

- W.-D., & Moser, J. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 27336–27345.
 12) Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., & Fujita, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 15021–15028.
 13) Kaiser, J.T., Hu, Y., Wiig, J.A., Rees, D.C., & Ribbe, M.W. (2011) *Science*, 331, 91–94.
 14) Raymond, J., Siebert, J., Staples, C., & Blankenship, R. (2004) *Mol. Biol. Evol.*, 21, 541–554.
 15) Hu, Y., Yoshizawa, J., Fay, A., Lee, C., Wiig, J., & Ribbe, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 16962–16966.
 16) Lee, C., Hu, Y., & Ribbe, M. (2010) *Science*, 329, 642.

藤田 祐一

(名古屋大学大学院生命農学研究科・JST さきがけ)

Dark-operative protochlorophyllide reductase: structural framework common to nitrogenase and evolutionary aspects
 Yuichi Fujita (Graduate School of Bioagricultural Sciences,
 Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464–
 8601, Japan)

臍β細胞における甘味受容体の機能

1. はじめに

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、その作用機構についてはこれまで多くの研究がなされてきた。臍β細胞においてグルコースはグルコース輸送体Glut2を介して細胞内に取り込まれる。その後、解糖系やミトコンドリアで代謝されることにより産生された細胞内ATPの濃度あるいはATP/ADP比が増加することでATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)が閉鎖する。それにより細胞膜が脱分極し、やがて膜電位が閾値を超えると電位依存性Ca²⁺チャネル(VDCC)が開口し、Ca²⁺が細胞内に流入する。この細胞に流入したCa²⁺がトリガーとなりインスリン顆粒の開口放出が開始される¹⁾。さらにグルコースの代謝に依存してはいるが、K_{ATP}チャネルには依存していないシグナル経路も存在している²⁾。いずれもグルコース代謝に依存する形でインスリン分泌が促進されることから、グルコースがこのような経路によりインスリン分泌を促進するという考え方には「代謝説」と呼ばれてきた。この説によれば、グルコースは細胞内で代謝されたのちにその作用を発揮することから、直ちに作用を発揮することはできないはずである。実際、グルコースの添加後、β細胞内のCa²⁺濃度の変化をモニターすると1~数分のタイム

ラグの後にCa²⁺濃度の上昇がみられる³⁾。

我々はβ細胞におけるシグナル伝達に興味をもち、β細胞内で起こるシグナル伝達を可視化する実験を行ってきた。その過程で、上記の代謝説では説明がつかないシグナル変化に遭遇することになった。図1は臍β細胞株であるMIN6細胞にグルコースを添加した際のCキナーゼ(PKC)活性化をリアルタイムにモニターしたものである。PKC活性化の指標として、GFPを融合したmyristolated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)を使用した⁴⁾。MARCKSはPKCの基質となるタンパク質で、非刺激時(脱リン酸化状態)には細胞膜に局在する。リン酸化を受けるとMARCKSは細胞膜から細胞質へ移行する。高濃度グルコースを添加すると、刺激直後、細胞質のMARCKSの蛍光強度は急速に増加する。この上昇は一過的で徐々に減衰するが、数分後、再び上昇に転じ、増加は持続する。グルコースの代謝を抑制するD-mannoheptuloseをグルコースとともに添加すると、第二相の持続的な増加は消失したが、最初の素早い増加は影響を受けなかった。一方、代謝を受けないグルコースアナログ2-deoxy-D-glucoseの添加によって素早い蛍光強度の増強を再現することができた。この結果は、最初の数秒以内に起こる素早いPKCの活性化がグルコースの代謝に依存しないことを強く示唆している。またMARCKSの局在変化の代わりに、conventional PKCであるPKCαのトランスロケーションをモニターしても、同様にグルコースが素早く、かつ二相性の変化を示す。この第一相の素早い活性化は、グルコース代謝に依存しない。conventional PKCの調節領域にはC1ドメインと

