

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09026

研究課題名（和文）グルタミン酸シグナルによるインスリン開口分泌制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of the regulation of insulin granule exocytosis by glutamate signaling in beta-cells

研究代表者

武倉 アブドグプル（Bughra, Abdughapur）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70750488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食後に腸管から分泌されるインクレチンはcAMPシグナルを介してグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するが、代表者らはこれまでに細胞質のグルタミン酸がこの作用に重要であることを見いだしている。本研究ではインスリン顆粒の比較プロテオミクスにより得られたcAMP/グルタミン酸シグナルによる開口分泌に関与しうる候補分子を同定するとともに、細胞内におけるグルタミン酸によるインスリン分泌増強の新たなメカニズムを明らかにした。これらの結果から、グルタミン酸は膵細胞内で複数の機序によりインスリン分泌を増強するシグナルとして機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、糖尿病治療において、インクレチン作用を利用したインクレチン関連薬が標準的な治療薬となっており重要な位置を占めている。本研究の成果はインクレチン関連薬の作用機序の解明に繋がることから、本治療薬の新たな可能性や治療抵抗性の症例に対しても有効な治療法の発見が期待できることから、意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Incretins are secreted from enteroendocrine cells upon meal ingestion and potentiate glucose-induced insulin secretion (GIIS) from pancreatic β -cell through cAMP signaling. We previously found that cytosolic glutamate mediates action of incretin/cAMP in insulin secretion. In this study, we aimed to elucidate the mechanisms by which glutamate mediates incretin/cAMP action in β -cell. From comparative proteomic analysis of insulin granule, candidate proteins that are possibly associated with exocytosis induced by glutamate were identified. The investigation of mechanism by which glutamine amplifies insulin secretion revealed that intracellular glutamate converted from glutamine by glutaminase amplified GIIS through elevation of intracellular Ca^{2+} level without further conversion to α -ketoglutarate, which is the mechanism different from previously known. These results suggest that intracellular glutamate promotes insulin secretion through multiple mechanisms in pancreatic β -cell.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：インスリン分泌 インクレチン グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞からのインスリン分泌は、種々の刺激により精密に調節され、血糖を正常範囲に維持する。インスリン分泌障害は糖尿病の発症および病態に深く関与しており、主要な治療標的である。したがって、インスリン分泌調節機構の解明は糖尿病の克服のため極めて重要な課題である。

グルコースはインスリン分泌を惹起する主要な刺激であるが、他にもインスリン分泌は神経入力やホルモン等、様々な刺激の調節を受ける。特に、インクレチン (GLP-1, GIP) は生理的に重要である。インクレチンは、食事摂取に応じて消化管内分泌細胞より分泌され、膵β細胞の cAMP シグナルを介して血糖依存的にインスリン分泌を増強することにより、食後高血糖を抑制する。インクレチン/cAMP シグナルが血糖依存的にインスリン分泌を増強する機序として、膵β細胞内のグルコース代謝と cAMP 作用の何らかの相互作用が予想されてきたが、これまでその詳細は不明であった。代表者らは、グルタミン酸がグルコース代謝と cAMP 作用を結びつける鍵シグナルとして機能することを発見した。すなわち、グルコース代謝の過程で aspartate aminotransferase 1 (AST1) により産生されたグルタミン酸が、インクレチン/cAMP シグナルにより小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) を介してインスリン顆粒内に取り込まれ、インスリン分泌が促進されることを示した (Cell Rep, 2014; PLoS One, 2017)。しかし、インスリン顆粒内に取り込まれたグルタミン酸がどのようにしてインスリン分泌を増強するのかは依然として不明である。「分泌顆粒内のグルタミン酸がどのようなメカニズムで開口放出を増強するのか」という「問い」は、インクレチン/cAMP シグナルによるインスリン分泌増強機構を解明するために最も核心をなす学術的な「問い」である。

2. 研究の目的

本研究では「グルタミン酸によるインスリン開口分泌制御機構の解明」を目的とする。

3. 研究の方法

1) インクレチン/cAMP/グルタミン酸シグナルで変動する顆粒タンパク質のインスリン分泌における機能の解明

インクレチン/cAMP 刺激とグルタミン酸刺激で共通して変動するインスリン顆粒タンパク質を同定するために、密度勾配を用いたインスリン分泌細胞株 MIN6 からのインスリン顆粒の単離・精製法と安定同位体標識アミノ酸を用いた比較プロテオーム解析 (SILAC 法) を組み合わせた解析を行った。この解析から同定された候補タンパク質について、遺伝子ノックダウンなどにより機能解析を行った。

