

# 博士論文

論文題目 消化管内分泌細胞の開口分泌に  
おけるアミノ酸受容体の機能解明

氏名 大屋 愛実

## 目次

略語	4
第1章 緒言	7
1-1. ホルモン研究の歴史	7
1-1-1. ホルモンの発見	7
1-1-2. インスリン分泌機構の解明	10
1-1-3. 消化管ホルモン研究の歴史	14
1-2. 顕微鏡研究の歴史	18
1-3. 本研究の目的	28
第2章 GLP-1 分泌における GPRC6A の機能に関する研究	29
2-1. 序論	29
2-1-1. GLP-1 について	29
2-1-2. GLP-1 分泌制御機構について	30
2-1-3. 消化管における G タンパク質共役型受容体の機能	32
2-1-4. 本研究の目的	35
2-2. 材料と手法	37
2-2-1. 実験に使用した材料および試薬	37
2-2-2. 細胞培養および遺伝子導入	37
2-2-3. cDNA ライブラリ作成と RT-PCR 法による遺伝子解析	38
2-2-4. セルソーターを用いた初代培養 L 細胞の単離と定量型 RT-PCR	38
2-2-5. 細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度の観察	38
2-2-6. 免疫蛍光染色	40
2-2-7. 全反射蛍光顕微鏡による tPA-GFP の分泌反応の可視化解析	41
2-2-8. 蛍光分光光度計を用いた tPA-GFP 分泌量の測定	41
2-2-9. 酵素免疫測定法を用いた GLP-1 分泌量の測定	42
2-2-10. RNA 干渉法による GPRC6A の発現抑制	42
2-2-11. 解析方法	42
2-3. 結果	43
2-3-1. 小腸内分泌 L 細胞におけるアミノ酸受容体の発現	43
2-3-2. アミノ酸投与時の細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度変化	43
2-3-3. L-オルニチン投与時の細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度変化	45
2-3-4. L-オルニチンが GLP-1 分泌に及ぼす影響	49
2-3-5. siRNA による GPRC6A 発現抑制の GLP-1 分泌に及ぼす影響	56
2-3-6. 代謝系および cAMP を介した制御機構の検証	60
2-4. 考察	66

2-4-1. 小腸内分泌 L 細胞におけるアミノ酸受容体の発現.....	66
2-4-2. アミノ酸感受による GLP-1 分泌制御機構に関する考察.....	66
2-4-3. GLP-1 の可視化解析について.....	67
2-4-4. 初代培養 L 細胞に関する考察.....	68
2-4-5. <i>in vivo</i> での GPRC6A の機能について.....	69
第 3 章 総合統括.....	71
3-1. 消化管における栄養素感受機構.....	72
3-2. GLP-1 分泌制御機構に関する最新の知見.....	74
3-3. GLP-1 の生理機能.....	77
3-4. GPRC6A の生理機能.....	78
3-5. 本研究を通しての所感.....	78
参考文献.....	81
謝辞.....	96

## 略語

BDNF: brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養素因子)

cAMP: cyclic AMP (サイクリック AMP)

CaSR: calcium-sensing receptor (カルシウム感受性受容体)

CCK1R: cholecystokinin-1 receptor (1型コレシストキニン受容体)

DAG: diacylglycerol (ジアシルグリセロール)

DDA: 2',3'-dideoxyadenosine (2',3'-ジデオキシアデノシン)

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ変法イーグル培地)

DPP-4: dipeptidyl peptitase-4 (ジペプチジルペプチターゼ 4)

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)

ELISA: enzyme-linked immunosolvent assay (酵素免疫測定法)

EM-CCD: electron multiple-charge coupled device (電子倍增型電荷結合素子)

FFAR: free fatty acid receptor (遊離脂肪酸受容体)

GABA: gamma-aminobutyric acid ( $\gamma$ -アミノ酪酸)

GFP: green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)

GH: growth hormone (成長ホルモン)

GIP: glucose-dependent insulintropic polypeptide (グルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド)

GIPR: GIP receptor (GIP 受容体)

GLP-1: glucagon-like peptide-1 (グルカゴン様ペプチド-1)

GLP-2: glucagon-like peptide-1 (グルカゴン様ペプチド-2)

GLUT: glucose transporter (グルコーストランスポーター)

GPCR: G-protein coupled receptor (Gタンパク質共役型受容体)

GPRC6A: G protein-coupled receptor, family C, group 6, subtype A (L-アミノ酸感受性受容体、G

タンパク質共役型受容体 C6A)

