

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09375

研究課題名(和文) グルコース感知受容体の機能解明：グルコース作用の新たな理解にむけて

研究課題名(英文) Functional elucidation of glucose sensing receptor: toward new understanding of glucose action

研究代表者

中川 祐子 (Nakagawa, Yuko)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90422500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： グルコースはインスリン分泌を調節する最も重要な因子で、その作用機序については未だ不明な点も少なくない。申請者は膵細胞においてグルコース刺激わずか数秒以内に様々な細胞内セカンドメッセンジャーが活性化されることを明らかにしてきた。この素早い応答は代謝を介した応答とは異なり、代謝阻害剤存在下においても抑制されず、非代謝性のグルコースアナログでも再現できた。したがって一連の素早い応答は「グルコース代謝非依存的な応答」であることが考えられる。また、これらのシグナル応答の一部は T1R3とCalcium Sensing Receptorを介していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Glucose is the most important factor regulating insulin secretion, and its mechanism of action is still unknown. We have revealed that various intracellular second messengers are activated within only a few seconds of glucose stimulation in pancreatic cells. Unlike the response via metabolism, this rapid response was not suppressed even in the presence of a metabolic inhibitor and could be reproduced with non-metabolic glucose analogs. Therefore, it is conceivable that a series of quick response is "a glucose metabolism-independent response". It also revealed that some of these signal responses are via T1R3 and Calcium Sensing Receptor.

研究分野：生理学

キーワード：グルコース インスリン

1. 研究開始当初の背景

インスリンは糖代謝を調節するもっとも重要なホルモンで、その作用不全は糖尿病を招来する。我が国における糖尿病患者数は増加の一途をたどり、社会的にも大きな問題となっている。我が国の糖尿病患者の大半はインスリン分泌不全を特徴とする2型糖尿病であることから、インスリン分泌調節の全容を解明することは有効な治療法を開発するためにも重要な課題である。インスリン分泌を調節する最も重要な因子はグルコースで、その作用機構に関してはこれまで多くの研究がなされてきた。現在、一般に認められている定説では、グルコースはGlut2を介して細胞内に取り込まれ、解糖系により代謝される。このとき産生されたATPあるいはATP/ADPの濃度比が増加することでATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)が抑制され、脱分極が起きる。これにより電位依存性Ca²⁺チャネルが活性化され細胞内Ca²⁺が上昇する。これがインスリン顆粒の開口放出を引き起こす。この他にもK_{ATP}チャネルを介さない経路が存在するが、いまだ不明な点も少なくない。

2. 研究の目的

申請者は膵細胞のセカンドメッセンジャーの動態を可視化する測定系を確立し、その鋭敏な測定系を用いてグルコース応答性のシグナル伝達機構を解析してきた。その結果、膵細胞の培養細胞株であるMIN6細胞においてグルコース刺激わずか数秒以内に細胞内Ca²⁺およびcAMPの上昇、ジアシルグリセロール(DAG)の産生亢進またプロテインキナーゼC(PKC)によるリン酸化の増強が惹起された。この素早い応答は従来知られているグルコースの代謝を介した応答とは異なり、代謝阻害剤存在下においても抑制されず、非代謝性のグルコースアナログでも再現できた。したがって一連の素早い応答は「グルコース代謝非依存的な応答」であることが考えられる。また、これらのシグナル応答の一部はG

タンパク質共役受容体(GPCR)であるTaste receptor type 1 member 3(T1R3)を介していることが明らかとなった。マウスの膵灌流実験においてT1R3の阻害剤グルマリンによりグルコース応答性インスリン分泌の第一相目ばかりでなく、第二相目も抑制することが明らかになった。またMIN6細胞の検討からグルコースによりグルコース感知受容体を活性化させるとATP産生が促進されることも分かった(Endocr. J., 61: 2, 2014)。このようにT1R3はグルコースを感知する受容体であることから、以降T1R3をグルコース感知受容体として検討を行う。そこで本研究では、膵細胞に発現するグルコース感知受容体の機能解明を行い、グルコース作用の新たな理解を目指す。

3. 研究の方法

膵細胞においてグルコースは、Glut2を介して細胞内に流入する経路の他に、グルコース感知受容体を介して多様なシグナルを発生させ、代謝を促進し、ATP産生量を増強させ、最終的にインスリン分泌を促す。申請者は新規のグルコース応答性インスリン分泌の制御機構の解明を目指し、1. T1R3koを用いて、グルコース感知受容体より発生するシグナルの全貌を明らかにし、2. グルコース感知受容体と共役するGタンパク質の同定を行なった。具体的な方法を以下に示す。予備検討としてMIN6細胞を用いた検討により、非代謝性のグルコース応答に関連するシグナル伝達を同定した。主なシグナル因子はCa²⁺、cAMP、ジアシルグリセロール(DAG)およびプロテインキナーゼC(PKC)である。WTおよびT1R3koの単離細胞を用いた検討でも同様の結果が得られるか、またこれらのシグナル発生にグルコース感知受容体が関与するか否かを検討した。申請者は、膵細胞の細胞膜にグルコースにより活性化される受容体が存在し、グルコース誘発性インスリン分泌、特にその初期相において重要な働きをし

