

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460289

研究課題名(和文) グレリン分泌細胞における体内エネルギー量認識機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ghrelin secretion from endocrine cells

研究代表者

坪井 貴司 (TSUBOI, Takashi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：80415231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンは、空腹時に胃のX/A様細胞から分泌され、摂食やグルコース負荷によりその分泌が抑制される。しかし、グレリン分泌の詳細な制御機構は明らかになっていない。そこで本研究では、グレリン産生細胞株であるマウスMGN3-1細胞を用いて、分泌を制御する分子メカニズムの解明を試みた。解析の結果、グルコース濃度低下によって細胞内ATP産生量が低下し、その結果ATP感受性K<sup>+</sup>チャネルが開口し、膜電位が過分極する。そして、過分極によって活性化する電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルが開口することで細胞内にCa<sup>2+</sup>が流入し、グレリン分泌が起こることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin is a growth hormone (GH)-releasing peptide, isolated from the X/A-like cells from stomach, which plays an important role in the regulation of food intake and body metabolism. Although ghrelin secretion is known to be induced by neurotransmitters or hormones or by nutrient sensing in the ghrelin-secreting cells themselves, the mechanism of ghrelin secretion is not clearly understood. In the present study, we found that changing the extracellular glucose concentration from elevated (25 mM) to optimal (10 mM) caused an increase in the intracellular calcium concentration in ghrelin-secreting mouse ghrelinoma 3-1 (MGN3-1) cells, whereas changing the glucose concentration from elevated to lowered (5 or 11 mM) had little effect on the intracellular calcium concentration. These findings suggest that ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels are involved in glucose-dependent ghrelin secretion in MGN3-1 cells.

研究分野：分泌生理学

キーワード：開口放出 イメージング グレリン

### 1. 研究開始当初の背景

摂食行動は、胃の X/A 様細胞 (グレリン分泌細胞) から分泌される摂食促進ホルモンであるグレリンと、脂肪細胞から分泌される摂食レプチン、膵細胞から分泌されるインスリン、小腸内分泌 L 細胞から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) といった食欲抑制ホルモンの複雑な相互作用により調節されている。

グレリン分泌細胞からのグレリン分泌について、現象論的に見出されている知見は、大きく分けて2つある。第1に、食事時間に合わせてスパイク状のグレリン分泌がマウス個体において観察されている (Natalucci et al. Eur J Endocrinol 2005)。このことは、グレリン分泌が自律神経系によって制御されていることを示している。事実、副交感神経は、グレリン分泌を抑制するように、交感神経はグレリン分泌を促進するようにはたらく (Kojima et al. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2006)。第2に、マウス個体の胃へグルコースを直接投与すると、血中グレリン濃度が減少する (Sakata et al. Am J Physiol 2012)。このことから、食事に含まれる栄養素が、グレリン分泌を制御する可能性もある。これらの結果は、グレリン分泌細胞の初代培養実験系が確立されていないことや、グレリン分泌モデル細胞株が存在していなかったことから、マウス個体を用いた研究によるものである。そのため、グレリン分泌がどのように制御されているのか、分子・細胞レベルでの説明は、未だなされていない。

食欲抑制ホルモンである GLP-1 やインスリンは、小腸内分泌 L 細胞や膵細胞が、血中グルコース濃度増加を感知することで分泌する。その一方で、グレリン分泌細胞は、小腸内分泌 L 細胞や膵細胞とは対照的に、血中グルコース濃度上昇時にグレリン分泌が減少し、血中グルコース濃度低下時にグレリン分泌が増加する。しかし、グレリン分泌細胞がどのようなメカニズムで血中グルコース濃度増減を感知しグレリンを分泌するのか、そのメカニズムは未解明である。また、グルコース以外の血中成分 (アミノ酸や脂質、その他神経伝達物質やホルモンなど) についても、グレリン分泌細胞が、どのようなメカニズムでそれらを感知し、グレリン分泌に影響を及ぼすのか、不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず網羅的遺伝子解析によりグレリン分泌細胞における体内エネルギー量変化を感知する受容体、トランスポーター、イオンチャネル等の同定を行う。そして、グレリン分泌細胞からのグレリン分泌反応や細胞内シグナル伝達過程を直接全反射蛍光顕微鏡下で可視化解析できる観察系を構築する。そしてこれらの解析手法を組み合わせることで、グレリン分泌細胞がどのようなメ

カニズムで、体内エネルギー量変化を感知し、グレリン分泌を制御するのかを解明する。また、網羅的遺伝子解析の結果を用いて、グレリン分泌を制御する新たな生理活性物質の同定も試みる。