2) グルタミンによるインスリン分泌促進作用の解析

グルタミン酸によるインスリン分泌特性は明らかになっていない。グルタミン酸は細胞膜をほとんど透過しないことから、細胞内でグルタミン酸に変換されるグルタミンでβ細胞を刺激したときのインスリン分泌特性を調べた。

4. 研究成果

1) インクレチン/cAMP/グルタミン酸シグナルで変動する顆粒タンパク質のインスリン分泌における機能の解明

インクレチン応答性を有するインスリン分泌細胞株である MIN6-K8 細胞を安定同位体アミノ酸により標識した後、GLP-1、8-Br-cAMP、ジメチルグルタミン酸 (dmGlu) で刺激し、インスリン顆粒画分を精製して質量分析による解析を行った。その結果、インスリン顆粒画分中で各刺激により増減が認められるタンパク質がそれぞれ 15~96 程度、合計で 300 以上同定された。

この中で、特に開口分泌に関与することが知られている分子としては、V-ATPase のサブユニットおよび VAMP などがインスリン顆粒画分での増減が認められた。これらの分子は siRNA によるノックダウンによりグルコース応答性インスリン分泌およびインクレチン/cAMP によるインスリン分泌がともに減弱した。今後は、グルタミン酸シグナルによるインスリン開口分泌におけるこれらの分子の関与をより詳細に検討する必要がある。

2) グルタミンによるインスリン分泌促進作用の解析

グルタミン酸によるインスリン分泌特性は明らかになっていない。グルタミン酸は通常は β 細胞膜をほとんど透過しないため、細胞内でグルタミン酸に変換されるグルタミンで β 細胞を刺激したときのインスリン分泌特性を詳細に調べた。

グルタミンによるインスリン分泌は濃度依存的であり、またグルコース濃度依存的であった。グルタミンによるインスリン分泌についてのメカニズムについては、これまでの報告から、主に低濃度グルコース下で、 β 細胞内に取り込まれたグルタミンがグルタミナーゼ (G1s) によりグルタミン酸に変換され、さらにそれがグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) によって α -ケトグルタル酸に変換されて TCA 回路に供給されることで ATP 産生を促し、インスリン分泌を促進するメカニズムがよく知られていた。我々の検討では、 β 細胞の G1s のノックダウンによりグルタミンによるインスリン分泌は顕著に減弱するが、GDH 欠損細胞株においてもグルタミンによるグルコース応答性インスリン分泌 (GIIS) の増強が認められた。さらに、グルタミン刺激により、細胞質のグルタミン酸濃度が著しく増加するが、これが G1s の阻害によりほぼ消失することから、高濃度グルコース下ではグルタミンは細胞質で G1s によりグルタミン酸に変換され、その後 α -ケトグルタル酸に変換されることなくインスリン分泌を促進することが示唆された。

次に、グルタミン刺激が細胞内カルシウム濃度変化に及ぼす影響について検討した。高濃度グルコース刺激によって β 細胞内のカルシウム濃度が上昇するが、グルタミン刺激の追加により、さらなるカルシウム濃度の上昇が認められた。また、このグルタミンの効果は G1s の阻害やノックダウンによってほぼ消失すること、および GDH 欠損細胞においてもグルタミンによるカルシウム濃度上昇の効果が認められることから、細胞内のグルタミン酸がカルシウム濃度上昇に寄与していることが示唆された。また、このグルタミンの効果は電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤存在下および細胞外カルシウム非存在下ではほとんど消失することから、グルタミンによる細胞内カルシウム濃度上昇は細胞外からのカルシウム流入に依存していることが明らかになった。

以上の結果から、高濃度グルコース存在下では、グルタミンは β 細胞内でグルタミン酸に変換され、細胞内カルシウム濃度の上昇を介してインスリン分泌を増強することが明らかになった (図)。

