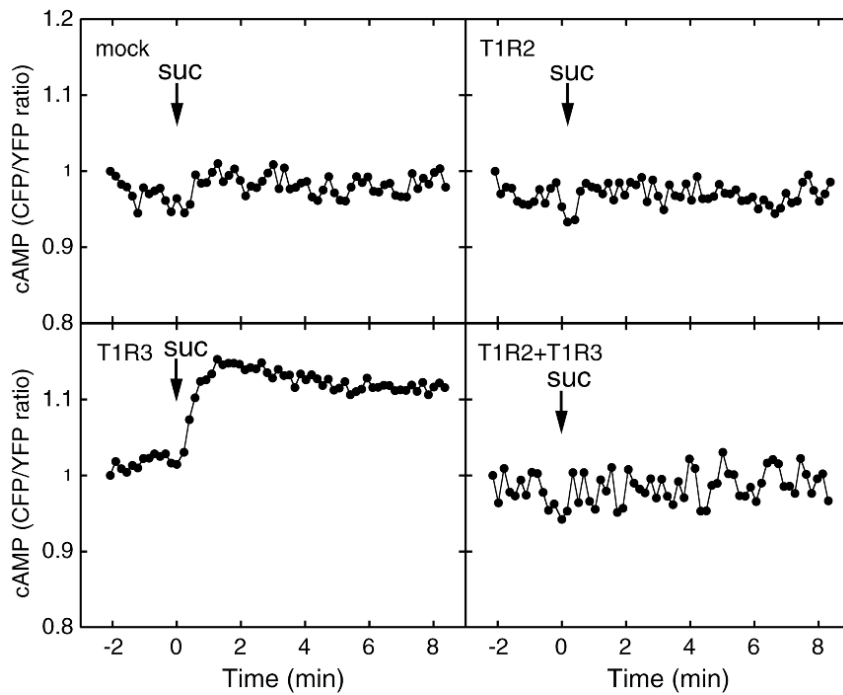


図 4. 甘味物質による cAMP の変化

- A. Day0 (未分化)、分化させた Day2 および Day6 の 3T3-L1 細胞を、37°C で 30 分間、20 mM スクラロース (Suc) もしくは 20 mM サッカリン (Sac) もしくは、刺激なし (コントロール: Con) とインキュベートし、cAMP 量を測定した。結果は、mean±SE (n=3) で示した。*は P<0.05、**は P<0.01 (vs. Con) である。
- B. 分化した 3T3-L1 細胞 (Day6) に電気穿孔法により Epac1-camps を遺伝子導入した。24 時間培養後、細胞を 20 mM スクラロース (Suc) で刺激し [cAMP]_c の変化を測定した。結果は、[cAMP]_c を CFP/YFP として示した。
- C. HEK293 細胞に電気穿孔法で pcDNA3.1 ベクター (20 µg) のみ (mock) もしくはマウス T1R3 cDNA (20 µg) (T1R3) を含んだベクターを遺伝子導入し、12-well 培養プレートに播いた。24 時間培養後、細胞を 20 mM スクラロース (Suc)、20 mM サッカリン (Sac) もしくは、刺激なし (コントロール: Con) で、37°C で 30 分間インキュベートし、cAMP 量を測定した。結果は、mean±SE (n=4-6) で示した。*は P<0.05、**は P<0.01 (vs. Con) である。
- D. pcDNA3.1 ベクター (mock)、T1R2 (20 µg) (T1R2)、T1R3 (20 µg) (T1R3) もしくは T1R2 および T1R3 の両方 (各 10 µg) (T1R2 + T1R3) を電気穿孔法で遺伝子導入した HEK293 細胞を 35mm ガラス底培養プレートに播き、矢印で示す時点で 20 mM スクラロース (Suc) で刺激した。

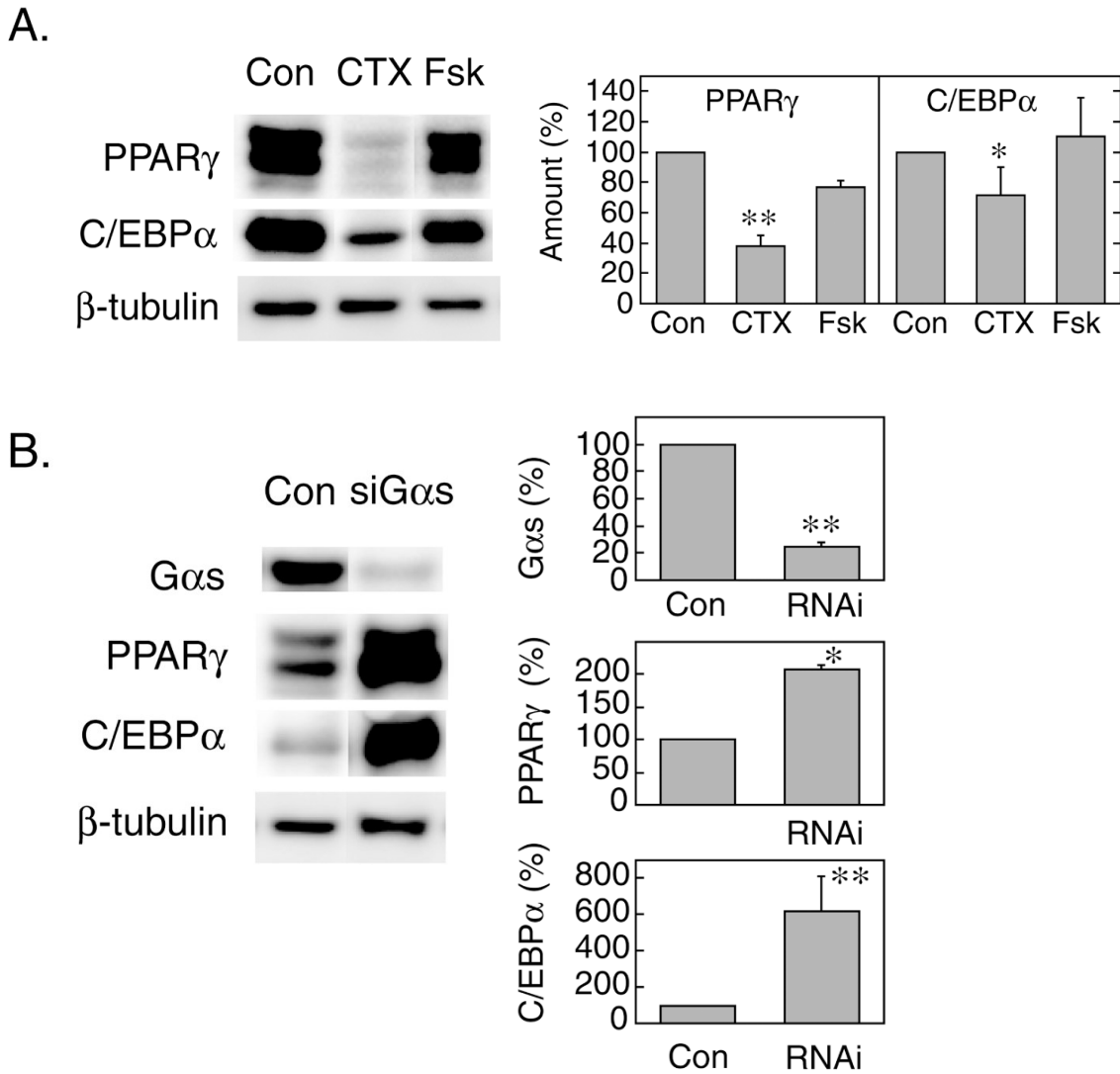


図 5. 脂肪細胞分化における G α s の役割

- A. 3T3-L1 細胞を 0.1 μ g/ml コレラ毒素 (CTX) あるいは 20 μ M フォルスコリン (Fsk) の条件下もしくは刺激なし (コントロール: Con) で 48 時間分化させた。PPAR γ および C/EBP α の発現量を免疫ブロットで測定した。代表的な免疫ブロットデータ (パネル左側) および β -tubulin で規準化したタンパク質の相対的な量(パネル右側)を示した。データは、mean \pm SE (n=3) として示した。*は P<0.05、**は P<0.01 (vs. Con) である。
- B. 未分化の 3T3-L1 細胞に、non-silencing (Con) もしくは G α s-targeting siRNA (20 nmole) (siG α s) を遺伝子導入した。細胞は 12-well 培養ディッシュに播き、コンフルエントまで培養した。その後 48 時間分化させた後に

PPAR γ および C/EBP α の発現量を免疫ブロット法により測定した。代表的な免疫ブロットデータ (パネル左側) および、 β -tubulin で規準化したタンパク質の相対的な量 (パネル右側) を示した。データは、mean \pm SE (n=3) として示した。*は P<0.05、**は P<0.01 (vs. Con) である。

