

<平成19年度>

食品中に含まれる香気成分とその受容体の消化管における機能発現に関する分子および器官生理学的研究

加治 いずみ・唐木 晋一郎・桑原 厚和
(静岡県立大学大学院環境科学研究所環境生理学研究室)

1. はじめに

消化管の最も内側を覆っている粘膜上皮は、常に外部環境と接しており、摂取した栄養素を効率よく吸収すると共に、食物と一緒に入ってくる生体にとって有害な異物や細菌が体内に侵入しないように働いている。そのため消化管壁には、常に外部環境をモニターし、蠕動運動や上皮膜における吸収・分泌、生体防御機構を制御するセンサー/制御機構として、腸管神経、腸内分泌細胞および腸管免疫系の3種類の機構が存在する。中でも、粘膜上皮に存在する腸内分泌細胞(Enteroendocrine cell; EC cell)は消化管管腔に直接接し、食物として摂取した栄養素、食品中に含まれる各種化学成分などを感受する感覚細胞と考えられてきたが、その実態については殆ど明らかにされていなかった。最近、消化管の粘膜上皮細胞に香辛料や香気成分を感受する受容体を発現している腸内分泌細胞が発見され、粘膜での味覚・嗅覚細胞として機能しているのではと考えられるようになってきている^{1, 6)}。しかしながら、これらの受容体がどのタイプの腸内分泌細胞に発現しており、どのように消化管の運動や分泌機能に影響するかといったことは殆ど分かっていない。申請者らはこれまでに、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸が下部消化管で受容され、腸管運動やイオン分泌といった生理機能に影響することを報告している^{7, 8, 12, 13)}。また、短鎖脂肪酸受容体が粘膜の腸内分泌細胞および肥満細胞に発現して

いることを確認した^{4, 5)}。本研究では、申請者らの研究成果を踏まえ、1) 味覚・嗅覚受容体の消化管上皮で発現を分子生物学的および組織化学的手法を用いて明らかにすると共に、2) これら受容体のリガンドが粘膜上皮でのイオン輸送に及ぼす影響についても生理学的に解析した。

2. 方 法

2.1 RT-PCR 法

放血屠殺したラットから結腸を摘出し腸間膜付着部位より長軸方向に切開し、実体顕微鏡下で筋および粘膜下組織を剥離し粘膜のみを採取した。このような方法で採取した粘膜組織より、total RNAを抽出した。poly-TプライマーとAMV由来逆転写酵素を用いてmRNAを逆転写させてcDNAを合成し、これをPCR法に供した。thymol受容体、ヒトOR1G1に相同なラットの遺伝子配列をNCBIおよびKEGGデータベースにて検索したところ、ratOR1G1(Olr430: gene ID 296691)および、ratOlr1480(NM_214831)(query coverage 89%)が候補として挙げられた。また、eugenol受容体、ヒトOR73(OR5D18: NM_001001952.1)に相同なラット遺伝子を検索したところ、ラットではratOR73(XM_001075255.1)(query coverage 94%), ratOlr604(NM_001000656)および、ratOlr1161(XM_001075229)が候補として挙げられた。さらに、バニロイド受容体(transient receptor potential channel: TRP)ファミリーのメンバーである

TRPV3が, thymol や eugenol の受容体として機能することが報告されている^{10,11)}。そこで, 以上6つの受容体候補の遺伝子配列に特異的な配列のプライマーを設計し, PCRを行った。プライマー設計には, Primer3 plus および, NCBI Primer-BLAST を用いた。陽性コントロールとして, イントロンを含む領域の rat β -actin を増幅させ, ゲノムの混入がないことを確認した。

2.2 短絡電流法

ウィスター系雄性ラット (体重 200 - 230g) より遠位結腸を摘出し, 腸間膜付着部位より長軸方向に切開してシート状にした。これを氷冷 Krebs-Ringer 液灌流下で筋層を剥離して粘膜-粘膜下組織標本を作成し, Ussing flux chamber に装着した。粘膜側, 血管側共に 37°C の Krebs-Ringer 液 (117mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgCl₂, 1.2mM NaH₂PO₄, 2.5mM CaCl₂ および 11mM glucose) を 10mL ずつ循環させ, 95%酸素 - 5%二酸化炭素混合ガスを曝気し pH を 7.4 に維持した。電位差および短絡電流 short-circuit current (I_{sc}) 測定には銀-塩化銀電極を用い, グルコース非添加の Krebs-Ringer 液を 4%の寒天

