

# 運動機能と認知・記憶機能の向上を目指したうま味受容体を 基軸とする脳－腸－骨格筋連環の解明

井上 愛沙子\* 古株 彰一郎\*

## ELUCIDATION OF THE BRAIN-INTESTINE-SKELETAL MUSCLE LINKAGE CENTERED ON THE UMAMI TASTE RECEPTOR FOR THE IMPROVEMENT OF MOTOR FUNCTION AND COGNITIVE/MEMORY FUNCTION

Asako Inoue and Shoichiro Kokabu

Key words: taste receptor, brain, intestine, skeletal muscle.

### 緒 言

我が国は世界一の長寿国であるが、「平均寿命」と「健康寿命」の間には約10年の乖離がある。これは生活の質が低下したり、介護が必要な状態で人生の最後を過ごしたりしなければならないことを意味する。サルコペニア（筋の衰弱）や骨粗しょう症（骨の衰弱）などでみられる運動機能の低下と認知症に代表される認知・記憶機能の低下、更に糖尿病などの生活習慣病の基礎となる肥満症は健康寿命、すなわち、心身ともに自立し健康的に生活できる期間を短縮させる大きな要因である。そのため超高齢社会の我が国では、健康寿命を延伸するため運動と認知・記憶機能の向上、ならびに肥満の解消を目指した取り組みが必要である。更に、この取り組みを広く普及させるために、運動と認知・記憶機能の向上を担う手法は高価な薬剤などではなく、食生活や日常の活動など、生活習慣に根ざしたものが望ましい。

Tas1R ファミリー (Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3) (図

1) は G タンパク質共役型受容体で味覚受容体として Tas1r2/Tas1r3 の複合体で甘味、Tas1r1/Tas1r3 の複合体でアミノ酸や核酸などのうま味を感知する。

食物中のうま味物質は口腔粘膜の味蕾に存在するうま味受容体で受容され、“おいしい”という味感覚として認知し、積極的に摂取され、消化されたアミノ酸は小腸粘膜で吸収され骨格筋に筋線維タンパク質として貯蔵される。そして飢餓時などでは、筋線維を分解しアミノ酸を血中に放出する。サルコペニアでは、このアミノ酸ネットワークが破綻し、骨格筋タンパクが分解しアミノ酸を放出する量を取り込み量を上回ることで骨格筋量の減少と機能低下をもたらす(図2)。

舌に存在するうま味受容体は、うま味という豊かな味わいを脳に伝え幸福感をもたらし、運動器(骨・骨格筋)の構成材料となるうま味物質(アミノ酸・核酸)の摂取を促進することで、メンタルヘルスと運動機能の向上に必須である。近年、このうま味受容体が舌以外のさまざまな組織に存

在し、その機能を制御するなど、うま味感覚の受け取り手だけにとどまらない役割に注目が集まっている (図3)。

例えば、小腸のうま味受容体を介したグルタミン酸刺激は、小腸上皮細胞の正常なターンオーバーに不可欠であり<sup>9)</sup>、うまみ刺激がなければ小腸からのアミノ酸吸収が低下することが示唆され

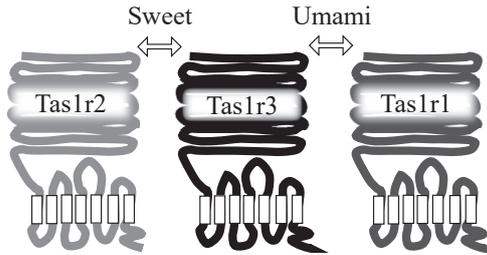


図1. Tas1rR ファミリー

Fig.1. Taste 1 receptors.

Taste 1 receptors (Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3) is a G protein-coupled receptor that senses sweet taste through the Tas1r2/Tas1r3 complex and umami taste through the Tas1r1/Tas1r3 complex.