GRPP: glicentin-related polypeptide (グリセンチン関連ポリペプチド)

IP: intervening peptide (介在ペプチド)

IP<sub>3</sub>: inositol triphosphate (イノシトール 3 リン酸)

K<sub>ATP</sub> channel: ATP-sensitive potassium channel (ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネル)

M1R: muscarinic acetylcholine receptor M1 (ムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 サブタイプ)

M-BAR: membrane bile acid receptor (胆汁酸受容体)

mGluR: metabotropic glutamate receptor (代謝型グルタミン酸受容体)

NA: numerical aperture (開口数)

NPY: neuropeptide Y (ニューロペプチド Y)

PC: prohormone convertase (プロホルモンコンバーターゼ)

PDX-1: pancreatic duodenal homeobox 1 (膵臓特異的ホメオボックスタンパク質 1)

PKA: protein kinase A (プロテインキナーゼ A)

PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (ホスファチジルイノシトール 2 リン酸)

PI3-K: phosphoinositide 3-kinase (PI3 キナーゼ)

PLC: phospholipase C (ホスホリパーゼ C)

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

SCFA: short chain fatty acid (短鎖脂肪酸)

SGLT: sodium dependent glucose transporter (ナトリウム依存性グルコーストランスポーター)

siRNA: small interfering RNA (低分子干渉 RNA)

SNAT2: sodium-dependent neutral amino acid transporter-2 (ナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーター)

SST2R: somatostatin receptor 2 (2 型ソマトスタチン受容体)

SST5R: somatostatin receptor 5 (5型ソマトスタチン受容体)

Tas1R: taste receptor type 1 (味覚受容体 T1R ファミリー)

Tas2R: taste receptor type 2 (苦味受容体)

TIRFM: total internal reflection fluorescence microscopy (全反射蛍光顕微鏡法)

tPA: tissue type plasminogen activator (組織型プラスミノゲン活性化因子)

Venus: yellow fluorescent protein variant (黄色蛍光タンパク質)

2-APB: 2-aminoethoxydiphenylborate (2-アミノエトキシジフェニルボレート)

# 第 1 章 緒言

## 1-1. ホルモン研究の歴史

### 1-1-1. ホルモンの発見

ホルモンは神経伝達物質と並んで、生物の恒常性を保つ上で重要なはたらきを持つ。最初に発見されたホルモンは、高峰譲吉と上中敬三（以下、高峰と上中）によって 1900 年に結晶化されたアドレナリンである (1)。アドレナリンは腎臓に隣接する副腎（図 1-1）から分泌されるホルモンであり、血圧の上昇、心拍数増加などの生理機能を持つ。副腎が生体内で重要な機能を担っていることは、多くの研究者が気づいていたものの、副腎の生理活性物質を発見するまでには長い年月を要した。

アドレナリンの発見にいたるより 100 年以上前の 1775 年に、フランスの医学者 Théophile de Bordeu によって、「すべての器官、組織および細胞は体内の他の部分に影響を与える物質を血液中に放出している」という内分泌の概念が提唱された (2)。その後 1849 年にはドイツのゲッティンゲン大学生理学教授の Arnold Berthold（以下 Berthold）がホルモンの作用を明らかに示すことに成功した (3)。Berthold は、去勢した雄鳥に対し、摘出した生殖腺を背部や腹部に埋め込むことによって、二次性徴が現れることを見出した。1856 年にはフランス人科学者である Alfred Vulpian が、副腎の異常によっておこるアジソン病において、皮膚が黒色に変化することに着目した。彼は副腎から皮質を取り除いた髓質のみを採取し、その抽出液に塩化鉄（Ⅲ）溶液を加えると緑色を呈するという、アドレナリンの呈色作用を発見した (4)。この発見により、特異的な生理活性をもつ化学物質が、副腎髓質において産生されていることが初めて示された。その後、1901 年に高峰と上中がこの活性物質の結晶化に成功し、アドレナリンと名付けた (1)。

