

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670431

研究課題名(和文)甘味受容体の内因性リガンドの探索・同定：細胞・脂肪細胞における機能の全容解明

研究課題名(英文)Identification of the endogenous ligand for the sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膵細胞や脂肪細胞に発現する甘味受容体を活性化させる内因性のリガンドを明らかにし、その作用、生理学的・病態生理学的意義を明らかにすることを目的としている。研究開始当初は、体内や細胞内に存在する代謝産物がリガンドではないかと想定し検討を進めたが、その過程で、生理的にもっとも重要な糖であるグルコースがこの受容体のリガンドであることが明らかになった。それ以降は、グルコースによる受容体の活性化機構、細胞内シグナル、その意義などについて検討を行った。その結果、グルコースはグルコース感知受容体を活性化して細胞内の代謝を促進すること、これによりインスリン分泌に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify an endogenous ligand for the sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells and adipocytes. We initially searched for intracellular compounds which activate the receptor. During the course of the study, we found that glucose is an endogenous ligand for this receptor. We therefore designated this receptor "the glucose-sensing receptor". We investigated the function and physiological role of this receptor in the action of glucose in beta-cells. We found that glucose activates the receptor, facilitates the metabolism in mitochondria and enhances the production of ATP. Since blockade of the receptor results in reduction of insulin secretion, we conclude that glucose-sensing receptor is involved in the action of glucose on insulin secretion. We also studied the changes in the expression of the glucose-sensing receptor in pancreatic beta-cells. The expression of the receptor is markedly reduced after the meal and hyperglycemia.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：甘味受容体 膵細胞 インスリン分泌 グルコース

## 1. 研究開始当初の背景

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)。

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)。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(Endocrine J 2013)、生理的なインスリン分泌に関与している可能性が予想される。

細胞の甘味受容体サブユニットの発現を検討するとT1R3優位でT1R2発現はきわめて低い。したがって細胞の甘味受容体はおそらくT1R3のホモダイマーと推定される。味蕾の甘味受容体の細胞外ドメインは口腔内に顔を出し、食物中の甘味物質を感知しているのに対し、細胞の受容体は体内に発現し、細胞外ドメインは血液に面している。おそらく血中にこの受容体を活性化する内因性リガンドが存在すると考えられ、生理的なインスリン分泌調節に関与していることが推定される。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞に発現する甘味受容体を活性化する内因性のリガンドを同定し、この受容体のもつ生理学的意義を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

細胞株 MIN6 細胞やマウス膵島より単離した細胞、さらには T1R3 を発現する HEK 細胞 (HEK-T1R3 細胞) を用いリガンド活性を測定するアッセイ系とする。様々な化合物や組織抽出液を用いてスクリーニングを行う。まず HEK-T1R3 細胞を用い、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_c$ ) の増加を受容体活性化の指標としてスクリーニングを行う。活性が認められたら、様々な分画法を用い、リガンド化性をもつ化合物の同定を進める。活性をもつ化合物が同定できたら、さらに MIN6 細胞やマウス

細胞を用いて受容体活性化をさらに検討する。この時、グルマリンやラクチゾールといった T1R3 拮抗剤を用い、これら拮抗剤に

より作用が抑制されるかを明らかにする。

細胞の甘味受容体を活性化するリガンドが明らかになったら、それが生理的/病態生理学的状況において、インスリン分泌調節にどのように関わるかを明らかにして行きたい。とくに細胞に作用してどのような細胞内シグナルを産生し、どのようにしてインスリン分泌を調節するかを明らかにして行きたい。

## 4. 研究成果

糖代謝・エネルギー代謝の調節に関係する様々な化合物、さらには代謝の中間産物、様々な組織や臓器の抽出物などを用い、HEK-T1R3 細胞において受容体を活性化する化合物のスクリーニングを行った。

