

## 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 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890086

研究課題名（和文）インクレチン刺激による $\beta$ 細胞機能制御メカニズム研究課題名（英文）GLP-1 Receptor Signaling in Pancreatic  $\beta$ -cells

研究代表者 竹田 有加里 (TAKEDA YUKARI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20582159

研究成果の概要（和文）：腸管から分泌される GLP-1 は $\beta$ 細胞の cAMP を上昇させ、PKA や Epac を活性化し、グルコース刺激時の膜興奮性を高めることで、インスリンの分泌を増強させる。そこで、活動電位や $[Ca^{2+}]_i$  動態を変動させる細胞内各要素の役割とその寄与の大きさを定量的・総合的に解明するため、シミュレーション研究を行った。まず GLP-1 シグナル伝達経路モデルを構築し、[cAMP]制御機構を解析した。次に、それを $\beta$ 細胞モデルに実装し、PKA・Epac 依存性チャンネルをモデル化することで、GLP-1 刺激時のバースト発火頻度・持続時間の上昇を再現することができた。

研究成果の概要（英文）：

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) elevates intracellular concentration of cAMP ([cAMP]) and facilitates glucose-dependent insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. However, because of complex interactions between signaling factors and effectors, the detailed mechanism underlying elevated insulin secretion has not been elucidated. We thus utilized 'bioinformatics' to quantitatively analyze the GLP-1 effects. First, we reconstructed a minimal mathematical model of GLP-1 receptor signal transduction, which involves GLP-1 receptor, Gs protein, adenylate cyclase (AC), phosphodiesterase (PDE). By fitting this theoretical reaction scheme to key experimental records of the GLP-1 response, the parameters determining individual reaction steps were estimated. The model reconstructed satisfactorily the dynamic changes in cAMP, and predicted the activities of cAMP effectors, protein kinase A (PKA) and cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor (cAMP-GEF or Epac) during GLP-1 stimulation. The simulations also predicted the presence of two sequential desensitization steps of the GLP1 receptor that occur with fast and very slow reaction rates. The cross talk between glucose- and GLP-1-dependent signal cascades for cAMP synthesis was well reconstructed by integrating the direct regulation of AC and PDE by  $[Ca^{2+}]_i$ . We finally incorporated the GLP-1 signaling cascade model into the  $\beta$ -cell model. By coding the PKA and Epac induced modulation on ion channels (L-type  $Ca^{2+}$  currents, Voltage-dependent  $K^+$  channels, ATP-dependent  $K^+$  channels), the GLP-1 effects on the magnitude as well as the amplitude of bursts of action potentials were well reconstructed. We will be able to quantitatively analyze the effects of GLP-1 on each signaling effectors on membrane excitability and  $Ca^{2+}$  signaling when models of  $Ca^{2+}$  releasing channels on endoplasmic reticulum (ER) are completed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	810,000	243,000	1,053,000
2011 年度	1,060,000	318,000	1,378,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,870,000	561,000	2,431,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学, 細胞・組織, シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞から分泌されるインスリンは血糖値の恒常性維持を担う重要なホルモンである。インスリンの分泌は、血糖濃度上昇により発生する活動電位や細胞内Ca<sup>2+</sup>の周期的変動で調整されている。腸管から分泌されるインクレチンはβ細胞のcAMP-PKA経路を活性化させ、インスリンの分泌を相乗的に増強させる重要なホルモンであるが、その経路には細胞膜および細胞内の多くの要素が複雑に関与していて総合的なメカニズム解析は依然として困難であった。

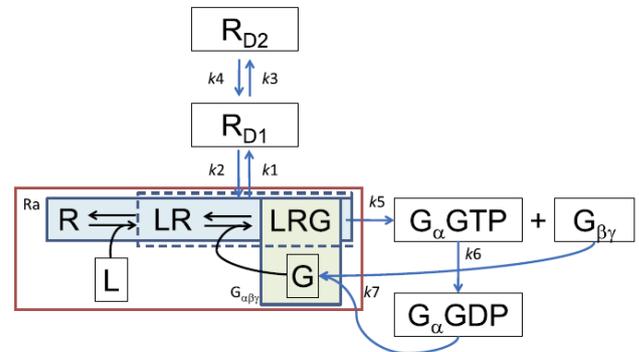
2. 研究の目的

本研究は文献にある医学・生理学実験データを数理細胞モデルに組み込み、細胞機能をコンピュータ上に再現し、活動電位と細胞内Ca<sup>2+</sup>の変動に関与する細胞内各要素の役割とその寄与の大きさを総合的・定量的に解明することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

