

腸管内分泌細胞の味覚感受性に対するレプチンの効果についての研究

上瀧, 将史

<https://doi.org/10.15017/1441138>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

腸管内分泌細胞の味覚感受性に対する
レプチンの効果についての研究

上瀧 将史

九州大学大学院 歯学府歯学専攻
口腔常態制御学講座 口腔機能解析学分野

指導：二ノ宮 裕三 教授

九州大学大学院 歯学研究院
口腔常態制御学講座 口腔機能解析学分野

目次

発表論文	1
要旨	4
緒言	6
材料と方法	9
結果	13
考察	28
謝辞	32
参考文献	33

発表論文

本研究の一部は下記の論文に報告した。

Jyotaki M, Yoshida R, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y

Leptin modulates sweet sensitivities in enteroendocrine STC-1 cells.

J Physiol. 投稿中

また、本文の内容の一部は下記の学会において発表した。

20th Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior, Florida、

2011年7月

日本味と匂学会第45回大会、石川、2011年10月

第2回先端味覚研究セミナー、東京、2012年、8月

日本味と匂学会第46回大会、大阪、2012年10月

第33回日本肥満学会、京都、2012年10月

21st Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior, New Orleans、

2013年7月

第64回西日本生理学会、福岡、2013年10月

その他の発表論文

Ohkuri T, Yasumatsu K, Horio N, Jyotaki M, Margolske RF, Ninomiya Y. Multiple sweet receptors and transduction pathways revealed in knockout mice by temperature dependence and gurmarin sensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296(4): R960-971, 2009

Yoshida R, Yasumatsu K, Shirosaki S, Jyotaki M, Horio N, Murata Y, Shigemura N, Nakashima K, Ninomiya Y. Multiple receptor systems for umami taste in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1170:51-54, 2009

Yoshida R, Miyauchi A, Yasuo T, Jyotaki M, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y. Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J Physiol.* 587(Pt 18): 4425-4439, 2009

Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF, Ninomiya Y. Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(2): 935-939, 2010

Horio N, Jyotaki M, Yoshida R, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. New frontiers in gut nutrient sensor research: nutrient sensors in the gastrointestinal tract: modulation of sweet taste sensitivity by leptin. *J Pharmacol Sci.* 112(1): 8-12, 2010

Jyotaki M, Shigemura N, Ninomiya Y. Modulation of sweet taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors. *Endocr J.* 57(6): 467-475, 2010

Niki M, Jyotaki M, Yoshida R, Ninomiya Y. Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids. *Results Probl Cell Differ.* 52: 101-114, 2010

Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. Modulation of

sweet responses of taste receptor cells. *Semin Cell Dev Biol.* 24(3): 226-231, 2013

大栗弾宏、安松啓子、楠原庸子、上瀧将史、Robert F Margolskee、二ノ宮裕三
甘味関連遺伝子 T1R3⁻、Gust⁻、TRPM5-KO マウスを用いた甘味受容・情報伝達
経路の解析

日本味と匂学会誌 15(3): 407-410, 2008

仁木麻由、上瀧将史、吉田竜介、二ノ宮裕三

レプチン受容体アンタゴニストによるマウスの甘味応答

日本味と匂学会誌 18(3): 255-258, 2012

要旨

レプチンは、主に白色脂肪細胞で作られ、視床下部にあるレプチン受容体 (Ob-Rb) を介して摂食やエネルギーホメオスタシスを調節するホルモンとして知られている。最近の研究で、レプチンは腸管、膵臓、筋肉などの末梢組織に発現している Ob-Rb に作用し、それらの組織が様々な生理機能を示すことも報告された。実際、当研究室では、レプチンが味覚器でその受容体 (Ob-Rb) を介して甘味感受性を抑制することを明らかにした。

甘味は、生体に必要なエネルギー源を見つけるために重要な役割を果たしている。近年、腸管内分泌細胞も味細胞と同様に甘味受容体 (T1R2/T1R3) などを発現しており、それらが腸管での消化管ホルモン (GLP-1, GIP) の分泌や栄養物の吸収に関与していることが明らかとなってきた。しかし、レプチンによる甘味感受性調節作用が腸管内分泌細胞にも存在し、さらに、それが腸管でのホルモン分泌や栄養吸収を調節するかどうかは、まだ全く不明である。

そこで本研究では、レプチンの腸管内分泌細胞における働きを明らかにするため、マウスの腸管内分泌細胞培養系 STC-1 細胞の味応答に対するレプチンの効果を調べた。まず、レプチン受容体などの発現を確認するため、STC-1 細胞から抽出した mRNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、Ob-Rb、味覚受容体 (T1R1, T1R2, T1R3)、細胞内伝達分子 (TRPM5, Gα-gust) の発現が認められた。また、免疫染色では、Ob-Rb と味覚受容体が STC-1 細胞に共発現していた。STC-1 細胞は、甘味、苦味、うま味、塩味物質によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、甘味受容体の阻害剤であるグルマリンの添加により、甘味物質に対する応答のみが特異的に抑制された。このことから、STC-1 細胞の甘味応答は、甘味受容体を介して起きていることが示唆された。この甘味物質に対する応答はレプ

チンの添加によって特異的に抑制され、その抑制効果は Ob-Rb 阻害剤によって消失した。さらに、レプチンによる甘味応答の抑制は、 K_{ATP} チャンネル阻害剤の添加によっても消失した。また、レプチンは甘味刺激による STC-1 細胞からの GLP-1 分泌も阻害した。これらの結果から、レプチンが腸管内分泌細胞の Ob-Rb に作用し、 K_{ATP} チャンネルを介して甘味感受性を変化させ、栄養物の検知や吸収に関与する可能性が示唆された。

緒言

味覚は、食を通して健康を維持する上で欠かせない重要な感覚である。味覚の受容体は口腔内のみならず、消化管、膵臓、中枢神経系など様々な部位に発現しており、味の受容により快・不快の情動をはじめ、唾液、消化液、ホルモンの分泌など、様々な調節系に働くことで、生体の恒常性維持に役立っている。近年増加している肥満や、糖尿病などの生活習慣病は、食調節系の乱れが関与するものと推定されている。そのため、食調節のコントロールに関わる味覚の役割は、食の健全化を通じた生活の質（Quality of life）の向上を求める上で極めて重要である。

主に脂肪細胞から作られるレプチンは、視床下部内のレプチン受容体 (Ob-Rb) を介して摂食やエネルギーホメオスタシスを調節するホルモンとして知られている (Zhang Y. et al., 1994; Tartaglia LA. et al., 1995; Lee GH. et al., 1996)。さらに近年、レプチンは腸管、膵臓、筋肉などの末梢組織に発現している Ob-Rb に作用し、それらの組織が様々な機能を示すことも報告された (Kieffer TJ. et al., 1996; Barrenetxe J. et al., 2002)。例えば、当研究室では、ヒトとマウスにおいて摂食抑制ホルモンのレプチンが甘味抑制に働くことを明らかにした (Kawai K. et al., 2000; Shigemura N. et al., 2004)。特に甘味は、生体に必要なエネルギー源の検出に重要な役割を果たしていることから、レプチンによる甘味感受性の調節は、体内のエネルギーバランスを維持する上で最適の甘味情報を脳に伝え、食行動の制御に働くことを示唆している。さらに、最近の研究で、Ob-Rb が腸管細胞にも発現しており、血中レプチンが腸管での吸収やホルモン分泌などの消化管の機能を調節していることが報告されている (Kieffer TJ. et al., 1996; Barrenetxe J. et al., 2002; Lostao MP. et al., 1998; Anini Y. et al., 2003)。実際、腸管において、レ

プチンは sodium-glucose transporter 1 (SGLT-1)の活性化を阻害することでグルコースの吸収を低下させる(Lostao MP. et al., 1998; Ducroc R. et al., 2005; Iñigo C. et al., 2007)。つまり、これらの発見は、レプチンが視床下部だけではなく、腸管や舌などの様々な末梢組織を介して摂食や栄養吸収を調節する重要な物質であることを示唆している。

