

膵β細胞における新規グルコース感知受容体 T1R3/T1R3の機能解明

中川 祐子

群馬大学生体調節研究所 助教

緒言

インスリンは糖代謝を調節する最も重要なホルモンでその作用不全は糖尿病を招来する。我が国における糖尿病およびその予備軍は2050万人にも達し、大きな社会問題となっている。我が国の糖尿病患者の大半はインスリン分泌不全を特徴とする2型糖尿病であることからインスリン分泌調節の全容を解明することは有効な治療法を開発するために大変重要である。インスリン分泌を調節する最も重要な因子はグルコースで、その作用機序については多くの研究がなされてきた。一般的に、グルコースはGlut2を介して細胞内に取り込まれ、解糖系により代謝される。このとき産生されたATPあるいはATP/ADPの濃度比が増加することでATP感受性 K^+ チャネル(K_{ATP} チャネル)が抑制され、脱分極が起きる。これにより電位依存性 Ca^{2+} チャネルが活性化され細胞内 Ca^{2+} が上昇する。これがインスリン顆粒の開口放出を引き起こす。この他にも K_{ATP} チャネルを介さない経路が存在するが、いまだ不明な点も少なくない。

筆者は膵β細胞のセカンドメッセンジャーの動態を可視化する測定系を確立し、その鋭敏な測定系を用いてグルコース応答性のシグナル伝達機構を解析してきた。その結果、以下のような特筆すべき結果を得た。膵β細胞の培養細胞株であるMIN6細胞においてグルコース刺激わずか数秒以内に細胞内 Ca^{2+} およびcAMPの上昇、ジアシルグリセロール(DAG)の産生亢進またプロテインキナーゼC(PKC)によるリン酸化の増強が惹起された。この素早い応答は従来知られているグルコースの代謝を介した応答とは異なり、代謝阻害剤存在下においても抑制されず、非代謝性のグルコースアナログでも再現できた。したがって一連の素早い応答は「グルコース代謝非依存的な応答」であることが考えられる。また、これらのシグナル応答の一部はGタンパク質共役受容体(GPCR)であるTaste receptor type 1 member 3(T1R3)のホモダイマー(T1R3/T1R3)を介していることが明らか

となった。マウスの膵灌流実験において甘味受容体の阻害剤グルマリンによりグルコース応答性インスリン分泌の第一相目ばかりでなく、第二相目も抑制することが明らかになった。またMIN6細胞の検討からグルコースによりグルコース感知受容体を活性化させるとATP産生が促進されることもわかった¹⁾。このようにT1R3/T1R3はグルコースを感知する受容体であることから、以降T1R3/T1R3をグルコース感知受容体として検討を行う。

そこで本研究では筆者が見いだした「膵β細胞に発現するグルコース感知受容体」のグルコース応答性インスリン分泌機構における生理的意義を明らかにし、特にグルコースにより活性化されたグルコース感知受容体から発生するシグナルの全貌を解明し、どのような分子制御機構で多様なシグナルが発生するのかを検討する。またその後起こるグルコース代謝の活性化およびATP産生の増強の制御機構を明らかにする。本研究によりグルコース感知受容体を介した新たな作用機構が明らかになれば定説を塗り替える新たな知見がもたらされ、新たな代謝調節系が明らかになる。このように本研究は極めて新規性の高い独創的な研究である。

結果

グルコースによる細胞膜直下の細胞内 Ca^{2+} の変化

我々はまずグルコースにより細胞内 Ca^{2+} の素早い応答が引き起こされるか否か検討を行った。この目的のために我々は、細胞膜に局在する超高感度 Ca^{2+} インジケータ yellow Cameleon-nano15 (PM-Cameleon-nano15)²⁾を用い、膵β細胞株MIN6細胞の細胞内 Ca^{2+} 変化を測定した。細胞外グルコース濃度を2.8 mMから25 mMに変化させたところ、素早い一過的な Ca^{2+} 上昇が観察された。典型的な Ca^{2+} 応答パターンを図1Aに示す。この素早い Ca^{2+} 上昇は、数秒以内に観察され、10秒でプラトーに達した。その後、急速な Ca^{2+} 低下が観察された。この Ca^{2+} 低下は、ベースラインより低い値を示した。 Ca^{2+}