1889 年にはフランスの生物学者 Charles Édouard Brown-Séquard がモルモットとイヌの睾丸

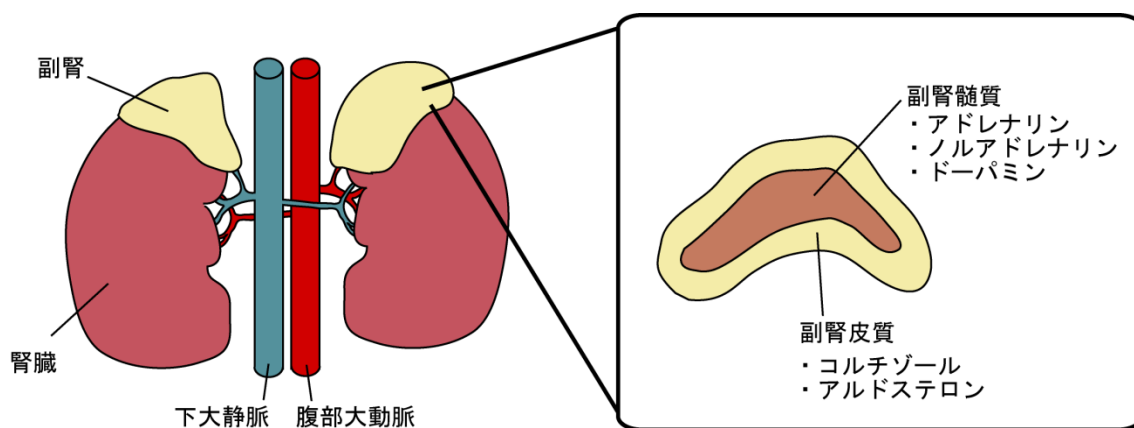


図 1-1. 副腎の模式図

副腎は腎臓に隣接して存在する。副腎の構造は皮質と髄質に分けられる。髄質ではアドレナリン、ノルアドレナリンおよびドーパミン（3 つを合わせてカテコールアミンと言う）、皮質ではコルチゾールおよびアルドステロンが産生される。



の水抽出液を自身に皮下注射することによって、活力が向上することを人体で初めて証明した (5)。

1902年に William Bayliss と Earnest Starling (以下、Bayliss と Starling) が、十二指腸粘膜の分泌物が膵液の分泌を促進することを見出し、活性物質をセクレチンと命名した (6)。Starling はこの発見から、「内分泌器官が分泌する物質で、血液によって遠く運ばれ、標的機関に特異的な作用をもたらすものをホルモンと呼ぶ」というホルモンの定義を提唱した (7)。

しかし、その後の研究でホルモンが血液を介さずに作用することが明らかとなった。具体的には、血液を介さず隣接する細胞に作用するものや (傍分泌: パラクライン)、その細胞自身に作用するもの (自己分泌: オートクライン) が存在する。また、ニューロンからホルモンを分泌する神経内分泌系では、ホルモンと神経伝達物質がニューロン末端から分泌される。このように様々な作用機序を持つホルモンの代表例として、神経系のホルモンであるバソプレシンが挙げられる (8)。バソプレシンは視床下部において産生され、その投射先である脳下垂体後葉から血中へと分泌される。血中のバソプレシンは腎臓や肝臓、血管にはたらきかけ、腎臓における水分の再吸収や血圧の上昇により体内の恒常性を調節する (9)。その一方で、下垂体前葉の門脈中に分泌されて、副腎皮質刺激ホルモンの分泌を制御する (9)。また、中枢神経では神経伝達物質として機能しており、生殖行動に関与することが明らかになっている (10)。以上のように、一つのホルモンが複数の機能をもつことが明らかになり、ホルモンの定義は「特異的な作用を標的器官にもたらす液性の生理活性物質」と変化している (11)。

本研究で焦点をあてたグルカゴン様ペプチド 1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) も様々な生理機能を持つことが知られている。たとえば、膵β細胞にはたらきかけてインスリン分泌を促進するだけでなく (12)、側坐核および腹側視蓋野の神経細胞に発現する受容体を介して食欲を抑制することが分かっている (13)。また、近年の研究で GLP-1 が膵β細胞の細胞量を増加させることが明らかになり (14)、今後も新たな機能の発見が期待される。

### 1-1-2. インスリン分泌機構の解明

膵臓は、腸や肝臓とともに食物の一連の消化機能を担っていることや、発生学的に腸由来の器官であることから、消化器官の一つとして扱われることが多い (10)。その一方で、血糖を調節するホルモンを分泌する器官であることから、糖尿病治療のために古くから研究されてきた特徴的な器官である。

1889年に Joseph von Mering と Oskar Minkowski によって、膵臓が糖尿病治療において重要な役割を果たすことが証明された (15)。彼らはイヌの膵臓を除去することで、血糖が上昇し尿中に糖が現れることを明らかにした。その後 Fredrick Banting と Charles Best が膵臓から内分泌腺であるランゲルハンス島のみを単離し、その抽出物を経口投与すると、糖尿病のイヌの尿中の糖が減少することを見出した (16)。