で固めた塩橋を介してボルテージクランプアンプに接続した。また, 1分毎に3秒間, 10 mV のコマンドパルスを組織に与え, 短絡電流の変化量から膜コンダクタンス (G_t) を算出した。Ussing chamber に標本を装着してから 1 - 1.5 時間後, basal I_{sc} および G_t の値が安定したところで粘膜下神経に電気刺激 (25V, duration of 0.5 ms, 5Hz, 120s) を行い, 組織の状態を確認した。実験は, 電気刺激による I_{sc} や G_t の上昇が再び基線に戻った後に開始した。

I_{sc} および G_t に対する香気成分の作用を検討するために, 濃度を変えて thymol (チモール) または eugenol (オイゲノール) を粘膜側または血管側に一回投与し, I_{sc} および G_t の変化を測定した。なお, 本実験では香気成分をジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて溶解したが, ヒトおよびラット結腸では循環クレブス液量の 1%以下の DMSO は I_{sc} および G_t に影響しないことを確認している。

3. 結果および考察

3.1 消化管内味覚受容体の発現

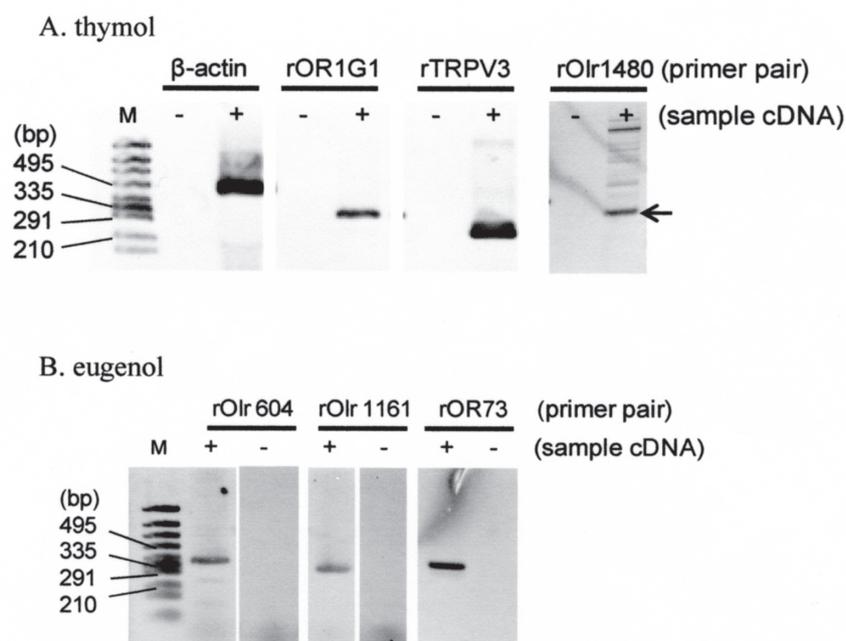


図1 ラット遠位結腸粘膜における thymol (A) および eugenol (B) 受容体候補分子の発現 (RT-PCR 法)

RT-PCR 法により、ラット遠位結腸の粘膜において、thymol および eugenol をリガンドとする受容体 ratOR1G1, ratOlr1480, ratOR73, ratOlr604, ratOlr1161 および TRPV3 の mRNA レベルでの発現が確認できた (Fig.1)。この結果から、下部消化管の粘膜には味覚受容器が存在し、さまざまな化学物質に対して生理的に反射を引き起こす機構が備わっている可能性が示唆された。

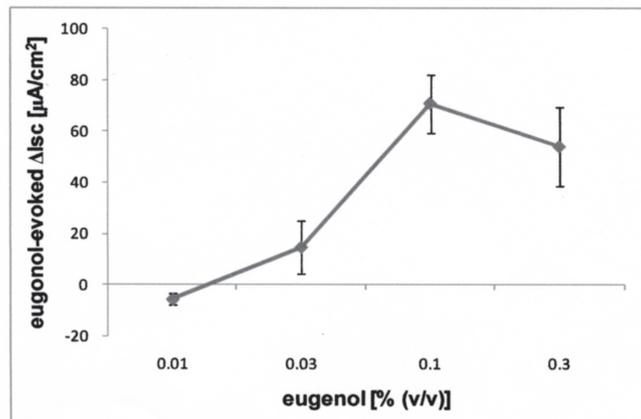
3.2 味覚受容体リガンドの消化管イオン輸送に及ぼす影響

(1) eugenol Ussing flux chamber を用いた実験において、ラット遠位結腸の粘膜側に eugenol を投与すると、eugenol は濃度依存的に