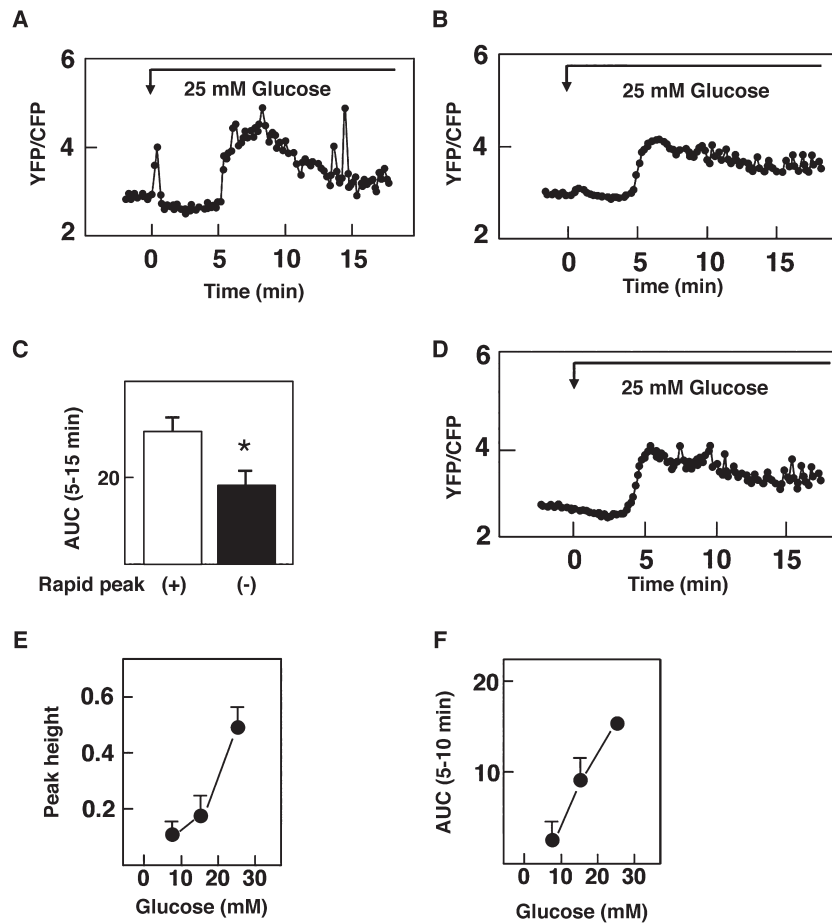


図1 MIN6細胞でのグルコースの効果

A, B: PM-Cameleon-nano15を用いて測定したCa²⁺動態。(A) 刺激直後のCa²⁺応答が大きい群。(B) 刺激直後のCa²⁺応答が小さい群。C: 刺激直後のCa²⁺応答が大きい群と小さい群のCa²⁺応答強度の違い。D: PM-Cameleon-nano15を導入した細胞にFura-2をロードした状態でのCa²⁺動態。E: 刺激直後のCa²⁺上昇におけるグルコース濃度依存性。F: Ca²⁺応答強度におけるグルコースの濃度依存性。

低下は1~5分続き、その後、二度目のCa²⁺上昇が起こった。一過的なCa²⁺上昇が観察された細胞は、検討した細胞のうち約60%で見られ、二度目の大きなCa²⁺上昇は検討した全ての細胞で観察された。一過的なCa²⁺上昇が見られない細胞では、大きな一過的なCa²⁺上昇に代わり、グルコース刺激直後、ブロードで小さなCa²⁺上昇が観察された(図1B)。そして、その後、一過的で大きなCa²⁺上昇が観察された細胞と同様に1~5分間にわたりCa²⁺低下が見られ、二度目の大きなCa²⁺上昇が見られた。このCa²⁺上昇は、一過的なCa²⁺上昇が見られた細胞のArea under the curve (AUC) に比べ、小さい値を示した(図1C)。PM-Cameleon-nano15を用いることにより、グルコース刺激直後に大きな一過的なCa²⁺上昇やブロードで小さなCa²⁺上昇が観察されたが、従来型のCa²⁺インジケーターでは、グルコース刺激直後の上昇は見られなかった。しかし、その後のCa²⁺低

下と二度目の大きなCa²⁺上昇は観察された。興味深いことにPM-Cameleon-nano15を導入した細胞にFura-2をロードすると、グルコース刺激直後の大きな一過的なCa²⁺上昇とブロードで小さなCa²⁺上昇が消失した。しかし、その後起こるCa²⁺低下と二度目のCa²⁺上昇は見られた(図1D)。この結果は、Fura-2がグルコース刺激直後の上昇を阻害することを示す。PM-Cameleon-nano15を用いることによって観察された3つのCa²⁺応答、刺激直後の一過的で大きなCa²⁺上昇またはブロードで小さなCa²⁺上昇、その後Ca²⁺低下、二度目の大きなCa²⁺上昇は、8.3 mMや16.7 mMグルコース刺激でも観察された。8.3 mMや16.7 mMグルコース刺激では、刺激直後のCa²⁺応答が全体の50%の細胞で観察された。各濃度で得られたCa²⁺上昇応答からAUCを算出し、比較すると、グルコース刺激直後のCa²⁺応答と二度目の大きなCa²⁺上昇は、濃度依存的に起こることが示され

た (図1E-F)。

グルコース刺激直後に見られる一過的で大きなCa²⁺上昇は、フォスホリパーゼC (PLC) の阻害剤U73122によって阻害された。また、Ca²⁺低下応答も阻害された。Gq阻害剤であるYM254890によってグルコース刺激直後の一過的で大きなCa²⁺上昇とその後Ca²⁺低下が顕著に阻害された。U73122およびYM254890存在下でのCa²⁺応答によって得られたAUCを比較した結果、刺激直後の一過的で大きなCa²⁺上昇 (図2A) とその後Ca²⁺低下 (図2B) が著しく阻害されていることがわかった。また、YM254890存在では、二度目の大きなCa²⁺上昇も

