

β細胞に発現する甘味受容体を標的とした創薬戦略の確立

群馬大学 生体調節研究所 細胞調節分野

中川 祐子

1. はじめに

甘味受容体は、舌の味蕾に発現する甘味を感知する受容体として同定された。その分子実体は、CタイプのGタンパク質供与型受容体 (GPCR)、T1R2およびT1R3のヘテロ二量体であった。当初この分子は、主に舌の味蕾に存在し、甘味の受容に関与する分子として単離されたが、近年、その発現部位は様々な器官におよぶことが明らかになった。その中には、視床下部、十二指腸、小腸の内分泌細胞など甘味の感受とは一見関係ない器官も含まれていた。私は甘味受容体がインスリンを分泌する膵β細胞に発現することを見だし、甘味受容体のアゴニストによりインスリン分泌が惹起されることを明らかにした。またこの時、細胞内で起こるシグナル伝達機構を詳細に検討したところ、細胞内Ca²⁺の上昇、cAMPとジアシルグリセロール (DAG) の産生およびプロテインキナーゼC (PKC) の活性化が起こることを示した。しかしながら、このように多岐にわたるシグナルが発生されるメカニズムについては未だ不明であった。

味蕾における検討では、甘味の受容には T1R2+T1R3 のヘテロ二量体に加え、これに結合する G タンパク質である Gα_{gust} または G14 が必要であることが報告されている。Gα_{gust} は、ホスホジエステラーゼ (PDE) を活性化するため cAMP を減少させる。一方、G14 は Gq に分類され、フォスホオリパーゼ C (PLC) を活性化し、イノシトール 1, 4, 5-3 リン酸 (IP₃) と DAG の産生を促す。またこの Gα に結合する βγ サブユニットは、PLCβ2 を活性化するといわれている。現在最もコンセンサスを得られているシグナル経路は、甘味物質が T1R2+T1R3 に結合し、受容体に結合する三量体 G タンパク質が解離し、その βγ サブユニットによって PLCβ2 が活性化される。これにより IP₃ と DAG が産生される。IP₃ は III 型 IP₃ 受容体を活性化し、小胞体から Ca²⁺ を放出させる。これによって Ca²⁺ 依存的に TRPM5 が活性化され、細胞内に Na⁺ が取り込まれる。細胞膜の脱分極がおき電位依存性 Na⁺ チャネル (VGNC) が活性化され、さらに脱分極が進み、Pannexin-1 が活性化され、ATP が細胞外に放出され、シグナルを味覚神経に伝達するというものである。T1R2+T1R3 には、糖やアミノ酸、人工甘味料など様々な構造の物質をアゴニストとするが、これら全ての物質が先述と同じシグナルを発生させるのか、またアゴニスト特異的なシグナルを発生させるのかは不明である。同じ C タイプの GPCR の代謝型グルタミン酸受容体において、結合部位の異なるアゴニストが異なるシグナルを発生させることが知られている。そこで本研究では、膵β細胞の細胞株である MIN6 細胞を用いて、シグナル伝達経路をリアルタイムで観察することにより、様々な甘味受容体アゴニストが惹起するシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

膵β細胞における甘味受容体を介したインスリン分泌を惹起するメカニズムを明らかにするために、その細胞株である MIN6 細胞を用いてシグナル伝達をリアルタイムで観察できる鋭敏な測定系を開発した。cAMP および Ca²⁺ の動態を同時モニターするため MIN6 細胞に、Lipofectamin 2000 (invitrogen) を用いて cAMP のインジケーター Epac1-camps を導入し、その後、Ca²⁺ インジケーターである fura-2-AM を導入した。Epac1-camps は、Rap1 の GEF である Epac1 の両端に蛍光タンパク質である YFP および CFP を融合したタンパク質である。定常状態では YFP と CFP の距離が近いため FRET が起きるが、Epac1 に cAMP が結合すると YFP と CFP が離れ、FRET が解消される。この性質を利用して cAMP の産生量を相対的に検出した。またプロテインキナーゼ C (PKC) のリン酸化活性を検出するために PKC の基質である MARKS に蛍光タンパク質 GFP を融合した MRACKS-GFP を MIN6 細胞に導入し、観察した。MARCK-GFP は定常状態で細胞膜に局在するが PKC のリン酸化をうけると細胞質へと局在を変化させる。この性質を利用し、細胞質の蛍光強度を測定することにより PKC のリン酸化活性を相対的に評価した。これらの観察には、AQUACOSMOS/ASHURA (Hamamatsu Photonics) を使用した。ま

た DAG の産生量をモニターするため、コンベンショナル型 PKC である PKC γ の C1 ドメインに蛍光タンパク質 RFP を融合し、細胞に導入し、観察を行った。C1 ドメインは、定常状態では細胞膜に局在し、DAG と結合することにより細胞膜に局在を移行する。TIRF 顕微鏡を用いて、細胞膜の蛍光強度を観察した。

3. 結果

甘味受容体アゴニストであるスクラロース、アセスルファム K、およびサッカリンを MIN6 細胞に添加することによりインスリン分泌が惹起されることを報告した。今回新たに同じく甘味受容体アゴニストであるグリチルリチンを添加することにより、MIN6 細胞でインスリン分泌が惹起されることを明らかにした。