興味深いことに、最近の研究で、消化管の内分泌細胞が、口腔内の味受容体細胞と似た分子を持っており、それらで栄養物を検知していることが報告されている。例えば、腸管細胞は味覚受容体 (T1Rs, T2Rs など) や、G-protein gustducin ($G\alpha$ -gustducin)、phospholipase C- β 2 (PLC- β 2)、transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5 (TRPM5) などの味覚情報伝達に関わる細胞内因子を発現している(Jang HJ. et al., 2007; Wu SV. et al., 2002)。また、それらの細胞は甘味 (グルコース、スクラロース)、苦味 (デナトニウム)、うま味 (アミノ酸) などの味物質に応答する(Jang HJ. et al., 2007; Margolskee RF. et al., 2007)。さらに、内分泌細胞の甘味受容体 (T1R2/T1R3) の活性化により glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) が分泌される。また、それらの物質は腸管細胞の SGLT-1 の発現を促し、グルコース吸収を増加させるホルモンとして知られている(Jang HJ. et al., 2007; Margolskee RF. et al., 2007)。従って、もしレプチンが味細胞と同様に内分泌細胞の甘味感受性を調節すれば、腸管でのインクレチン分泌やグルコース吸収がレプチンによって制御されることになる。しかしながら、レプチンによる腸管内分泌細胞の甘味感受性の調節に関する報告はまだない。

そこで本研究では、腸管細胞の機能や細胞内情報伝達系を調べるため、栄養物や味物質に対する Ca^{2+} シグナルやインクレチン分泌の研究でよく用いられているマウス腸管内分泌細胞系の STC-1 細胞で実験を行った(Chen MC. et al., 2006; McLaughlin JT. et al., 1998; Mangel AW. et al., 1995; Young SH. et al., 2010; Saitoh O.

et al., 2007)。この STC-1 細胞は味覚受容体や細胞内情報伝達因子を発現し、甘味物質に応答して GLP-1 を分泌することが報告されている(Ohara-Imaizumi M. et al., 2009; Geraedts MC. et al., 2012)。さらに、過去の研究で、STC-1 細胞は Ob-Rb を発現しておりレプチンにも応答することも報告された(Guilmeau S. et al., 2003)。しかしながら、これらの研究の多くは、マウスの血中レプチン濃度が平均で約 3.5ng/ml に対し高濃度 (1.6 μ g/ml) で長時間 (1 hour) レプチンを作用させており非生理的な環境下で行われている。そこで、本研究では、生理的なレプチン濃度 (1~20ng/ml) かつ短時間 (5~30 min) での味刺激に対する STC-1 細胞の Ca^{2+} 応答や GLP-1 分泌の測定を行なった。その結果、レプチンは STC-1 細胞の甘味応答のみを特異的に抑制し、その抑制効果は Ob-Rb 阻害剤によって消失した。さらに、レプチンは甘味刺激による STC-1 細胞の GLP-1 分泌も阻害した。

材料と方法

細胞

マウス腸管腸管内分泌細胞培養系 STC-1 (Dr. D. Hanahan から分与) は、10% fetal bovine serum (FBS)を加えた 25mM グルコース含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)中に 37°C、5% CO₂ 下にて培養を行なった。細胞は 4 日おきに継代を行い、起こしてから 2 ヶ月経ったものは破棄し、新しい細胞を起こした。

カルシウムイメージング

35mm ディッシュ (Ibidi GmbH, Munich, Germany) で 5.5mM グルコース含有の DMEM を用いて 3 日間培養した後、5 μ M fura-2 AM (Invitrogen)を 37°Cで 30 分間インキュベートした。培地を捨てた後、測定溶液[10mM HEPES を加えた 5mM グルコース含有の Hank's balanced salt solution (HBSS ph 7.4)または 2mM グルコース含有の Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB)]にて 2 回細胞を洗った。5 分間測定溶液にて還流を行い、その後カルシウムイメージングを行った。味溶液は測定溶液に味物質を溶解させた、30~300mM NaCl、1~10mM denatonium benzoate (BD)、0.3~3mM monosodium glutamate (MSG)、8~100mM glucose、1~30mM sucralose、1 μ M GABA を用いた。ペリスタポンプを用いて測定溶液を還流させ (1ml/min)、味刺激は 30 秒間行い、次の味溶液の投与まで 5 分間空けた。グルマリン (Gur)、レプチン (Lep)、レプチン受容体阻害剤 (mutant L39A/D40A/F41A; LA)、グリベンクラミド (Gc) は 5 分間それぞれディッシュ内で保持した。細胞内カルシウム濃度は、AQUA COSMOS Ca²⁺-imaging system (Hamamatsu Photonics、Hamamatsu、Japan)を用いて測定を行った。

RT-PCR 法

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Ratingen, Germany)を用いて STC-1 細胞から RNA の精製を行った。さらに、Ready-To-Go You-Prime First-Strand beads (GE Healthcare, CT, USA)を用いて、RNA の逆転写を行い、first-strand cDNA を作成した。この時、逆転写酵素を入れたもの(RT+)と入れなかったもの(RT-)をそれぞれ用意した(RT : 50°C30 分)。作成した cDNA と遺伝子特異的プライマー (表 1) を用いて PCR を行った (PCR : 94°C30 秒、58°C60 秒、68°C60 秒)。その後、2%アガロースゲルを用いて 30 分間電気泳動を行い、DNA を検出した。

免疫組織化学染色法

35mm ディッシュ (Ibidi GmbH) で 5.5mM グルコース含有の DMEM を用いて 3 日間培養した後、培養液を取り除き、PBS で 2 回細胞を洗った。その後、4% パラホルムアルデヒドを加えて 10 分間インキュベートして細胞を固定し、PBS で 3 回細胞を洗った。抗原の不活化のため、0.1µg/ml proteinase K (Invitrogen) を加えて 10 分間インキュベートして PBS で 3 回細胞を洗った。次に、ブロッキング溶液[1% blocking reagent (Invitrogen)]を加え、1 時間、4°C、暗室にて静置した。さらに、rabbit polyclonal Ob-Rb antiserum (OBR 12-A) (1:100; Clinisciences, Montrouge, France)、goat polyclonal T1R2 antiserum (1:50; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、goat polyclonal T1R3 antiserum (1:50; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit polyclonal SUR1 antiserum (1:50; Santa Cruz Biotechnology)を一次抗体として 1 晩、4°C、暗室に静置した。PBS で 4 回細胞を洗った後、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (1:200; Invitrogen)と Alexa Fluor 568 donkey anti-goat IgG (H+L) (1:200; Invitrogen)を二次抗体として 1 時間、室温にて静置した。PBS で 4 回細胞を洗った後、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo、

Japan) を用いて観察し、Fluoview software (Olympus) で画像を取得した。

GLP-1 測定

60mm ディッシュで 5.5mM グルコース含有の DMEM を用いて 3 日間培養した後、培地を捨て測定溶液 (HBSS) で 2 回細胞を洗った。その後、味溶液(30mM sucralose and 10mM denatonium benzoate)単独または 3ng/ml レプチンを添加した溶液を加え、37°C、5% CO₂ 下にて 2、5、15、30、60 分間インキュベートした。その後、上清を回収し、GLP-1 active form assay kit (IBL)を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により GLP-1 を検出した。この GLP-1 は Multiscan JX microplate reader (Thermo Scientific、MA、USA)で測定した。

データ解析

Ca²⁺応答は、刺激直前の 30 秒間の F340/F380 の平均値と刺激中の 20 秒間の F340/F380 の平均値の差で表す。また、GLP-1 分泌は、0 分の GLP-1 濃度からの変化量で表す。

阻害剤の効果を調べるため、two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA)を用いて統計処理を行った。ANOVA で有意差が得られたとき、Tukey HSD test または t-test により各平均値の比較を行った。P 値が 0.05 以下のとき、統計的に有意であると判断した。計算は統計ソフトウェア IBM SPSS Statistics (IBM、Armonk、NY)を用いて行った。

Table 1 Primer sequence used in RT-PCR				
gene	Accession No.	Forward	Reverse	Product size (bp)
Ob-Rb	MMU58861	CTGAATTTCCAAAA GCCTGA	TTGCTGACCAGAG TTGCATA	320
T1R1	NM_031867	GGTTCTGCCTCACT GTCTCC	GCAGCAGCAATAG CGTGTTA	340
T1R2	NM_031873	CAAAGCATCGCCTC CTACTC	AGAATGGCCAGCG TACTGAT	365
T1R3	NM_031872	CTACCCTGGCAGCT CCTGGA	CAGGTGAAGTCAT CTGGATGCTT	343
gustducin	NM_001081143	TGCTTTGAAGGAGT GACGTG	GTAGCGCAGGTCA TGTGAGA	341
TRPM5	NM_020277	CTGATCGCCATGTT CAGCTA	ACTCTGTGTGCCG TTTTCT	335
GABA _A β-3	NM_00807	CATGATGGACCTCA GAAGAT	GGACCTCTTCCAA AGAAAAT	320
β-actin	NM_007393	GGTTCCGATGCCCT GAGGCTC	ACTTGCGGTGCAC GATGGAGG	370