阻害されることがわかった (図2C)。

我々はさらに素早いCa²⁺上昇を検討するために、従来の方法でCa²⁺を測定することができるか否か検討を行った。その結果、Fluo-8を用いることで、グルコース刺激直後の素早いCa²⁺上昇を検出することができた。図3Aに示すように、25 mMグルコースにより刺激直後のCa²⁺上昇を検出した。Fluo-8を用いて検討した細胞の内、約40%が刺激直後に一過的なCa²⁺上昇が観察できた。また、それに続くCa²⁺低下、二度目の大きなCa²⁺上昇を観察することができた。これはPM-Cameleon-nano15での検討結果と非常に良く類似している。外液のCa²⁺を除いた状態では、グルコース刺激をした結果刺激直後の一過的なCa²⁺上昇とそれに続くCa²⁺低下は観察できたが、二度目の大きなCa²⁺上昇は見られなかった (図3B)。また、Lタイプ電位依存性Ca²⁺チャネルの阻害剤であるnifedipineによっても、グルコース刺激直後のCa²⁺上昇とその後のCa²⁺低下は検出できたが、二度目の大きなCa²⁺上昇は抑制された (図3C)。また、代謝阻害剤であるmannoheptuloseでもグルコース刺激直後のCa²⁺上昇とその後のCa²⁺低下は検出できたが、二度目の大きなCa²⁺上昇は抑制された (図3D)。非代謝性のグルコースアナログである3-O-Methylglucoseにより刺激すると、刺激直後の一過的なCa²⁺上昇とそれに続くCa²⁺低下が観察された (図3E)。T1R3の阻害剤のlactisole³⁾存在下でのグルコース応答では、刺激直後の一過的なCa²⁺上昇とそれに続く低Ca²⁺低下が消失した。しかし、二度目の大きなCa²⁺上昇は観察された (図3F)。Lactisoleの有無でCa²⁺低下を比較したところ、lactisole存在下はコントロールに比べではCa²⁺低下が抑制された。

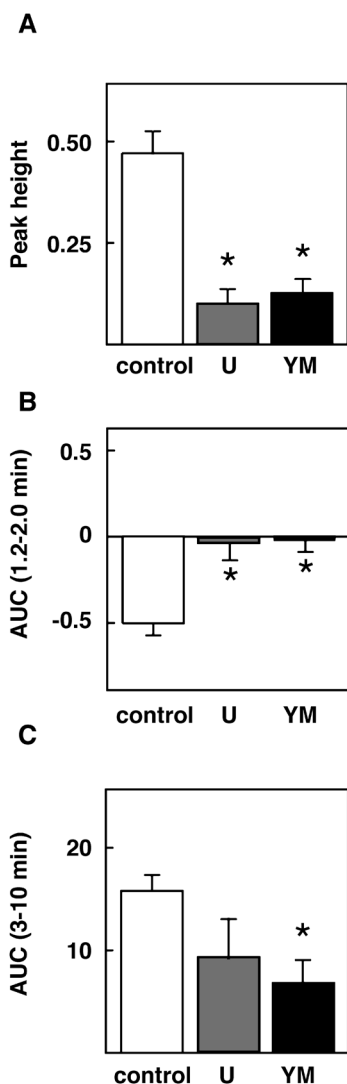


図2 グルコース誘導性Ca²⁺応答におけるU73122とYM254890の効果

A: 刺激直後のCa²⁺応答におけるU73122 (U) とYM254890 (YM) の効果。B: Ca²⁺低下応答におけるU73122とYM254890の効果。C: Ca²⁺上昇応答におけるU73122とYM254890の効果。

グルコースによるcAMPの変化

我々はグルコースによるcAMPの変化を測定するためにcAMPのインジケータであるEpac1-camps⁴⁾を用いた。Epac1-campsを発現させたMIN6細胞に25 mMグルコースで刺激すると、刺激直後cAMPが上昇し、その上昇は持続的に続いた (図4A)。cAMPの上昇は、グルコース刺激後10秒で上昇し始め、約1分でプラトーに達した。Ca²⁺とcAMPを同時に測定すると、同じ時に変化することがわかった (図4B)。8.3 mMグルコースでcAMP上昇が観察された。このcAMPの上昇は濃度依存的に起こった (図4C)。cAMPの上昇は、外液のCa²⁺を抜いた状態でも起こった。外液のCa²⁺の有無でcAMP変化をそれぞれのAUCをとり、比較した (図4D)。cAMPの上昇がGs