### 3. 研究の方法

(1) グレリン分泌細胞株 MGN3-1 細胞および胃組織から単離精製したグレリン分泌細胞から、mRNA を抽出し、SMARTer Ultra Low RNA kit for Illumina Sequencing (タカラバイオ) を用いて cDNA の作製を試みる。胃組織からのグレリン分泌細胞単離には、グレリン分泌細胞に特異的に発現しているグレリンやグレリン 0-アシルトランスフェラーゼに対する抗体を用いてグレリン分泌細胞を染色し、その後フローサイトメーターを用いて単離、精製を試みた。次に、次世代シーケンシステム (Genome Analyzer, Illumina 社) を用いて、既存および未知のグレリン分泌に關与する mRNA を網羅的に同定した (RNA sequencing 解析、対象約 300 万リード)。そして、遺伝子発現の認められた受容体、チャネル、トランスポーター、ホルモン受容体等について、組織中での発現細胞を *in situ* hybridization 法にて、細胞内での発現と局在は、免疫プロット法や蛍光免疫染色法により検証する。

(2) 脳由来神経栄養因子 (BDNF) に蛍光タンパク質を融合させたプラスミド (BDNF-Venus) を MGN3-1 細胞へ遺伝子導入し、グレリン分泌小胞を可視化する。そして、栄養素を投与した際のグレリン分泌小胞の動態、分泌反応数等を、細胞表面の超微小領域内の蛍光プローブ動態を特異的に検出できる全反射蛍光顕微鏡により生きたまま観察を行う。

(3) 蛍光タンパク質に遺伝子改変を加え、細胞内の  $Ca^{2+}$ 、cAMP、 $IP_3$  等の濃度測定を可能にした分子スパイプローブ (Oya et al. Genes Cell 2011; Kitaguchi et al. Biochem J 2013; Shimozono et al. Nature 2013) を MGN3-1 細胞に遺伝子導入する。そして上記解析 (1) で発現を認めた栄養素を感受する受容体やチャネル、トランスポーターの阻害剤やアゴニストを投与し、細胞内の  $Ca^{2+}$ 、cAMP、 $IP_3$  濃度変化を測定する。また、RNA 干渉法 (RNAi) を用いて、MGN3-1 細胞における栄養素を感受する受容体やイオンチャネル、トランスポーターや関連酵素の発現を抑制し、グレリン分泌反応への影響を評価する。同時に ELISA によるグレリン分泌量の計測も行う。

### 4. 研究成果

(1) マウス由来胃内分泌 X/A 様細胞株である MGN3-1 細胞を用いて、グルコース濃度依存的なグレリン分泌の制御機構を解析した。

解析の結果、細胞外グルコース濃度を高血糖状態（25 mM）から、低血糖状態（5 および 10 mM）に低下させることで、細胞内  $Ca^{2+}$  が上昇し、グレリン分泌反応が促進されることを見出した。

次に、機能不全変異型 ATP 感受性  $K^+$  チャンネル ( $K_{ATP}$  チャンネル) を MGN3-1 細胞に強制発現させたところ、10 mM グルコースによって引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$  上昇およびグレリン分泌反応が抑制された。一方、正常 MGN3-1 細胞に  $K_{ATP}$  チャンネルの開閉剤であるジアゾキシドを 25 mM グルコース刺激と共投与することによってグレリン分泌反応が促進されること、 $K_{ATP}$  チャンネルの開閉剤であるトルブタミドを 10 mM グルコース刺激と共投与することによってグレリン分泌反応およびグレリン分泌量が増加することが明らかになった。さらに、L、N、および T 型の電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの阻害剤であるジルチアゼム、コトキシシンおよび NNC55-0396 を 10 mM グルコースと共投与することにより、低グルコースによって引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇およびグレリン分泌が抑制された (Oya et al, *Journal of Endocrinology* 226, 25-34, 2015)。

これらの結果から、以下の分泌制御機構が提唱された。まず、グルコース濃度低下によって細胞内 ATP 産生量が低下し、その結果  $K_{ATP}$  チャンネルが開閉し、膜電位が過分極する。そして、過分極によって活性化される電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルが開閉することで細胞内に  $Ca^{2+}$  が流入し、グレリン分泌が起こる (図 1)。

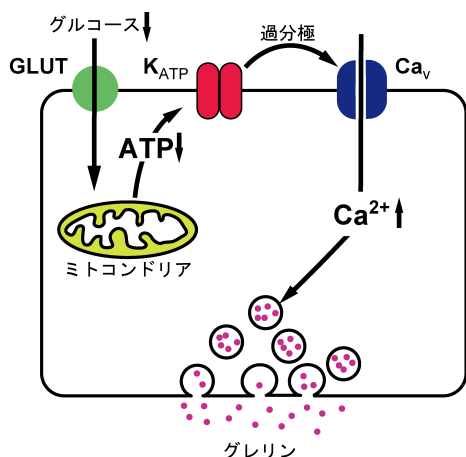


図 1 グルコース濃度依存的グレリン分泌機構モデル

(2) グレリン分泌を制御する因子の同定と機能解析を進めた。まず、低グルコース条件下で培養した MGN3-1 細胞から mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析や RT-PCR 解析を行った。解析の結果、小胞輸送や開口放出を司る低分子量 G タンパク質 Rab ファミリー、CAPS ファミリー、そして SNARE タンパク質ファミリーの発現を見出した。