血糖値を調節するホルモンは複数存在し、グルカゴン、成長ホルモン、アドレナリン、甲状腺ホルモン、グルココルチコイドが血糖値を上昇させる。その一方で、血糖値を減少させるホルモンは唯一インスリンのみである。そのため、糖尿病治療法の開発に向け、インスリンの分泌機構に関する研究が行われてきた。インスリンのアミノ酸配列は 1956 年に Frederick Sanger によって明らかにされた (17)。インスリンは図 1-2A に示した機構のとおり、プレプロインスリンから産生される。粗面小胞体上で合成されたプレプロインスリンは粗面小胞体から分離するときにシグナルペプチドが切り取られ、プロインスリンとしてゴルジ体へ輸送される。ゴルジ体内を通過時に、プロテアーゼを含む小胞内に取り込まれる。プロホルモンコンバーターゼ (PC) 1/3 および PC2 によって A 鎖と B 鎖がジスルフィド結合で連結したインスリンと、結合ペプチドである C 鎖とに切り分けられる (18)。インスリンは分泌小胞内で亜鉛イオンとともに 6 量体の結晶を構成し、最終的に膵β細胞内の毛細血管へと分泌される (11) (図 1-2B)。

膵β細胞は細胞外のグルコース濃度を感知することによってインスリン分泌を制御する (19)。その一方でインスリン分泌はランゲルハンス島に分布する迷走神経によっても制御