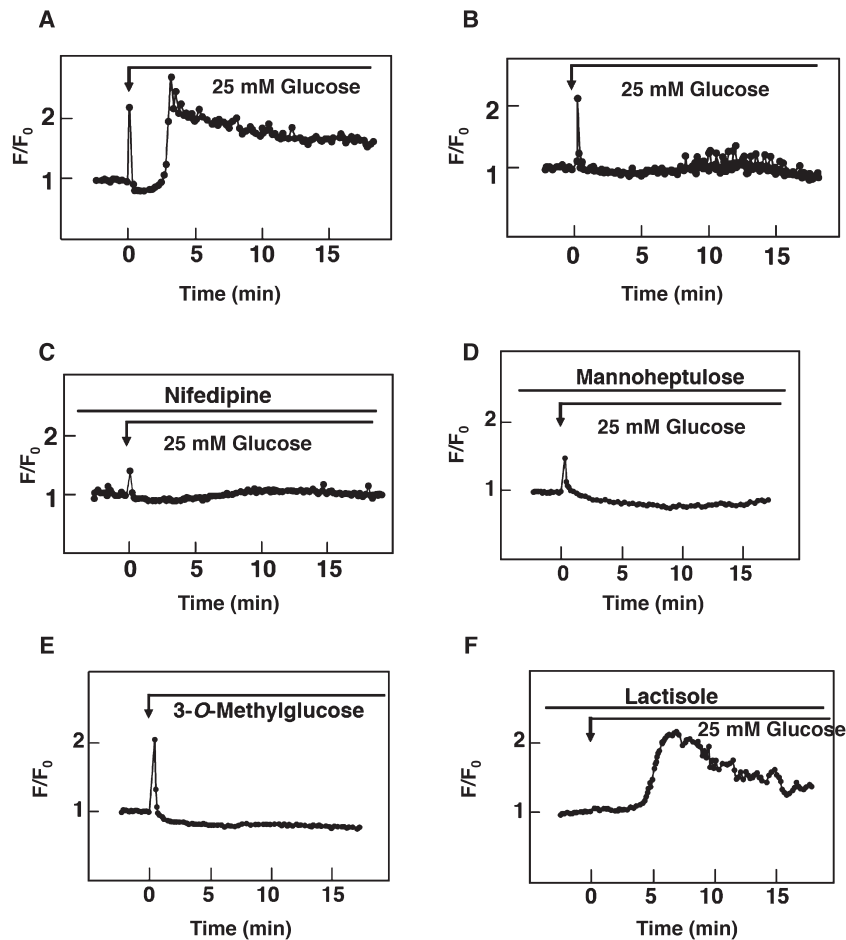


図3 Fluo-8を用いて測定したグルコースと3-O-Methylglucoseの効果

A: Fluo-8を用いて測定したCa²⁺動態。B: 細胞外Ca²⁺を除いた状態でのCa²⁺動態。C: Nifedipine存在下でのCa²⁺動態。D: Mannoheptulose存在下でのCa²⁺動態。E: 3-O-MethylglucoseによるCa²⁺動態。F: Lactisole存在下でのCa²⁺動態。

に依存して起こるかどうかが検討するために、dominant negative Gsを導入し、検討を行った。その結果、グルコース誘導性のcAMPの上昇は抑制された(図4E)。cAMPの上昇は、代謝を抑制した状態でも観察された。さらに非代謝性グルコースアナログによってもcAMPの上昇が観察された。T1R3をノックダウンさせるとcAMPの上昇は抑制された(図4F)。

グルコースによるPKCの変化

次に我々はDAGの変化を測定した。図5Aに示すように、25 mMグルコースにより素早い一過的なDAGの上昇が観察された。DAGは10秒以内に上昇し、3分間上昇した。次にPKCの基質であるMARKSの動態を測定した。MARKSはPKCによってリン酸化されると、形質膜から細胞質へと局在を変化させる。最初の上昇は20秒以内に観察され、2から3分間でピークの値になった

(図5B)。二度目の大きな上昇は5から7分後に起きた。mannoheptuloseによって代謝を止めると、最初の上昇は観察させたが、二度目の上昇は抑制された(図5C)。非代謝性のグルコースアナログである3-O-Methylglucoseによって、最初の上昇は観察されたが、二度目の上昇は観察されなかった(図5D)。

T1R3ノックアウトマウスより単離したβ細胞におけるグルコースの効果

我々はグルコース感知受容体の検討を行うために、T1R3ノックアウトマウスの単離β細胞を用いてグルコースによるCa²⁺の動態を検討した。野生型のマウスより単離したβ細胞では25 mMグルコースにより、刺激直後の一過的な上昇とそれに続くCa²⁺の低下、その後二度目の大きなCa²⁺の上昇を観察した(図6A)。最初のピークが観察された細胞は全体の45%だった。それ以

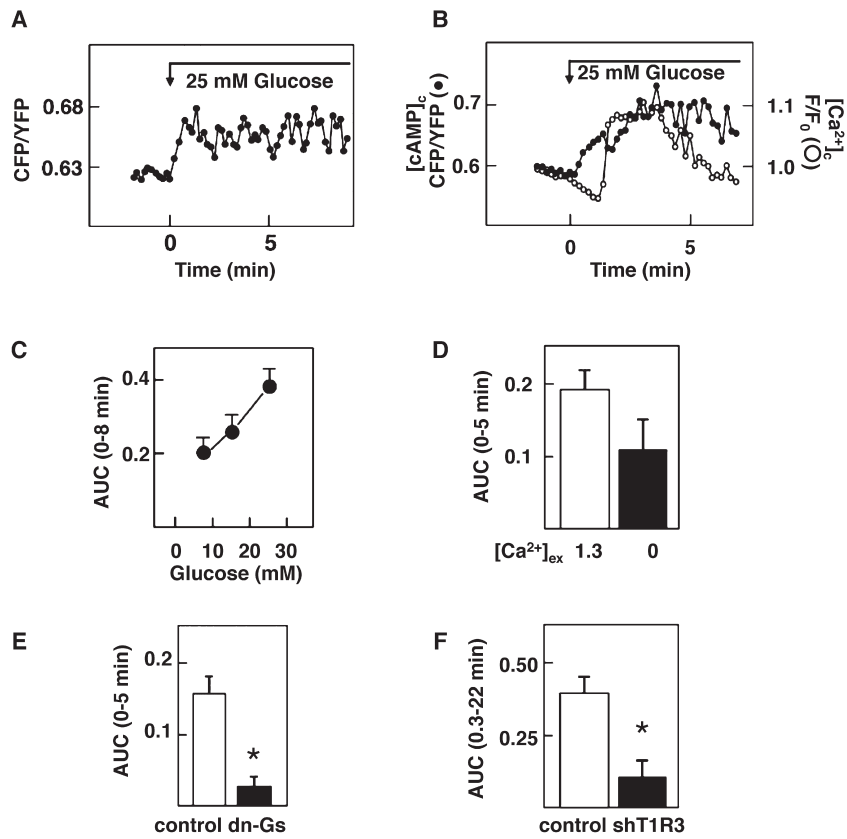


図4 MIN6細胞でのグルコース応答性cAMPの変化

A: グルコース刺激によるcAMP動態。B: グルコース刺激によるcAMPとCa²⁺の動態。C: cAMP応答のグルコース濃度依存性。D: 細胞外Ca²⁺濃度の違いによるcAMP応答の変化。E: dominant negative Gs (dn-Gs) によるグルコース応答性cAMP応答の変化。F: shT1R3によるグルコース応答性cAMP応答の変化。

