

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390245

研究課題名(和文) 甘味受容体による内分泌系の新たな制御システムの解明

研究課題名(英文) Regulation of the endocrine system by the sweet taste receptor

研究代表者

小島 至 (Kojima, Itaru)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：60143492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵細胞、脂肪細胞、小腸内分泌細胞などにおける甘味受容体の機能とその意義を明らかにすることを目的とした。膵細胞においては甘味受容体のサブユニットであるT1R3がホモダイマーとして機能し、Ca²⁺やcAMP系を活性化させ、インスリン分泌を促進することを明らかにした。またこの受容体はインスリン分泌における最も重要な調節因子であるグルコースにより活性化され、しかもミトコンドリアにおけるグルコース代謝を促進するというまったく新規な調節を行うことを明らかにした。脂肪細胞においては、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程において負の調節を行うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the function and physiological role of the sweet taste receptor in pancreatic beta-cells, adipocytes and enteroendocrine cells. In pancreatic beta-cells, the sweet taste receptor subunit T1R3 forms a homodimer and function as a sweet taste-sensing receptor. This receptor is activated by glucose, the most important regulator of insulin secretion. Glucose activates the receptor and promotes its own metabolism in beta-cells. Hence, the sweet taste-sensing receptor plays a vital role in the regulation of insulin secretion. In adipocytes, the sweet taste-sensing receptor, a homodimer of T1R3, negatively regulates differentiation of preadipocytes to mature adipocytes. In enteroendocrine L-cells, the sweet taste-sensing receptor, a homodimer of T1R3, is activated by glucose and other sweet substances and promotes secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：甘味受容体 インスリン 膵細胞 脂肪細胞 分化誘導 GLP-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 甘味受容体は舌の味蕾に発現し、糖や人工甘味料などの甘味を感知する受容体である。2001年にその分子実体が解明され、T1R2とT1R3という二種類のG蛋白共役型受容体(GPCR)のヘテロ二量体であることが判明した。長い間、甘味受容体は味蕾にのみ発現し味覚に特化した分子と考えられてきた。しかし近年、この受容体が消化管内分泌細胞にも発現していることが報告された(Margoskee et al. 2007)。

(2) 最近申請者は、この受容体が膵細胞にも発現し、この受容体を活性化することによりインスリン分泌が惹起されることを見出し報告した(PLoS ONE 2009)。申請者が行った予備実験によれば、細胞の甘味受容体はきわめてユニークなシグナル伝達系をもち、生理的なインスリン分泌に参与している可能性が予想される。このことは、甘味受容体が、生体の糖代謝・エネルギー代謝調節に参与する様々な臓器に発現していることを示唆している。そこで予備検討を行い糖代謝・エネルギー代謝に参与する内分泌臓器における発現を検討したところ、甘味受容体が脂肪細胞、視床下部の弓状核、下垂体のGH産生細胞などにも発現していることが明らかになった。これらのことから、甘味受容体が広く糖代謝・エネルギー代謝調節に参与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、様々な内分泌細胞やホルモン標的細胞に発現する甘味受容体の機能と生理学的意義を明らかにし、新たな調節機構を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 膵細胞における甘味受容体機能の検討：マウス単離膵島を用いてバッチインキュベーションあるいはペリフージョン系によりインスリン分泌を測定する。また遊離細胞、あるいはMIN6細胞を用いてCa²⁺、cAMP、DAG、Ins-P₃、PKCなどの細胞内メッセンジャーの変化をモニターし、甘味受容体により活性化されるシグナル伝達系を明らかにする。またホタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を作製し、それを用いて細胞内ATPをモニターする。さらにRTPCR、免疫プロット法、免疫組織化学などにより甘味受容体の発現を検討する。

(2) 脂肪細胞における検討：マウス遊離脂肪細胞あるいは3T3L1細胞を用いて検討を行う。分化誘導はoil red-O染色による脂肪の染色、PPAR γ 、CEBP α 、GUT4などを免疫プロットで測定する。Ca²⁺、cAMPなどの細胞内シグナルをモニターしてシグナル伝達系を検討する。

(3) 小腸内分泌細胞における検討：ヒトGLP1産生細胞株Hutu80細胞を実験系とし、Ca²⁺、cAMPなどのモニターを行って細胞内シグナル伝達系を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 膵細胞における検討：まずMIN6細胞を用いて甘味受容体のシグナル伝達系について検討を行った。甘味受容体刺激として、構造の異なる4種類の甘味料、すなわちスクラロース、アセスルファームK、サッカリン、グリチルリチンを用い、細胞内Ca²⁺、cAMPをモニターした。その結果、驚くべきことに4種類のアゴニストがそれぞれ異なるパターンの細胞内シグナルを産生した(図1)。

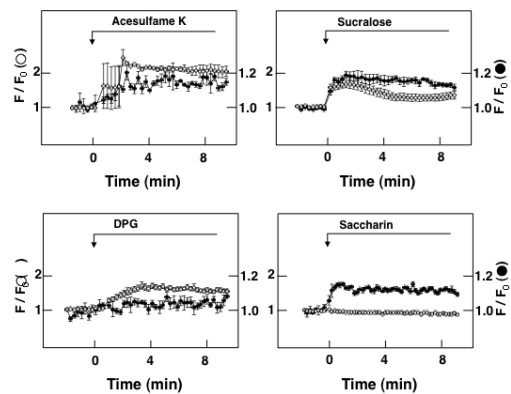


図1 アセスルファーム K、スクラロース、グリチルリチン、サッカリンによる細胞内Ca²⁺、cAMP濃度の変化

様々な検討を行った結果、4種類のアゴニストはそれぞれ異なるメカニズムによりイオンチャネル、フォスホリパーゼなどの酵素を活性化し、まったく異なるパターンのシグナルを産生することが明らかになった(図2)。

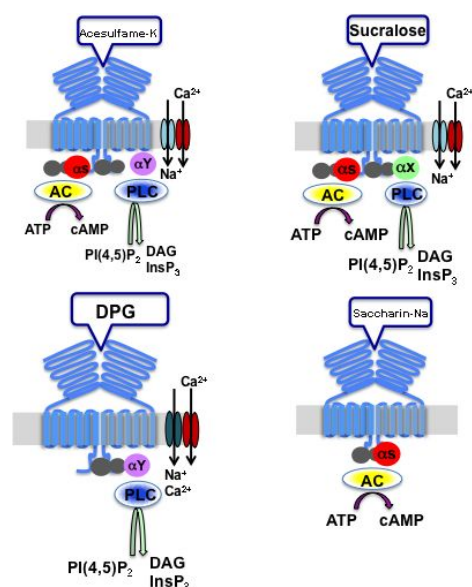


図2 4種類のアゴニストの作用機構

次に 細胞に発現する甘味受容体がグルコ

ースによるインスリン分泌に関与しているかについて検討を行った。まずマウス単離膵島を用いてインスリン分泌を測定した。高濃度グルコースによるインスリン分泌は、甘味受容体を抑制するグルマリンを投与することにより30-40%程度抑制された。インスリン分泌をペリフージョン系で測定すると、グルコースにより二相性のインスリン分泌が誘発される。グルマリンを投与すると、インスリン分泌の第一相だけでなく、第二相も有意に抑制された。この結果は、甘味受容体シグナルがグルコース作用の全般に関与していることを示唆している。そこで、申請者は、甘味受容体シグナルがグルコースの代謝を制御しているのでは内科という仮説を立て、それを検証する為にルシフェラーゼを発現させた MIN6 細胞を作製し、細胞内の ATP をモニターした。MIN6 細胞の甘味受容体をスクラロースで刺激すると、スクラロース自身は代謝されないにもかかわらず細胞内 ATP が大きく増加した(図3)。

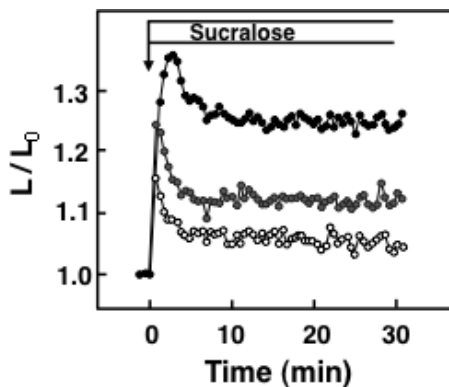


図3 スクラロースの ATP 増加作用

ミトコンドリアの基質であるコハク酸を投与すると ATP が増加するが、スクラロースはこのコハク酸による ATP 産生を大きく増強し、その作用点がミトコンドリアであることが示唆された。スクラロースと同様な作用は代謝されないグルコースアナログである 3-O-メチルグルコース(30MG)を投与した場合にも観察され、グルコース自身が甘味受容体に作用して、ミトコンドリアにおける代謝を促進することが明らかになった。さらに T1R3 をノックダウンすると、グルコースにより増加する ATP の増加が有意に抑制された。この結果は、甘味受容体 T1R3 がグルコース感知受容体として機能しており、グルコースの代謝を促進させていることを示唆している。これらの結果に基づき、グルコース作用に関する新たなモデルを提唱した(図4)。

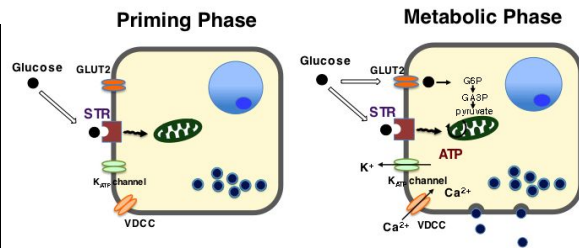


図4 グルコースの作用機構

グルコースはまず細胞表面のグルコース感知受容体に作用し、ミトコンドリアにおける代謝を活性化させる。次にグルコースは細胞内に取り込まれ、あらかじめ活性化された代謝系により代謝を受け、より多くの ATP が産生されるというものである。

(2) 脂肪細胞における検討: 脂肪前駆細胞モデルである 3T3L1 細胞にインスリン、デキサメサゾンなどを投与すると、やがて細胞は分化し、脂肪滴をもった脂肪細胞へと変化する。これは脂肪細胞の分化系として確立されているが、この時甘味料のスクラロースやサッカリンを添加させると、脂肪の蓄積は抑制され、甘味受容体シグナルが脂肪分化を抑制することが明らかになった。スクラロースなどの添加により、PPAR γ や CEBP α などの発現も抑制された。分化前の 3T3L1 細胞にはわずかに T1R3 が発現していたが、脂肪分化に伴って T1R3 の発現は著明に増加した。T1R3 を HEK 細胞に発現させると、スクラロース添加により cAMP が増加し、T1R3 が Gs を活性化させることが明らかになった。3T3L1 細胞にスクラロースを添加すると分化が抑制されたが、cAMP を増加させるフォルスコリンではその作用が再現されず、一方 Gs を活性化させるコレラ毒素を添加すると分化が抑制された。この結果、Gs 活性化は分化抑制に関与しているものの、cAMP 増加は関与していないことが明らかになった。

(3) GLP1 産生細胞における検討: ヒト GLP1 産生細胞株 Hutu80 を用いて甘味受容体のシグナル伝達について検討を行った。この細胞には T1R3 が多く発現していた。細胞や脂肪細胞と同様、T1R3 ホモダイマーが甘味受容体として機能しているものと考えられた。この細胞に、スクラロース、アセスルファーム K、サッカリン、グリチルリチンを投与すると、Ca $^{2+}$ 、cAMP レベルが変化した。その変化のパターンは 4 種類の甘味料により異なるものであった。それだけでなく、MIN6 細胞において得られた結果と比較すると、異なったものであった。特にアセスルファーム K の場合は顕著で、その投与により Ca $^{2+}$ は大きく減少した。そのメカニズムを検討したところ、アセスルファーム K により細胞膜のカルシウムポンプが活性化されるため Ca $^{2+}$ 濃度が低下することが明らかになった。

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5件)

Nakagawa Y, Ohtsu Y, Nagasawa M, Shibata H, Kojima I. Glucose promotes its own metabolism by acting on the cell-surface glucose-sensing receptor T1R3. *Endocr J* 査読有 61, 2014,119-131.

DOI 10.1507/endocrj.ej13-0431

Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Madina A, Nagasawa M. Sweet taste-sensing receptor expressed in pancreatic β -cells: Sweet molecules act as biased agonists. *Endocr Metab* 査読有 29, 2014, 12-19.

DOI 10.3803/enm.2014.29.1.12

Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr J* 査読有 60, 2013, 1191-1206.

DOI 10.157/endocrj.ej13-0282

Masubuchi Y, Nakagawa Y, Ma J, Sasaki S, Kitamura T, Yamamoto Y, Kurose H, Kojima I, Shibata H Novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *PLoS ONE* 査読有 8, 2013, e54500.

DOI 10.1371/journal.pone.0054500

Kojima I, Nakagawa Y. The role of the sweet taste receptor in enteroendocrine cells and pancreatic β -cells. *Diab Metab J* 査読有 35, 2011, 451-457.

DOI 10.4093/dmj.2011.35.5.451

[学会発表](計10件)

小島 至、中川 祐子 グルコース感知受容体によるインスリン分泌の制御 第87回日本内分泌学会総会 2014年4月26日(福岡国際会議場)

増淵 洋祐、中川 祐子、馬 金輝、長澤 雅裕、小島 至、柴田 宏 甘味刺激によるGs活性化は微小管脱重合とRho活性化を介して脂肪分化を抑制する 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月17日(ホテル日航熊本)

中川 祐子、長澤 雅裕、最上 秀夫、小島 至 グルコース作用における甘味受容体の関与 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日(ホテル日航熊本)

大津 義晃、中川 祐子、荒川 浩一、小

島 至 GLP1 産生細胞における甘味受容体のシグナル産生機構 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16日(ホテル日航熊本)

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/celphy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 至 (KOJIMA, Itaru)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号: 60143492