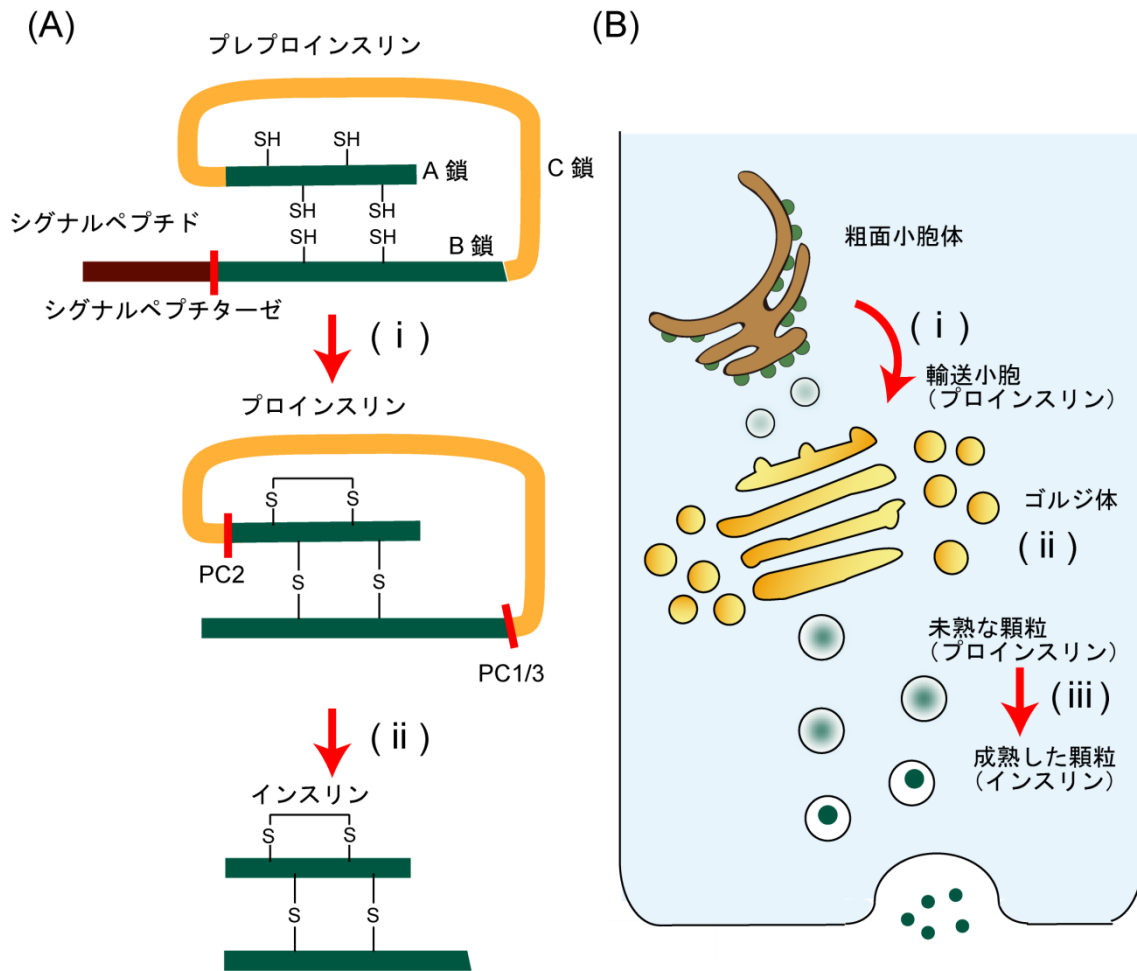


図 1-2. インスリンのプロセッシングメカニズム

(A) シグナルペプチターゼによってプレプロインスリンのシグナルペプチドが切断され、ジスルフィド結合が形成されるとプロインスリンとなる (i)。プロホルモンコンバーターゼ (PC) 1/3 および PC2 によってプロインスリンの C 鎖が切除されてインスリンとなる (ii)。

(B) リボソームで翻訳されたプレプロインスリンは、粗面小胞体でシグナルペプチドが切断され、プロインスリンとなる (i)。プロインスリンはゴルジ体通過後、PC1/3 および PC2 とともに分泌顆粒に取り込まれる (ii)。顆粒が成熟していく過程で、プロインスリンはインスリンとなり、亜鉛イオンと 6 量体を形成して成熟顆粒となる (iii)。

される。副交感神経を介してアセチルコリンがインスリンの分泌を促進する一方で (20)、交感神経系のノルアドレナリンはインスリン分泌を抑制する (21)。また、他のホルモンによる制御も行われている。下垂体前葉から分泌される成長ホルモン、上部小腸の内分泌 S 細胞から分泌されるセクレチンはインスリンの分泌を促進する一方で (22-24)、膵 $\delta$ 細胞および小腸内分泌 D 細胞から分泌されるソマトスタチンはインスリン分泌を抑制する (25)。

以上のように様々な因子によってインスリン分泌が調節されている。それでは、これらの細胞外の情報を感知した膵 $\beta$ 細胞内では、どのような機構で分泌を制御しているのだろうか。

神経細胞をはじめとする様々な細胞では、イオンの選択的透過によって電気化学的ポテンシャルが変化し、細胞内情報伝達を経て分泌反応が引き起こされる。1968年に Philip M. Dean と E. Keith Matthews らによって、初めて膵 $\beta$ 細胞における電気生理学的研究が行われた。彼らは、微小電極を用いた実験によって、膵 $\beta$ 細胞の膜電位を測定し、高グルコース投与時に脱分極およびバースト反応を観察し、この膜電位変化がインスリン分泌を制御している可能性を提唱した (26)。その後 1984年に Daniel L. Cook らによって ATP 感受性  $K^+$  チャンネル ( $K_{ATP}$  チャンネル) が (27)、1990年には Arun S. Rajan らによって L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルが膵 $\beta$ 細胞に発現していることが明らかになった (28)。これらの発見から現在想定されているグルコースによるインスリン分泌制御機構は以下のとおりである (図 1-3)。細胞内に取り込まれたグルコースは、ミトコンドリアで代謝され、細胞内 ATP 濃度を上昇させる。細胞内で産生された ATP は  $K_{ATP}$  チャンネルを閉じ、細胞外への  $K^+$  の流出が遮断される。すると脱分極がおき、それにより電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルが開くことで細胞内への  $Ca^{2+}$  流入がおこり、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することでインスリン分泌が起こる (29)。その一方で、グルコース以外のアミノ酸や脂肪酸によってもインスリン分泌が促進されることが明らかとなっており (30-32)、今後それらの分泌制御機構の解明が待たれる。