次に、RNA 干渉法を用いて内在性の CAPS1

遺伝子をノックダウンし、グレリン分泌への影響を解析した。ELISA 法により、グレリン分泌量を比較すると、CAPS1 のノックダウンによってグレリン分泌量が減少することが示された。また CAPS1 は、分泌反応の引き金となる細胞内カルシウム濃度上昇反応には、影響を与えないが、グレリン分泌動態には影響を及ぼすことが明らかとなった。具体的には、全反射蛍光顕微鏡による解析の結果、CAPS は、グレリン分泌における膜融合過程を調節する可能性を見出した。

## 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 6 件)

Matsuda S, Harada K, Ito M, Takizawa M, Wongso D, Tsuboi T, Kitaguchi T. Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid linkers between a fluorescent protein and PDE5. *ACS Sensors* 2, 46-57, (2017) 査読有  
doi: 10.1021/acssensors.6b00582

Yamashita S, Tsuboi T, Ishinabe N, Kitaguchi T, Michiue T. Wide and high resolution tension measurement using FRET in embryo. *Scientific Reports* 6, 28535, (2016) 査読有  
doi: 10.1038/srep28535

Harada K, Kamiya T, Tsuboi T. Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental and pathological implications in the brain. *Frontiers in Neuroscience* 9, 499, (2016) 査読有  
doi: 10.3389/fnins.2015.00499

Aoki R, Tsuboi T, Okamoto H. Y-maze avoidance: an automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. *Neuroscience Research* 91, 69-72, (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.neures.2014.10.012

Harada K, Kitaguchi T, Tsuboi T. Integrative function of adrenaline receptors for glucagon-like peptide-1 exocytosis in enteroendocrine L cell line GLUTag. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460, 1053-1058, (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.151

Oya M, Kitaguchi T, Harada K, Numano R, Sato T, Kojima M, Tsuboi T. Low glucose-induced ghrelin secretion is

mediated by ATP-sensitive potassium channel. Journal of Endocrinology 226, 25-34, (2015) 査読有  
doi: 10.1530/JOE-15-0090

〔学会発表〕(計 8件)

神谷泰智、原田一貴、坪井貴司。「グルタミン誘導性グルカゴン様ペプチド-1 分泌機構の解析」、第94回日本生理学会大会、2017年3月30日、オークラクトシティー浜松、静岡県浜松市

原田一貴、伊藤幹、Xiaowen Wang、田中三佳、Devina Wongso、平瀬肇、坪井貴司、北口哲也。「新規 cAMP 可視化赤色蛍光タンパク質の開発と応用」、第94回日本生理学会大会、2017年3月29日、オークラクトシティー浜松、静岡県浜松市

松田翔吾、原田一貴、伊藤幹、滝澤舞、Devina Wongsom、坪井貴司、北口哲也。「蛍光タンパク質を用いた単色型 cGMP 可視化プローブの開発」、第39回日本分子生物学会、2016年11月30日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

原田一貴、北口哲也、神谷泰智、坪井貴司。「小腸内分泌 L 細胞におけるリソフォスファチジルイノシトール依存性細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇機構」、第93回日本生理学会大会、2016年3月22日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

神谷泰智、原田一貴、北口哲也、坪井貴司。「小腸内分泌 L 細胞株における L-グルタミン投与時の GLP-1 分泌機構」、第93回日本生理学会大会、2016年3月22日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

原田一貴、北口哲也、大屋愛実、沼野利佳、佐藤貴弘、児島将康、坪井貴司。「胃グレリン分泌細胞からのグレリン分泌制御機構の解析」、第93回日本生理学会大会、2016年3月23日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

原田一貴、北口哲也、坪井貴司。「アドレナリンによるインクレチン分泌調節機構の解析」、第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会大会、2015年3月22日、神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市

原田一貴、北口哲也、坪井貴司。「アドレナリンによる小腸内分泌 L 細胞からの GLP-1 分泌への影響」、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 貴司 (TSUBOI, Takashi)  
東京大学・大学院総合文化研究科・教授  
研究者番号：80415231

### (2) 研究分担者

北口 哲也 (KITAGUCHI, Tetsuya)  
東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授  
研究者番号：60432374

### (3) 連携研究者

太田 邦史 (OHTA, Kunihiro)  
東京大学・大学院総合文化研究科・教授  
研究者番号：90211789