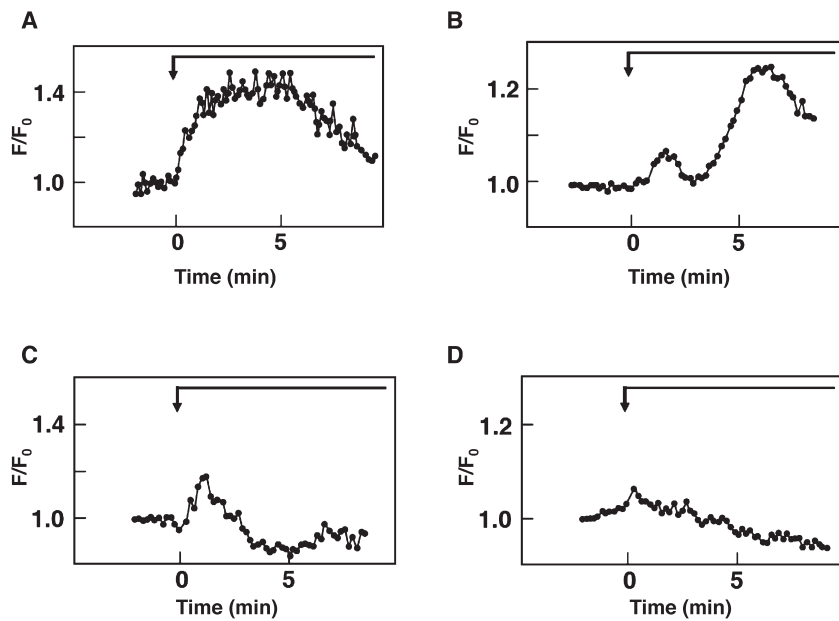


図5 MIN6細胞でのグルコース刺激によるDAGとMARCKSの変化

A: 25 mMグルコースによるDAGの変化。B: 25 mMグルコースによるMARCKSの変化。C: Mannoheptulose存在下での25 mMグルコースによるMARCKSの変化。D: 25 mM 3-O-MethylglucoseによるMARCKSの変化。

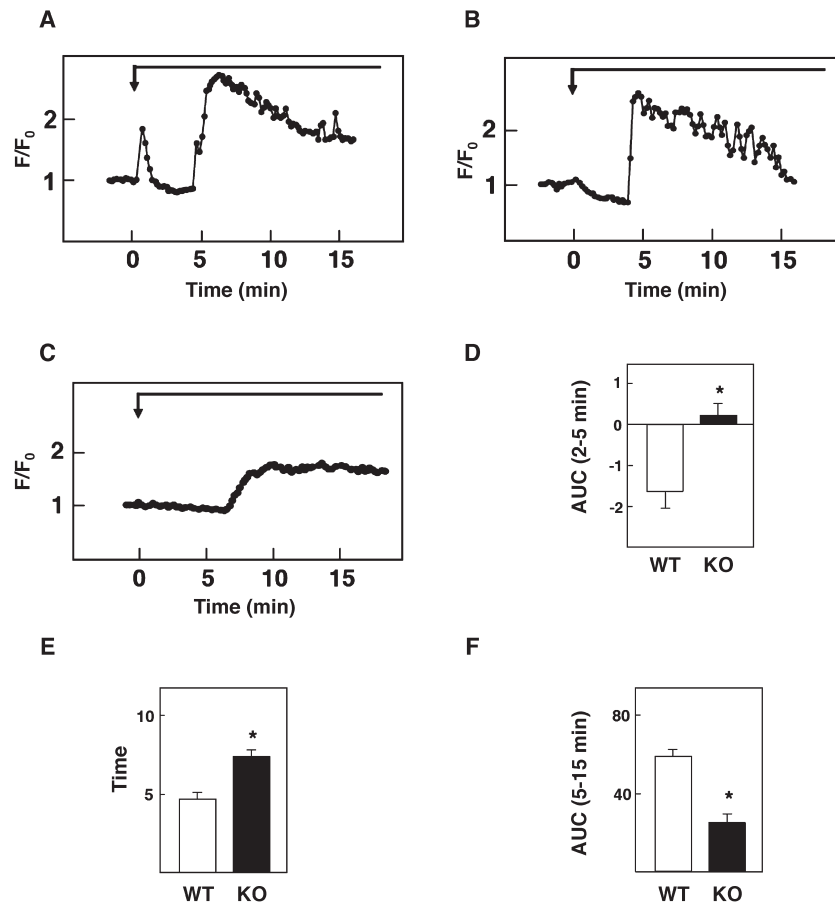


図6 グルコース応答性 Ca^{2+} 変化における野生型 (WT) と T1R3 knockout (KO) の比較

A, B: WTより単離した膵 β 細胞のグルコース応答性 Ca^{2+} の変化。(A) 刺激後一過的な Ca^{2+} 応答がある群。(B) 刺激後一過的な Ca^{2+} 応答がない群。C: KOより単離した膵 β 細胞のグルコース応答性 Ca^{2+} の変化。D: グルコース刺激後2~5分の Ca^{2+} 応答強度の比較。E: 二度目の Ca^{2+} 応答までの時間の比較。F: グルコース刺激後5~15分の Ca^{2+} 応答強度の比較。