Visual Basic のプラットフォームで、GLP-1受容体、G蛋白(G<sub>α</sub>)、AC、PDEを含むGLP-1シグナル伝達経路モデルを構築し(モデル1)、シミュレーションによって、GLP-1刺激時のcAMP変化のタイムコースを正確に再現し、その制御メカニズムを考察した。さらに、PKAやEpacをモデルに組み込むことで、GLP-1刺激時のPKA・Epacの活性も見積り、それらcAMPのエフェクターによるβ細胞の機能修飾を再現した。

モデル1 GLP-1受容体を介するcAMP制御モデル



$$V_{AC-I} = V_{AC} + V_{AC-G}$$

$$V_{AC} = V_{max\_AC} \cdot \frac{0.0004}{0.0004 + G_{\alpha}GTP} \cdot \frac{[ATP]}{[ATP] + 1.03}$$

$$V_{AC-G} = V_{max\_AC-G} \cdot \frac{G_{\alpha}GTP}{0.0004 + G_{\alpha}GTP} \cdot \frac{[ATP]}{[ATP] + 0.315}$$

$$((1 - f_{Cd\_AC}) + f_{Cd\_AC} \cdot \frac{[Ca_3CaM] + [Ca_4CaM]}{[Ca_3CaM] + [Ca_4CaM] + 0.000348} \cdot \frac{0.075}{0.075 + [Ca^{2+}]})$$

$$V_{PDE} = V_{max\_PDE} \cdot \left( \frac{f \cdot [cAMP]}{[cAMP] + K_{mL}} + \frac{(1-f) \cdot [cAMP]}{[cAMP] + K_{mH}} \right)$$

$$((1 - f_{Cd\_PDE}) + f_{Cd\_PDE} \cdot \frac{[Ca_3CaM] + [Ca_4CaM]}{[Ca_3CaM] + [Ca_4CaM] + 0.000348})$$

[L]	GLP-1 (ligand)
[R]	free GLP-1 receptor
[R <sub>t</sub> ]	total GLP-1 receptor
[R <sub>a</sub> ]	active GLP-1 receptor
[R <sub>D1</sub> ]	desensitized GLP-1 receptor in state 1
[R <sub>D2</sub> ]	desensitized GLP-1 receptor in state 2
[LR]	GLP-1 receptor bound with ligand
[LRG]	GLP-1 receptor bound with ligand and G <sub>s</sub>
[G <sub>t</sub> ]	total G <sub>s</sub> -protein
[G]	G <sub>s</sub> complex
[G <sub>βγ</sub> ]	β and γ subunit of G <sub>s</sub>
[G <sub>α</sub> GTP]	total GTP-bound α subunit of G <sub>s</sub>
[G <sub>α</sub> GDP]	GDP-bound α subunit of G <sub>s</sub>
V <sub>AC,t</sub>	total adenylate cyclase activity
V <sub>AC</sub>	activity of adenylate cyclase with G protein unbound
V <sub>max,AC,t</sub>	Maximum activity of V <sub>AC</sub>
V <sub>AC,G</sub>	activity of adenylate cyclase with G <sub>α</sub> GTP
V <sub>max,AC,G</sub>	maximum activity of V <sub>AC,G</sub>
f <sub>Ca,AC</sub>	fraction of Ca <sub>v</sub> CaM-dependent V <sub>AC,G</sub>
V <sub>Ca,AC</sub>	Ca <sub>v</sub> CaM-dependent component of V <sub>AC,G</sub>
[CaM]	Calmodulin
[Ca <sub>3</sub> CaM]	Calmodulin bound with Ca <sup>2+</sup> ions ([Ca <sub>3</sub> CaM]+ [Ca <sub>4</sub> CaM])
[Ca <sub>3</sub> CaM]	Calmodulin bound with 3 Ca <sup>2+</sup> ions
[Ca <sub>4</sub> CaM]	Calmodulin bound with 4 Ca <sup>2+</sup> ions
V <sub>PDE</sub>	activity of phosphodiesterase
V <sub>max,PDE</sub>	maximum activity of V <sub>PDE</sub>
K <sub>mL</sub>	low K <sub>m</sub> of PDE
K <sub>mH</sub>	high K <sub>m</sub> of PDE
f	fraction of PDE with K <sub>mL</sub>
f <sub>Ca,PDE</sub>	fraction of Ca <sub>v</sub> CaM-dependent V <sub>PDE</sub>
V <sub>Ca,PDE</sub>	Ca <sub>v</sub> CaM-dependent component of V <sub>PDE</sub>