表1 RT-PCR で用いたプライマー配列

結果

STC-1 細胞でのレプチン受容体と味覚受容体の発現

STC-1 細胞から抽出した mRNA で RT-PCR を行なった結果、Ob-Rb、味覚受容体 (T1R1, T1R2, T1R3)、細胞内伝達分子 (TRPM5, G α -gust) の発現が認められた (図 1A)。また、免疫染色の結果から、Ob-Rb と T1R2 (図 1B) または T1R3 (図 1C) がそれぞれ STC-1 細胞で共発現していた。それぞれの一次抗体を省くと、蛍光発色は見られなくなった (図 1D)。これらの結果から、STC-1 細胞は Ob-Rb や味覚受容体を持ち、それらを発現していることが示唆された。

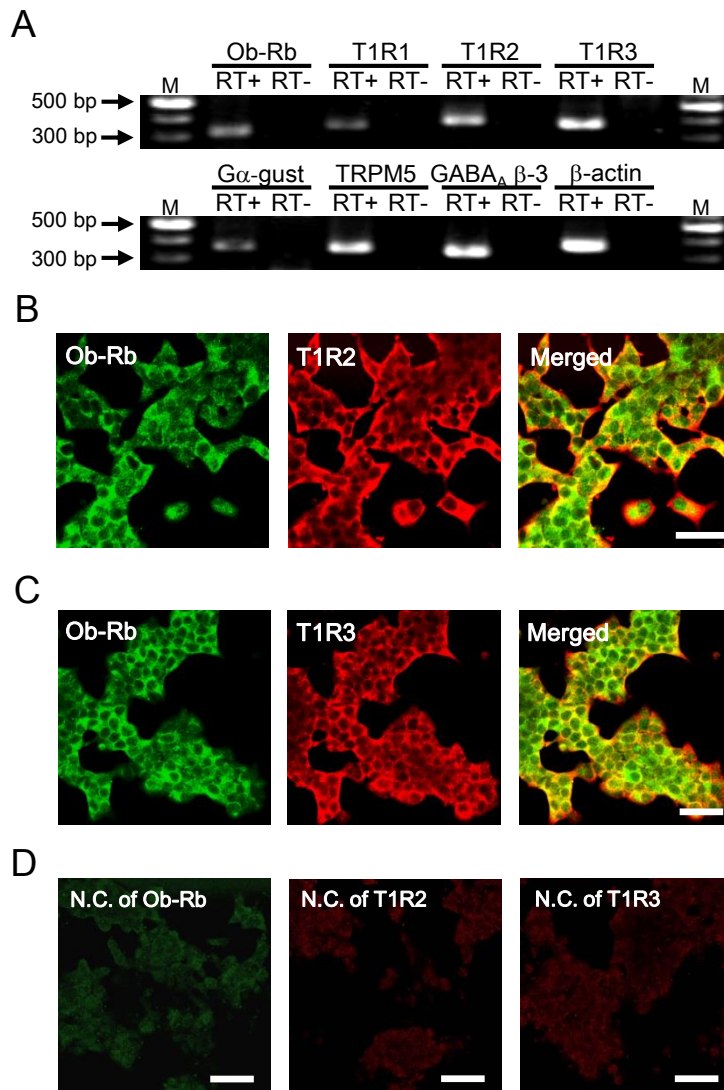


図1 STC-1細胞におけるレプチン受容体 (Ob-Rb)、味覚受容体 (T1R1、T1R2、T1R3)、味覚関連情報伝達分子 (G α -gust, TRPM5) の発現。

(A) RT-PCRによるSTC-1細胞でのOb-Rb、T1R1、T1R2、T1R3、G α -gust、TRPM5、GABA β -3の発現解析の例。(M: 100-bpサイズマーカー、RT+: 転写酵素あり、RT-: 転写酵素なし)。(B-D) STC-1細胞でのOb-RbとT1R2 (B) またはT1R3 (C) の二重免疫染色の例。また、それぞれの一次抗体を除いた時の免疫染色の例 (D)。

STC-1 細胞の甘味応答に対する甘味受容体阻害剤の効果

STC-1 細胞は、甘味物質[100mM glucose (Glc), 100mM sucrose (Suc), 30mM sucralose (Sucra), 3mM SC45647 (SC)], 苦味物質[10mM denatonium benzoate (DB)], うま味物質[0.3mM monosodium l-glutamate (MSG)], 塩味物質(100mM NaCl)に反応して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた (図 2A-E)。これらの結果は、過去の報告と一致した(Chen MC. et al., 2006; McLaughlin JT. et al., 1998; Mangel AW. et al., 1995; Young SH. et al., 2010; Saitoh O. et al., 2007; Némoz-Gaillard E. et al., 1998)。しかし、STC-1 細胞の甘味物質に対する応答に甘味受容体 T1R2/T1R3 が関与しているかはまだ分かっていない。そこで、マウスの甘味受容体阻害剤であるグルマリン (Gur) (Maillet EL. et al., 2009)を投与すると、甘味刺激に対する応答のみが有意に抑制された (図 2A, B, F)。また、グルマリンによる 30mM Sucra 応答の抑制は、濃度依存的に増加し、 IC_{50} は $0.62 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ となった (図 2G)。一方、 $10 \mu\text{g/ml}$ Gur は他の味物質 (DB, MSG, NaCl) には影響をしなかった (図 2C-F)。これらの結果から、STC-1 細胞は甘味受容体を介して甘味物質に反応していることが示唆された。