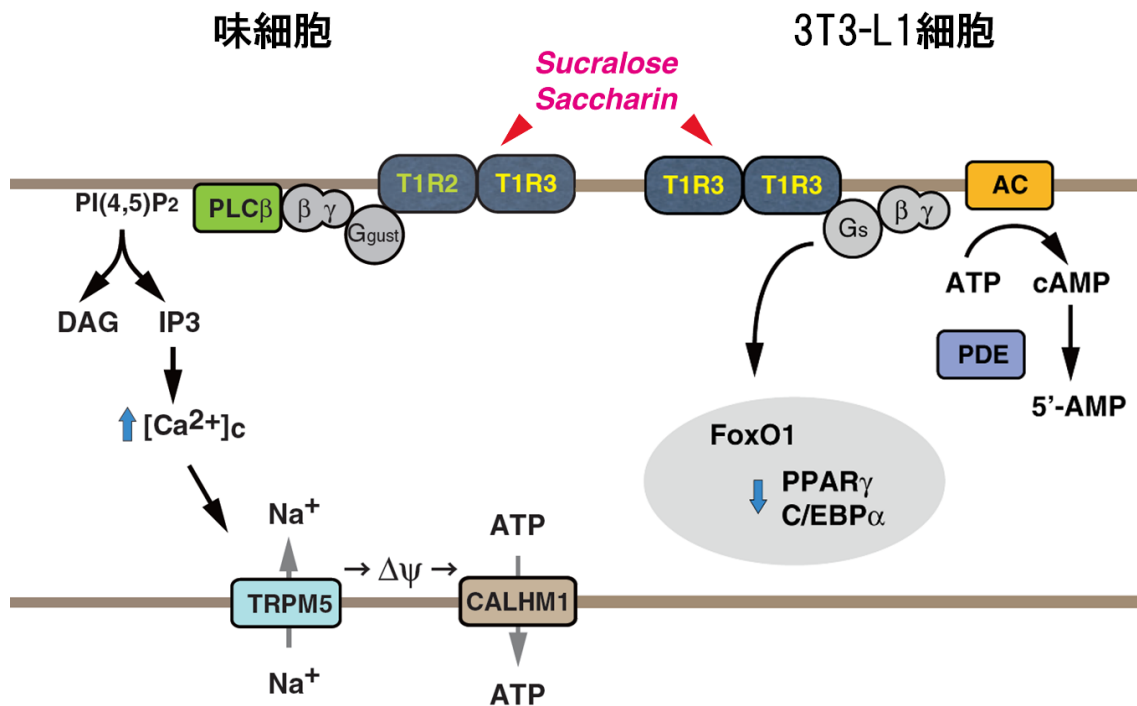
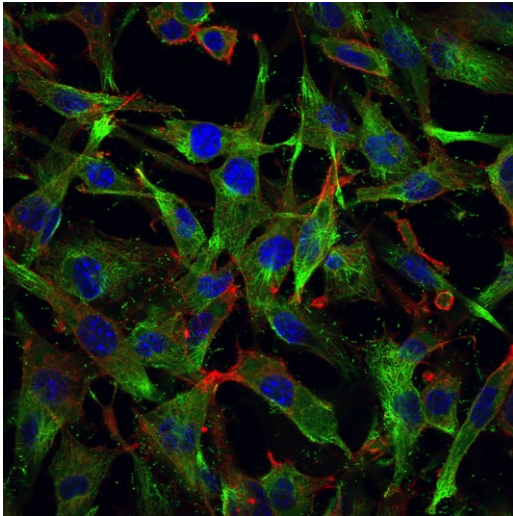


図 6. 味細胞および 3T3-L1 細胞における甘味感知受容体の下流シグナル伝達機構モデル

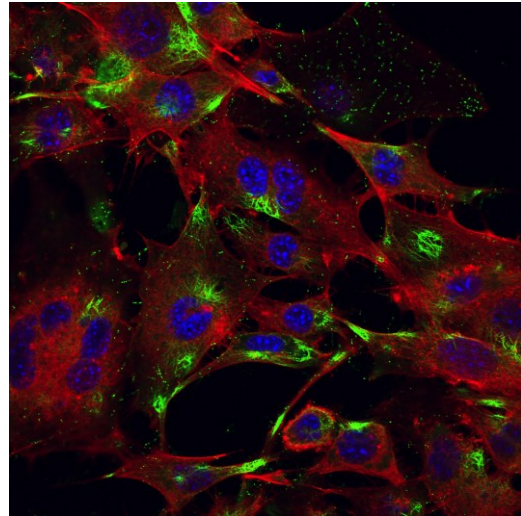
味細胞（左側）においては、T1R2 と T1R3 のヘテロ二量体甘味受容体がガストデューシン (*Gagust*) もしくは他の G タンパク質を介して PLCβ2 を活性化し、 $[Ca^{2+}]_c$ の上昇および細胞膜脱分極を引き起こす。この脱分極により CALHM1 が活性化され ATP が放出される。3T3-L1 細胞（右側）においては、T1R3 のホモダイマー受容体が *Gαs* を活性化し、cAMP 非依存的に脂肪細胞分化抑制シグナルを伝える。PLCβ: phospholipase C-β2、DAG: diacylglycerol、IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate、TRPM5: transient receptor potential cation channel subfamily M member 5、CALHM1: calcium homeostasis modulator 1、AC: adenylate cyclase、PDE: cAMP phosphodiesterase

图 7.