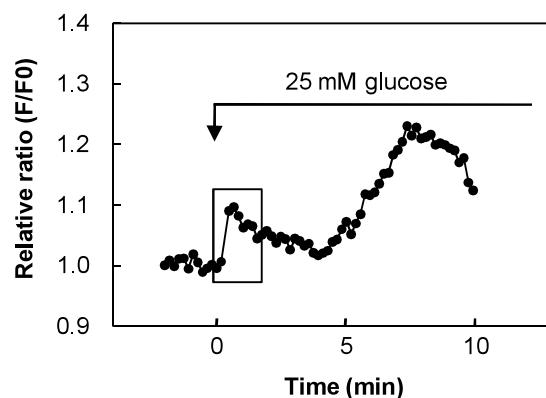


図1 グルコース刺激によるPKC活性化

MARCKS-GFPを発現させたMIN6細胞を用いて、細胞質の発光強度を指標にPKC活性化を経時的に観察した。グルコースにより細胞質の発光強度は上昇した。四角で囲んだように数秒以内にPKC活性化が観察された。その数分後に2度目の大きなPKC活性化がみられた。

C2ドメインが存在し、前者はジアシルグリセロール(DAG)またはホルボールエステルの結合領域であり、後者はCa²⁺の結合領域である。conventional PKCが触媒活性を示すには、これらのセカンドメッセンジャーが必要である。ではグルコースはどのような機序によって代謝非依存的にセカンドメッセンジャーを産生するのか？またそのシグナルの生理的意義とは何であろうか？

2. 甘味受容体を介したシグナル伝達機構

β細胞におけるグルコースの作用はすべて代謝に依存するのであろうか？今では忘れ去られているが、古くからβ細胞にグルコースを認識する受容体が存在するのではないかと考える研究者がいた。例えば1974年、仁木らはグルコースをリガンドとする受容体の存在を提唱した(グルコレセプター説)⁵⁾。当時、その分子実体は明らかではなかったが、彼らはグルコースアノマーに対する認識能が味蕾に存在する受容体と類似することや、味蕾の甘味受容を抑制する物質であるp-nitrophenyl α-D-glucopyranosideによってインスリンの分泌が抑えられることを示した⁶⁾。

2001年にNelsonらによりtaste receptor, type 1, member 3(T1R3)遺伝子がクローニングされ、この遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにより、T1R3遺伝子がコードするタンパク質が甘味受容体であることが証明された⁷⁾。この分子は7回膜貫通部位をもつCタイプのGタンパク質共役型受容体(GPCR)で、同じT1Rファミリーに属するT1R2とヘテロダイマーを形成し機能する。近年、甘味受容体を介するシグナル伝達機構の研究が進み様々なシグナル伝達分子が同定されている。その中で現在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ホスホリバーゼC(PLC)β2が活性化されるというものである。これによりイノシトール三リン酸(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transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5(TRPM5)が活性化され、細胞内にNa⁺が取り込まれる。その結果、細胞膜の脱分極が起き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。

その後、味蕾以外の細胞・臓器でもT1R2+T1R3甘味受容体が発現することが示された。小腸では内分泌細胞に発現する甘味受容体の活性化によりインクレチニンの分泌が

誘導され、ナトリウム・グルコース共輸送体(SGLT1)の発現が誘導される⁸⁾。

我々は膵β細胞におけるグルコースの素早い作用に甘味受容体が関与しているのではないかと考え、まずβ細胞における甘味受容体の発現を検討した⁹⁾。その結果、RT-PCRによりマウス単離膵島およびMIN6細胞にT1R2、T1R3およびGタンパク質ガストデューションが発現していることを確認した。また抗T1R3抗体を用いた免疫組織化学染色によりTIR3はインスリンを産生するβ細胞に発現することが明らかになった。

次に、膵β細胞での甘味受容体の機能を検討した。甘味受容体のアゴニストである人工甘味料スクラロースを単離膵島に添加すると濃度依存的にインスリン分泌が促進されグルコースによる分泌も増強された。MIN6細胞においても同様の結果を得た。そこでMIN6細胞を用いて、甘味受容体を介したシグナル伝達経路の検討を行った。fura-2および蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づくcAMPのバイオセンサーであるEpac1-camp¹⁰⁾を導入し、単一細胞でCa²⁺とcAMPの濃度変化を同時に検出した。

MIN6細胞にスクラロースを添加し、Ca²⁺とcAMPの濃度変化を検出した結果、細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_c)は一過的な大きな上昇とそれに続く持続的な上昇を示し、cAMPは持続的な上昇を示した(図2A)。この変化はCa²⁺動員アゴニストであるカルバコールとは異なり、またcAMPを上昇させることが知られているglucagon-like peptide-1(GLP-1)に比べcAMPの上昇が顕著であった。