#### 4. 研究成果

図 1 の GLP-1 シグナル伝達モデルを Visual Basic にコーディングし、ミュレーションで GLP-1 (100 nM) 刺激時の cAMP 変化のタイムコース (Fig. 1A) や、GLP-1 濃度反応曲線 (B)、50%効果濃度(C)を再現した。

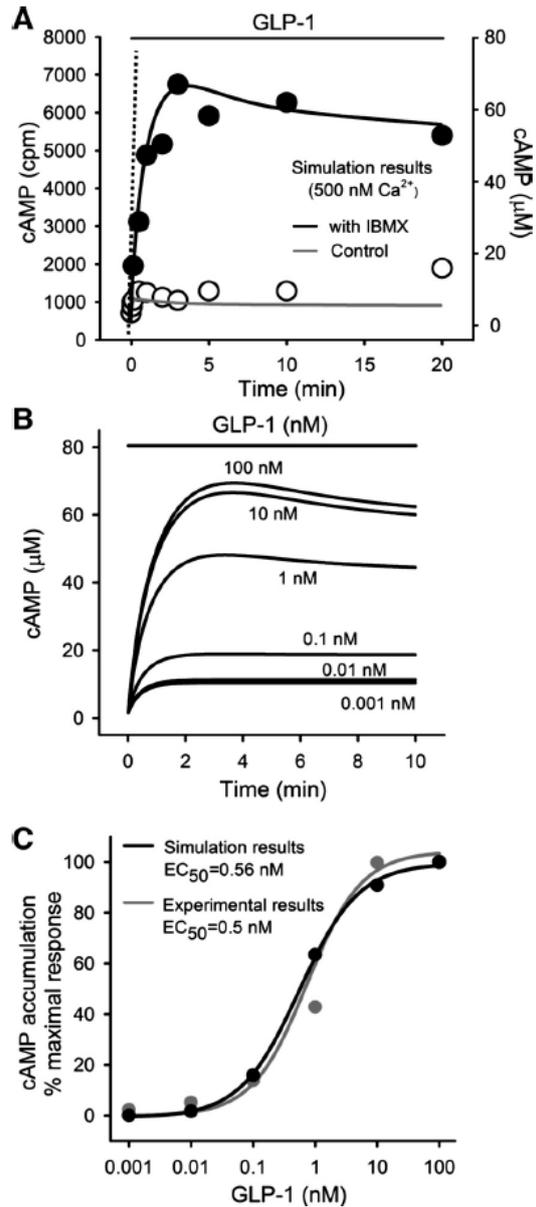


図 1 GLP-1 刺激時の cAMP のタイムコースとの GLP-1 濃度依存的 cAMP の上昇

次に、図 2 A のプロトコルを用いた実験 (テーブル 1) をシミュレーションで再現した結果、GLP-1 刺激で活性化された受容体には経時的に出現する二つの desensitization のステート (RD1, RD2) があり、それが cAMP の減衰動態を決定していることが明らかとなった。

	Preincubation Period With 100 nM GLP-1		
	0.5 h	1 h	2 h
% Reduction			
Simulation results	16	26	40
Experimental results	21	35	50