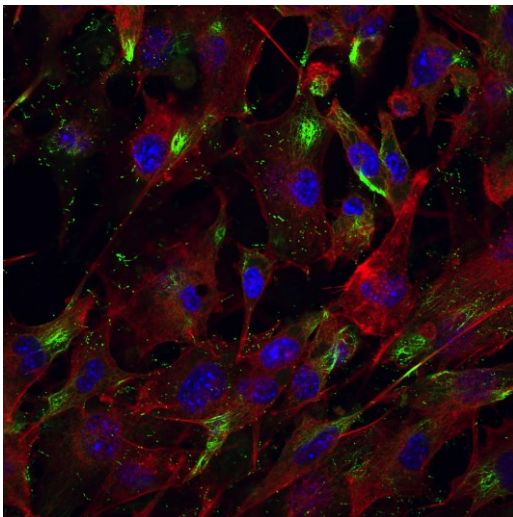
Control



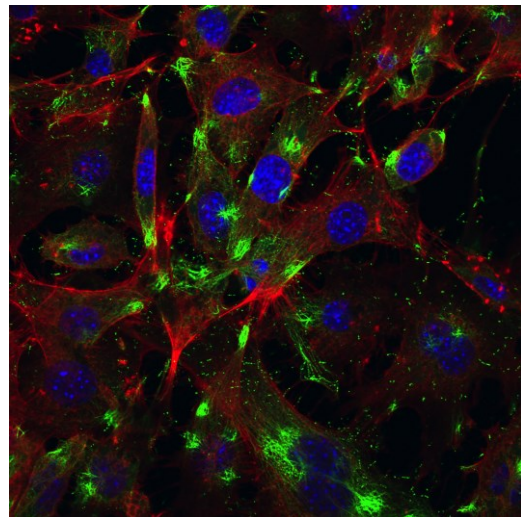
20 mM Sucralose



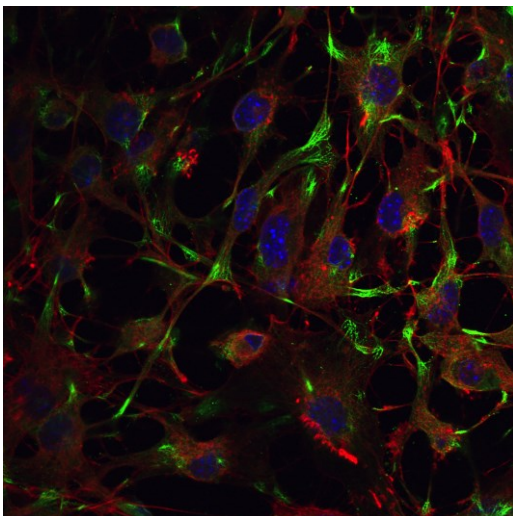
20 mM Saccharin



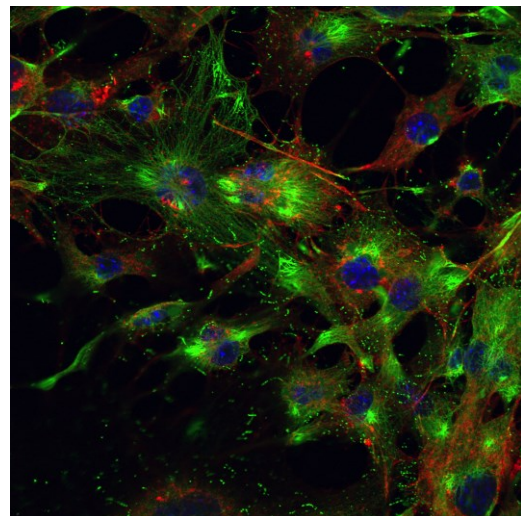
5 μ M Isoproterenol



0.1 μ g/ml Cholera toxin



40 μ M Forskolin



tubulin/phalloidin/DAPI

図 7. 甘味受容体アゴニストによる微小管脱重合作用

未分化の 3T3-L1 細胞における tubulin (緑)、および phalloidin (赤) の免疫蛍光染色画像。核は、DAPI (青) で可視化した。固定方法は、3% (w/v) パラホルムアルデヒドで行った。刺激なし (Control)、20 mM スクラロース (Sucralose)、20 mM サッカリン (Saccharin)、5 μ M イソプロテレノール (Isoproterenol)、0.1 μ g/ml コレラ毒素 (Cholera toxin)、40 μ M フォルスコリン (Forskolin) で 2 時間刺激した。

図 8.

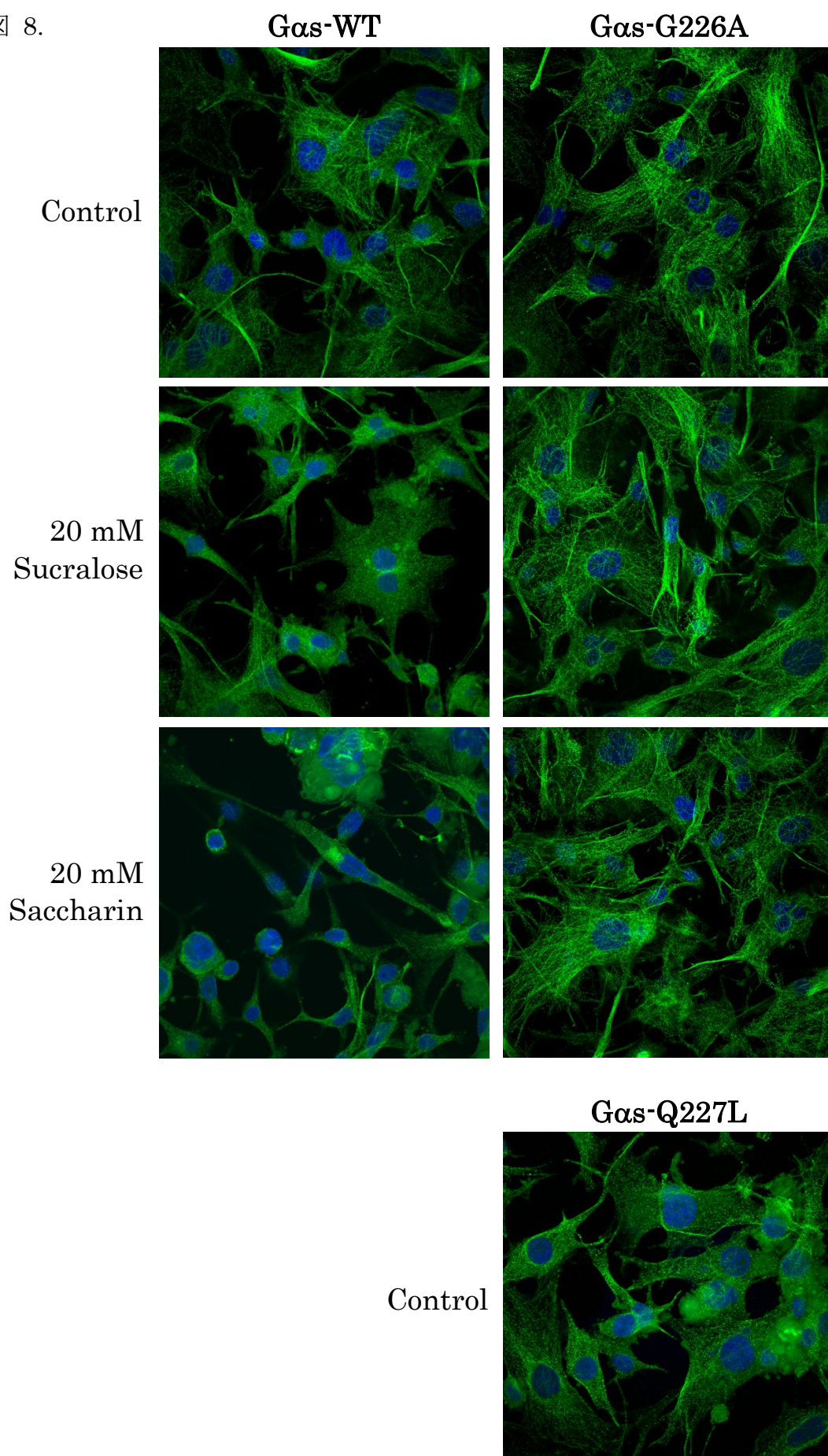
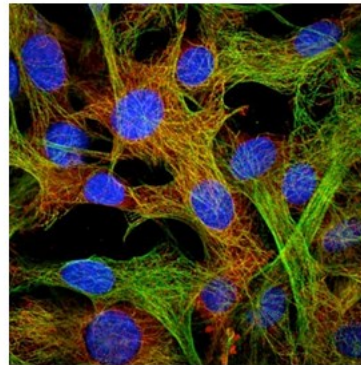
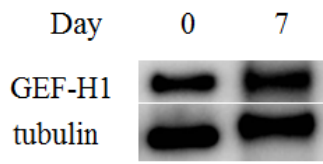


図 8. Gas を介する微小管脱重合作用

未分化の 3T3-L1 細胞に Gas-WT (20 μg)、Gas-G226A (20 μg) および Gas-Q227L (20 μg) を電気穿孔法で遺伝子導入した。その後、24 時間後に 20 mM スクラロース (Sucralose)、20 mM サッカリン (Saccharin) および D-MEM 培地のみでの刺激なし (Control) と 3 時間インキュベートし、tubulin (緑) の免疫蛍光染色を行った。Gas-Q227L (20 μg) は遺伝子導入後 24 時間で tubulin (緑) の免疫蛍光染色を行った。核は、DAPI (青) で可視化した。

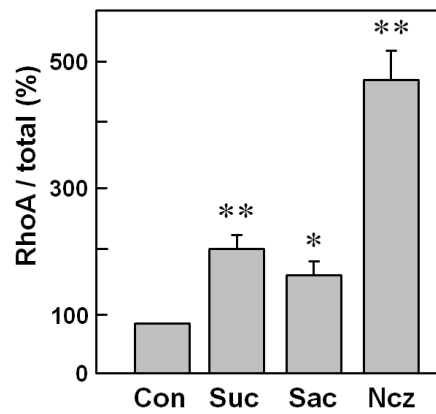
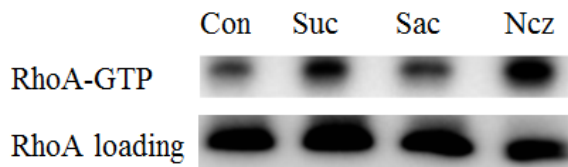
图 9.

A. GEF-H1

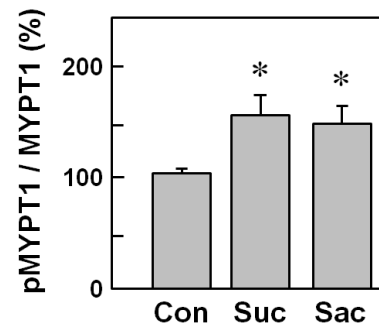
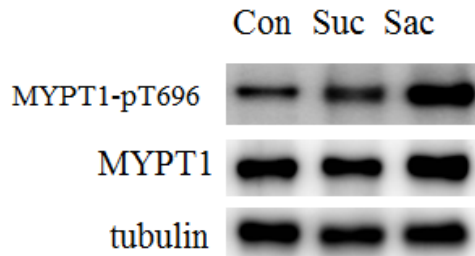