その結果、意外なことにこの受容体を活性化する化合物は生理的に最も重要な糖であるグルコースであった。そこで MIN6 細胞や細胞においてもこの T1R3 ダイマー受容体を活性化するかどうかを検討した。これらの細胞ではグルコースは細胞内に取り込まれて代謝され、それを介して  $[Ca^{2+}]_c$  増加作用などを示すので、そのままでは受容体活性化が検討しにくい。そこで細胞内で代謝を受けず、しかも T1R3 に結合する非代謝性のグルコースアナログである 3-O-メチルグルコース (3OMG) を用いて検討を行った。3OMG は代謝を受けないグルコースであることから、これまでの常識では細胞に作用を及ぼすとは考えにくい化合物であるが、意外なことにグルコースによる細胞内  $Ca^{2+}$  変化の一部を再現し、これは T1R3 拮抗剤であるラクチゾールにより消失したことから、グルコースがこの受容体のリガンドであり、確かに作用を発揮することが確認された。グルコースは生理的にもっと重要な糖であり、また細胞におけるインスリン分泌を制御する最も重要な糖である。そこで我々は細胞に発現する甘味受容体 (分子実体は T1R3 ホモダイマーと予想される) をグルコース感知受容体と呼ぶことにした。

次にグルコース感知受容体が、グルコース誘発性インスリン分泌に関与することを明らかにするため、グルコース感知受容体をグルマリンやラクチゾールで抑制したり、T1R3 をロックダウンした細胞を用いて検討を行った。その結果、グルコース感知受容体を抑制することにより、グルコース誘発インスリン分泌が 40-60% 程度抑制された。さらにペリフュージョン系を用い、この受容体抑制によりグルコース誘発インスリン分泌が

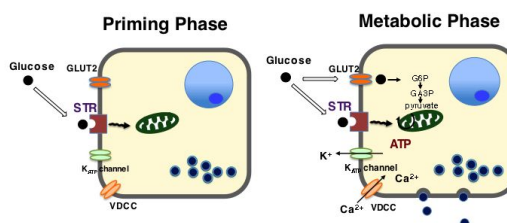
どのように変化するかを検討した。その結果、グルコース感知受容体を抑制することによりグルコース誘発性インスリン分泌の第一相および第二相が優位に抑制された。このことはグルコース作用の全体にわたってグルコース感知受容体が関与していることが推測された。我々はグルコース感知受容体シグナルがグルコースの代謝に何らかの影響を与えるのではないかと推定し、代謝がどのように関与するかを明らかにしようと考えた。その目的のために、細胞内の ATP の変化をモニターすることを行った。ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を MIN6 細胞に発現させ、その発光を測定することにより細胞内の ATP をモニターする測定系を確立した。

この細胞を用いて、グルコースによる ATP 変化を測定すると、グルコース濃度を増加させることにより二相性の ATP 増加が起きることが明らかになった。そこでこの測定系を用いてまず T1R3 をスクラースにより活性化した際の ATP 変化を検討した。スクラースは代謝されない化合物であるが、その投与により著明な ATP の増加が観察された。この ATP 増加は、細胞外のグルコースを除いた条件においても同じように観察された。またミトコンドリアで代謝されるコハク酸投与による ATP 増加もまたスクラースにより大きく増強された。これらの結果は、T1R3 を活性化することにより代謝が活性化され、ATP が増加することを示唆している。そこで、代謝を受けないグルコースアナログである 30MG を投与して細胞内 ATP の変化を測定した。その結果、解糖系の基質になり得ない 30MG によっても ATP が増加することが判明した。この結果は、グルコース分子がグルコース感知受容体を活性化し、細胞内の代謝を促進することにより ATP が増加することを示唆している。そこで我々は次にグルコースを投与した際に観察される ATP の増加がグルコース感知受容体ノックダウンによりどのように影響されるかを検討した。その結果、グルコース感知受容体 T1R3 のノックダウンによりグルコースにより惹起される ATP 増加が優位に抑制されることが明らかになった。

これらの結果は、グルコースは従来考えられて来たように細胞内で代謝を受け、それによって産生された ATP により ATP 感受性 K チャンネルが抑制されてインスリン分泌が惹起されるというだけでなく、代謝経路そのものがグルコース感知受容体により調節されているという新しい理解をもたらすものである。