外の細胞はグルコース刺激後 Ca^{2+} が低下し、その後 Ca^{2+} が上昇し、その後10分ほど Ca^{2+} 上昇が続いた (図6B)。T1R3ノックアウトマウスの β 細胞では、グルコース誘導性の素早い一過的な上昇は観察されなかった。また、 Ca^{2+} の低下も観察されなかった。グルコース刺激後、7分で Ca^{2+} の上昇が見られた (図6C)。野生型とT1R3ノックアウトマウスの β 細胞におけるグルコース刺激直後の Ca^{2+} 応答は、野生型に比べT1R3ノックアウトマウスでは小さかった (図6D)。また、二度目の大きな Ca^{2+} 上昇までの時間が長かった (図6E)。加えて、二度目の大きな Ca^{2+} 上昇も野生型に比べT1R3ノックアウトマウスでは小さかった (図6F)。

次に25 mM 3-O-Methylglucoseによる単離膵 β 細胞における効果を検討した。その結果、野生型では刺激直後の一過的で大きな Ca^{2+} 上昇とその後の Ca^{2+} 低下が観察された (図7A)。これに対してT1R3ノックアウトマウス

より単離した β 細胞では、3-O-Methylglucoseには反応しなかった (図7B)。次に単離膵 β 細胞におけるcAMPの動態を検討した。野生型ではグルコース刺激後、素早く持続的なcAMPの上昇が見られた (図7C)。cAMPの上昇は10秒以内に見られた。これに対してT1R3ノックアウトマウスより単離した β 細胞ではグルコースによりcAMPは変化しなかった (図7D)。野生型とT1R3ノックアウトマウスの違いを定量的比較すると、明らかにT1R3ノックアウトマウスでは、cAMPの上昇が抑制された。

考 察

今回の検討により、膵 β 細胞におけるグルコースによって活性化される受容体経路の素早いシグナルが存在することを証明した。形質膜に局在する超高感度の Ca^{2+} インジケーター Cameleon-nano15を用いて、膵 β 細胞に起

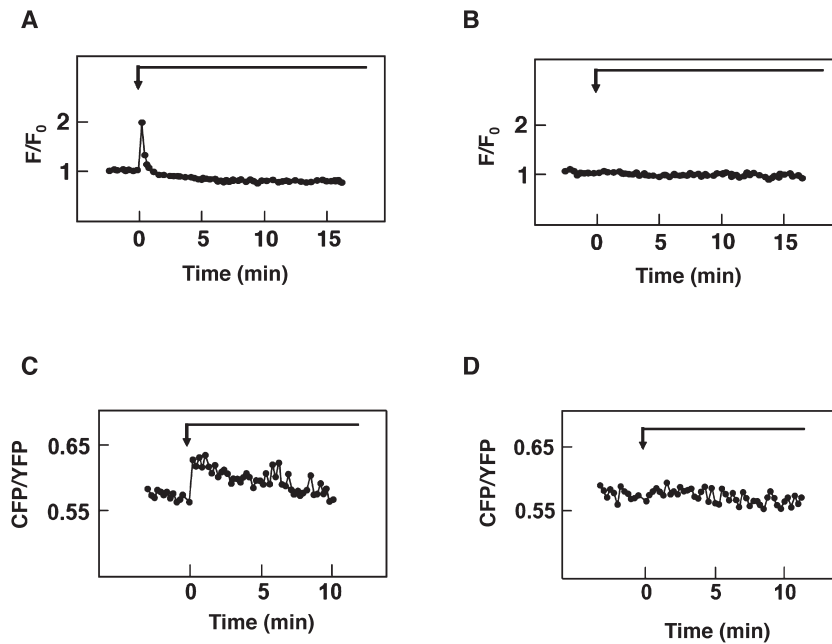


図7 3-O-Methylglucose 応答性Ca²⁺変化とグルコース応答性cAMP変化におけるWTとKOの比較

A: WTより単離した膵β細胞の3-O-Methylglucose 応答性Ca²⁺の変化。B: KOより単離した膵β細胞の3-O-Methylglucose 応答性Ca²⁺の変化。C: WTより単離した膵β細胞のグルコース応答性cAMPの変化。E: KOより単離した膵β細胞のグルコース応答性cAMPの変化。

きるわずかな違いを検出できた。図1Aに示すように、グルコースはβ細胞で素早く一過的なCa²⁺上昇を誘導した。この素早いCa²⁺上昇は今回はじめて報告された。なぜなら、Ca²⁺の上昇は素早くわずかなため、既存の方法、例えばFura-2などのインジケーターでは検出が不可能だった。図1Dに示すようにCameleon-nano15を導入した細胞にFura-2をロードすると素早いCa²⁺の上昇が消失してしまう。Fura-2のキレート作用によりCa²⁺上昇の変化を緩衝してしまうためと考えられる。しかし、高感度な方法では、グルコースによる素早いCa²⁺上昇を検出できることが可能となる。比較的蛍光強度が高いFluo-8では素早いCa²⁺上昇が検出できた(図3A)。このCa²⁺上昇は細胞外のCa²⁺を除いた状態でも検出することができることから、細胞内Ca²⁺プールより動員されたものと考えられる。また、この素早いCa²⁺上昇はPLC阻害剤やGq阻害剤で抑制されることから、イノシトール三リン酸によってERを刺激してCa²⁺放出したものと考えられる。素早いCa²⁺上昇は、代謝阻害剤であるmannoheptuloseによって阻害されないことから、代謝非依存的に起こると考えられる。これに対して、T1R3の阻害剤であるlactisoleでは阻害された。また、T1R3ノックアウトマウスより単離した膵β細胞でもグルコースによる素早いCa²⁺上昇が観察されなかった。