ていることを明らかにしてきた (Hamano, K., et al., J. Diab. Invest., 2015)。しかし、この分子実体については甘味受容体であるT1R3が一部その機能を担うことを報告した (Nakagawa, Y., et al., PLOS ONE, 2015)、完全な理解には至っていない。そこで本研究では新たなグルコース感知受容体を探索すべくHEK293細胞を用いてスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) グルコース誘発性Ca²⁺シグナルにおけるグルコース感知受容体の関与

マウス単離膵島を用いてグルコース応答性のCa²⁺変化を測定した。WTと比較してT1R3koではCa²⁺上昇までのタイムラグの延長、および強度の減弱が見られた。以上の結果は、T1R3がグルコース誘発性Ca²⁺応答の一部を担う分子であることを示唆している。

(2) HEK-CaSRにおけるCa²⁺誘発性Ca²⁺応答
グルコース応答性受容体として機能するT1R3はGタンパク質共役受容体 (GPCR) である。GPCRの多くは2量体を形成し機能すると言われている。そこでT1R3と共に機能するGPCRの探索を行なった。膵細胞に発現し、T1R3と同じタイプCに属するGPCRとしてカルシウム感知受容体 (CaSR) が存在することが分かった。このCaSRの分子機能を解析するためにHEK293細胞にヒトCaSRを発現させ、CaSRを恒常的に発現するstable cell lineを取得した (HEK-CaSR)。HEK-CaSRにおけるCaSRの発現をwestern blotting法により検討した (図1A)。図1に示すようにHEK-CaSRはコントロールに比べ有意に発現していた。また蛍光免疫染色法の検討によりHEK-CaSRではCaSRが形質膜に発現していることが分かった (図1B)。

次にHEK-CaSRのCa²⁺動態をCa²⁺インジケーターであるfluo-8を用いて検討した。細胞外Ca²⁺濃度が2.5 mMのときHEK-CaSRではCa²⁺オシレーションが観察された (図2A)。これに

対し細胞外Ca²⁺濃度が0 mMのときCa²⁺オシレーションは消失した (図2B)。CaSRのアゴニストであるcinacalcetにより一過的なCa²⁺上昇が観察された。以上のことよりHEK-CaSRはCa²⁺およびcinacalcetによりCa²⁺上昇を示すことが分かった。

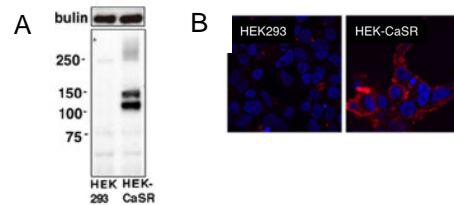


図1. HEK-CaSR における CaSR の発現

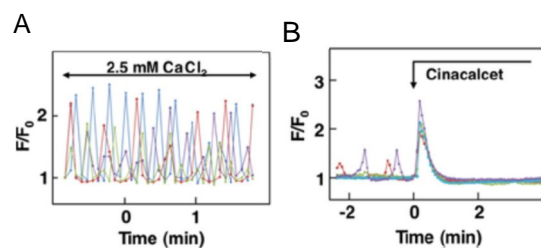


図2. HEK-CaSR の Ca²⁺ 応答

(3) HEK-CaSRにおけるグルコース誘発性Ca²⁺応答

HEK-CaSRは細胞外Ca²⁺濃度が1.3 mMの時Ca²⁺オシレーションを示す。HEK-CaSRを25 mM Glucoseで刺激することによりCa²⁺の一過的な上昇が観察された (図3 A)。これに対しHEK293では25 mM Glucoseにより細胞内Ca²⁺濃度に変化は見られなかった (図3 B)。様々な濃度のグルコースでHEK-CaSRを刺激し、そのCa²⁺応答を検討した結果、HEK-CaSRはグルコースの濃度依存的にCa²⁺応答を示すことが分かった (図3 D)。CaSRがGタンパク質サブユニットのGqと共役するかどうかを確かめるために、Gqの阻害剤であるYM254890を用いて検討した。その結果、YM254890存在下でHEK-CaSRを25 mM Glucoseで刺激すると細胞内Ca²⁺濃度の一過的な上昇が消失した (図3 E)。また、グルコース誘発性Ca²⁺応答にPKCが関与しているかどうかを確かめるためにMARKS-GFPを用いて検討を行なった。その結果、5 mM Glucoseで刺激することにより、MARCKS-GFP