表 1 GLP-1 レセプター前処理 (図 2 A 参照) 持続時間に応じて異なる GLP-1 再刺激時の cAMP。

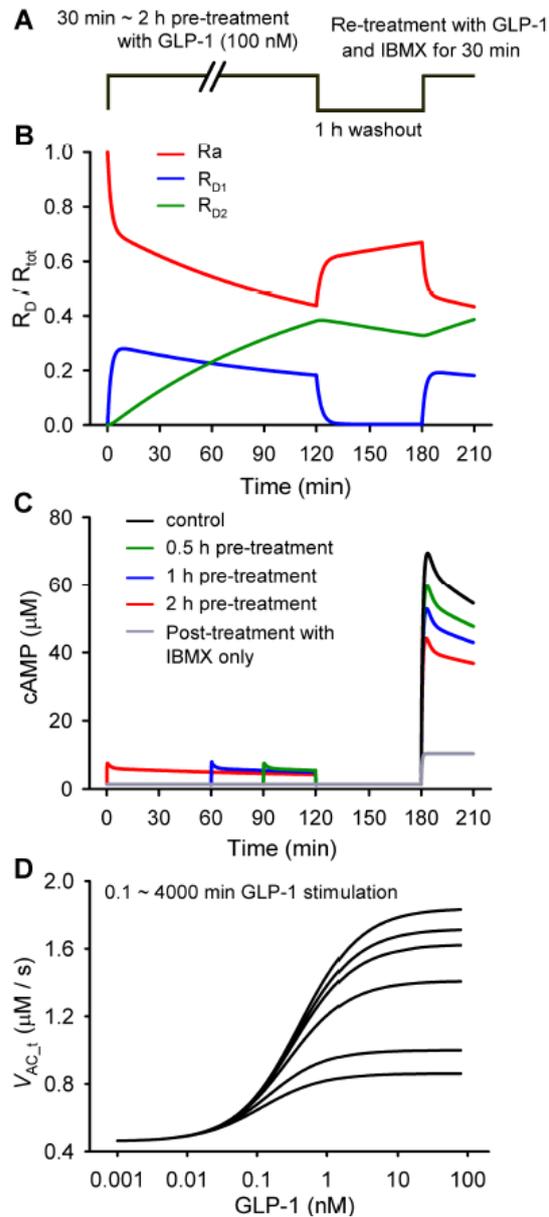


図 2 経時的に表れる GLP-1 レセプターの脱感作(RD1, RD2)。A: 脱感作を誘発するための実験プロトコル (Baggio et al, 2004)。B: 2 時間のレセプター前処置プロトコル適用時の active receptor (Ra) と脱感作状態 1 又は 2 (RD1, RD2) にあるレセプターの存在確率。C: レセプターのの前処理持続時間に応じて異なる GLP-1 再刺激時の [cAMP]。D: GLP-1 前処理持続時間依存性の cAMP の GLP-1 用量応答曲線。

次に、コントロールでは  $[Ca^{2+}]$  と cAMP の antiphasic な関係が、GLP-1 存在下では phasic に変化することが実験で観測されているが、そのメカニズムをシミュレーションで検証した。結果、コントロールでは、 $[Ca^{2+}]$  が上昇すると、PDE が活性化し、cAMP が減少し(図 2A・C)するが、GLP-1 存在下では Gsa で上昇した AC 活性が PDE に比べ、 $[Ca^{2+}]$  に応じてより強く活性化されるため cAMP の生成が促進される(B・D)ことが明らかとなった。