る。骨格筋のうま味受容体はアミノ酸を受容してオートファジー系によるタンパク分解を抑制する<sup>8)</sup>。骨においてもその存在が知られ、うま味受容体の全身性ノックアウトマウス (KO)<sup>7)</sup> や機能喪失マウス<sup>3)</sup> に高エネルギー食を摂取させ肥満を起こさせると、野生型に比べ骨量が維持される。しかし、これらのマウスにおいて骨吸収の低下による骨量維持の可能性が示唆されているものの<sup>3)</sup>、破骨細胞におけるうま味受容体の機能は全く検討されていない。更に、グルタミン酸は中枢神経では主要な興奮性神経伝達物質であるが、うま味受容体を介したグルタミン酸の機能は全くわかっていない。すなわち全身に存在するうま味受容体の機能や意義についてまだまだ不明な点が多い。

そこで本研究では運動器や中枢神経系に発現するうま味受容体の機能を解析し、うま味受容体の制御による運動機能と認知・記憶機能の向上を目

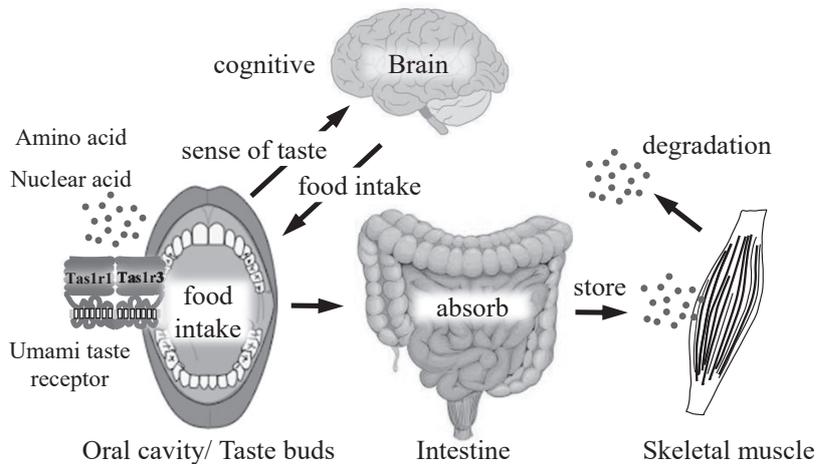


図2. 摂取後のうま味物質(アミノ酸・核酸)の動態

Fig.2. The kinetics of Umami substance (amino acid / nucleic acid) after ingestion.

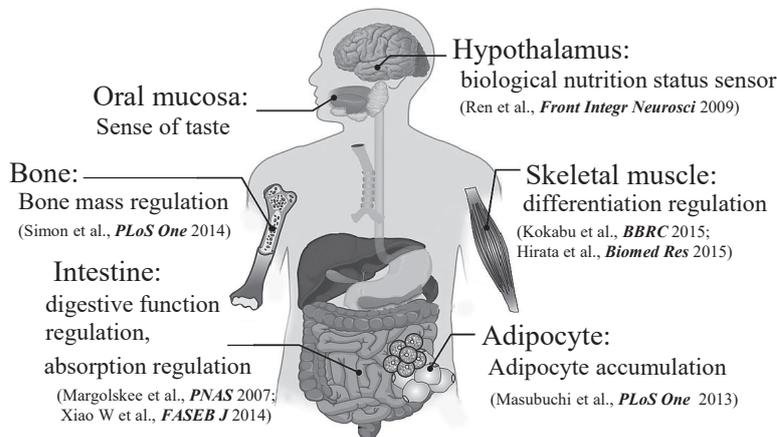


図3. うま味受容体はさまざまな組織に存在する

Fig.3. Taste receptors expresses by various tissues.

