

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790200

研究課題名（和文）甘味受容体を介した新規インスリン分泌機構の解明

研究課題名（英文） Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells is Involved in Novel Insulin Secretion Pathway

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

研究成果の概要（和文）：

申請者は膵 β 細胞のシグナル伝達に関与する複数のセカンドメッセンジャーを、単一細胞でしかも同時に可視化する測定系を確立し、その鋭敏な測定系を用いて β 細胞におけるシグナル伝達機構の解析を行った。その結果、グルコース刺激に応答して Ca^{2+} 、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) の活性化が瞬時に起こることを観察した。興味深いことにこれらの応答はグルコース代謝非依存的で、従来考えられてきた代謝依存的応答とは異なる新規メカニズムが存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the signal transmission mechanism in the β cell using the sharp system of measurement. As a result, we observed activation of Ca^{2+} , cAMP, diacylglycerol (DAG) and protein kinase C (PKC) being generated instantly in response to glucose stimulation. The response clarified that the new mechanism that was different from the metabolism-dependent reply that had been thought about conventionally in a glucose metabolism-independent object existed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：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。このとき産出されたATPあるいはATP/ADPの濃度比が増加することでATP感受性 K^+ チャンネル(K_{ATP} チャンネル)が抑制され、脱分極が起きる。これにより電位依存性 Ca^{2+} チャンネル(VDCC)が活性化され細胞内 Ca^{2+} 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} チャンネルを介さない経路の存在が明らかになるなどいまだ明らかでない点も少なくない。申請者は、味蕾に発現する甘味受容体が膵 β 細胞にも発現し機能していることを明らかにし報告した(PLoS One, 4: e5106, 2009)。甘味受容体はCタイプのGタンパク質共役型レセプターT1R2とT1R3の二量体である。この甘味受容体はグルコースを感知することから、甘味受容体が β 細胞におけるグルコースの感知に関与することが期待される。

2. 研究の目的

(1) 甘味受容体による細胞内シグナル伝達機構の詳細を明らかにし、グルコース誘発性インスリン分泌に甘味受容体に関与するか否かを明らかにする。申請者はこれまで β 細胞における甘味受容体のシグナル伝達を検討し、細胞内 Ca^{2+} の二相性の上昇とcAMPの持続的な上昇およびPKC活性化が起きることを明らかにしてきた。これらのメッセンジャー産生の分子基盤、具体的には関与するG蛋白、イオンチャンネルの同定、シグナル伝達

経路の詳細を検討する。次に、甘味受容体シグナルがグルコース作用に関与するかを、受容体アンタゴニストの投与、受容体やG蛋白のノックダウンなどにより検討する。とくに上述のグルコースによる素早い反応に着目し、これに甘味受容体に関与するかを明らかにする。

(2) 膵 β 細胞における甘味受容体の生理的意義を明らかにする。味蕾において甘味受容体は糖や甘味料を感知している。内臓である β 細胞は何を感知するのだろうか。上述のグルコース以外にも内因性のアゴニストが存在する可能性がある。とくにT1Rファミリーは複数の部位に多様な構造のリガンドを結合することができ、アミノ酸や糖、など多様な化合物を認識できる。糖代謝や脂質代謝、ヌクレオチドなどの代謝産物などがリガンドになる可能性がある。そこで、CHO細胞にT1R2+T1R3を発現させ、この系を用いて様々な代謝産物などをスクリーニングし、有効なリガンドを同定する。さらに甘味受容体ノックアウトマウスを用いて、 β 細胞の甘味受容体欠失により生体の糖代謝がどのように変化するかなどを明らかにする。これらを通じて、 β 細胞における甘味受容体の生理的意義を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 甘味受容体を介したシグナル伝達経路の解析 既に申請者は膵 β 細胞に発現する甘味受容体を刺激すると Ca^{2+} とcAMPの増加が起こることなどを報告している(PLoS One, 4: e5106, 2009)。この甘味受容体シグナル伝達の詳細を明らかにするため以下の検討を行う。これまでの検討により甘味受容体アゴニストによりVDCCを介した Ca^{2+} 流入が起こることがわかっている。またこの作用が外液 Na^+ に依存し、 Na^+ 透過性陽イオンチャンネルの関与が示唆された。そこで電気生理学的検討によりこのチャンネルを同定するとともに、候補のチャンネルであるTRPM4などのノックダウンを行い、チャンネル分子を同定する。甘味受容体を