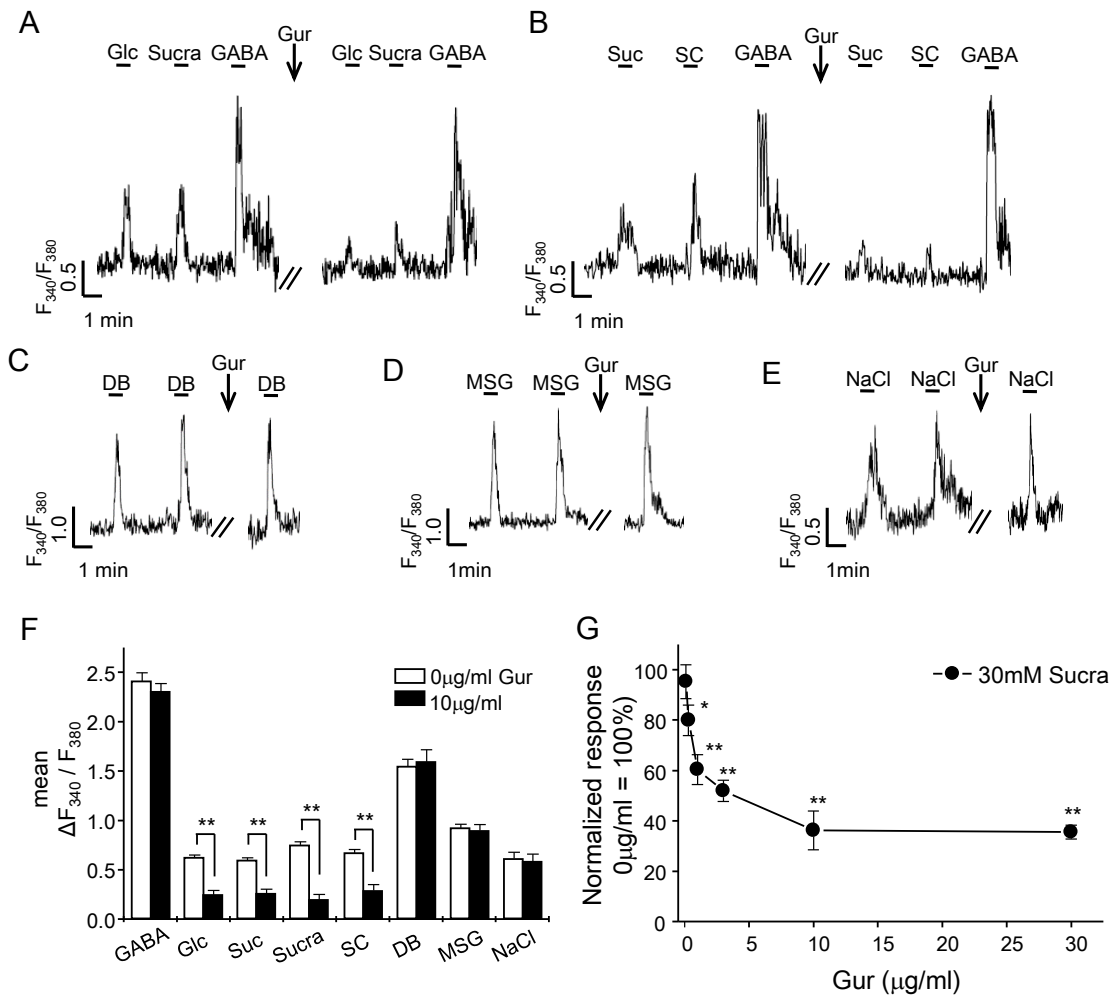


図2 STC-1細胞の味応答に対するグルマリンの阻害効果。

(A-E) STC-1細胞の10 $\mu\text{g/ml}$ グルマリ処理前後の味物質に対する細胞内Ca²⁺応答例。縦軸F₃₄₀/F₃₈₀は、蛍光強度F340とF380の比率を示し、横軸は時間(分)を表す。グラフ上部の横線は溶液の投与期間(30秒)を表す。味溶液: 100mM Glc, 30mM Sucra (A), 100mM Suc, 3mM SC (B), 10mM DB (C), 0.3mM MSG (D) and 100mM NaCl (E)。(F) グルマリ処理前(Vehicle)と処理後(10 $\mu\text{g/ml}$ Gur)の味物質に対する細胞内Ca²⁺応答の平均値。 $\Delta F_{340}/F_{380}$ は、刺激前30秒のF₃₄₀/F₃₈₀の平均値と刺激間20秒の平均値との差を表す。(G) Gur(0.03-10 $\mu\text{g/ml}$)による30mM Sucra応答の抑制率。データは平均値 \pm SEで示す。n \geq 20。paired t-testにより統計処理した。(**p<0.01,*p<0.05)

STC-1 細胞の味応答に対するレプチンの効果

STC-1 細胞において、Glc、Sucra、DB、MSG、NaCl は濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた (図 3A-E)。その後、レプチン (Lep) を投与すると、甘味物質に対する応答のみが有意に抑制され、その抑制効果はレプチンの濃度依存的に増大した (図 3A-C、図 4A-E)。さらに、測定溶液を 5mM グルコース含有の HBSS から 2mM グルコース含有の KRB に替えて Glc 応答を測定すると、生体に近いグルコース濃度 (8mM) でもレプチンによって抑制された (図 4D)。また、レプチンによる 30mM Sucra 応答の抑制効果の IC50 は $3.87 \pm 0.97 \text{ng/ml}$ となった (図 4B)。一方、20ng/ml Lep は他の味物質 (DB、MSG、NaCl) には影響をしなかった (図 3D-F、図 4F-H)。

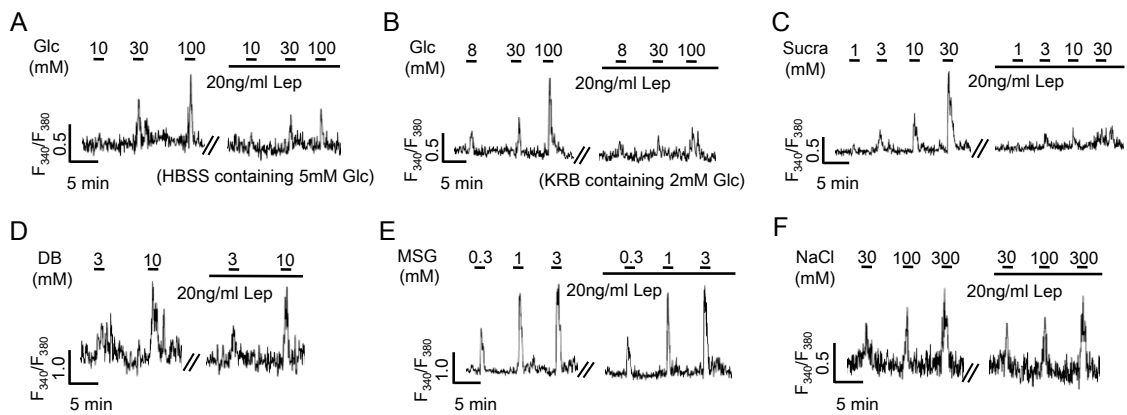


図3 STC-1細胞の味応答に対するレプチンの阻害効果。

(A-E)STC-1細胞の20ng/mlレプチン処理前後の味物質に対する細胞内Ca²⁺応答例。

縦軸F₃₄₀/F₃₈₀は、蛍光強度F₃₄₀とF₃₈₀の比率を示し、横軸は時間(分)を表す。グラフ上部の横線は溶液の投与期間(30秒)を表す。味溶液: 10~100mM Glc in HBSS (A)、8~100mM Glc in KRB (B)、1~30mM Sucra (C)、1~10mM BD (D)、0.3~3mM MSG (E)、30~300mM NaCl (F)。

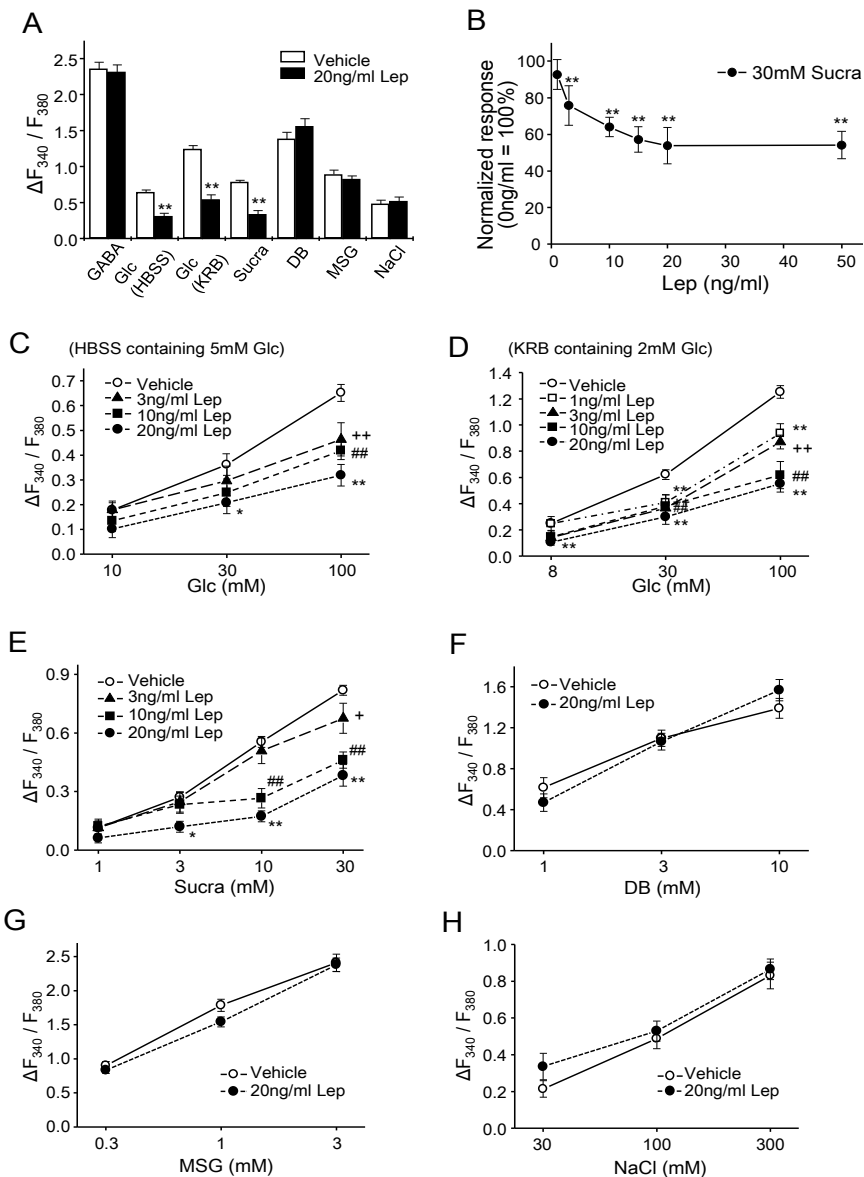


図4 STC-1細胞の味応答に対するレプチンの阻害効果。(A)レプチン処理前 (Vehicle) と処理後 (20ng/ml Lep) の味物質に対する細胞内 Ca^{2+} 応答の平均値。 $\Delta F_{340}/F_{380}$ は、刺激前30秒の F_{340}/F_{380} の平均値と刺激間20秒の平均値との差を表す。(B) Lep (1-50 ng/ml) による 30mM Sucra 応答の抑制率。(C-H) HBSS を測定溶液として使用した時の Glc (C)、Sucra (E)、DB (F)、MSG (G)、NaCl (H) の濃度応答。KRB を測定溶液として使用した時の Glc (D) の濃度応答。データは平均値 \pm SE で示す。 $n \geq 20$ 。ANOVA を用いて統計処理を行った。ANOVA で有意差が得られたとき、post hoc t-tests により各平均値の比較を行った。($n \geq 20$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$)