の局在が変化した(図3F)。以上のことより、CaSRはGqを介してグルコース誘発性Ca²⁺応答を示す。また、この時発生したシグナル伝達パスウェイにはPKCの活性化が含まれていることが示唆された。

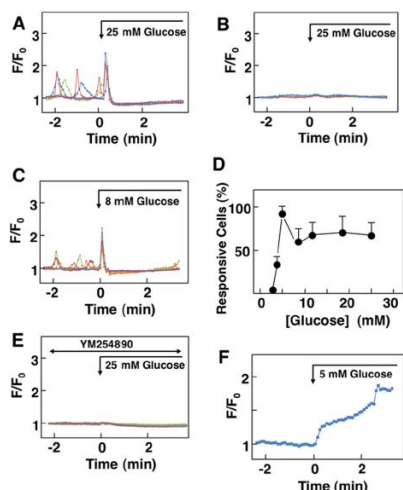


図 3. HEK-CaSR のグルコース誘発性 Ca²⁺ 応答

(4) HEK-CaSRにおけるグルコース誘発性 cAMP 応答

HEK-CaSRでのcAMP動態を測定するためにcAMP indicatorであるFlamindo2を使用した。図4 Aで示すように、cAMP活性化剤であるForskolinによりcAMPが一過的に上昇した。次にHEK-CaSRに5 mM Glucoseで刺激するとcAMPが持続的に低下した。同様にCaSRのアゴニストであるcinacalcetや人工甘味料であるsucraloseで刺激するとcAMPが持続的に低下した。CaSRの阻害剤であるNPS-2143存在下で5 mM Glucoseで刺激するとcAMPの持続的な低下が抑制された。さらにGiの阻害剤であるPTX存在下で5 mM glucoseで刺激するとcAMPの低下が抑えられた。以上のことよりCaSRをグルコースで刺激することにより、Giを介してcAMPの持続的な低下が誘導されることが示唆された。

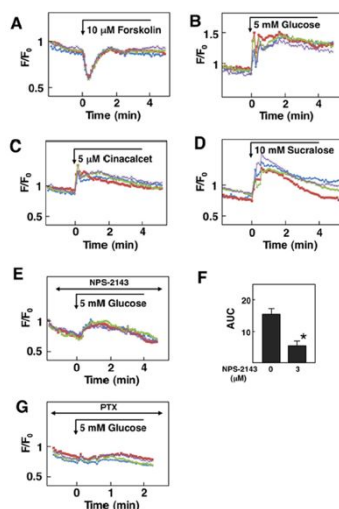


図 4. HEK-CaSR のグルコース誘発性 cAMP 応答

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Kojima, I., Medina J., and Nakagawa, Y. Role of the glucose-sensing receptor in insulin secretion. *Diabetes Obes. Metab.*, 査読有, Suppl 1:54-62. (2017).

Masubuchi, Y., Nakagawa, Y., Medina, J., Nagasawa, M., Kojima, I., Rasenick, M. M., Inagaki, T., and Shibata, H. T1R3 homomeric sweet taste receptor regulates adipogenesis through Gs-mediated microtubules disassembly and Rho activation in 3T3-L1 cells. *PLoS One*, 査読有, e0176841. (2017).

Medina, J., Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Fernandez, A., Sakaguchi, K., Kitaguchi, T., and Kojima, I. Positive Allosteric Modulation of the Calcium-sensing Receptor by Physiological Concentrations of Glucose. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 291 (44): 23126-23134. (2016).

〔学会発表〕(計 5件)

中川祐子(代表), 濱野邦久, 長澤 雅裕, 小島至. グルコースが産生する細胞内シグナルの再検討: グルコース感知受容体を介するシグナルの解明. 日本糖尿病学会. 2015.

中川 祐子(代表), ヨハン メディナ, 小島 至. T1R3/CaSR ヘテロダイマーはグルコース感知受容体として機能する. 日本糖尿病学会. 2016.

李 龍飛, 大津 義晃, 中川 祐子(代表), 小島 至. グルコース感知受容体を介する代謝促進機構. 日本糖尿病学会. 2016.

ヨハン・メディナ, 中川 祐子(代表), 小島 至. T1R3 ホモダイマーの機能解析. 日本糖尿病学会. 2017.

中川 祐子(代表), ヨハン・メディナ, 藤谷 与士夫, 小島 至. グルコース感知受容体の分子実体の解明: CaSR ノックアウト細胞を用いた検討. 日本糖尿病学会. 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 祐子 (NAKAGAWA, Yuko)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号: 90422500

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

(4) 研究協力者 ()