我々はこれらの実験結果にもとづき、グルコース作用に関する新しいモデルを提唱した。

### 我々の提唱する新しいモデル



このモデルによれば、グルコースはまず細胞上に発現するグルコース感知受容体に作用する。活性化された受容体により、細胞内の代謝経路は活性化される(Priming Phase)。次にグルコースは GLUT2 を経て細胞内に入り、あらかじめグルコース感知受容体により活性化をうけた代謝経路に沿って代謝を受け、ATP が産生され、インスリン分泌が惹起される(Metabolic Phase)。つまりグルコースは単に解糖系の基質として作用するだけでなく、リガンドとして細胞外から作用し、自身の代謝を調節するというきわめて合目的な作用を発揮していることが明らかになった。

このようにグルコース感知受容体が生理的なインスリン分泌調節に関与していることが明らかになったことから、次に我々は T1R3 の発現が生理的条件下、あるいは病態においてどのように変化するかを検討した。免疫組織化学法により T1R3 はすべての細胞に発現しているが、一方で一部の細胞にも発現していることが明らかになった。これに対して、T1R2 の発現は免疫組織化学法では検出できなかった。定量的 PCR 法では、T1R2 発現は T1R3 発現の 1% 以下であった。これらのことから、やはり細胞においては T1R3 ホモダイマーが受容体として機能していると考えられた。細胞における T1R3 発現は栄養状態により大きく変動することも明らかになった。例えば、空腹時の T1R3 は顕著であったが、食後 3-4 時間が経過すると T1R3 発現は著明に低下した。免疫沈降法により T1R3 発現を検討しても、やはり食後 3 時間後の T1R3 発現量は、空腹時に比べて半減していた。T1R3 の mRNA 量を定量的 PCR 法により測定すると、食前・食後で mRNA 発現量に大きな変化は認められなかった。このことは、遺伝子発現レベルではなく、蛋白レベルで発現量が変化することを示唆している。一方、糖尿病のモデル動物である GK ラットや db/db マウスにおける T1R3 発現を検討すると

著明な発現低下が観察された。この場合は mRNA 発現が著明に低下しており、転写レベルで抑制がかかると推測された。一方、GK ラットにインスリン投与を行い血糖を低下させると、T1R3 発現が回復したことから、糖尿病モデル動物における T1R3 発現低下は高血糖によるものであることが推測された。これらの結果は、グルコース感知受容体が生理学的状況や糖尿病などの病態においてダイナミックに変化することを示しており、この受容体の機能や意義を考える上で、示唆に富んでいると思われる。

#### 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7件)

Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Hamano K, Medina J, Nagasawa M. Return of the glucoreceptor: Glucose activates the glucose-sensing receptor T1R3 and facilitates metabolism in pancreatic beta-cells. *J Diabetes Invest* 査読有 in press DOI 10.1111/jdi.12304

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

Medina A, Nakagawa Y, Ma JH, Li LF, Hamano K, Akimoto T, Ninomiya Y, Kojima I. Expression of the glucose-sensing receptor T1R3 in pancreatic islets: Changes in the expression levels in various nutritional and metabolic states. *Endocr J* 査読有 61, 2014, 797-805.

DOI org/10.1507/endocrj.E14-0221

Ohtsu Y, Nakagawa Y, Nagasawa M, Takeda S, Arakawa H, Kojima I. Diverse signaling systems activated by the sweet taste receptor in human GLP-1-secreting cells. *Mol Cell Endocrinol* 査読有 394, 2014, 70-79.

DOI 10.1016/j.mce.2014.07.004

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

Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I.

Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic  $\beta$ -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

[学会発表](計10件)

大津 喜晃、中川 祐子、濱野 邦久、李 龍飛、荒川 浩一、小島 至 グルコース感知受容体 T1R3 による糖代謝の促進機構 第57回日本糖尿病学会年次学術集会

(2014年5月23日 大阪国際会議場)

中川 祐子、Anyu Medina、濱野 邦久、大津 喜晃、李 龍飛、馬 金輝、小島 至 膵細胞におけるグルコース感知受容体 T1R3 の発現

第57回日本糖尿病学会年次学術集会

(2014年5月23日 大阪国際会議場)

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24日 福岡国際会議場)

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17日 熊本市市民会館)

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17日 熊本市市民会館)

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 熊本市市民会館)

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