レプチンによる甘味応答の抑制に対するレプチンアンタゴニストの効果

STC-1 細胞のレプチン受容体が機能しているかを確かめるため、レプチンアンタゴニスト (LA) のマウスレプチン 3 変異体(L39A/D40A/F41A) (Salomon G. et al., 2006)を用いて実験を行った。50ng/ml LA は、10ng/ml Lep による甘味応答 (100mM Glc, 30mM Sucra) の抑制を阻害し、それらの応答を有意に回復させた (図 5A, D)。一方、他の味物質 (10mM DB, 0.3mM MSG, 100mM NaCl) に対する応答には影響しなかった (図 5B-D)。これらの結果から、レプチンは STC-1 細胞に発現しているレプチン受容体を介して甘味応答を抑制していることが示唆された。

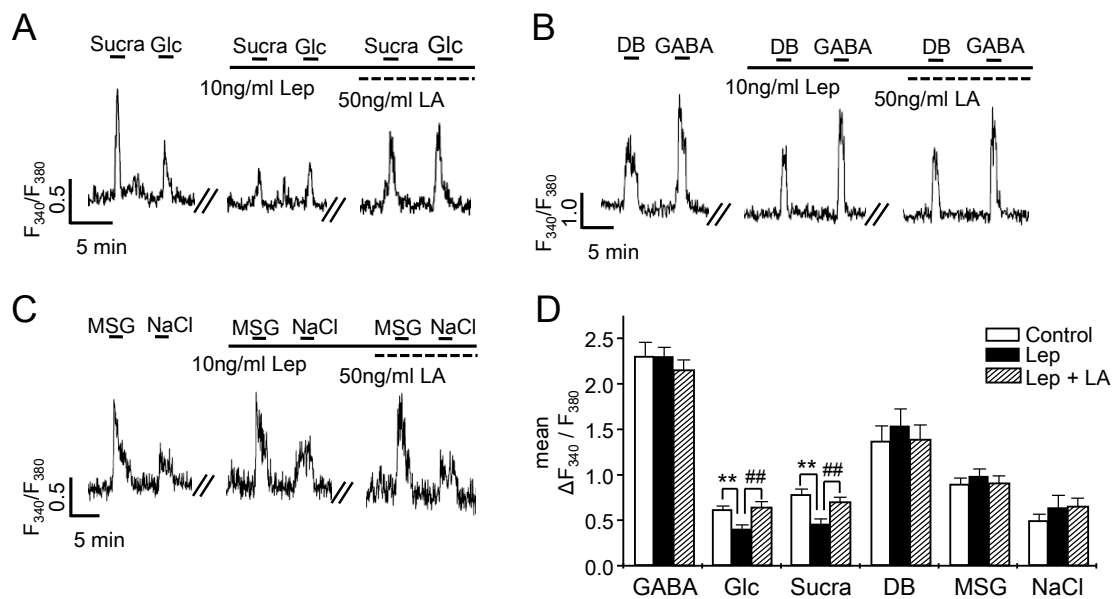


図5 レプチンアンタゴニストによるレプチンの甘味応答抑制の阻害。

(A-C) STC-1 細胞の 10ng/ml レプチン (Lep) と 50ng/ml レプチンアンタゴニスト (LA) 処理前後の味物質に対する細胞内 Ca^{2+} 応答例。縦軸 F_{340}/F_{380} は、蛍光強度 F_{340} と F_{380} の比率を示し、横軸は時間 (分) を表す。グラフ上部の横線は溶液の投与期間 (30 秒) を表す。味溶液: 100mM Glc, 30mM Sucra (A)、10mM DB, 0.3mM MSG (B)、0.3mM MSG, 100mM NaCl (C)。(D) 10ng/ml レプチン処理前 (Vehicle) と処理後 (Lep)、さらに 50ng/ml レプチンアンタゴニスト (LA) で処理したときの味物質に対する細胞内 Ca^{2+} 応答の平均値。 $\Delta F_{340}/F_{380}$ は、刺激前 30 秒の F_{340}/F_{380} の平均値と刺激間 20 秒の平均値との差を表す。データは平均値 \pm SE で示す。n \geq 20。paired t-test により統計処理した。

(**p<0.01,*p<0.05,##p<0.01,#p<0.05)

STC-1 細胞の GLP-1 分泌に対するレプチンの効果

STC-1 細胞は、甘味や苦味刺激により GLP-1 を分泌することが報告されている(Ohara-Imaizumi M. et al., 2009; Geraedts MC. et al., 2012)。本研究では、甘味物質 (30mM Sucra) と苦味物質 (10mM DB) 単独または 3ng/ml Lep を混合した溶液を用い、投与後 0、2、5、15、30、60 分ごとに活性型 GLP-1 濃度を測定した。図 6 で示すように、3ng/ml Lep は Sucra 投与 2 分後から GLP-1 分泌を有意に抑制しているが、DB 投与では GLP-1 分泌に違いは見られなかった。

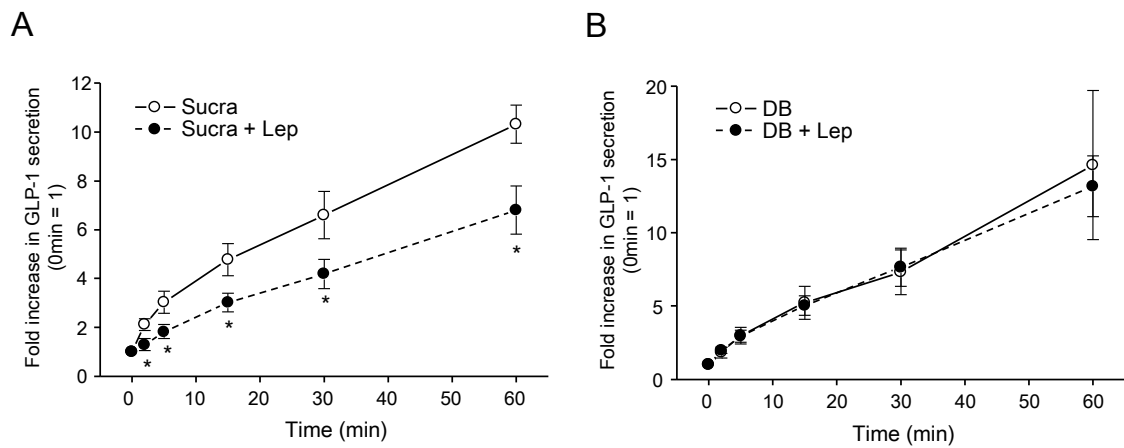


図6 STC-1細胞のGLP-1分泌に対するレプチンの阻害効果。

30mM Sucra、30mM Sucra + 3ng/ml Lep (A) または 10mM DB、10mM DB + 3ng/ml Lep (B) を投与し、2、5、15、30、60 分間インキュベートしたときの GLP-1 濃度。GLP-1 濃度は、0 分の時の濃度を基準にして示す。データは平均値 \pm SE で示す。n \geq 20。ANOVA を用いて統計処理を行った。ANOVA で有意差が得られたとき、post hoc t-tests により各平均値の比較を行った。(n \geq 6, *p<0.05)