指した健康増進法確立のための分子基盤形成を目的とした。

## 方 法

### A. 遺伝子改変マウスの作製

Tas1r1 null マウスは株式会社セツロテックに委託し、エレクトロポレーション法を用いて受精卵へ Cas 9 protein とガイドシークエンスを導入し、マウス Tas1r1 の第 6 エクソンを欠失させることで作製した。Tas1r3 null マウス<sup>2)</sup> および Tas1r3 eGFP マウス<sup>1)</sup> は岡山大学の吉田竜介教授より提供していただいた。

### B. RNA の抽出とリアルタイム PCR

FastGene<sup>TM</sup>RNA Basic Kit (日本ジェネティク, 東京, 日本) を用いて mRNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本) を使用して cDNA に逆転写した。リアルタイム定量的 (q) PCR は、Quantstudio 3 システム (Thermo Fisher Scientific) で評価した。遺伝子発現レベルは、 $\Delta\Delta CT$  法で計算し、mRNA 標的遺伝子をハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin で標準化した。

### C. 骨格筋の再生

10週齢の雄マウスの前脛骨筋に10  $\mu$ M カルディオトキシンを50  $\mu$ l を注射し骨格筋再生を誘導した。

### D. サテライト細胞の採取

6 週齢雄マウスの前脛骨筋を採取し、コラゲナーゼ処理後 MACS システムを用いてサテライト細胞を単離した。プラスチックディッシュに播種後 5 % ウマ血清含有分化培地で培養し、筋分化を誘導した。

### E. 破骨細胞分化および TRAP 染色

RAW 264.7 細胞およびマウス骨髄細胞は 10 % FBS、100 ng/ml sRANKL を添加した  $\alpha$ MEM で 4 日間培養し、2 日ごとに培地交換を行った。分化した細胞は 10 % ホルムアルデヒドで 10 分間、エタノール-アセトン (1 : 1) 混合液で 1 分間固定した後、蒸留水で洗浄した。固定した細胞を 50 mM 酢酸緩衝液に Fast Red violet LB salt、Naphthol-MX phosphate、N,N-dimethylformamide を加えた TRAP 溶液を用いて染色した。

### F. 細胞の免疫染色

細胞を 4 % PFA で固定後、0.3 % Triton X100 と 5 % ヤギ血清含有 PBS で室温 30 分間透過処理およびブロッキングした後、一次抗体を 1 時間作用させた。抗 Myhc マウスモノクローナル抗体 (MF20, R & D Systems, Minneapolis, MN) もしくは抗 Ki-67 ウサギポリクローナル抗体 (ab15580, Abcam) を用いた。二次抗体として Alexa 488-conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い、ABZ-9000 (Keyence, 東京, 日本) を用いて観察した。

### G. 細胞の免疫染色

標本は安楽死後に採取して、液体窒素を用いてイソペンタンで急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織切片の画像は BZ-II Analyzer (KEYENCE, 大阪, 日本) を用いて記録した。筋線維の外周を ImageJ software (National Institute for Health) で記録し、筋線維の断面積 (CSA) を求めた。CSA を求める際の組織選択基準としては、著明な彎曲や歪みがないものとした。また斜めに切られた切片も除外した。

### H. 運動機能試験

Tas1r1 および Tas1r3 null マウスに対して、ホイール試験およびローターロッド試験を実施した。ホイール試験ではホイールを設置した特殊ケージを用い、マウスが自発的にホイール上にいる時間と走行距離、走行スピードを計測した。ローターロッド試験では回転させていないロッドにマウスを 5 分間乗せたときの落下回数を測定した。

### I. 認知機能試験

Tas1r1 および Tas1r3 null マウスに対して、Y 字型迷路試験および Morris 水迷路試験を実施した。マウスを Y 字型迷路のいずれかのアームの先端に置き、5 ~ 8 分間にわたって迷路内を自由に探索させ進入したアームを順に記録した。Morris 水迷路試験では、マウスから見えないように水面下 10 ~ 15 mm に退避用プラットホームを設置した大型の円形プールを用意し、プラットホームへの到達時間ならびに遊泳距離を計測した。