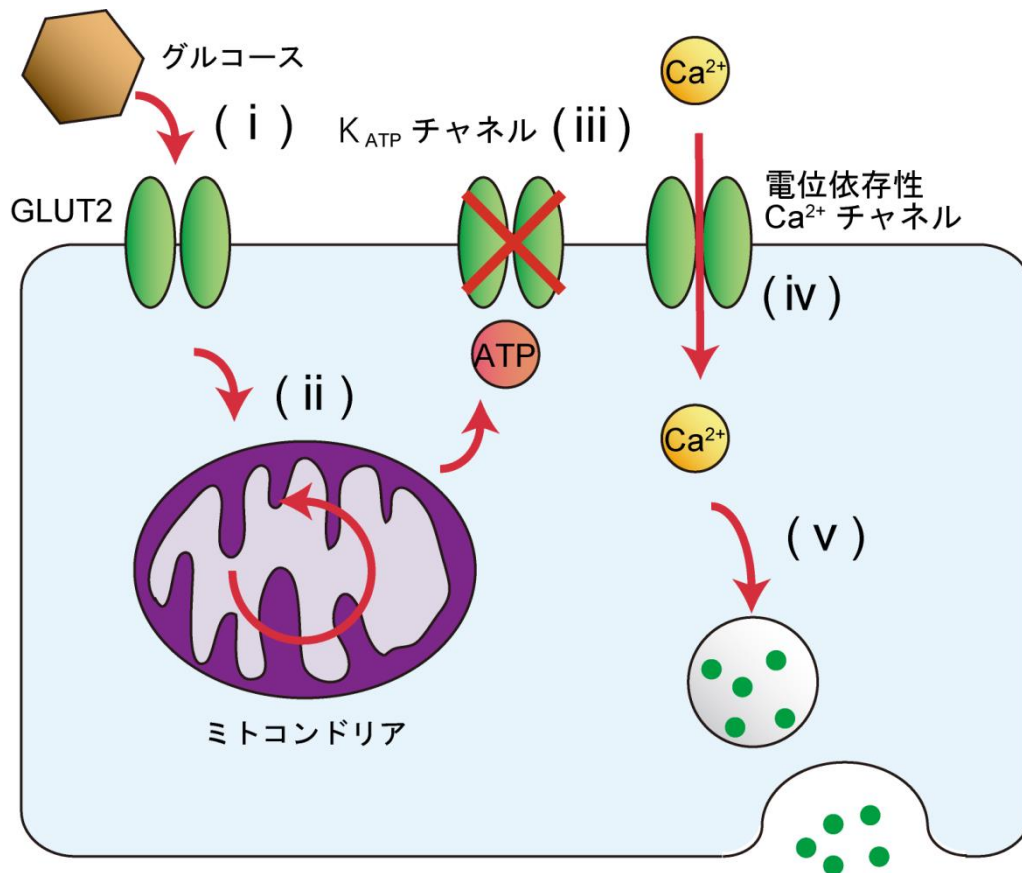


図 1-3. 膵β細胞におけるインスリン分泌制御機構

細胞外のグルコースはグルコーストランスポーター2 (GLUT2) によって細胞内に取り込まれる (i)。取り込まれたグルコースはミトコンドリアにおいて代謝され、ATPを産生する (ii)。ATPはATP感受性  $K^+$ チャンネル ( $K_{ATP}$ チャンネル) を閉じ、 $K^+$ の細胞外への流出を止め、脱分極が起きる (iii)。脱分極が起きると電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$ チャンネルが開き、細胞内へ  $Ca^{2+}$ が流入する (iv)。細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇するとインスリン分泌が起こる (v)。

### 1-1-3. 消化管ホルモン研究の歴史

消化管は摂取した食物を消化し、栄養素を吸収する器官として知られている。その一方でホルモンを分泌して他臓器の機能を制御する。Ivan Petrovich Pavlovは、イヌが条件反射によって唾液を分泌することを1905年に発見し、“神経がすべての臓器の機能を制御している”という神経万能説を唱え、その仮説を支持する研究者が多かった。それに対し、BaylissとStarlingは、神経をすべて除去した状態でも、十二指腸に塩酸を滴下すると膵管から膵液が分泌されることを1902年に見出した(6)。この発見は、神経を介さずに、血液によって運搬されて他臓器に生理学的効果を及ぼす物質が存在する、というホルモンの概念の提唱につながる発見であった。

この発見にヒントを得て、1905年にイギリスの生理学者であるJohn S. Edkinsが、胃の幽門前庭から分泌されるガストリンが、胃体部からの胃酸分泌を制御していることを見出した(33)。

また、1928年にはアメリカのAndrew Conway Ivyが、十二指腸の抽出物が胆嚢を収縮させて胆汁を分泌させることを見出した(34)。そしてこの発見から、十二指腸の抽出物中に存在する生理活性物質をコレシストキニンと名付けた。

以上のように3種の消化管ホルモンが次々と発見されたものの、その後ホルモンの同定が進まず、消化管ホルモン研究は滞ってしまった。1960年代に入って、これらのホルモンがペプチドで構成されていることが明らかになると、消化管のどの細胞から分泌されるのかに注目が集まった。クロム塩を含む固定液で小腸の上皮細胞を染色した際に、黄色に染色される顆粒を持つ細胞が見出され、この細胞は腸クロム親和細胞と名付けられた。そして、そのクロム陽性顆粒を持つ細胞がセクレチンを分泌することが分かった。その一方で、イタリアの病理学者Enrico Solciaが胃の幽門前庭にクロム染色で染まらない顆粒をもつ細胞が存在することを見出した。彼はこれをG細胞と名付け、ガストリンを分泌する細胞であると