STC-1 細胞の K_{ATP} チャンネル活性化に対するレプチンの効果

膵臓の β 細胞において、レプチンは K_{ATP} チャンネルを活性化させることで細胞を過分極状態にし、細胞興奮性を低下させることが報告されている(Harvey J. et al., 1997)。また、最近の研究で STC-1 細胞は K_{ATP} チャンネルを発現していることが明らかにされた(Ramshur EB. et al., 2002)。そこで、 K_{ATP} チャンネルが、レプチンによる STC-1 細胞の甘味応答の抑制に関わっているかを調べた。まず、 K_{ATP} チャンネルの免疫染色を行った結果、 K_{ATP} チャンネルの構成要素の 1 つである Sulfonylurea receptor 1 (SUR1) が STC-1 細胞に発現していた (図 7A)。次に、SUR 阻害剤であるグリベンクラミド (Gc) を STC-1 細胞に投与すると、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させた。さらに、この Gc に対する応答はレプチンにより抑制され、10 μ M Gc の応答は最大で約 40%抑制された (図 7B-C)。

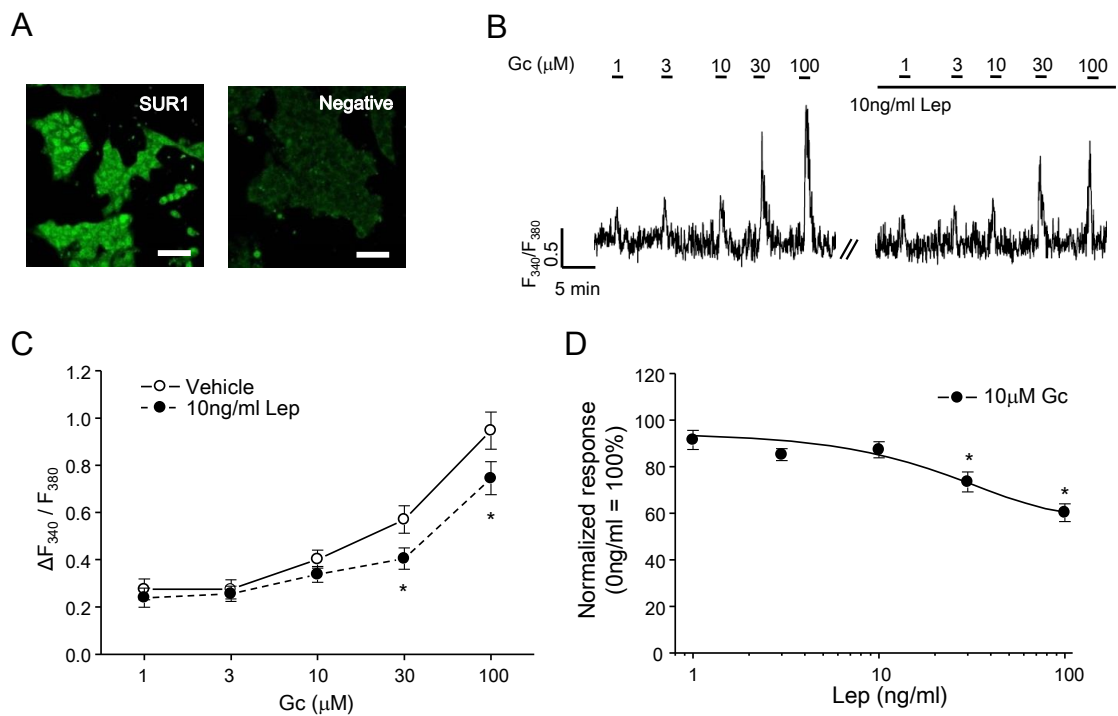


図7 STC-1細胞の K_{ATP} チャンネルに対するレプチンの効果。

(A) STC-1細胞での SUR1 とその一次抗体を除いた時の免疫染色の例。(B-C) STC-1細胞の 10ng/ml レプチン処理前後の 1-100 μ M Gc に対する細胞内 Ca^{2+} 応答例 (B)。縦軸 F_{340}/F_{380} は、蛍光強度 F_{340} と F_{380} の比率を示し、横軸は時間 (分) を表す。グラフ上部の横線は溶液の投与期間 (30 秒) を表す。また、その時の細胞内 Ca^{2+} 応答の平均値 (C)。 $\Delta F_{340}/F_{380}$ は、刺激前 30 秒の F_{340}/F_{380} の平均値と刺激間 20 秒の平均値との差を表す。

(D) Lep (1-100 ng/ml) による 30mM Sucra 応答の抑制率。データは平均値 \pm SE で示す。 $n \geq 20$ 。paired t-test により統計処理した。 (* $p < 0.05$)

レプチンによる甘味応答の抑制に対する K_{ATP} チャンネル阻害剤の効果

10 μ M Gc は一時的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させるが、5分ほどで元の状態に戻る。この10 μ M Gc 存在下では、10ng/ml Lep による30mM Sucra 応答の抑制は阻害され、Sucra 応答は有意に回復した。一方、GABA や Sucra 自体の応答には影響しなかった (図8)。これらの結果から、 K_{ATP} チャンネルはレプチンによる甘味抑制に関与していることが示唆された。

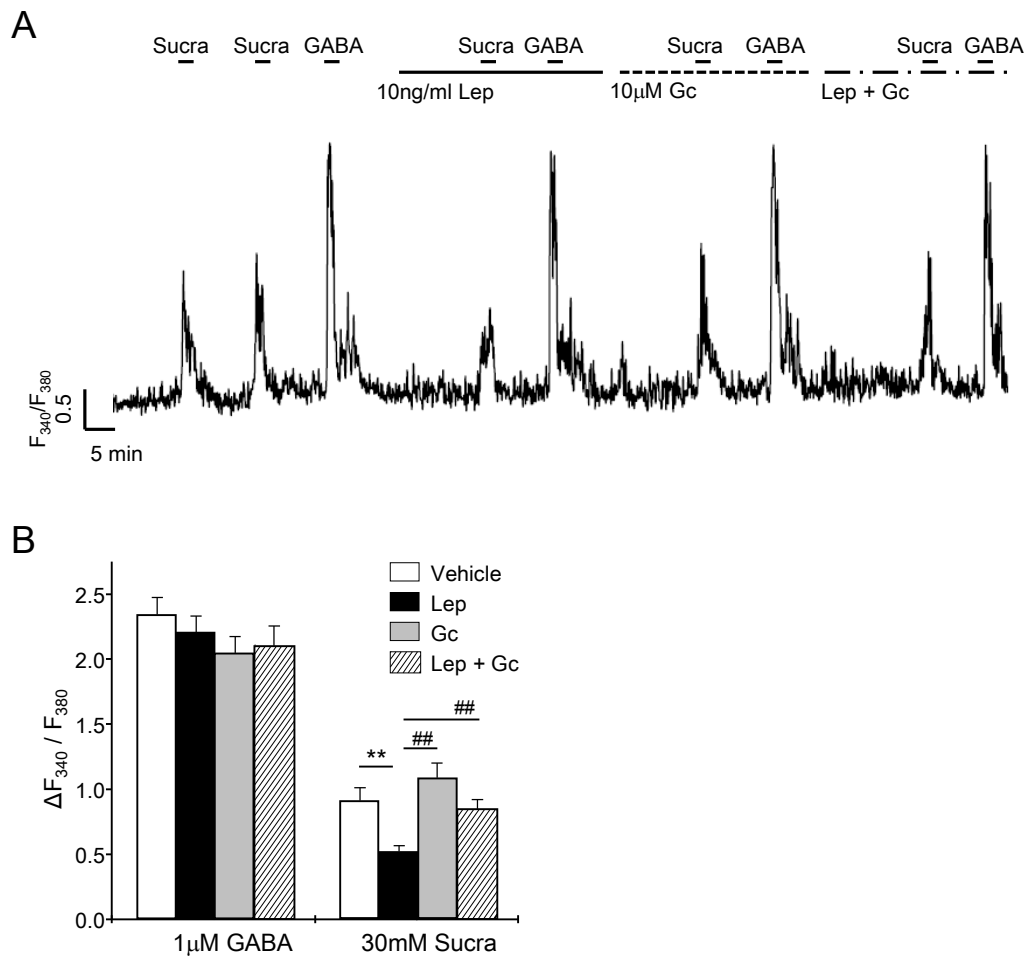


図8 グリベンクラミドによるレプチンの甘味応答抑制の阻害。

STC-1 細胞の 10ng/ml レプチン (Lep) と 10µM グリベンクラミド (Gc) またはそれらの混合液での処理前後の 30mM Sucra と 1µM GABA に対する細胞内 Ca^{2+} 応答例。縦軸 F_{340}/F_{380} は、蛍光強度 F_{340} と F_{380} の比率を示し、横軸は時間 (分) を表す。グラフ上部の横線は溶液の投与期間 (30 秒) を表す (A)。また、その時の細胞内 Ca^{2+} 応答の平均値 (B)。 $\Delta F_{340}/F_{380}$ は、刺激前 30 秒の F_{340}/F_{380} の平均値と刺激間 20 秒の平均値との差を表す。データは平均値 \pm SE で示す。n \geq 20。paired t-test により統計処理した。