次にスクラロースの刺激によって観察された[Ca²⁺]_cの変化が甘味受容体を介することを確認するために甘味受容体の阻害剤グルマリン¹¹⁾の効果を検討した。その結果、グルマリン(3 μg/ml)により[Ca²⁺]_cの上昇が抑制されることが確認された(図2B)。

[Ca²⁺]_c上昇の機序を明らかにするため、VDCCの阻害剤Nifedipine(10 μM)および細胞外液のCa²⁺を除き検討を行った。その結果、スクラロースで誘導される[Ca²⁺]_c上昇が顕著に抑制されたことから、外液のCa²⁺、特にVDCCを介したCa²⁺流入経路に依存的であることが確認された。VDCCの活性化には、細胞膜の脱分極が必須である。そこで細胞外液のNa⁺を除いてスクラロースの作用を検討したところ、Na⁺の除去により[Ca²⁺]_c上昇は抑制された。Na⁺の流入に関与する経路についてはTRPM4とTRPM5を想定している。その根拠は両チャネルはともにNa⁺透過性チャネルであること、また膵β細胞に発現し、インスリン分泌に関与するためである。

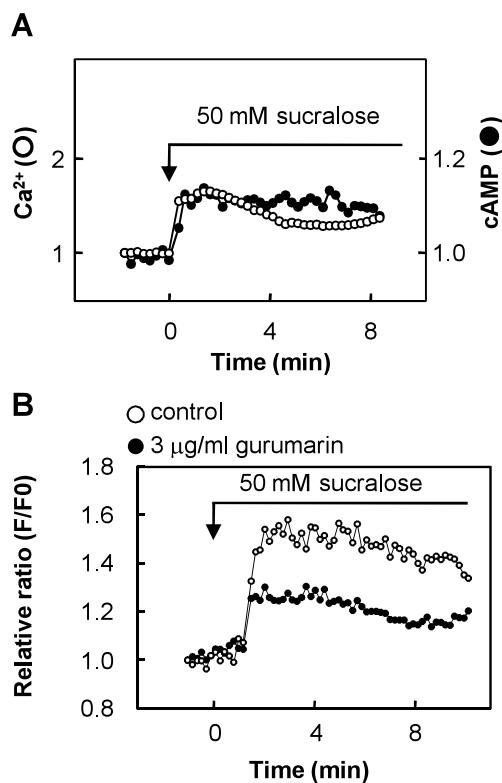


図2 甘味受容体アゴニストを介したシグナル伝達

(A) MIN6細胞にfura-2およびEpac1-campを導入し、スクラロース刺激による Ca^{2+} およびcAMPの動態変化を経時的に観察した。スクラロースにより Ca^{2+} およびcAMPの上昇が見られた。(B) グルマリン存在下でのスクラロース刺激による Ca^{2+} 応答を測定した。グルマリン存在下では、非存在下に比べ Ca^{2+} 上昇が約50%抑制された。

スクラロースによる $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 上昇の大部分は細胞外からの Ca^{2+} 流入によるが、 Ca^{2+} 流入をブロックしても $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 增加を完全に抑制することはできなかった。そこで細胞内 Ca^{2+} ストアおよびPIターンオーバーの寄与を考え、薬理学的な検討を加えた。その結果、PLCの阻害剤U73122(10 μM)、およびIP₃レセプターの阻害剤2-aminoethoxy-diphenyl borate(2-APB)(200 μM)によって $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 上昇は抑えられた。

次に、PIターンオーバーの活性化のメカニズムを明らかにするために検討を加えた。まずGqの関与を考え、Gq/11の阻害剤YM254890^[12]を用いて検討を行った。スクラロースによる $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 増加は、10 μM YM254890によりほとんど抑制されなかった。この濃度のYM254890はカルバコールによる $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 上昇を完全に抑制したことから、甘味受容体を介したシグナル伝達におけるGqの寄与は小さいと考えられる。

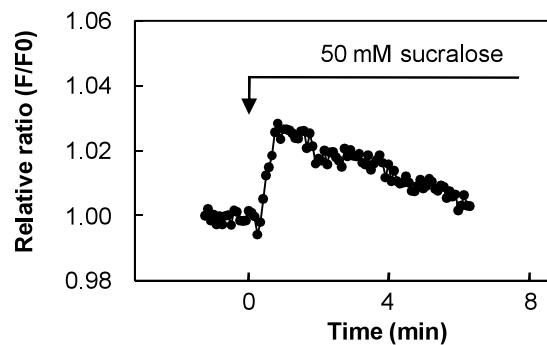


図3 スクラロース刺激によるDAG量の変化

C1-strawberryを用いて、スクラロースによって誘導されるDAGの変化量を測定した。刺激直後、DAG量の上昇が見られた。

グルマリンの感受性は、甘味受容体とガストデューションの局在に対して強い相関がみられるという報告がある^[13]。前述のように、スクラロースによる $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ 上昇はグルマリンによって部分的に抑えられる。 β 細胞においても甘味受容体とガストデューションは共役していると考えられる。

さらにMARCKS-GFPを用いた検討により、スクラロースによってMARCKS-GFPの細胞質での発光強度が上昇しPKCが活性化されることが確認された。この活性化は細胞外 Ca^{2+} に依存し、またPLC活性化を介していた。

次にPKCのC1ドメインに蛍光タンパク質mStrawberryを融合したC1-strawberryを作製し、全反射蛍光顕微鏡(TIRF)顕微鏡を用いてDAG濃度の変化を検討した。その結果、スクラロースによるDAGの上昇が見られた(図3)。

これまでの結果をまとめると、甘味受容体にアゴニストが結合することにより、PIターンオーバーが亢進し、DAGとIP₃が産生される。その後Na⁺の流入により、脱分極が起き、VDCCが活性化される。この時流入した Ca^{2+} がインスリン分泌を惹起する。今後、甘味受容体に結合するGタンパク質の特定、および細胞にNa⁺を流入させる機構を解明する必要がある。

3. リガンド特異的なシグナル伝達機構

甘味受容体を構成するT1R2およびT1R3タンパク質は構造上、N末端側に大きな細胞外領域をもち、その約2/3はLobe 1とLobe 2という構造的ユニットを形成する。両者の境界面が開閉することからVenus flytrap(VFT)領域と呼ばれている。この部分はリガンドの認識と結合に関与することが知られている。その下流にシステインリッチ領域、七回膜貫通領域そして細胞内領域にGタンパク質と

の結合部位をもつ。最近、同じCタイプのGPCRである代謝型グルタミン酸受容体の結晶構造が明らかになり¹⁴⁾、アゴニストの結合様式が解明されつつある。

ところで甘味受容体のアゴニストになりうるものとはどんな物質であろうか？ 基本的に我々が甘いと感じる物質がこれに該当する。例えば、单糖のグルコースや二糖のスクロース、アミノ酸のグリシンや、タンパク質のソーマチン、また漢方薬に使用される甘草の主成分であるグリチルリチンなどである。もちろん、日常的に摂取している様々な人工甘味料も甘味受容体のアゴニストである。次の疑問として、膵β細胞に存在する甘味受容体も味蕾と同様に様々な物質をアゴニストとするか、さらにそれらの作用によりどのようなシグナルが産生されるかということが問題となる。

そこで我々は、グリチルリチン酸2カリウム(GAD)、サッカリンナトリウムおよびアセスルファムKを用いて、インスリン分泌能を検討した。GAD、サッカリンナトリウムおよびアセスルファムKがインスリン分泌を促進させることができた。

次にこれらの物質がスクラロースと同様なシグナルを産生させるかどうかを検討した。その結果、アセスルファムKはスクラロースと同様に $[Ca^{2+}]_c$ およびcAMPの上昇を促進した。しかしGADは $[Ca^{2+}]_c$ の上昇を促進したもののcAMPに変化をおよぼさなかった。これに対してサッカリンはcAMPの上昇のみを引き起こし、 $[Ca^{2+}]_c$ の変化は生じなかった。さらにスクラロースとGADが発生させる Ca^{2+} シグナルに違いがあるか調べるために薬理学的な検討を加えた。その結果、細胞外液の Na^+ を取り除いた時、GADによる $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は部分的に抑えられるが、スクラロースの作用は完全に抑えられた。このように様々な甘味受容体アゴニストは異なったパターンのセカンドメッセンジャーの変化を引き起こすことが示された。