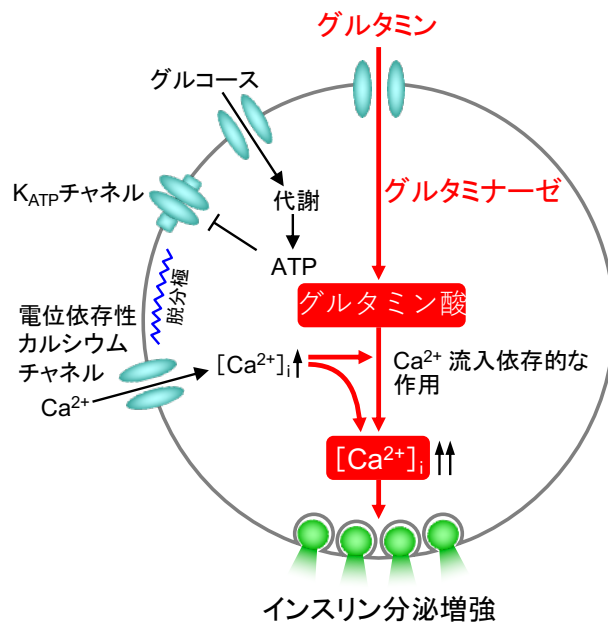


図 高濃度グルコース下におけるグルタミン酸を介したインスリン分泌増強のメカニズム

以上の結果から、細胞質のグルタミン酸は、インスリン顆粒における開口分泌関連分子との相互作用のほかに、細胞内カルシウム濃度上昇を介したメカニズムを介してインスリン分泌を増強することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Murao N, Yokoi N, Takahashi H, Hayami T, Minami Y, Seino S	4. 巻 55
2. 論文標題 Increased glycolysis affects β -cell function and identity in aging and diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Metabolism	6. 最初と最後の頁 101014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2021.101414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida M, Yokoi N, Takahashi H, Hatano N, Hayami T, Ogawa W, Seino S	4. 巻 605
2. 論文標題 O-GlcNAcylation of myocyte-specific enhancer factor 2D negatively regulates insulin secretion from pancreatic β -cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 90-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayami Tomohide, Yokoi Norihide, Yamaguchi Takuro, Honda Kohei, Murao Naoya, Takahashi Harumi, Wang Shujie, Seino Yusuke, Kamiya Hideki, Yabe Daisuke, Sweet Ian R, Mizoguchi Akira, Nakamura Jiro, Seino Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor like features of gene expression and metabolic profiles in enlarged pancreatic islets are associated with impaired incretin induced insulin secretion in obese diabetes: A study of Zucker fatty diabetes mellitus rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1434 ~ 1447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Oduori Okechi S., Murao Naoya, Shimomura Kenju, Takahashi Harumi, Zhang Quan, Dou Haiqiang, Sakai Shihomi, Minami Kohtarō, Chanclon Belen, Guida Claudia, Kothegala Lakshmi, Tolo Johan, Maejima Yuko, Yokoi Norihide, Minami Yasuhiro, Miki Takashi, Rorsman Patrik, Seino Susumu	4. 巻 130
2. 論文標題 Gs/Gq signaling switch in β cells defines incretin effectiveness in diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 6639 ~ 6655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI140046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Han Guirong, Takahashi Harumi, Murao Naoya, Gheni Ghupurjan, Yokoi Norihide, Hamamoto Yoshiyuki, Asahara Shun ichiro, Seino Yutaka, Kido Yoshiaki, Seino Susumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Glutamate is an essential mediator in glutamine amplified insulin secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高橋晴美、オドゥオリ オケチ、清野 進	4. 巻 276(5)
2. 論文標題 インスリン分泌機構 - 糖尿病の膵 細胞におけるGタンパク質シグナル変換の意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 364-370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi H, Yokoi N, Seino S	4. 巻 95(6)
2. 論文標題 Glutamate as intracellular and extracellular signals in pancreatic islet functions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.	6. 最初と最後の頁 246-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.95.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Denwood G, Tarasov A, Salehi A, Vergari E, Ramracheya R, Takahashi H, Nikolaev VO, Seino S, Gribble F, Reimann F, Rorsman P, Zhang Q	4. 巻 151(9)
2. 論文標題 Glucose stimulates somatostatin secretion in pancreatic δ -cells by cAMP-dependent intracellular Ca^{2+} release.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gen Physiol	6. 最初と最後の頁 1094-1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201912351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayami T, Yokoi N, Yamaguchi T, Honda K, Murao N, Takahashi H, Wang S, Seino Y, Kamiya H, Yabe D, Sweet IR, Mizoguchi A, Nakamura J, Seino S	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor-like features of gene expression and metabolic profiles in enlarged pancreatic islets are associated with impaired incretin-induced insulin secretion in obese diabetes: a study of ZFDM rat.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 村尾 直哉、横井 伯英、高橋 晴美、清野 進
2. 発表標題 細胞内NAD代謝の変容が瞬 細胞老化を制御する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋晴美、オドゥオリ オケチ、村尾直哉、清野 進