した。その後開発された免疫染色法によって、様々なホルモンがそれぞれ別の細胞から分泌されるという多元説が立証された。

次にホルモンを分泌する内分泌細胞が、どのように管腔の刺激を受け取ってホルモン分泌を制御しているかに注目が集まった。藤田恒夫（以下藤田）らは、電子顕微鏡による観察から、各種の分泌小胞を持つ内分泌細胞の頂部が管腔に面しており、その頂端部に微絨毛を持つことを見出した。藤田は、この構造が味細胞と類似していることに注目し、味細胞は口腔に入ってきた物質の情報を神経に伝えるのに対し、腸の内分泌細胞は、管腔に入ってきた物質の情報をホルモンを介して伝達していると考えた（図1-4）。その一方で、アメリカのMorton I. Grossmanは、消化管に張り巡らされた神経を介して内分泌細胞がホルモンを分泌しているとした（35）。しかし、1980年に藤田らはフグ毒であるテトロドトキシンを用いて、神経伝達を遮断した状態でも、アミノ酸投与時にコレシストキニンが分泌することを示した。この実験結果から、消化管内分泌細胞は頂部の微絨毛によって、管腔の栄養素を感知し、ホルモン分泌制御をおこなっていることが示された（35）。

本研究で着目したGLP-1も消化管ホルモンの一つである。1906年にMoore Benjaminらによって腸管粘膜抽出物には膵内分泌腺刺激作用があることが分かり、経口摂取によって糖尿病が劇的に改善されることが示された（36）。1929年にはJean M. La Barreらが腸管粘膜抽出物の血糖を低下させる生理活性物質の分離に成功し、その因子をインクレチンと名付けた（37）。インクレチンとは、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称で、これまでにグルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド（glucose-dependent insulintropic polypeptide: GIP）とGLP-1の2つのホルモンがインクレチンとして機能することが確認されている（12）。GIPは上部小腸に存在するK細胞から、GLP-1は下部小腸に存在するL細胞から分泌される（38）。GIPとGLP-1は血中グルコース濃度が高い場合にはインスリン分泌を促進するが、血中グルコース濃度が低い場合に