これらのデータより、グルコースはグルコース感受体を活性化してCa²⁺上昇を惹起させることが考えられる。これと一致するように非代謝性のグルコースアナログである3-O-Methylglucoseによって素早いCa²⁺上昇が観察された。これらのデータより、グルコースが受容体を介して素早いCa²⁺応答を引き起こすことが考えられる。しかし、グルコースによる素早いCa²⁺応答は典型的なCa²⁺活性化剤であるカルバコールによる応答とは異なると考えられる。グルコースと同様にカルバコールもPLCを活性化し細胞内Ca²⁺を上昇させるが、グルコース応答はfura-2で検出することができないが、カルバコール応答はfura-2で検出することができる。また、グルコース応答はCa²⁺上昇のあとCa²⁺低下するが、カルバコール応答ではCa²⁺低下はしない。恐らく、グルコースとカルバコールは異なる方法でPLCを活性化し、異なるCa²⁺シグナルを引き起こすと考えられる。

今回得られたデータはグルコースに対する応答が異なる2つのタイプの細胞が存在することを示唆している。半分の細胞はグルコース刺激直後にCa²⁺上昇が起き、もう半分の細胞は刺激直後にCa²⁺上昇が起きない。この2つの細胞群の違いはT1R3の発現の違いであると考えられる。恐らく、シグナル分子の発現量の違いによって、2つのタイプの細胞が生じると考えられる。

以前の知見では、グルコースがCa²⁺低下を誘導することが示されており、それによるとERにあるSERCAが活性化され、Ca²⁺を隔離すると言われている⁵⁾。しかし、グルコースがERにCa²⁺を隔離するメカニズムは明らかではない。さらにグルコース感受受容体の阻害剤であるlactisoleによって、グルコースが誘導するCa²⁺低下を抑制する(図3F)。同じようにT1R3ノックアウトマウスの細胞でもこのCa²⁺低下が抑えられていた。加えて、3-O-Methylglucoseによって再現できた。これらのデータはグルコースによるCa²⁺低下はグルコース感受受容体を介して起こることを示唆している。今のところ、この受容体がSERCAの活性化を経てERへCa²⁺の隔離を誘導するメカニズムは明らかではない。この点において、このCa²⁺低下はGqやPLCの阻害剤によって消失する。そのため、このCa²⁺低下は受容体が活性化するPLCのシグナルと連鎖していると考えられる。HEK293にT1R3を発現させた細胞では、25 mMグルコースによって素早いCa²⁺上昇が起き、その後Ca²⁺低下が起きる。このCa²⁺低下はグルコース感受受容体がもつユニークな特徴である。またT1R3の活性化はCa²⁺の低下を引き起こす。ヒトのGLP-1産生細胞において、アセシルファミンKによってグルコース感受受容体を活性化させると、形質膜に局在するCa²⁺ポンプ(PMCA)⁶⁾を活性化し、Ca²⁺を低下させる。未だ、このPMCAを活性化の詳細なメカニズムは不明であるが、リガンドと結合した受容体がCa²⁺ポンプを活性化させ、持続的なCa²⁺の低下を引き起こすものと考えられる。 β 細胞においては、グルコースによる受容体の活性化がSERCAを活性化し、Ca²⁺低下を引き起こすことが考えられる。今後、グルコースによって活性化される受容体がどのようにSERCAを活性化するかを明らかにする必要がある。この点に関して、subplasma membranのCa²⁺の上昇がSERCAを活性化し、ERへのCa²⁺取り込みを亢進させる可能性がある。他の可能性として、cAMPの上昇がERへのCa²⁺隔離を促しており、Gs経路でERへのCa²⁺取り込みに関与している可能性も考えられる。グルコースによるCa²⁺低下はグルコースの代謝に依存する可能性がある。なぜならば、SERCAはATPを必要とする酵素でグルコースは数分うちにATPを上昇させるからである。上昇したATPはERへのCa²⁺取り込みを亢進しうる。

今回の検討では、グルコースが誘導する素早いcAMPの動態を検出することもできた。この結果はMIN6や β

細胞においてグルコースが素早くcAMPを上昇させることを示唆する。cAMPの上昇は二度目の大きなCa²⁺上昇より先に起こり、細胞外のCa²⁺を除いた状態でも上昇した。この結果は、少なくともcAMPの上昇はCa²⁺上昇に依存しないことを示す。我々はこれまでグルコース感受受容体は、Gsを介してcAMPを上昇させることを報告した。加えて、3-O-Methylglucoseによりグルコース感受受容体を介してcAMPを上昇させることを報告した。我々のデータはKim et al.⁷⁾やFridlyand et al.⁸⁾のデータと一致する。しかし、我々のデータは、Ca²⁺上昇に依存したcAMP上昇とする先のデータとは一致しない。この理由については不明だ。しかし、我々の測定系では β 細胞の早い応答に関するcAMPに注目している。少なくとも素早いcAMPの上昇は受容体を介したGsの活性化に依存していると考えられる。