刺激することにより、持続的なcAMPの上昇が見られる。まずこの経路にGs-アデニル酸シクラーゼ (AC) が関与していることを確認するため、GsノックダウンやAC阻害剤 (2', 5'-dideoxyadenosine) 投与により関与の有無を調べる。またcAMP産生の経路にもCa²⁺が関与するか否か検討を行う。すでに述べたように、グルコースにより「代謝に依存しない素早いPKC活性化」がおこる。これは未知のシグナル伝達経路を介する。この素早い反応に果たして甘味受容体が関与しているかを、①甘味受容体アンタゴニストであるグルマリンの投与、②甘味受容体 T1R2, T1R3 のノックダウン、③T1R3 ノックアウトマウスから単離したβ細胞を用いた検討、などによって明らかにする。さらにこれらの方法による甘味受容体抑制により、グルコース誘発性インスリン分泌がどの程度抑制されるかを明らかにし、グルコース作用における甘味受容体経路の意義を検討する。

4. 研究成果

(1) 甘味受容体のシグナル伝達機構の解明、グルコース作用への関与

申請者はこれまでβ細胞における甘味受容体のシグナル伝達を検討し、細胞内Ca²⁺の二相性の上昇とcAMPの持続的な上昇およびPKC活性化が起きることを明らかにしてきた。これらのメッセンジャー産生の分子基盤、具体的には関与するG蛋白、イオンチャネルの同定、シグナル伝達経路の詳細を検討した。その結果、この甘味受容体はGsを介してシグナルを伝達することが明らかになった(図1)。次に、甘味受容体シグナルがグルコース作用に関与するかを明らかにするため、受容体アンタゴニストの投与、受容体やG蛋白のノックダウンなどにより検討した。その結果、Gs siRNA存在下で甘味受容体を介したシグナルが抑制される。今後は上述のグルコースによる素早い反応に着目し、これに甘味受容体が関与するかを明らかにする。

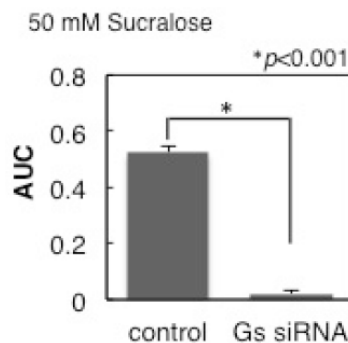


図1. GssiRNA 存在下でのスクラロースの影響。

(2) β細胞における甘味受容体の機能と生理学的意義の解明

味蕾において甘味受容体は糖や甘味料を感知している。内臓であるβ細胞は何を感知するのだろうか。上述のグルコース以外にも内因性のアゴニストが存在する可能性がある。とくにT1Rファミリーは複数の部位に多様な構造のリガンドを結合することができ、アミノ酸や糖、など多様な化合物を認識できる。糖代謝や脂質代謝、ヌクレオチドなどの代謝産物などがリガンドになる可能性がある。そこで、HEK細胞にT1R2+T1R3を発現させ、この系を用いて様々な代謝産物などをスクリーニングし、有効なリガンドを同定する。この検討を行うために、HEK細胞にT1R2, T1R3 および T1R2+T1R3 およびそのGプロテイン、インジケータであるEpac1-campsを導入した。その結果、T1R2+T1R3を導入した細胞のみcAMP上昇が観察された(図2)。スクラロースさらにマウスを用いて、β細胞の甘味受容体欠失により生体の糖代謝がどのように変化するかなどを明らかにする。これらを通じて、β細胞における甘味受容体の生理学的意義を明らかにしたい。

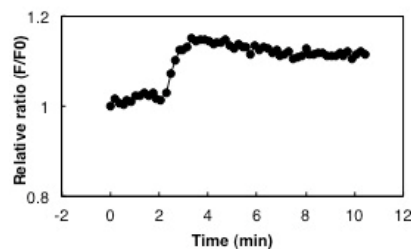


図2. T1R2+T1R3 の効果。20 mM スクラロース添加後のcAMPの変化を示す。

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2件)

1. Function of sweet taste receptor in pancreatic beta-cells. Nakagawa, Y. *生化学*, 査読有, 83 (7): 647-651, (2011).

2. Interferon regulatory factor-2 regulates exocytosis mechanisms mediated by SNAREs in pancreatic acinar cells.

Mashima, H.,

Nakagawa, Y., Kojima, I., Ohnishi, H. (他3名, 4番目), *Gastroenterology*, 査読有, 141(3): 1102-1113, (2011).

[学会発表] (計2件)

1. 第54回日本糖尿病学会 膵β細胞におけるグルコース作用:代謝に依存しない DAG 産生経路の解明 2011年5月19日札幌

2. 第53回日本糖尿病学会膵β細胞におけるグルコース作用:代謝に依存しないシグナル伝達機構 2010年5月27日岡山

[図書] (計0件)

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: