

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791014

研究課題名（和文）

受容体欠損マウスを用いた OGR1 ファミリー GPCR のインスリン分泌応答機構の解明

研究課題名（英文）

Role of OGR1 family G protein-coupled receptors in mechanism of insulin secretion.

研究代表者

中倉 敬 (NAKAKURA TAKASHI)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：60568658

研究成果の概要（和文）：

OGR1 ファミリーは細胞外の pH とリゾ脂質の受容体であるが、インスリン分泌調節における役割は不明である。そこで本研究ではまず、OGR1 欠損マウスの耐糖能やインスリン感受性について調べた。また、単離ラズラ島および INS-1 細胞を用いて細胞外 pH の低下による OGR1 を介したインスリン分泌調節メカニズムを解析した。以上の結果、OGR1 が細胞外 pH を感知してグルコース応答性インスリン分泌を調節していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

OGR1 family receptors response to extracellular pH and lysolipid, however its functions in insulin secretion are unknown. In this study, we investigated glucose tolerance and insulin sensitivity in OGR1-deficient mice. Moreover, islets isolated from OGR1-deficient mice and INS-1 cells were analyzed for the mechanisms of insulin secretion by acidification of extracellular pH. These results indicated that OGR1 responded to extracellular pH and regulated the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic beta cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

(1) OGR1、TDAG8、GPR4、G2A からなる OGR1 ファミリーは、発見された当初はリゾ脂質（スフィンゴシルホスホリルコリン、リゾフォスファチジルコリン、サイコシン）が特異的に結合する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であると考えられていた。その後、私たち (Wang et al, *J Biol Chem*, 2004 他) を含むいくつかのグループから (Ludwig et al, *Nature*, 2003 他)、OGR1 ファミリーはリゾ脂質に加えて細胞外 pH の低下、つまりプロトン感知するユニークな受容体群であることが明らかとなった。このように、特徴

的なリガンドを持つ OGR1 ファミリーの生理機能については未だ不明な点が多い。そこで我々は OGR1、GPR4、TDAG8 の欠損マウスを使って、個体レベルで OGR1 ファミリーの生理機能の解明を目指し、研究を進めてきた。

(2) 唯一の血糖低下ホルモンであるインスリンは、膵臓ランゲルハンス島（ラズラ島）の細胞で生合成され、血中グルコースの上昇に反応して分泌される。インスリン分泌にはさまざまな過程で pH が関与する。例えば、成熟インスリンの生合成のためには、V-ATPase による分泌顆粒内の酸性化が必須である。また、塩化アンモニウムによって実

験的にアシドーシスを起こしたラットは血中インスリン濃度が上昇することが知られている。一方で、インスリン分泌はさまざまな GPCR を介したシグナルにより増強されることが知られている。例えばアセチルコリン受容体である M3 受容体や長鎖遊離脂肪酸の受容体である GPR40 欠損マウスではインスリン分泌の低下を顕著に示す。また、これらのシグナル伝達に関わる $G_{q/11}$ タンパク質の欠損も同様である。このようなことから、4 種類の OGR1 ファミリーもいずれかがインスリン分泌調節に関与している可能性が予想された。

2. 研究の目的

OGR1 ファミリーと糖代謝の関係についてはこれまで不明であった。このため我々が有している OGR1 ファミリー欠損マウスに対して腹腔糖負荷試験を行い、個体レベルでインスリン分泌への影響を調べると、OGR1 欠損マウスで顕著に血中インスリン濃度の低下が観察された。したがって、OGR1 によるインスリン分泌調節メカニズムの存在が示唆されるが、OGR1 は細胞外 pH とリゾ脂質を感知する受容体であることから (図 1)、インスリン分泌を調節するリガンドを特定する必要がある。このため、本研究では OGR1 機能を調節するリガンドの特定とその調節機構の解明を細胞内シグナル伝達系のレベルまで解析することで、OGR1 のインスリン分泌に対する



生理機能を明らかにすることを目的として、主に受容体欠損マウスを用いた研究を進めた。

図 1

3. 研究の方法

(1) OGR1 欠損マウスを用いた糖代謝機能の *in vivo* 解析

野生型と OGR1 欠損マウスに対して、グルコースやインスリンを腹腔に負荷し、血中グルコースとインスリンの経時的変化を調

べることで、耐糖能、インスリン分泌能、インスリン感受性を調べた。血中グルコース濃度はグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法により、血中インスリン濃度については ELISA 法を用いて定量した。

(2) マウス単離ラ氏島を用いたインスリン分泌能の解析

野生型と OGR1 欠損マウスから膵ラ氏島を単離し、*in vitro* 培養系を用いて、グルコース応答性インスリン分泌に対するリゾ脂質と低 pH の効果を解析した。また、OGR1 の欠損が膵・細胞の発生学的な機能欠損を起こしていないことを示すため、 G_q タンパク質共役型受容体であるアセチルコリンやバソプレシン受容体のアゴニストや G_s タンパク質共役型受容体である GLP-1 受容体アゴニスト Exendin-4 を用いて、OGR1 欠損ラ氏島からのインスリン分泌を調べ、OGR1 機能の特異性を証明した。

(3) INS-1 細胞における pH 依存的グルコース応答性分泌の解析

単離膵ラ氏島には膵・細胞以外の細胞も含まれている。このため、これら細胞の影響を排除するため、ラット膵・細胞株である INS-1 細胞を用いて、インスリン分泌に対する細胞外 pH の低下の影響を調べた。加えて、pH 依存的なイノシトールリン脂質の合成を放射性同位体を用いて調べた。

(4) OGR1 を介したインスリン分泌応答を調節するシグナル伝達経路の解明

OGR1 は G_q タンパク質共役型受容体であることから、膵ラ氏島と INS-1 細胞培養実験系に G_q タンパク質機能抑制剤を用いることで、OGR1 を介したインスリン分泌が G_q タンパク質を介したものであるかどうかを調べた。また、他の SU 剤をはじめとするシグナル伝達経路活性化剤や阻害剤を用いて同様の実験を行った。さらに、グルコースや細胞外 pH 刺激による細胞内カルシウム変化を Fura2 を用いたカルシウムイメージング法によって解析することで、細胞外 pH による OGR1 を介したセカンドメッセンジャーの活性化についても調べた。

4. 研究成果

(1) OGR1 欠損マウスに対して腹腔糖負荷試験とインスリン感受性試験を行った結果、OGR1 欠損マウスにおいて血糖値に差が見られなかったが、血中インスリン濃度の低下とインスリン感受性の亢進が見られた。また、絶食時血中グルカゴン濃度も有意に低下していた。したがって、インスリン分泌低下が

起こっているにもかかわらず、糖負荷後も OGR1 欠損マウスの血糖値に差が見られなかった原因として、インスリン感受性の亢進やグルカゴン分泌の低下が関わっているものと考えられる。

(2) マウスからの単離膵ラ氏島を用いた解析によって、OGR1 がリゾ脂質ではなく細胞外 pH の低下を感知して、グルコース応答性インスリン分泌を増進することが明らかとなった。また、OGR1 欠損マウスから単離した膵ラ氏島は生理的 pH である pH 7.4 ですでにインスリン分泌能が低下していた。したがって、OGR1 は生理的 pH でもインスリン分泌の調節に関与する、構成的活性化型受容体である可能性が示唆された。

(3) インスリン分泌調節における OGR1 の作用点を明らかにするために、単離ラ氏島に対してインクレチン受容体などの GPCR に対するアゴニストや SU 剤、 G_q タンパク質抑制剤を作用させた際の pH 依存的なインスリン分泌の解析を行った。この結果、OGR1 欠損膵ラ氏島のインスリン分泌はほとんどのアゴニストで野生型と差がみられなかったが、SU 剤を使用した場合のみ有意に低下していた。したがって、OGR1 - G_q タンパク質シグナルが K_{ATP} チャンネル周辺を調節することで、インスリン分泌を制御している可能性が示唆された。

(4) OGR1 - G_q タンパク質シグナル伝達経路の活性化は細胞内カルシウムの上昇を引き起こす。このため、単離膵・細胞を用いて pH の低下による細胞内カルシウムの動態について、カルシウムイメージング法によって解析した。この結果、グルコースによって誘導される細胞内カルシウムの上昇は細胞外 pH の低下によってさらに増加するが、OGR1 を欠損する・細胞では有意に低かった。また、カリウムにより誘発される脱分極による細胞内カルシウムの増加も、OGR1 欠損・細胞で有意に低下していた。

(5) INS-1 細胞を用いてグルコース応答性インスリン分泌を解析すると、pH の低下依存的にインスリン分泌の上昇が確認された。また、この反応は G_q タンパク質抑制剤によって顕著に抑制された。さらに、INS-1 細胞は低グルコース濃度でも、pH の低下に従って細胞内カルシウム濃度が上昇すること、イノシトールリン脂質の合成量も上昇することから、細胞外 pH の低下によるインスリン分泌増加は G_q タンパク質共役型受容体を介して起こるものと考えられる。

以上の解析から、OGR1 が膵・細胞に発現し、生理的 pH で活性化する非常にユニークな受

容体であることが明らかになった。また、OGR1 は G_q タンパク質/PLC/カルシウム系を介して、グルコース応答性経路の K_{ATP} チャンネル周辺の活性を調節することで、インスリン分泌を増強している可能性が示唆された。インスリン分泌の際には分泌顆粒由来の酸によって、細胞膜近傍の酸性化が予想される。OGR1 はこの酸性化を感知することで、インスリン分泌を増強している可能性が考えられる。インスリン分泌異常は糖尿病に深く関与することから、今後は受容体欠損マウスに対して、高脂肪食負荷実験を行うことにより、糖尿病状態における OGR1 機能と細胞外 pH の関係について解析していくことが重要だと考えている。

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 4 件)

- ① Tanaka S*, Nakakura T* (Equal ly contributed), Jansen EJ, Unno K, Okada R, Suzuki M, Martens GJ, Kikuyama S. (2013) Angiogenesis in the Intermediate Lobe of the Pituitary Gland Alters its Structure and Function. Gen Comp Endocrinol. 185: 10-18. 査読有.
DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.01.009.
- ② Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, Okajima F. (2012) Deficiency of Proton-Sensing Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 Attenuates Glucose-Stimulated Insulin Secretion, Endocrinology, 査読有. 153: 4171-4180. DOI: 10.1210/en.2012-1164.
- ③ He DX, Tobo M, Mogi C, Nakakura T, Komachi M, Murata N, Takano M, Tomura H, Sato K, Okajima F (2011) Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 415: 627-631. 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.122.

- ④ Sato M*, Nakakura T*(Equally contributed), Ogushi Y, Akabane G, Kurabuchi S, Suzuki M, Tanaka S. (2011) Expression of a mammalian aquaporin 3 homolog in the anterior pituitary gonadotrophs of the tree frog, *Hyla japonica*. Cell Tissue Res. 343: 595-603. 査読有.

DOI: 10.1007/s00441-010-1122-1.

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

[学会発表] (計5件)

- ① 中倉敬, 茂木千尋, 戸村秀明, 岡島史和
膝・細胞におけるプロトン感知性 OGR1
を介したインスリン分泌シグナルの解析
第 85 回日本生化学会, 2012 年 12 月
14-16 日 福岡
- ② 中倉敬, 茂木千尋, 田中滋康, 戸村秀明,
岡島史和
プロトン感知性 OGR1 によるインスリン
分泌調節シグナルの解析
第 37 回日本比較内分泌学会大会, 2012
年 11 月 30 日-12 月 1 日 福井
- ③ 中倉敬, 茂木千尋, 田中滋康, 戸村秀
明, 岡島史和
インスリン分泌調節に対する細胞外
pH とプロトン感知性 OGR1 の関与 第
38 回日本神経内分泌学会学術集会
2011 年 11 月 25-26 日 東京
- ④ 中倉敬, 茂木千尋, 田中滋康, 戸村秀
明, 岡島史和
プロトン感知性 OGR1 を介したインス
リン分泌調節機構の解析
第 36 回日本比較内分泌学会大会
2011 年 11 月 23-24 日 東京
- ⑤ 中倉敬, 茂木千尋, 田中滋康, 戸村秀
明, 岡島史和
プロトン感知性 OGR1 を介したインス
リン分泌調節メカニズム
第 84 回日本生化学会 2011 年 9 月
21-24 日 京都

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中倉 敬 (NAKAKURA TAKASHI)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号: 60568658