今回のデータでは、グルコースがサイトゾルに存在するリン酸化MARCKSを二次的に上昇することにより、グルコースが素早く、長時間にわたりPKCの活性化を誘導することを示した。一般的にグルコースはCa²⁺上昇によってPKCを活性化させると考えられてきた。 β 細胞において、Ca²⁺の上昇はDAG産生を亢進させ、さらにCa²⁺依存性PKCを活性化させる。一方、高濃度のグルコースは基質より新規のDAGを産生する。いずれにせよPKCの活性化はグルコースの代謝に依存し、その開始は遅いとされていた。しかし、図5Bに示すようにMARCKSのリン酸化は刺激後10秒以内で起き、DAGの産生も10秒以内に起きる。さらに最初のリン酸化は非代謝性のグルコースアナログでも再現できることから、グルコースの代謝非依存的に起こる。我々はこれまでグルコース感受受容体はPLC-Ca²⁺システムと繋がっていることを示した。PKCの素早いリン酸化はグルコースの代謝に非依存的で、受容体を介したPLCの活性化に依存する。

今回の研究は β 細胞においてグルコースが素早く細胞内Ca²⁺およびcAMP上昇を惹起させることを初めて報告した。これらの作用は代謝に非依存的で、グルコース感受受容体依存的に起きる。重要なことは、受容体の阻害やT1R3の欠損によりグルコース応答性インスリン分泌が抑制される。特にインスリンの分泌はT1R3ノックアウトマウスより単離した β 細胞において遅延と低下が見られる。このように、受容体を介した素早い応答は β 細胞においてグルコースの作用において重要である。グルコースの作用はグルコースの代謝を介したものばかり

りではない。グルコース感知受容体は早いシグナルを惹起し、そして、代謝経路をプライミングし、グルコース代謝経路を亢進させる。我々のデータは、Kyriazis et al.⁹⁾による甘味受容体がインスリンの基礎分泌を阻害するという報告と矛盾する。以前我々が報告したように、T1R3の阻害剤である lactisole を使用して得られたデータがあるためである。さらに、Kyriazis et al. のデータでは、lactisole の使用方法が適切ではないと考えられる。さらに重要なことに T1R3 ノックアウトマウス由来のβ細胞では *in vivo* と *in vitro* 両方でグルコース応答性インスリン分泌を抑制する。すなわち T1R3 は膵β細胞においてグルコース作用に関与しているのである。

本研究より、我々はグルコースによって惹起されるグルコース感知受容体を介した細胞内シグナルを同定した。この素早い応答は代謝経路をプライミングし、インスリンの早い分泌に重要であると考えられる。

要 約

グルコースは膵β細胞においてインスリン分泌の最も重要な刺激物質である。高濃度のグルコースは代謝によりその作用を発揮するものと考えられていた。この点に関して我々は最近グルコースが細胞表面に存在するグルコース感知受容体を刺激し、代謝を亢進することを報告した。本研究において、グルコースによりグルコース感知受容体を刺激し、受容体を介した素早い応答を示すか否か検討を行った。MIN6細胞および単離β細胞において、グルコース刺激後数秒以内に一過的で顕著なCa²⁺上昇が見られた。その後、Ca²⁺低下と二度目の大きな

Ca²⁺上昇が見られた。最初の一過的なCa²⁺上昇は細胞外からのCa²⁺流入に依存せず、代謝にも依存しない。非代謝性グルコースアナログにより、刺激直後の一過的で顕著なCa²⁺上昇とその後のCa²⁺低下を再現した。また、T1R3の阻害剤 lactisole 存在下では、グルコース刺激直後の一過的で顕著なCa²⁺上昇とCa²⁺低下が抑制された。グルコースはまたcAMPの産生も亢進させた。この上昇はGs dominant negativeの導入やT1R3の発現抑制によって抑えられた。これらのデータよりグルコースは細胞膜に存在するグルコース感知受容体を活性化し、Ca²⁺とcAMPを素早く上昇させることを示唆する。それ故に、グルコースは細胞膜に存在するグルコース感知受容体を介して素早い細胞内シグナルを発生させる。

謝 辞

今回の研究は、公益財団法人三島海雲記念財団学術研究奨励金によりご支援頂き、行われたものです。本研究助成を受け賜りましたことを深く感謝致します。

文 献

- 1) Y. Nakagawa, et al.: *Endocr. J.*, **61**, 119–131, 2014.
- 2) M. Nagasawa, I. Kojima: *Physiol. Rep.*, **3**, e12296, 2015.
- 3) K. Hamano, et al.: *J. Endocrinol.*, **226**, 57–66, 2015.
- 4) L. J. Landa, et al.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 31294–31302, 2005.
- 5) M. W. Roe, et al.: *Am. J. Physiol.*, **266**, E852–E862, 1994.
- 6) Y. Ohtsu, et al.: *Mol. Cell Endocrinol.*, **394**, 70–79, 2014.
- 7) J. Kim, et al.: *PLoS ONE*, **3**, e2127 2008.
- 8) L. E. Fridlyand, et al.: *Am. J. Physiol.*, **293**, C1924–C1933, 2007.
- 9) G. A. Kyriazis, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E524–E532, 2012.