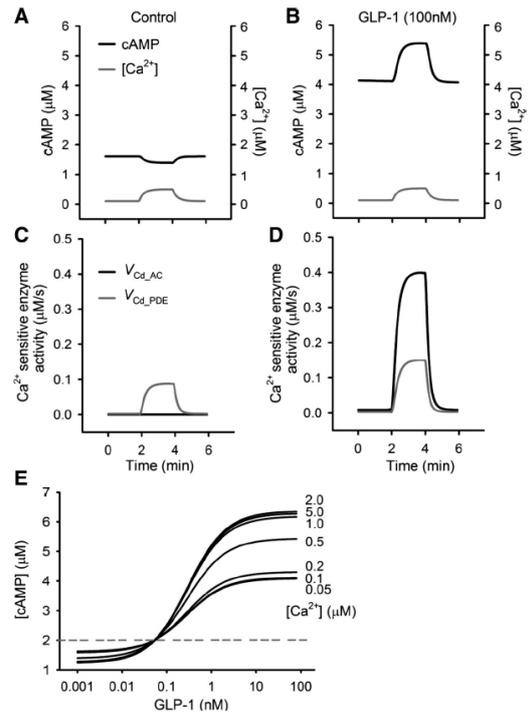


図 3  $[Ca^{2+}]$  動態に応じて変動する [cAMP] の挙動。人為的にシミュレートした  $[Ca^{2+}]$  とそれに応じて変動する [cAMP] (A: control、B: GLP-1 存在下)。A、B の実験条件における  $Ca^{2+}$  依存性 AC、PDE の活性 (C、D)。E:  $[Ca^{2+}]$  濃度依存的に変動する [cAMP] の GLP-1 用量応答曲線。(Landa et al, 2005; Dyachok et al, 2006)

A-1- Parameters determined based on GLP-1 signaling system in pancreatic  $\beta$ -cell and a  $\beta$ -cell line

Total amount of Receptor, $[R_t]$	0.00434 $\mu M$
Binding between [L] and [R]	$K_d = 0.004 \mu M$

A-2- Parameters determined by biochemical investigations

Total amount of Gs, $[G_t]$	2.83 $\mu M$
$G_{\alpha}GTP_{\text{tot}}$ -dependent AC_G activation	$K_{1/2} = 0.4 \mu M$
ATP dependent AC activity	$K_m = 1.03 \text{ mM}$
ATP dependent AC_G activity	$K_m = 0.315 \text{ mM}$
$Ca^{2+}$ CaM-dependent AC_G activation	$K_{1/2} = 0.348 \mu M$
$Ca^{2+}$ -dependent AC_G inhibition	$K_{1/2i} = 75 \mu M$
$Ca^{2+}$ CaM-dependent PDE activation	$K_{1/2} = 0.348 \mu M$
cAMP dependent PKA activation	$K_d = 2.9 \mu M, n_H = 1.4$
cAMP dependent Epac1 activity	$K_{1/2} = 30 \mu M$
cAMP dependent Epac2 activity	$K_{1/2} = 20 \mu M$

The kinetics for the activation and deactivation of Gs, protein  
 $k_5 = 16 \text{ s}^{-1}, k_6 = 1 \text{ s}^{-1},$   
 $k_7 = 1200000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

B) Parameters determined in the present study by fitting specific experimental records or measurements in references

Desensitization rate constants	
Faster desensitization kinetics	$k_1 = 0.0025 \text{ s}^{-1}, k_2 = 0.005833 \text{ s}^{-1}$
Ultra slow desensitization kinetics	$k_3 = 0.0002833 \text{ s}^{-1}, k_4 = 0.00005 \text{ s}^{-1}$
AC and PDE activities	
$V_{AC}$	$V_{\text{max}, AC} = 0.0006173 \text{ mM s}^{-1}$
$V_{AC,G}$	$V_{\text{max}, AC,G} = 0.01738 \text{ mM s}^{-1}$
	$f_{Ca, AC} = 0.6$
$V_{PDE}$	$V_{\text{max}, PDE} = 0.015 \text{ mM s}^{-1}$
	$f_{Ca, PDE} = 0.2$
	$K_{\text{int}} = 0.4148 \mu M, K_{\text{int}} = 53.98 \mu M$
	$f = 0.012$

C) Parameters determined in the present study by fitting the overall

model scheme to experimental records or measurements in references

Binding between [G] and [LR]	$K_d = 0.372 \mu M$
------------------------------	---------------------