### J. 統計解析

2 群間の比較には Wilcoxon 検定を用いた。3

群以上の比較には一元配置分散分析の後、Tukey-Kramerの事後検定を行った。 $P < 0.05$ は統計的に有意であるとみなした。

## 結 果

### A. Tas1r1と Tas1r3は脳および運動器に発現する

野生型マウス各組織に発現する Tas1r1と Tas1r3の mRNA レベルを比較した。Tas1r1は特に骨格筋組織でその発現量が高く、Tas1r3は特に発現量が高かった。脳では Tas1r1、Tas1r3ともに発現した。また骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞ともに Tas1r3の発現があったものの、Tas1r1の発現はほとんどなかった。これらの発現は Tas1r3GFP マウスから採取した組織に対して GFP の抗体を用いた免疫染色においても確認することができた。発現のポジティブコントロールとして舌の味蕾細胞を染色した。以上より、うま味受容体は味蕾だけでなく脳や骨、骨格筋にも発現することが確認できた。

### B. Tas1r1と Tas1r3の発現は骨格筋分化とともに発現量が増加する

野生型のマウス骨格筋より採取した初代培養サテライト細胞を筋分化条件で培養したところ、筋分化マーカーすなわち Myogenin や Myosin heavy chain 1 などとともに、Tas1r1、Tas1r3の mRNA 量が上昇した。これまで我々はマウスサテライト細胞の細胞株 C2C12を用いて Tas1r1と Tas1r3の発現制御メカニズムを報告してきたが<sup>4,5)</sup>、今回の初代培養サテライト細胞を用いた結果と一致することとなった。

### C. Tas1r1と Tas1r3の欠失で骨格筋の再生能力が低下する

Tas1r1および Tas1r3 null マウス null 由来サテライト細胞を用いて実験を行った。いずれの細胞も野生型に比べて細胞増殖能や分化能が低下した。カルディオトキシンの注入で誘導した前脛骨筋の再生を観察したところ、Tas1r1 null マウスではほぼ変化はなかったが、Tas1r3 null マウスでは再生筋の面積が有意に小さかった。

### D. Tas1r3シグナルの過剰で筋再生が亢進するわけではない

C2C12細胞にマウス Tas1r3の cDNA を遺伝子導入し、Tas1r3を過剰発現した細胞を作製し観察した。しかしながら、Tas1r3が過剰にあった状態でも、細胞の増殖や分化能などに変化はなかった。

### E. Tas1r3の欠失では破骨細胞および骨芽細胞分化能も低下する

破骨細胞には Tas1r3の発現はあったが、Tas1r1も Tas1r2の発現もほとんどなかった。骨芽細胞には Tas1r1、Tas1r2、Tas1r3がいずれも発現していた。破骨細胞および骨芽細胞の分化とともに Tas1r3の mRNA 量は増加した。また、Tas1r3 null 細胞から採取した破骨細胞前駆細胞ならびに骨芽細胞前駆細胞を分化誘導したところ、野生型コントロールに比べてそれぞれの分化能が有意に低下していた。

### F. Tas1r3シグナルの過剰で破骨細胞分化は亢進するが骨芽細胞分化は亢進しない

破骨細胞前駆細胞株 RAW 264.7細胞と前骨芽細胞株 MC3T3-E1細胞にマウス Tas1r3の cDNA を遺伝子導入し、Tas1r3を過剰発現した細胞をそれぞれ作製し観察した。すると RAW264.7細胞の破骨細胞分化は著明に亢進したが、MC3T3-E1細胞の分化能にはほとんど影響を与えなかった。

### G. Tas1r1と Tas1r3は直接的に運動・認知機能に影響を与えなかった

Tas1r1および Tas1r3 null マウスはいずれも野生型と比較して、ホイール試験、ローターロッド試験、Y字型迷路試験、および Morris 水迷路試験において有意な差を得ることはできなかった。

## 考 察

うま味感受性が低下しているヒトは、他の味覚(甘味, 塩味, 酸味, 苦味)障害と比べ著しい体重の減少や全身状態の悪化を認めると報告された<sup>6)</sup>。この報告では、「うま味がわからず食事が美味しいと感じないため、摂取量が低下したからであろう」と解釈されていた。しかし、もしゲノムレベルでうま味受容体の発現量や感受性の低下が生じていれば、単に味としての感覚低下だけでなく、アミノ酸ネットワークを構成する小腸粘膜や骨格筋、その他臓器のうま味受容体も同様に機