(**p<0.01,*p<0.05,##p<0.01,#p<0.05)

考察

本研究では、まず、STC-1細胞を用いて、甘味、苦味、うま味、塩味の物質に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を甘味受容体阻害剤グルマリン (Gur) 処理前後で調べた。STC-1細胞は、味覚受容体 (T1R1, T1R2, T1R3) や細胞内伝達分子 (TRPM5, $\text{G}\alpha\text{-gust}$) を発現しており、味刺激 (甘味、苦味、うま味、塩味、酸味) によって細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させることが報告されている (Chen MC. et al., 2006; McLaughlin JT. et al., 1998; Mangel AW. et al., 1995; Young SH. et al., 2010; Saitoh O. et al., 2007; Némoz-Gaillard E. et al., 1998)。しかし、STC-1細胞の甘味物質に対する応答に甘味受容体 T1R2/T1R3 が関与しているかはまだ分かっていない。そこで、甘味物質に応答した STC-1細胞に Gur を投与し、応答の変化を調べた。図2で示すように、Gur は STC-1細胞の甘味物質に対する応答を有意に低下させた。一方、他の味物質 (苦味、うま味、塩味) に対する応答には影響しなかった。つまり、STC-1細胞の甘味物質に対する応答は、甘味受容体を介していることが示唆された。しかしながら、Gur は甘味物質に対する応答を完全に消失させることはできず、30~40%の甘味応答が残存した。従って、STC-1細胞の甘味応答には、T1R2/T1R3だけでなく他の受容体も関与している可能性がある。最近の研究で、味細胞や腸管に発現する glucose transporter (SGLT-1, GLUT2) が、T1R2/T1R3非依存性の甘味応答に関与していることが明らかにされた (Ma J. et al., 2009; Merigo F. et al., 2011; Yee KK. et al., 2011)。また、腸管内分泌細胞系の STC-1細胞にも SGLT-1 は発現している (Dyer J. et al., 1997)。つまり、STC-1細胞においても、この glucose transporter が T1R2/T1R3非依存性の甘味応答に関わっている可能性がある。

近年、レプチン受容体が視床下部だけでなく多くの末梢組織にも発現してい

ることが報告されている(Kieffer TJ. et al., 1996; Barrenetxe J. et al., 2002)。さらに、レプチンがそれらの末梢組織に作用することで、様々な生理機能を示すことが分かってきた。例えば、腸管は管腔側と基底側にレプチン受容体を発現しており、レプチンが吸収やホルモン分泌などの機能を調節している(Lostao MP. et al., 1998; Ducroc R. et al., 2005)。しかし、腸管でのレプチンの機能はまだよく分かっていない。ある研究では、管腔側に分泌されたレプチンが proton-dependent PepT1 transporter や facilitative glucose transporter GLUT5 を介したオリゴペプチドやフルクトースの吸収を上昇させることを明らかになっている(Buyse M. et al., 2001; Sakar Y. et al., 2009)。その一方で、他の研究では、管腔側や血中のレプチンが、SGLT-1 を介したグルコース吸収を阻害することを報告している(Lostao MP. et al., 1998; Ducroc R. et al., 2005; Iñigo C. et al., 2007)。さらに、このグルコース吸収阻害についても、レプチンが直接 SGLT-1 を調節しているという報告(Iñigo C. et al., 2007)がある一方で、CCK や GLP-1 を介して間接的に調節しているという報告もある(Anini Y. et al., 2003; Ducroc R. et al., 2005; Guilmeau S. et al., 2003)。このように腸管でのレプチンの作用について意見が分かれているが、これらの研究の多くは、マウスの血中レプチン濃度が平均で約 3.5ng/ml に対し高濃度 (1.6µg/ml) で長時間 (1 hour) レプチンを作用させていた。そこで、本研究では、生理的なレプチン濃度 (1~20ng/ml) かつ短時間 (5~30 min) での腸管内分泌細胞系 STC-1 細胞への影響を調べた。その結果、レプチンを添加すると STC-1 細胞の甘味物質に対する応答が有意に抑制され、その抑制効果は Ob-Rb 阻害剤によって消失した (図 4-5)。一方、他の味物質 (苦味、うま味、塩味) に対する応答には影響しなかった。このことから、レプチンはレプチン受容体を介して STC-1 細胞の甘味物質に対する応答を特異的に抑制することが示唆された。これらの結果は、レプチンが WT マウスの甘味物質に対する味神経や行動応答のみを特異的に抑制するが、レプチン受容体に変異を持つ db/db マウスでは観察されなかった

ことと一致する (Kawai K. et al., 2000; Shigemura N. et al., 2004)。つまり、腸管内分泌細胞は、味細胞同様にレプチンが甘味感受性を調節している標的部位であることが示唆された。

ではどのようにしてレプチンは、甘味感受性を低下させるのであろうか。近年、インスリン分泌細胞やグルコース感受性視床下部神経において、レプチンは phosphoinositide 3-kinase (PI3K)の活性化を介して、 K_{ATP} チャンネルの活性化に影響を与えることが報告されている。これにより、細胞の膜電位は過分極状態になり、細胞興奮性が低下する (Harvey J. et al., 1997; Ramshur EB. et al., 2002; Hegyi K. et al., 2004; Barr VA. et al., 1999)。 K_{ATP} チャンネルの構成要素の 1 つである SUR1 が味細胞の甘味感受性にも関与していることが知られているので (Yee KK. et al., 2001)、本研究では、レプチンによる甘味感受性抑制に対する K_{ATP} チャンネルの効果調べた。STC-1 細胞は SUR1 を発現しており、SUR 阻害剤グリベンクラミドを投与すると、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加した。さらに、このグリベンクラミドに対する応答はレプチンにより濃度依存的に抑制されたことから (図 7B-C)、レプチンが STC-1 細胞の K_{ATP} チャンネルの活性化に関与している事が示唆された。そして、 $10\mu M$ Gc 存在下では、レプチンによる Sucra 応答の抑制は阻害されたが、GABA や Sucra 応答自体には影響しなかった。これらの結果から、レプチンは K_{ATP} チャンネルを活性化させることで腸管内分泌細胞の甘味応答を抑制していることが示唆された。また、肝細胞においてレプチンが、phosphodiesterase 3B (PDE3B)を制御し cAMP レベルを低下させることで糖新生を阻害することも報告されている (Zhao AZ. et al., 2000)。これと同様の分子機構が STC-1 細胞内にも存在している可能性があるため、今後、レプチンによる甘味応答抑制についてさらに研究を進めていく必要がある。