表2 モデルパラメータセット

以上、図1～3と表1の実験結果をGLP-1シグナル伝達モデルで再現することによって、表2A-2、B、Cで示すパラメータを推定した。

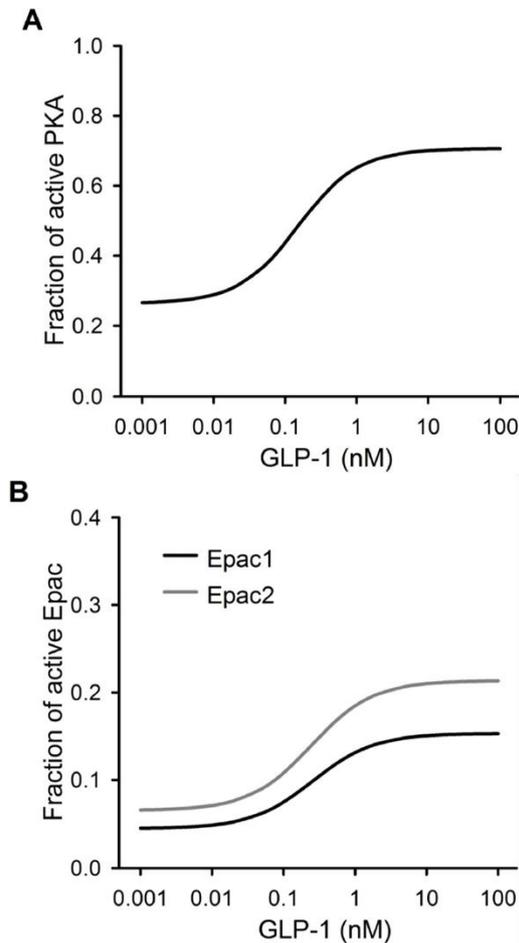


図4 PKA(A)・Epac(B)活性確立のGLP-1濃度応答曲線(30分刺激、500 nM [Ca<sup>2+</sup>])。

PKAやEpacをモデルに組み込むことで、GLP-1濃度依存性のPKAやEpacの活性も見積もることができた(図4)。

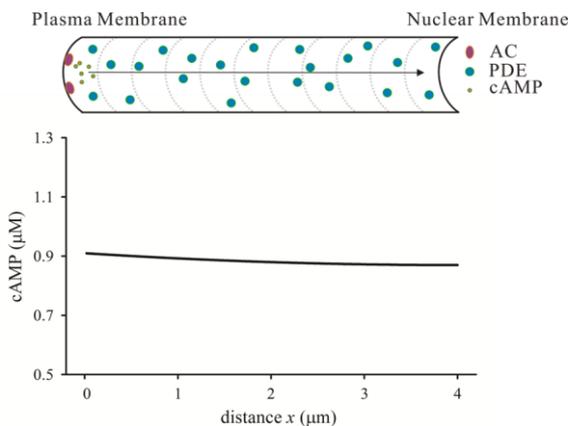


図5 膵β細胞における10 nM GLP-1存在下の細胞直下から核膜までの[cAMP]濃度勾配。

GLP-1(10 nM)存在下での細胞内cAMP濃度勾配をシミュレーションした結果(図5)、細胞膜直下におけるcAMPの局在は認められず、cAMPは細胞内ほぼ均一に分布していることが示唆された。したがって、PKA・Epacの活性は、細胞内で概ね一定であることが推測される。

このインクレチンシグナル伝達モデルをβ細胞モデルに実装し、β細胞モデルのL-type Ca<sup>2+</sup>チャンネル(LTCC、図6)、Kvチャンネル活動のPKA依存性とKATPチャンネル活動のEpac2依存性をモデル化することで、GLP-1刺激時のバーストの発火頻度と持続時間が上昇する現象を再現することした(図7)。

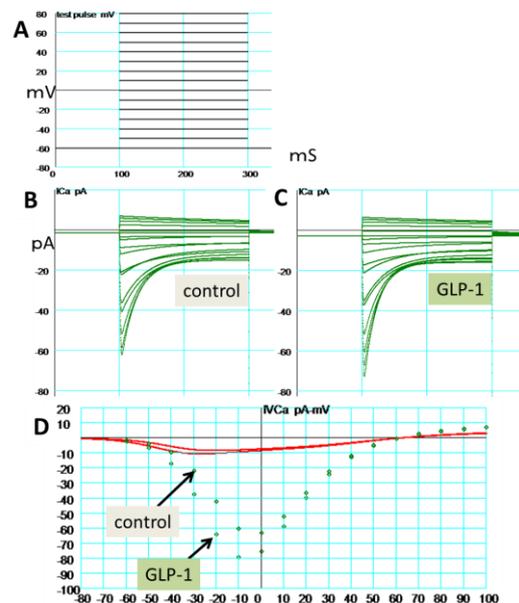


図6 GLP-1(10 nM)によるLTCCの活性化。A:LTCCを記録するための実験プロトコル。コントロール(B)またはGLP-1存在下(C)におけるLTCC。D:B,Cのシミュレーション結果から得られた電流電圧曲線。