2. 発表標題 Gs/Gq signaling switch in diabetic β -cells
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 インスリン分泌の分子機構の解明と今後の展望
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoya Murao, Norihide Yokoi, Harumi Takahashi, Susumu Seino
2. 発表標題 Metabolic Shift to Cytosolic NAD Production Regulates β -cell Function in Aging and Diabetes
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 舞、横井伯英、波多野直哉、速水智英、高橋晴美、小川 渉、清野 進
2. 発表標題 インクレチン応答性インスリン分泌障害に関与する候補タンパク質の同定
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 権 映月、高橋晴美、村尾直哉、清野 進
2. 発表標題 Improvements of hyperglycemia and insulin secretion by chronic imeglimin treatment in an obese diabetes model KK-Ay mice
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村尾直哉、横井伯英、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 細胞内NAD代謝の変容が膵 細胞老化を制御する β -SAMP1, SAMR1系統を用いた検討-
3. 学会等名 第36回老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋晴美、藤原結花、堰 千紘、横井伯英、清野 進
2. 発表標題 新規Epac2アイソフォームの膵 細胞機能における役割
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 韓 桂栄、高橋晴美、村尾直哉、ゲニ グブルジャン、太田新菜、浜本芳之、清野 裕、横井伯英、木戸良明、清野 進
2. 発表標題 グルタミンによるインスリン分泌増強機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村尾直哉、横井伯英、速水智英、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 耐糖能ならびに膵 細胞機能の加齢性変化の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 舞、横井伯英、速水智英、高橋晴美、小川 渉、清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病の膵島における、タンパク質のO-結合型糖鎖修飾に関連したインクレチン応答性障害の機序の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井伯英、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 SGLT阻害剤の全身の糖代謝に及ぼす作用の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村尾直哉, 横井伯英, 高橋晴美, 清野 進
2. 発表標題 耐糖能および膵 細胞機能の加齢性変化の解明 -SAMP1, SAMR1, B6J系統を用いた検討-
3. 学会等名 第35回老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Norihide Yokoi, Harumi Takahashi, Susumu Seino
2. 発表標題 Role of glutamate signaling in insulin secretion.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 舞, 横井伯英, 速水智英, 川畑綾子, 高橋晴美, 小川涉, 清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病における膵島機能不全の機序の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okechi S Oduori , Kenju Shimomura , Harumi Takahashi , Shihomi Hidaka , Naoya Murao , Norihide Yokoi , Susumu Seino
2. 発表標題 Enhanced β -cell Gq signal underlies improved insulin secretion and glucose tolerance by GLP-1 in Kir6.2 KO diabetic mice.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guirong Han, Harumi Takahashi, Norihide Yokoi, Ghupurjan Gheni, Naoya Murao, Yutama Seino, Yoshiyuki Hamamoto, Yoshiaki Kido, Susumu Seino
2. 発表標題 Role of glutamine/glutamate signaling in insulin secretion.
3. 学会等名 The 11thScientific Meeting of the AASD in conjunction with The 62nd Annual Meeting of the Japan Diabetes Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohide Hayami, Norihide Yokoi, Kohei Honda, Harumi Takahashi, Hideki Kamiya, Akira Mizoguchi, Jiro Nakamura, Susumu Seino
2. 発表標題 Tumor-like metabolic feature of enlarged pancreatic islets underlies incretin unresponsiveness in obese type 2 diabetes.
3. 学会等名 The 11thScientific Meeting of the AASD in conjunction with The 62nd Annual Meeting of the Japan Diabetes Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Susumu Seino, Naoya Murao, Harumi Takahashi, Okechi S Oduori
2. 発表標題 How can we improve insulin secretion of diabetic-beta-cells?
3. 学会等名 International Diabetes Federation Congress 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihide Yokoi, Tomohide Hayami, Mai Yoshida, Harumi Takahashi, Yukio Taniguchi, Susumu Seino
2. 発表標題 Elucidation of genetic factors and pathogenesis of obese diabetes: Study of ZFDM rat.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 速水智英、横井伯英、吉田 舞、本田洸平、高橋晴美、神谷英紀、溝口 明、中村二郎、清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病の豚島におけるインクレチン応答性障害の発症機序
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高橋 晴美 (Takahashi Harumi) (50546489)	神戸大学・医学研究科・特命准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------