4. おわりに

では最初の問い合わせに戻ろう。グルコースはどのような機序によって代謝非依存的シグナルを産生するのか？ またそのシグナルの生理的意義は何であろうか？ 我々は代謝非依存性シグナル産生の機序として、甘味受容体の関与を考え、それを支持するデータを得ている。T1R3をノックダウンしたMIN6細胞にMARCKS-GFPを導入し、PKC活性化を測定すると、コントロールの細胞に比べ、T1R3ノックダウン細胞ではグルコースによる素早いPKC活性化が抑えられる。この結果は、グルコースによる代謝を介さない

シグナル産生に甘味受容体が関与していることを示唆する。ではこの甘味受容体を介するシグナルはインスリン分泌に関与しているのであろうか？ 答えはイエスである。T1R3をノックダウンした細胞では、グルコースにより誘導されるインスリン分泌が低下するからである。この結果は、甘味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示している。現在甘味受容体の関与の詳細を解析している。

以上のように膵β細胞において、甘味受容体はグルコース誘発性インスリン分泌に関与していると考えられる。今後甘味受容体を介するグルコース作用がスクラロースと同様の経路でインスリン分泌を惹起するのか、または新規の経路を介するのかなどさらに詳細な検討が必要である。

甘味受容体は糖尿病治療の新たなターゲットとなりうるだろうか？ グルコース作用において、甘味受容体を介したインスリン分泌は代謝経路を介するそれに比して決して大きくはない。しかし、スクラロースなどの人工甘味料を用いることでより効率良くインスリン分泌を亢進させることができれば、望みは捨てたものではない。今後の課題は、甘味受容体アゴニストを膵β細胞までどのように届けるかということである。最近、甘味受容体のポジティブアロステリック修飾因子(PMA)についての報告がなされた¹⁵⁾。PMAは、うま味受容体におけるイノシン5'-リン酸(IPM)やグアノシン一リン酸(GMP)のように、それ自体にはほとんど味はないがうま味物質とともに摂取すると相加的、相乗的にうま味を増強する物質のことである。甘味受容体のグルコース感受性はそれほど高くない。そこでグルコースに対するPAMを探索することにより、新規のインスリン分泌を刺激する因子の発見につなげることも期待できそうである。

- 1) Meglasson, M.D. & Matschinsky, F.M. (1986) *Diabetes Metab. Rev.*, 2, 163–214.
- 2) Aizawa, T., Komatsu, M., Asanuma, N., Sato, Y., & Sharp, G. W. (1998) *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 496–499.
- 3) Gilon, P. & Henquin, J.C. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 20713–20720.
- 4) Mogami, H., Zhang, H., Suzuki, Y., Urano, T., Saito, N., Kojima, I., & Petersen, O.H. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 9896–9904.
- 5) Niki, A., Niki, H., Miwa, I., & Okuda, J. (1974) *Science*, 186, 150–151.
- 6) Niki, A., Niki, H., & Hashioka, T. (1989) *Arch. Histol. Cytol.*, 52, Suppl 33–38.
- 7) Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekhar, J., Zhang, Y., Ryba,

- N.J., & Zuker, C.S. (2001) *Cell*, **106**, 381–390.
- 8) Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S., Illegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., & Shirazi-Beechey, S.P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15075–15080.
- 9) Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Shigemura, N., Ninomiya, Y., & Kojima, I. (2009) *PLoS One*, **4**, e5106.
- 10) Nikolaev, V.O., Bünnemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., & Lohse, M.J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 37215–37218.
- 11) Kamei, K., Takano, R., Miyasaka, A., Imoto, T., & Hara, S. (1992) *J. Biochem.*, **111**, 109–112.
- 12) Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M., Kawasaki, T., Moritani, Y., Hayashi, K., & Kobori, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 47438–47445.
- 13) Shigemura, N., Nakao, K., Yasuo, T., Murata, Y., Yasumatsu, K., Nakashima, A., Katsukawa, H., Sako, N., & Ninomiya, Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 358–363.
- 14) Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumakura, T., Nakanishi, S., Jingami, H., & Morikawa, K. (2000) *Nature*, **407**, 971–977.
- 15) Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R.M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C., & Li, X. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4752–4757.

中川 祐子

(群馬大学生体調節研究所細胞調節分野)

Function of sweet taste receptor in pancreatic β -cells
Yuko Nakagawa (Department of Cell Physiology, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-8512, Japan)