次に、甘味受容体アゴニストが誘導するシグナル伝達機構が共通であるか、それともそれぞれの甘味受容体アゴニスト特異的なものかということになる。まず、Ca²⁺ と cAMP の動態を観察した。スクラロースとアセスルファムは共に Ca²⁺ と cAMP の上昇を促した。それに対してグリチルリチンは Ca²⁺ の上昇は促すものの、cAMP の上昇はあまり促さなかった。一方、サッカリンでは、Ca²⁺ の上昇はあまり促さず、cAMP の上昇のみを促した。この結果は、それぞれの甘味受容体特異的なシグナル伝達経路が存在することを示唆する。

スクラロース、グリチルリチンおよびアセスルファム K によって誘導される Ca²⁺ 上昇の作用機序を詳細に検討した。細胞外の Ca²⁺ を除くことにより、全てのアゴニストで誘導される Ca²⁺ は抑制された。この結果は、3つのアゴニストで誘導される Ca²⁺ 上昇は細胞外 Ca²⁺ に依存していることを示唆する。また、外液の Na⁺ を除くことで、スクラロースとアセスルファム K で誘導される Ca²⁺ はほぼ完全に抑制されるものの、グリチルリチンで誘導される Ca²⁺ は部分的な抑制があった。この結果はそれぞれの Na⁺ に対する依存性に違いがあることを示唆する。さらに Gq の関与を想定し、Gq インヒビターである YM-254890 を使用し、検討を行った。その結果、アセスルファム K によって誘導される Ca²⁺ はほとんど抑制されなかったが、スクラロースとグリチルリチンで誘導される Ca²⁺ はほぼ完全に抑制された。この結果は、スクラロースとグリチルリチンは Gq を介して Ca²⁺ シグナルを伝達していることを示唆するものである。げっ歯類の甘味受容体の阻害剤であるグルマリンを用いて Ca²⁺ 動態変化を観察した。スクラロースでの検討結果では、グルマリンは Ca²⁺ の上昇を阻害するが、cAMP の上昇は阻害しない。この結果を基に Ca²⁺ を上昇させるアゴニストが惹起する Ca²⁺ シグナルにグルマリンがどのような作用を及ぼすか検討を行った。その結果、スクラロースおよびグリチルリチンが誘導する Ca²⁺ は部分的に抑制されたが、アセスルファム K が誘導する Ca²⁺ 上昇は全く抑制されなかった。この結果は、スクラロースとグリチルリチンは甘味受容体を介して Ca²⁺ シグナルを発生させることを示唆する。

次に甘味受容体アゴニストを介したシグナル伝達機構に PKC が関与するか否かを MARKS-GFP を用いて検討を行った。その結果、Ca²⁺ 上昇を促進するアゴニスト、スクラロース、アセスルファム K およびグリチルリチンでは、PKC の強い活性化が見られたが、サッカリンでは弱い PKC 活性のみが見られた。この結果は全てのアゴニストで PKC 活性を促進するがその依存性には違いが見られることを示唆する。

cAMP の産生機に Gs が関与しているか否か検討を行った。siRNA 導入により Gs の発現を抑制し、この細胞を用いてスクラロースおよびサッカリンが誘導する cAMP の動態を観察した。その結果、スクラロースおよびサッカリンで誘導する cAMP はほぼ抑制された。この結果は、二つの甘味受容体アゴニストによって誘導される cAMP シグナルは、Gs を介していることを示唆するものである。

4. 考察

今回の研究により、MIN6細胞に甘味受容体アゴニストであるスクラロース、アセスルファム K、サッカリンに加え、グリチルリチンを作用させることによりインスリン分泌を促進することが示された。この4つの甘味受容体アゴニストを用いて細胞内シグナルを検討した結果、スクラロースとアセスルファム K では細胞内 Ca²⁺ と cAMP の上昇が促進され、グリチルリチンでは細胞内 Ca²⁺ は強く促進するが、cAMP 産生量はあまり変化しなかった。一方、サッカリンでは cAMP の産生は強く促進したが、Ca²⁺ はあまり変化しなかった。この結果は、甘味受容体アゴニスト全てにおいて、共通したシグナル伝達経路が存在するのではなく、甘味受容体アゴニスト特異的なシグナル伝達機構が存在することを示唆する。これまでの報告では、スクラロースやアセスルファム K は T1R2 と T1R3 の N 末端側に結合し、サッカリンは T1R3 に結合するとされている。グリチルリチンの甘味受容体に対する結合部位についての報告はない。

結合部位が共通するスクラロースとアセスルファムKにおいては、共通のシグナルを発生させる。今回の検討では、4つのみの検討であった。すでに結合部位が特定されている甘味受容体アゴニストを使用し、結合部位とシグナル発生との相関性を検討する必要がある。

cAMPを上昇させるスクラロースやサッカリンでは、Gsを介してcAMPを上昇させることが明らかとなった。これは、現在報告されているT1R2+T1R3に結合するGα_{gust}およびG14とは異なるGタンパク質が作用することを示唆するものである。

このように発生させるシグナルは異なるもののすべてのアゴニストはインスリン分泌を促す。次の課題として、この多様なシグナル伝達の生理的機能を解明することである。一つの手がかりは、cAMPを上昇させるアゴニストが細胞保護機能も併せもつことが示されたことである。今後、さらに検討を加え、β細胞に発現する甘味受容体を標的とした創薬に向け解析を行う。

5. 発表論文

1. Function of sweet taste receptor in pancreatic beta-cells. **Nakagawa, Y.** *生化学*, 83 (7): 647-651, (2011).
2. The role of the sweet taste receptor in enteroendocrine cells and pancreatic β-cells. **Kojima, I. and Nakagawa, Y.** *Diabetes Metab J.*, 35(5):451-457, (2011).