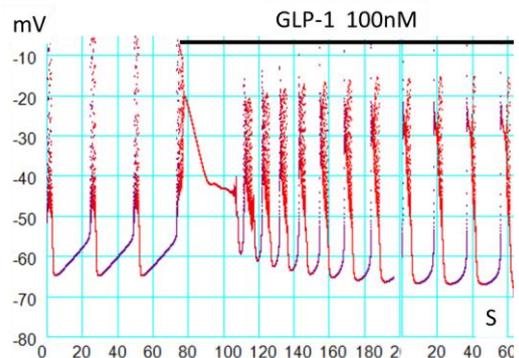


図7 GLP-1刺激時に増加するバーストの発火頻度と持続時間。

しかし、PKA・Epac による細胞内カルシウム制御を正確に計算し、Ca 依存性のある cAMP やイオンチャンネルの活性をより厳密に計算する必要がある。これに向けて、まず小胞体の SERCA モデルを構築した。次にリアノジンチャンネル (RYR) や IP3 レセプターモデルを実験データの基づき、正確にモデル化すれば、細胞レベルでのシミュレーション実験や数値解析によって、GLP-1 刺激による活動電位や細胞内 Ca<sup>2+</sup>の変動に関与する細胞内各要素の役割とその寄与の大きさ、またその分子メカニズムを総合的・定量的に解明することが可能となる。

#### 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 1 件)

Takeda Y, Amano A, Noma A, Nakamura Y, Fujimoto S and Inagaki N. Systems Analysis of GLP-1 Receptor Signaling in Pancreatic  $\beta$ -cells. Am J Physiol Cell Physiol. 301(4):C792-803, 2011. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takeda%20Y%20and%20Noma%20A>

[学会発表] (計 5 件)

<国際学会ポスター発表>

① Y. Takeda, A. Amano, A. Noma, S. Fujimoto, N. Inagaki. SYSTEMS ANALYSIS OF GLP-1 RECEPTOR SIGNALING IN PANCREATIC  $\beta$ -CELLS; Biophysical Society 55th annual meeting, Baltimore, Maryland, USA, Mar. 9th 2011 (査読有)

② Y. Takeda, A. Amano, A. Noma, S. Fujimoto, N. Inagaki. Systems Analysis of GLP-1 Receptor Signaling in Pancreatic  $\beta$ -cells; International Symposium “Computational Physiology of Cardiac Myocytes and Pancreatic  $\beta$ -cells; Interaction between Energy Metabolism and Membrane Excitability”, Kyoto, Japan, Jan. 30<sup>th</sup> 2011 (学会主催研究機関のため査読無)

<国内学会ポスター発表>

① 竹田 有加里、野間 昭典、中村 靖彦、藤本 新平、稲垣 暢也「Systems Analysis of GLP-1 Receptor Signaling in Pancreatic  $\beta$ -cells」第 89 回日本生理学会大会、長野県・松本、2012 年 3 月 31 日 (査読有)

② 竹田 有加里、天野 晃、野間 昭典、藤本 新平、稲垣 暢也「 $\beta$ 細胞における GLP-1 受容体を介する cAMP 制御機構の数理モデル化と統合的理解」第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、北海道・札幌、2011 年 5 月 19 日 (査読有)

③ 竹田 有加里、野間 昭典、藤本 新平、稲垣 暢也「数理モデルを用いた GLP-1 受容体シグナル伝達のシステム解析」第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、神奈川県・横浜、2011 年 3 月 29 日 (査読有) 震災のため中止

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 有加里 (TAKEDA YUKARI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号・20582159

(2) 研究分担者：なし