げっ歯類を用いた研究で、グルコースによる腸管内分泌細胞の甘味受容体の活性化が、GLP-1 や GIP の分泌を促し、腸管内で SGLT-1 の発現を増加させるこ

とを明らかになっている(Jang HJ. et al., 2007; Margolskee RF. et al., 2007)。また、GIP を腸管の漿膜層に投与すると、SGLT-1 が増加することも報告された(Singh SK. et al., 2008)。これらの報告により、腸管内分泌細胞の甘味受容体が GLP-1 や GIP または他のホルモンの分泌を調節することで、腸管内の SGLT-1 発現や栄養物吸収を制御していることが示唆された。その一方で、この現象はヒトでの臨床試験では証明されていない(Renwick AG and Molinary SV., 2010; Gerspach AC. et al., 2011)。しかしながら、当研究室では、食後血糖値の上昇が食前の血中レプチン濃度や甘味認知閾値と逆相関していることをヒトの研究で報告した(Nakamura Y. et al., 2008)。この結果から、ヒトの食後血糖値が大きく上昇するときは、食前の血中レプチン濃度が低いため、甘味感受性が高くなっているときであることが考えられる。実際、本研究でも、STC-1 細胞において甘味物質に対する Ca^{2+} 応答と GLP-1 の分泌が、レプチンによって阻害されることを明らかにした。この本研究の結果と過去の報告から、レプチンが腸管内分泌細胞の甘味感受性を制御することによって腸管での栄養物の検知や吸収を調節していることが示唆された。つまり、空腹時に血中レプチン濃度が低下すると、レプチンによる甘味感受性抑制の効果が減弱するため、腸管内分泌細胞の甘味感受性が高まり、腸管でのグルコース吸収が増大すると仮定される。従って、腸管内分泌細胞の味覚システムに作用するレプチンは腸管での栄養物吸収を制御することで、摂食やエネルギーホメオスタシスの調節に関与するレプチンの中枢性作用を補助している可能性がある。

最近、当研究室では、摂食促進ホルモンとして知られるエンドカンナビノイド[anandamide (AEA) and 2-arachidonoly glycerol (2-AG)]がマウスの甘味感受性を増大させることを明らかにした(Yoshida R. et al., 2010)。さらに、2-AG はレプチンとは逆に、STC-1 細胞の甘味応答を特異的に増大させることも明らかとなってきた(unpublished)。今後、甘味感受性の調節に関するレプチンやエンドカンナビ

ノイドの作用分子を明らかにしていくことで、味覚や腸管吸収を標的とした肥満予防への新たなアプローチが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なご指導とご高配を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野・教授 二ノ宮裕三先生に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を通して、直接ご指導を賜りました、准教授 重村憲徳先生、助教 實松敬介先生に深く感謝申し上げます。また、多くのご助言、ご指導を頂きました講師 吉田竜介先生ならびに様々なご協力とご支援を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野の皆様にも心より御礼申し上げます。

参考文献

- Anini Y and Brubaker PL. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 52: 252-259, 2003
- Barr VA, Lane K and Taylor SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 274: 21426-21424, 1999
- Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Muñoz-Navas M, Barber A and Lostao MP. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut* 50: 797-802, 2002
- Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Péranzi G, Merlin D, Laburthe M, Lewin MJ, Rozé C and Bado A. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest* 108: 1483-1494, 2001
- Chen MC, Wu SV, Reeve JR Jr and Rozengurt E. Bitter stimuli induce Ca²⁺ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(4): C726-739, 2006
- Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M and Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes* 54: 348-354, 2005

Dyer J, Varro A, Dockray GJ and Shirazi-Beechey SP. The expression of sugar transporters in the endocrine cell line STC-1. *Biochem Soc Trans* 25(3): 478S, 1997

Geraedts MC, Troost FJ and Saris WH. Addition of sucralose enhances the release of satiety hormones in combination with pea protein. *Mol Nutr Food Res* 56: 4117-4424, 2012

Gerspach AC, Steinert RE, Schönenberger L, Graber-Maier A and Beglinger C. The role of the gut sweet taste receptor in regulating glp-1, PYY, and CCK release in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(2): E317–E325, 2011

Glassmeier G, Herzig KH, Höpfner M, Lemmer K, Jansen A and Scherubl H. Expression of functional GABA_A receptors in cholecystokinin secreting gut neuroendocrine murine STC-1 cells. *J Physiol* 510: 805-814, 1998

Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP and Bado A. Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin- cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 52: 1664-1672, 2003

Harvey J, McKenna F, Herson PS, Spanswick D and Ashford ML. Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1. *J Physiol* 504: 527-535, 1997

Hegyí K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S and Falus A. Leptin-induced signal transduction

pathways. *Cell Biol Int* 28: 159-169, 2004

Iñigo C, Patel N, Kellett GL, Barber A and Lostao MP. Luminal leptin inhibits intestinal sugar absorption in vivo. *Acta Physiol* 190; 303-310, 2007

Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF and Egan JM. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(38): 15069-15074, 2007

Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H and Ninomiya Y. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11044-11049, 2000

Kieffer TJ, Heller RS and Habener JF. Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 522-527, 1996

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI and Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635, 1996

Lostao MP, Urdaneta E, Martínez-Ansó E, Barber A and Martínez JA. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett* 423: 302-306, 1998

Ma J, Bellon M, Wishart JM, Young R, Blackshaw LA, Jones KL, Horowitz M and

Rayner CK. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G735-G739, 2009

Maillet EL, Pelletier L, Cardozo TJ, Quijada J, Silie P, Zhao B, Ninomiya Y, Max M and Margolskee RF. Gurmarin inhibits the sweet receptor by binding to the Venus fly trap module of T1R3 (Abstract). *Chem Senses* 34: A78, 2009

Mangel AW, Prpic V, Wong H, Basavappa S, Hurst LJ, Scott L, Garman RL, Hayes JS, Sharara AI, Snow ND, et al. Phenylalanine-stimulated secretion of cholecystokinin is calcium dependent. *Am J Physiol* 268: G90-94, 1995

Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B and Shirazi-Beechey SP. 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, 2007

McLaughlin JT, Lomax RB, Hall L, Dockray GJ, Thompson DG and Warhurst G. Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca²⁺-dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. *J Physiol* 513: 11-18, 1998

Merigo F, Benati D, Cristofolletti M, Osculati F and Sbarbati A. Glucose transporters are expressed in taste receptor cells. *J Anat* 219: 243-252, 2011

Nakamura Y, Sanematsu K, Ohta R, Shirosaki S, Koyano K, Nonaka K, Shigemura N and Ninomiya Y. Diurnal variation of human sweet taste recognition thresholds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes* 57(10): 2661-2665, 2008

Némoz-Gaillard E, Cordier-Bussat M, Filloux C, Cuber JC, Van Obberghen E, Chayvialle JA and Abello J. Bombesin stimulates cholecystokinin secretion through mitogen-activated protein –kinase-dependent and –independent mechanisms in the enteroendocrine STC-1 cell line. *Biochem J* 331: 129-135, 1998

Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H and Nagamatsu S. Imaging exocytosis of single glucagon-like peptide-1 containing granules in a murine enteroendocrine cell line with total internal reflection fluorescent microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 16-20, 2009

Ramshur EB, Rull TR and Wice BM. Novel insulin/GIP co-producing cell lines provide unexpected insights into gut K-cell function in vivo. *J Cell Physiol* 192: 339-350, 2002

Renwick AG and Molinary SV. Sweet-taste receptors, low-energy sweeteners, glucose absorption and insulin release. *Br J Nutr* 104(10): 1415–1420, 2010

Saitoh O, Hirano A and Nishimura Y. intestinal STC-1 cells respond to five basic taste stimuli. *Neuroreport* 18: 1991-1995, 2007

Sakar Y, Nazaret C, Lettéron P, Ait Omar A, Avenati M, Viollet B, Ducroc R and Bado A. Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5

transporters links to hepatic metabolic function. *PLoS One* 4: e7935, 2009

Salomon G, Niv-Spector L, Gussakovsky EE and Gertler A. Large-scale preparation of biologically active mouse and rat leptins and their L39A/D40A/F41A muteins which act as potent antagonists. *Protein Expr Purif* 47: 128-136, 2006

Shigemura N, Ohta R, Kusakabe Y, Miura H, Hino A, Koyano K, Nakashima K and Ninomiya Y. Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology* 145: 839-847, 2004

Singh SK, Bartoo AC, Krishnan S, Boylan MO, Schwartz JH and Michael Wolfe M. Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulates transepithelial glucose transport. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2412-2416, 2008

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA and Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell* 83: 1263-1271, 1995

Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J and Rozengurt E. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 2392-2397, 2002

Yee KK, Sukumaran SK, Kotha R, Gilbertson TA and Margolskee RF. Glucose transporters and ATP-gated K⁺ (KATP) metabolic sensors are present in type 1 taste

receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5431-5436, 2001

Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF and Ninomiya Y. Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2): 935-939, 2010

Young SH, Rey O, Sternini C and Rozengurt E. Amino acid sensing by enteroendocrine STC-1 cells: role of Na⁺-coupled neutral amino acid transporter 2. *Am J Cell Physiol* 298: C1401-C1413, 2010

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994

Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA and Bornfeldt KE. Leptin induces insulin-like signalling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem* 275: 11348-11354, 2000