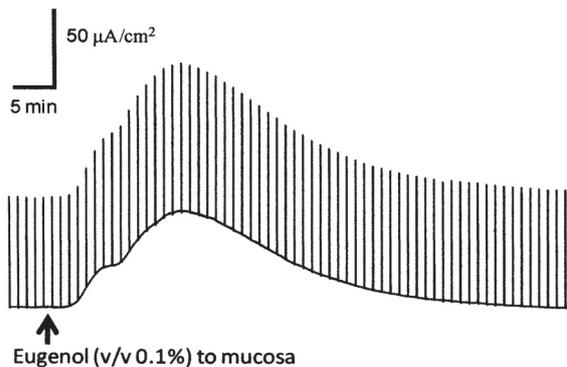
短絡電流 (I_{sc}) および膜コンダクタンス (G_t) を増加させた (Fig.2A および B)。また、ヒト結腸組織においても、同濃度の eugenol によってラット組織と類似したイオン輸送の反射が観察された (Fig.2C)。

(2) thymol ラット遠位結腸では、Thymol の粘膜側または漿膜側投与により濃度依存的に I_{sc} および G_t の増加が観察された (Fig.3A および B)。Thymol (1 mM) 投与後、 I_{sc} が増加し始めるまでには 1 - 2 分間を要し、投与約 5 分後に最大反応が観察された (Fig.3C)。 G_t は、 I_{sc} よりも遅く上昇し始め、7 - 10 分後に最大値が観察された (Fig.3D)。これにより、起電的イオン輸送

A. eugenol の粘膜側投与による I_{sc} の増加



B. ラット



C. ヒト

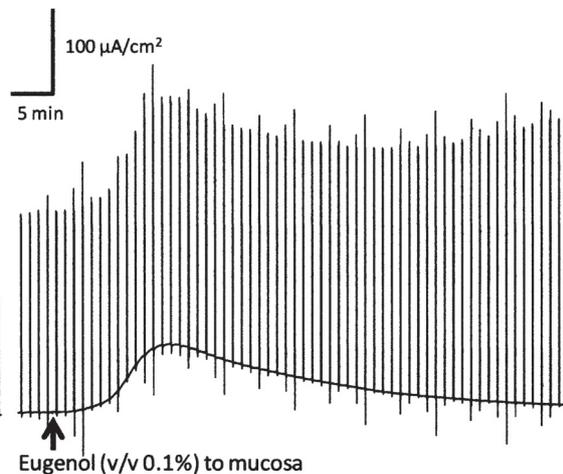


図2 Ussing flux chamber 法により測定した、粘膜側への eugenol 投与による短絡電流 (I_{sc}) の変化。 I_{sc} 増加は thymol の濃度に依存的であった (A)。ラット遠位結腸 (B) およびヒト上行結腸 (C) の粘膜-粘膜下組織標本を用いた時間経過を示した。

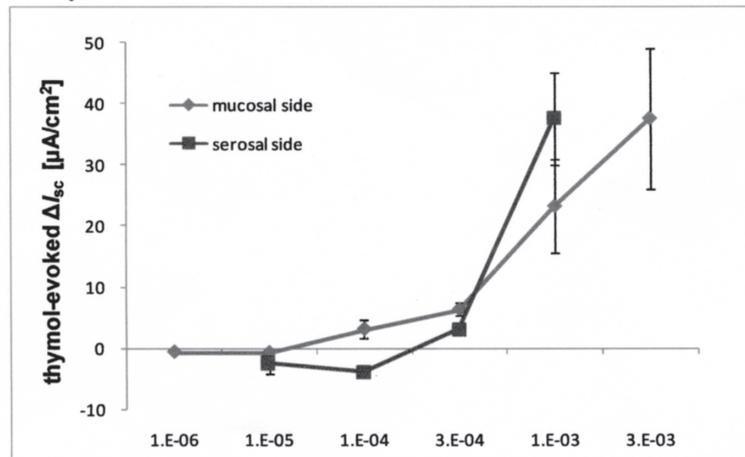
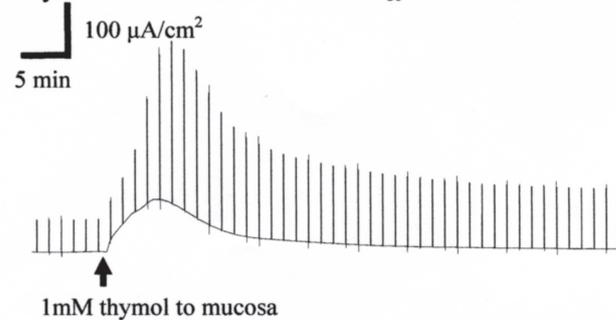
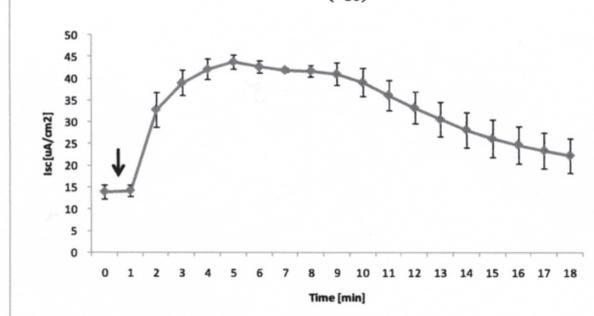
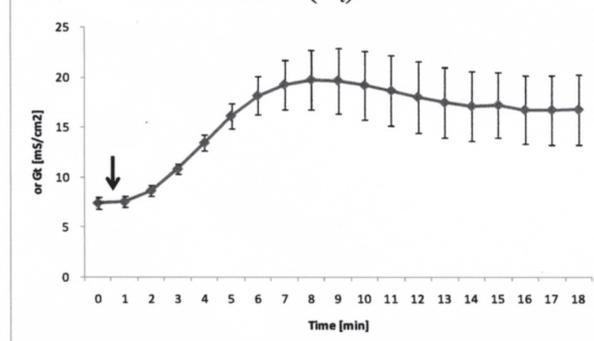
A. thymol の粘膜側および漿膜側投与による I_{sc} の増加B. thymol の粘膜側投与による I_{sc} の時間経過C. Short-circuit current (I_{sc})D. Tissue conductance (G_t)

図3 thymolを投与した時の短絡電流と膜コンダクタンスの変化

Ussing chamber法によりラット遠位結腸における短絡電流と膜コンダクタンスを記録した。 I_{sc} 増加はthymolの濃度に依存的であった(A)。thymol(1 mM)の作用の時間経過(B)を、1分ごとに短絡電流(C)および膜コンダクタンス(D)を計測し、グラフ化した。thymolによって短絡電流と膜コンダクタンスは増加するが、最大値に達するまでにかかる時間は、膜コンダクタンスの方が短絡電流よりも遅かった。

と非起電的イオン輸送とが連動せず、複数の機構で thymol が経上皮膜イオン輸送に影響することが示唆された。次に、thymol による I_{sc} 上昇にどのようなイオン種が関与しているかを、各種イオンチャネル阻害剤を用いて検討した。基底膜 Na-K-2Cl 共輸送体(NKCC)阻害薬である bumetanide や頂端膜 Na チャネル (ENaC) 阻害薬 amiloride あるいは K チャネル阻害剤 $BaCl_2$ によって thymol による I_{sc} の上昇は影響されなかった。また、神経伝達遮断薬である tetrodotoxin によっても thymol による I_{sc} の上昇は阻害されなかったことから、thymol のイオン輸送への影響は、粘膜下神経系を介さない反応であることが考えられた。

(3) 味覚・嗅覚受容体リガンドの相互作用
短鎖脂肪酸のひとつであるプロピオン酸は、モルモットおよびラット結腸において、濃度依存的に I_{sc} および G_t を増加させるが、これは Cl 分泌によるものであることが明らかになっている^{3, 13)}。また、近年当研究室では、ヒトおよびラットにおいて、プロピオン酸受容体を持つ細胞が、PYY を含有する腸内分泌細胞および、セロトニン 5-HT 含有肥満細胞であることを同定し報告した^{4, 5)}。短鎖脂肪酸脂肪酸は特有の臭いをもつため、香気成分として嗅覚受容体にも何らかの作用があるのではないかと考えられた。そこで、Thymol (1 mM) を粘膜に作用させた後に、プロピオン酸を粘膜に投与したところ、thymol はプロピオン酸による I_{sc} の上昇をほとんど完全に抑制した。その後、同組織を Krebs-Ringer 液で 3 回洗浄すると、プロピオン酸への反応はコントロール群と同レベルの反応を示した (Fig.4A)。この抑制作用は、thymol の濃度に依存した (Fig.4B)。同じく短鎖脂肪酸のひとつである酪酸も、1 mM の thymol によって反応が完全に抑制された。thymol を前駆体として工業的に合成される

menthol は、プロピオン酸の反応をコントロールの 30%にまで抑制した。プロピオン酸によるクロライドイオン分泌はアセチルコリンが関与していることが報告されているが¹³⁾、1mM の thymol は、アセチルコリンのアゴニストである carbachol による Cl 分泌を抑制しなかった。また、上皮細胞のイオン分泌促進因子である神経伝達物質、VIP の投与や、粘膜下神経への電気刺激による Cl 分泌に対しても影響しなかった。これらの結果から、thymol による短鎖脂肪酸の反応に対する抑制作用は、分泌上皮の抑制や神経系に対する作用によるものではなく、短鎖脂肪酸の受容機構に関与していることが考えられた。香気成分を受容する嗅覚受容体は、哺乳類の遺伝子に 1000 以上のサブタイプをもつことが知られている²⁾。これらのリガンドは、ある受容体サブタイプにはアゴニストとなるが、他の幾つかのサブタイプにはアンタゴニスト作用を示すことが知られている⁹⁾。このことから、thymol が短鎖脂肪酸の受容体に対してアンタゴニスト作用を持つ可能性が示唆された。しかし、その実体は不明であり、今後、更なる研究が必要であると考えられる。

4. おわりに

以上の結果より、1) 下部消化管粘膜において嗅覚・味覚受容体が発現していること、2) ある種の嗅覚・味覚受容体のリガンドは、ヒトおよびラットの下部消化管における経粘膜上皮イオン輸送に対して影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、嗅覚・味覚受容体のリガンドとなる化学物質は、消化管内における受容およびイオン輸送への影響という点において、相互作用を有している可能性が示唆された。これらの詳しい機構については、今後の研究の課題である。下部消化管には、経口摂取した物質だけでなく、それらが消化管の作用あるいは腸内細菌の作用によって代謝さ

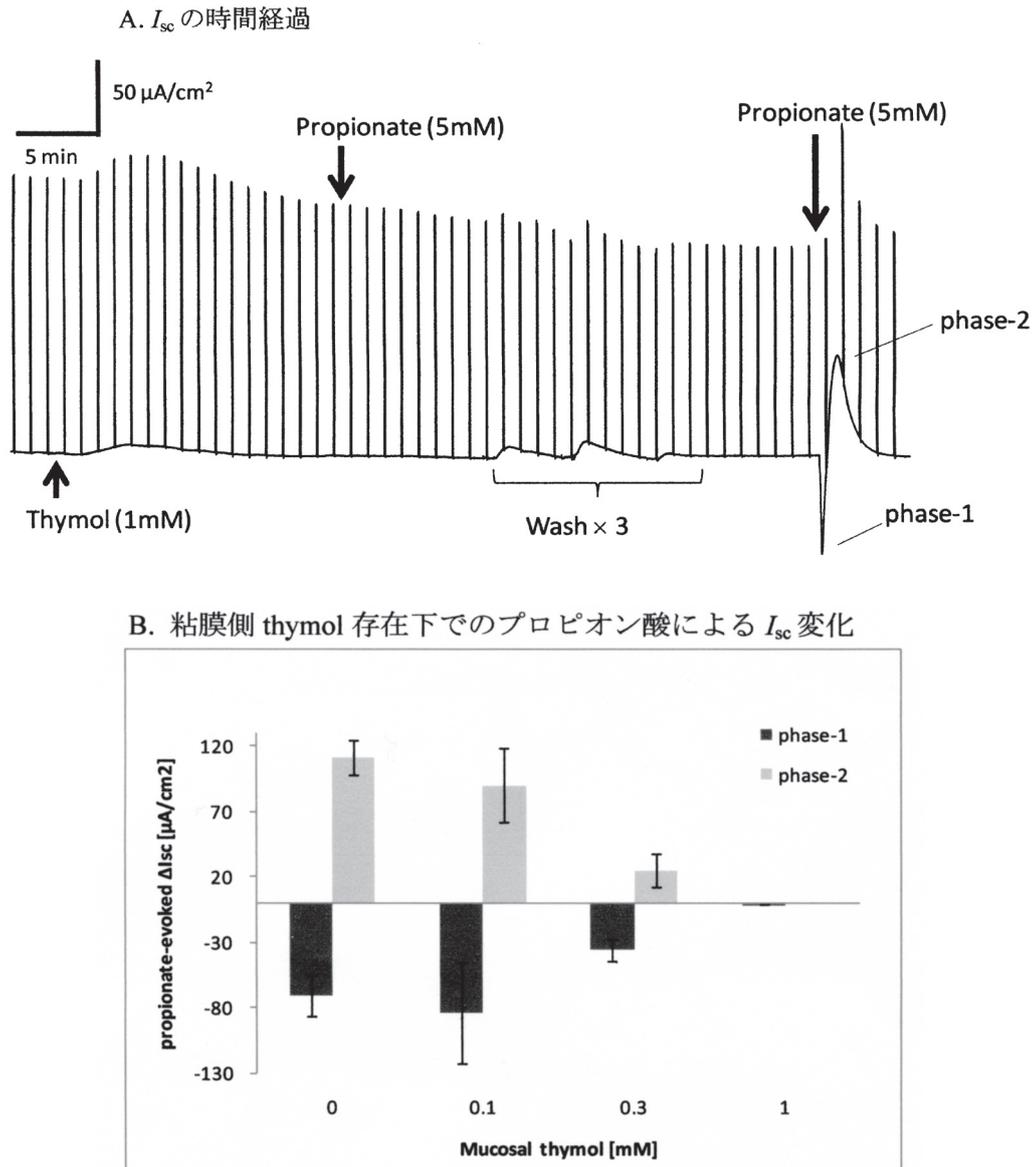


図4 粘膜側 thymol 投与のプロピオン酸への反応に対する影響

粘膜に投与した thymol の濃度依存的に、それに続く粘膜へのプロピオン酸投与による I_{sc} の反応が抑制され、1 mM の thymol 存在下では、ほぼ完全にプロピオン酸への反応が消失した。その後、Krebs-Ringer 液で組織を3回洗浄することにより、プロピオン酸への反応はコントロールと同レベルの反応を示した。

れて生じた物質が存在すると考えられる。従って、例えば毒物を感知して排除しようとする機構が、舌や鼻だけでなく下部消化管粘膜において機能することは、生体防御の観点からも非常に有用であると言える。消化管粘膜に発現している受容体とその生理機能の解析は、これまで注目されていなかった新たな消化管機能の発見につながると考えられる。

文献

- 1) Braun T, Volland P, Kunz L, Prinz C, Gratzl M. Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. *Gastroenterology* 132: 1890-1901, 2007.
- 2) Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187, 1991.
- 3) Karaki S, Kuwahara A. モルモット遠位大腸の電解質輸送に対する短鎖脂肪酸の作用 *Jpn J Physiol* 55 Suppl: S195, 2005.
- 4) Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A. Short-chain fatty

- acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res* 324 : 353-360, 2006.
- 5) **Karaki S, Tazoe H, Hayashi H, Kashiwabara H, Tooyama K, Suzuki Y, Kuwahara A.** Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Histol* 39 : 135-142, 2008.
- 6) **Kidd M, Modlin IM, Gustafsson BI, Drozdov I, Hauso O, Pfragner R.** Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295 : G260-272, 2008.
- 7) **Mitsui R, Ono S, Karaki S, Kuwahara A.** Propionate modulates spontaneous contractions via enteric nerves and prostaglandin release in the rat distal colon. *Jpn J Physiol* 55 : 331-338, 2005.
- 8) **Ono S, Karaki S, Kuwahara A.** Short-chain fatty acids decrease the frequency of spontaneous contractions of longitudinal muscle via enteric nerves in rat distal colon. *Jpn J Physiol* 54 : 483-493, 2004.
- 9) **Sanz G, Schlegel C, Pernollet JC, Briand L.** Comparison of odorant specificity of two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for antagonism. *Chem Senses* 30 : 69-80, 2005.
- 10) **Vogt Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H.** Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* 151 : 530-540, 2007.
- 11) **Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE.** Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 9 : 628-635, 2006.
- 12) **Yajima T.** Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol* 368 : 667-678, 1985.
- 13) **Yajima T.** Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro. *J Physiol* 403 : 559-575, 1988.

Secretory effects of luminal odorants and expressions of odorant receptors in human and rat large intestine

Izumi Kaji, Shin-ichiro Karaki and Atsukazu Kuwahara

(Laboratory of physiology, Graduate School of Nutrition and Environmental Sciences,
Institute for Environmental Science, University of Shizuoka)

Intestinal transepithelial ion transport is regulated by diverse systems including the enteric nervous system (ENS), a variety of gut hormones and cytokines, responding to mechanical and chemical stimuli. One type of chemical stimulus at the intestinal lumen is short-chain fatty acids (SCFAs) including propionate and butyrate, which are bacterial metabolites especially in the large intestine. SCFAs have been reported to evoke epithelial ion transport through mucosal stimulation and ENS activation. Although the sensing mechanism for SCFAs at mucosa is still unclear, we recently found that the SCFA receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in human and rat intestine. Therefore, we speculate that other chemical receptors are expressed by sensory cells in the intestine.

Recently, the same taste transduction mechanism found in the taste buds of lingual papillae was also reported to be present in the intestine. In the present study, we examined the effect of odorants thymol and eugenol on ion transport in human and rat colonic epithelia to elucidate the physiological function of odorant receptors in the intestine. Furthermore, odorant receptor expressions were also investigated in isolated large intestinal mucosa.

To find out the odorant receptors in rat large intestinal epithelia, RT-PCR analysis was performed by using isolated mucosa of rat without submucosa and muscle. Specific bands of same base pair (bp) sizes as the expected amplicon size for rOR1G1 and rTRPV3 were detected in the mucosa of rat distal colon (**Fig.1A**). We have also detected the receptor signals responsible for eugenol (**Fig.1B**). These results suggest that thymol or eugenol in the large intestine may be detected at epithelial odorant receptors (OR1G1, Olr604 and Olr1161).

The addition of thymol or eugenol to mucosal bathing solution evoked an increase in I_{sc} in both human and rat large intestine with increasing G_t (**Fig. 2 and 3**). After the addition of eugenol (v/v 0.1%), I_{sc} increased gradually for 5-15 min, with G_t increases. To investigate the effects of thymol on basal I_{sc} and G_t in rat colon, various concentrations of thymol (10^{-6} – 10^{-3} M) were added to mucosal bathing solution and changes in I_{sc} and G_t

were measured (**Fig.3**). In rat tissues, serosal addition of thymol was also tested; thymol to serosal bathing solution evoked an increase in I_{sc} similar to that of mucosa. Figure 3A shows concentration-dependent increases in I_{sc} in rat colon (**Fig.3A**). In the present study, we have shown the action of odorant receptor ligands, thymol and eugenol on epithelial ion transport and the expressions of putative receptors for thymol and eugenol. This study suggests that some luminal odorants in the large intestine induce a secretory response probably through the odorant receptor mediating chemical sensing mechanism. Thymol induced increases in I_{sc} in a concentration-dependent manner in rat distal colon. The mRNA expression of odorant receptors, rOR1G1, rTRPV3, Olr604 and Olr1161 were detected in colonic mucosa by RT-PCR analysis. Although, in the present study we could not be determined which specific receptor detect thymol or eugenol, the results suggest that thymol or eugenol may be detected at epithelial odorant receptors.

The present results indicate that the receptors for odorant can function as sensors that are able to modify the intestinal function including epithelial ion transport in human and rat intestine. Therefore, this system may be a new chemosensing mechanism in the large intestine to maintain intestinal homeostasis.