tubulin/GEF-H1/DAPI

B. RhoA (pull-down assay)



C. ROCK Activity



D. Raichu-RhoA (Ratio Image YFP/CFP)

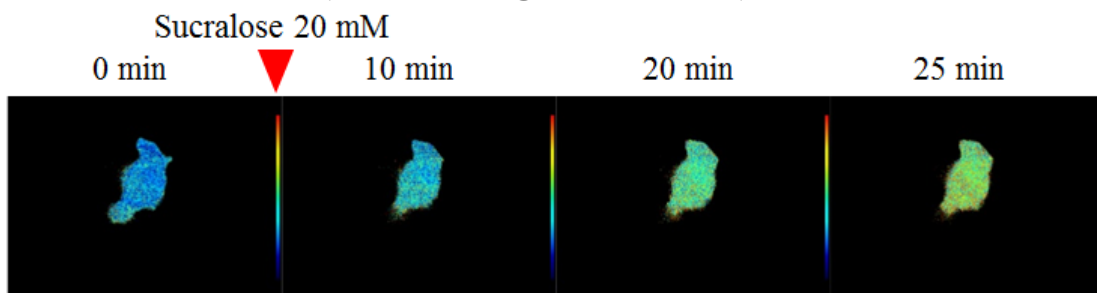
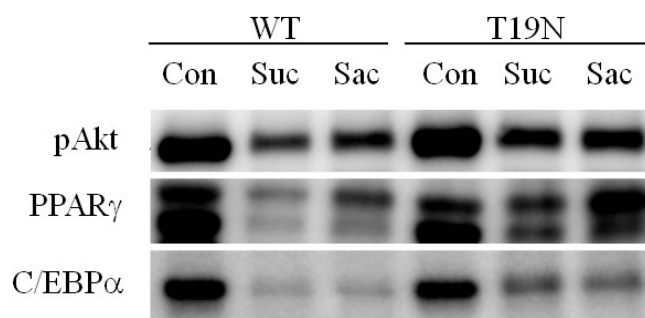


図 9. 微小管脱重合による Rho/ROCK 系の活性化

- A. 3T3-L1 細胞の分化前後 (Day0, Day7) における GEF-H1 および tubulin の発現変化を免疫ブロット法により測定した。右は、未分化の細胞における tubulin (緑) および GEF-H1 (赤) の免疫蛍光染色画像。核は、DAPI (青) で可視化した。
- B. プルダウンアッセイによる Rho の活性化の測定。刺激なし (コントロール: Con) または、20 mM スクラロース (Suc)、20 mM サッカリン (Sac) および 5 μ M ノコダゾール (Ncz) で刺激した細胞を回収し、免疫ブロットにより測定した。RhoA loading で規準化した相対的な量を示した (パネル右側)。結果は、コントロールを 100%として示した (n=2)。
- C. 刺激なし (コントロール: Con)、20 mM スクラロース (Suc) もしくは 20 mM サッカリン (Sac) を添加して分化誘導した。Day2 (48 時間) における MYPT1 およびリン酸化 MYPT1、内在性コントロールとして tubulin の発現量を免疫ブロットにより測定した。リン酸化 MYPT1/MYPT1 の比を取り示した (パネル右側)。結果は、コントロールを 100%として示した (n=2)。
- D. 未分化の 3T3-L1 細胞に、電気穿孔法により Rho のプローブである Raichu-RhoA-1237X を遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞に 20 mM スクラロース (Sucralose) を添加し、その後の経時的変化を観察した。矢印で示したポイントでスクラロースを添加した。