能低下が起きているはずである。すなわち体重の減少や全身状態の悪化は消化吸收の低下による栄養状態の不良、骨格筋代謝異常による骨格筋量の減少が体重減少として表出しているとの説明が可能であり、褐色脂肪細胞によるエネルギー代謝の変化も関与しているかもしれない。更に、うま味感受性が低下しているヒトでは、うま味受容体の発現量が高い脳・骨組織などにおいても、うま味受容体および発現する臓器そのものの機能低下が起きている可能性も十分に考えられる。

サルコペニア、骨粗しょう症、認知症は健康寿命を短縮させる代表的な疾患である。将来的に得られた研究成果から、食事（食品成分）によりうま味受容体の活性を制御する手法を確立することで、これら疾患の予防への実利用が大いに期待できる。例えば、ゲノム情報やうま味感受性と種々の疾患や身体的特徴との相関が明らかになれば、簡便かつ低コストのうま味感受性検査から種々の疾患のリスクを予見することが可能となり、そのリスクに応じてうま味受容体を活性化させる食事や食事成分を提供することなどである。

これまで日本社会は、「生命科学」により生み出された医療技術を駆使し、生の消滅をでき得る限り回避することに邁進してきた。その結果、個人として自立して社会生活を営むことのできる「健康寿命」と、生が尽きる「生命寿命」のギャップが10年も生じている。また、現代の生命科学とテクノロジーが創出した超高額医薬品により、我が国の医療制度の崩壊と経済格差による生命の選別が現実のものとなりつつある。すなわち食に基づくことで安価に健康寿命の延伸を提唱する本提案研究は、これら諸問題を解決し、超高齢社会の我が国の「社会」を持続可能なものへと大きく転換させる破壊的ポテンシャルをもつシーズであると考えている。

## 総 括

本研究により特に運動器に発現するうま味受容体の機能の一端を明らかにすることができた。本研究を進展させ、将来的に食事成分中のうま味刺

激物質で効率的にうま味受容体を活性化させ、運動機能とメンタルヘルスを向上させる方法が確立できれば、本研究課題は広く国民一般の「健康増進」・「健康な長寿」の実現に貢献できる。

## 謝 辞

本研究を助成対象として採択しサポートいただきました公益財団法人明治安田厚生事業団に御礼申し上げます。また、共同研究者として本研究に参画し、貴重なご意見やご協力を賜りました九州歯科大学講師 William N. Addison 氏、日本大学講師人見涼露氏、岡山大学教授吉田竜介氏、更に貴重な御助言をいただいた九州歯科大学分子情報生化学分野研究室メンバーに感謝を申し上げます。

本報告書におきましては、論文投稿前であるため具体的なデータの掲載を控させていただきました。

## 参 考 文 献

- 1) Clapp TR, et al. (2006): Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol*, **4**, 7.
- 2) Damak S, et al. (2003): Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, **301**, 850-853.
- 3) Eaton MS, et al. (2018): Loss of the nutrient sensor TAS1R3 leads to reduced bone resorption. *J Physiol Biochem*, **74**, 3-8.
- 4) Hirata Y, et al. (2019): Krüppel-like factor 5 (Klf5) regulates expression of mouse T1R1 amino acid receptor gene (*Tas1r1*) in C2C12 myoblast cells. *Biomed Res*, **40**, 67-78.
- 5) Kokabu S, et al. (2015): Muscle regulatory factors regulate T1R3 taste receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **468**, 568-573.
- 6) Sasano T, et al. (2014): Important role of umami taste sensitivity in oral and overall health. *Curr Paharm Des*, **20**, 2750-2754.
- 7) Simon BR, et al. (2014): Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass. *PLoS One*, **9**, e86454.
- 8) Wauson EM, et al. (2012): The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy. *Mol Cell*, **47**, 851-862.
- 9) Xiao W, et al. (2014): Glutamate prevents intestinal atrophy via luminal nutrient sensing in a mouse model of total parenteral nutrition. *FASEB J*, **28**, 2073-2087.