A. Dominant-Negative RhoA



B. ROCK Inhibitor

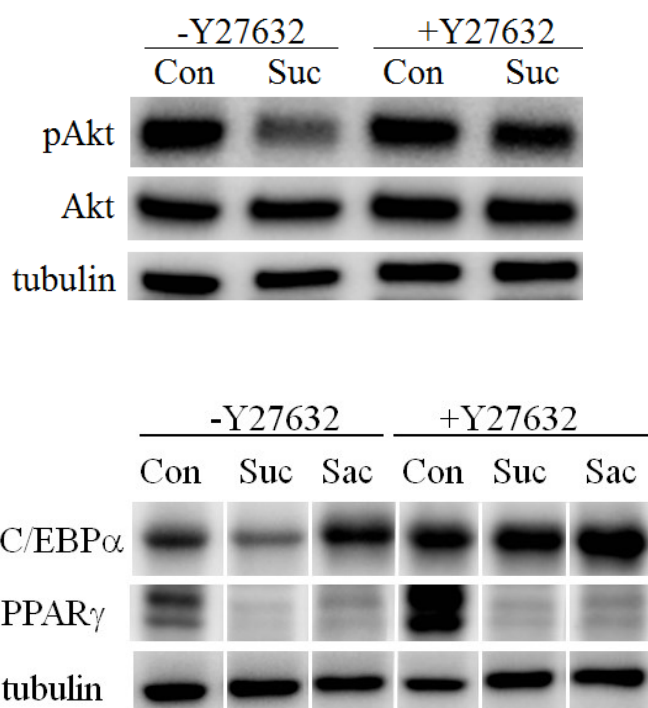
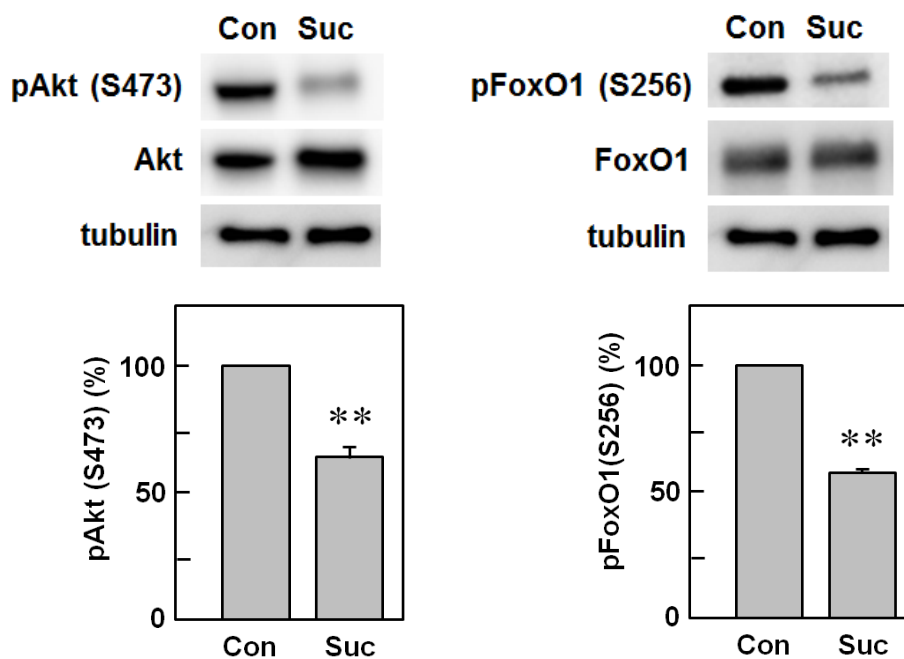


図 10. 甘味刺激による脂肪細胞分化抑制は Rho/ROCK を介する

A. 未分化の細胞に、Rho-WT (WT) (20 μ g) およびドミナントネガティブ変異体である Rho-T19N (T19N) (20 μ g) を遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞がコンフルエントになった後、刺激なし (コントロール: Con)、20 mM スクラロース (Suc) および 20 mM サッカリン (Sac) を含む分化刺激入り D-MEM (Low Glucose) で分化させた。Day2 (48 時間後) におけるリン酸化 Akt、PPAR γ および C/EBP α を免疫ブロットにより測定した。

B. 3T3-L1 細胞を Y-27632 (20 μ M) 存在下もしくは非存在下で、刺激なし (コントロール: Con)、20 mM スクラロース (Suc) および 20 mM サッカリン (Sac) を含む分化刺激入り D-MEM (Low Glucose) で分化させた。分化 6 時間後における Akt、リン酸化 Akt および tubulin (パネル上段) および、Day2 (48 時間後) における、PPAR γ 、C/EBP α および tubulin (パネル下段) を免疫ブロットにより測定した。

A. Akt および FoxO1 のリン酸化



B. PTEN の量的変化

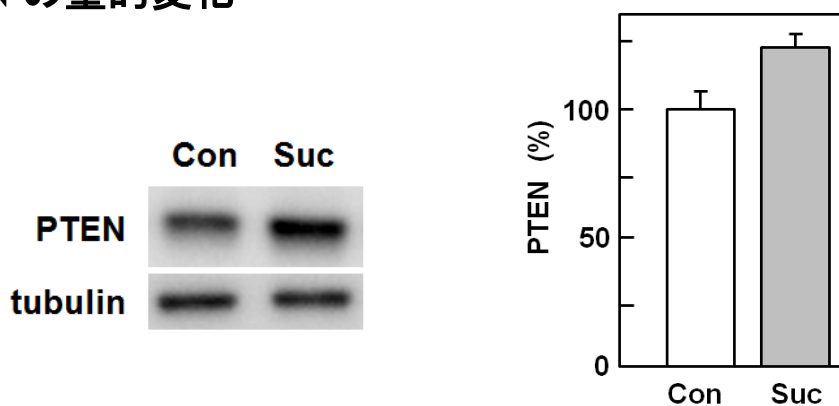


図 11. 受容体アゴニストによる PTEN 量の変化と Akt のリン酸化

A. 3T3-L1 細胞を分化刺激なし (Con) もしくは 20 mM スクラロース (Suc) で刺激し 48 時間後における Akt、FoxO1 および tubulin の発現量を免疫ブロットで測定した。内在性コントロールとして tubulin で規準化した。代表的な免疫ブロットデータ (パネル左側)、リン酸化 Akt / Akt およびリン酸化 FoxO1 / FoxO1 (パネル右側) の比として示す。結果は、mean ± SE (n=3) で

示した。**は $P < 0.01$ (vs. Con) である。

- B. 3T3-L1 細胞を分化刺激なし (Con) もしくは 20 mM スクラロース (Suc) で刺激し 3 時間後における PTEN 発現量を免疫ブロットで測定した。内在性コントロールとして tubulin で規準化した。代表的な免疫ブロットデータ (パネル左側)、PTEN の量的変化 (パネル右側) を示す。結果は、mean \pm SE (n=3) で示した。*は $P < 0.05$ (vs. Con) である。

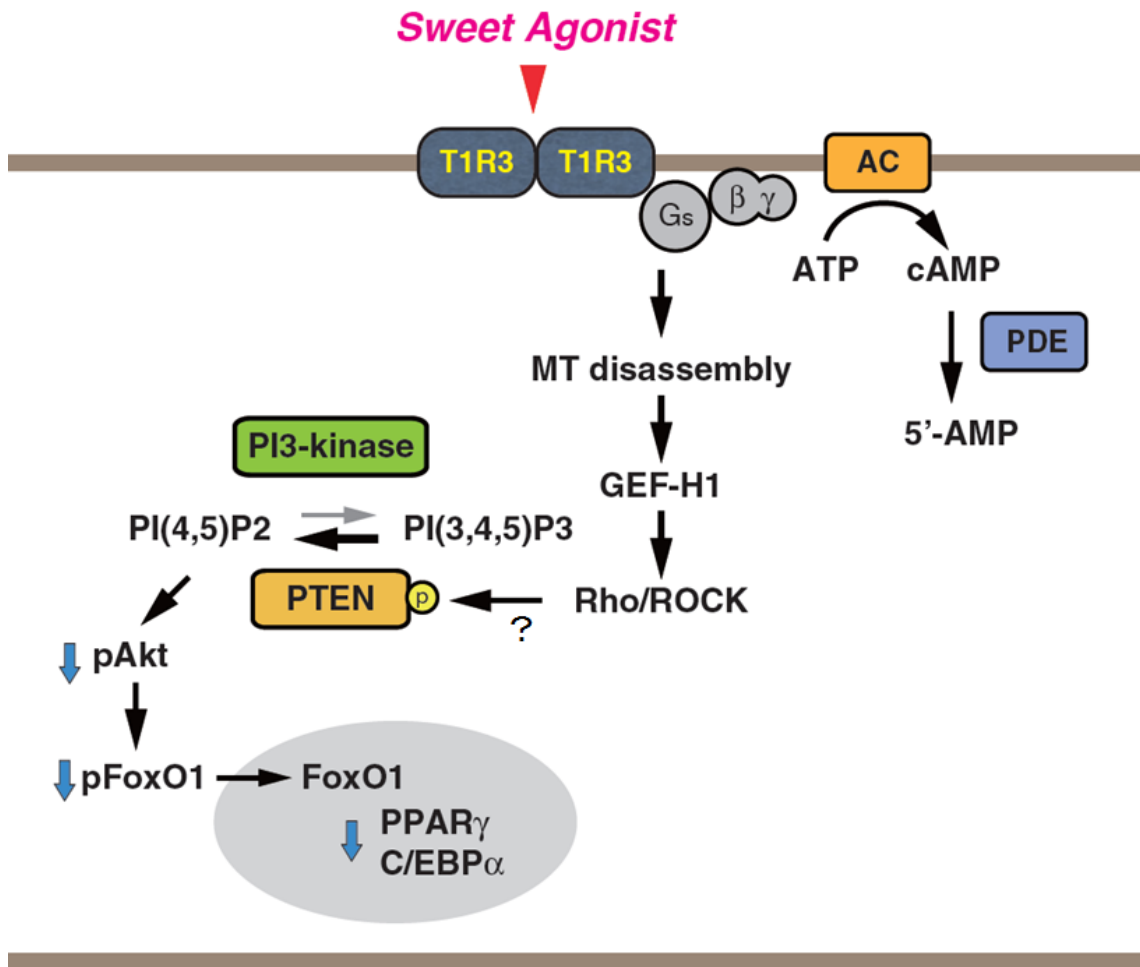


図 12. 3T3-L1 細胞における甘味アゴニストによる脂肪分化抑制メカニズム
 3T3-L1 細胞では、T1R3 のホモダイマーが $G_{\alpha s}$ を活性化し、cAMP 非依存的に分化抑制シグナルを伝える。 $G_{\alpha s}$ の下流シグナル分子として、 $G_{\alpha s}$ の活性化による微小管の脱重合が引き起こされ、微小管と共局在している GEF-H1 が活性化し Rho/ROCK 経路が活性化される。この Rho/ROCK 経路の活性化を介し、Akt のリン酸化抑制および FoxO1 のリン酸化抑制が引き起こされ、PPAR γ および C/EBP α の発現抑制を引き起こす。

発表論文

A Novel Regulatory Function of Sweet Taste-Sensing Receptor in Adipogenic
Differentiation of 3T3-L1 Cells.

(3T3-L1 細胞の脂肪分化における甘味感知受容体の新規制御機能)

PLoS One. 2013;8:e54500.

Yosuke Masubuchi, Yuko Nakagawa, Jinhui Ma, Tsutomu Sasaki,
Tadahiro Kitamura, Yoritsuna Yamamoto, Hitoshi Kurose,
Itaru Kojima, Hiroshi Shibata