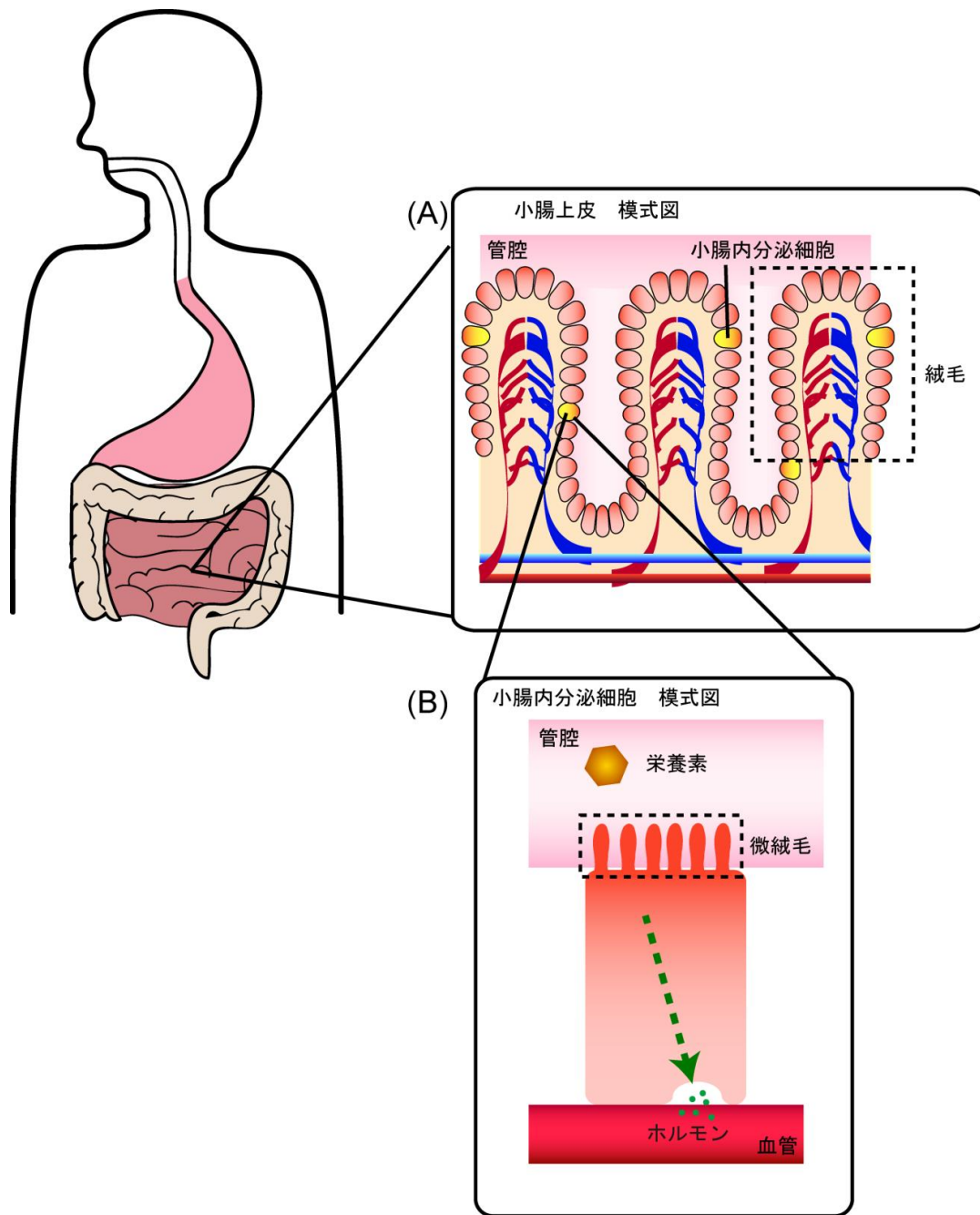


図 1-4. 小腸内分泌細胞 模式図

(A) 小腸上皮を構成する細胞には吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞などがあり、その中の数%が内分泌細胞である。

(B) 小腸内分泌細胞は頂部が管腔に面しており、頂端部の微絨毛を介して管腔の栄養素を感知する。栄養素の濃度変化に応答してホルモンを分泌し、血流を介してその情報を伝えていると考えられる。



は促進しない。この点から、糖尿病の治療において低血糖のリスクが低く、安全に高血糖を是正することが出来るホルモンとして注目されている。本研究では、消化管ホルモンのなかでも、インスリンを介した血糖値制御という重要な働きをもつGLP-1に焦点をあてて研究を行った。

## 1-2. 顕微鏡研究の歴史

“生体を構成する細胞を見てみたい”、という好奇心は古くから人類に存在し、顕微鏡が発明されたのは16世紀にまで遡る。オランダのメガネ職人であるHans JanssenとSacharias Janssenの親子は二枚のレンズを組み合わせることによって、複式顕微鏡の原型を発明した。17世紀になると、Robert Hookeが改良を重ね、コルクを構成する細胞壁をはじめて観察することに成功した。一方でAntonie van Leeuwenhoekが単式顕微鏡を発明し、微生物や精子の観察を行った (39)。その後も様々な研究者の手により、光学顕微鏡の開発がおこなわれてきた。

光学顕微鏡とは、波長380-780 nmの可視光を用いて、試料を拡大して観察することのできるツールである。分解能の点では、電子線を利用した電子顕微鏡にはおよばないが、試料を固定せずに観察できることが光学顕微鏡の大きな利点である。20世紀後半には、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡が開発され、試料を染色することなく生きたまま観察できるようになった。位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡は、光が試料を通過する際に屈折することによって生じる位相差を利用して、試料にコントラストをつけて観察することが可能である。しかし、試料の厚みや屈折率の違いによって、実際の構造を反映していない明暗コントラストが観察される可能性があり、空間分解能が低いことが短所である。

その後、蛍光色素や蛍光タンパク質の登場に伴い、それらを観察するための蛍光顕微鏡も開発された。蛍光顕微鏡の中でも、現在広く用いられているのが共焦点蛍光顕微鏡である。通常の落射蛍光顕微鏡は励起光が焦点位置以外の光軸方向の上下も照明してしまう (図1-5A) (40)。そのため、その領域内の蛍光をすべて検出してしまい、背景光の強度が強くなることが問題であった。それに対し、共焦点蛍光顕微鏡は光ファイバーを通したレーザー光 (点光源) とピンホールを用いることによって、焦点外の蛍光を検出することなく、高いコントラストで観察可能である (図1-5B)。しかし、レーザーを照射することにより、

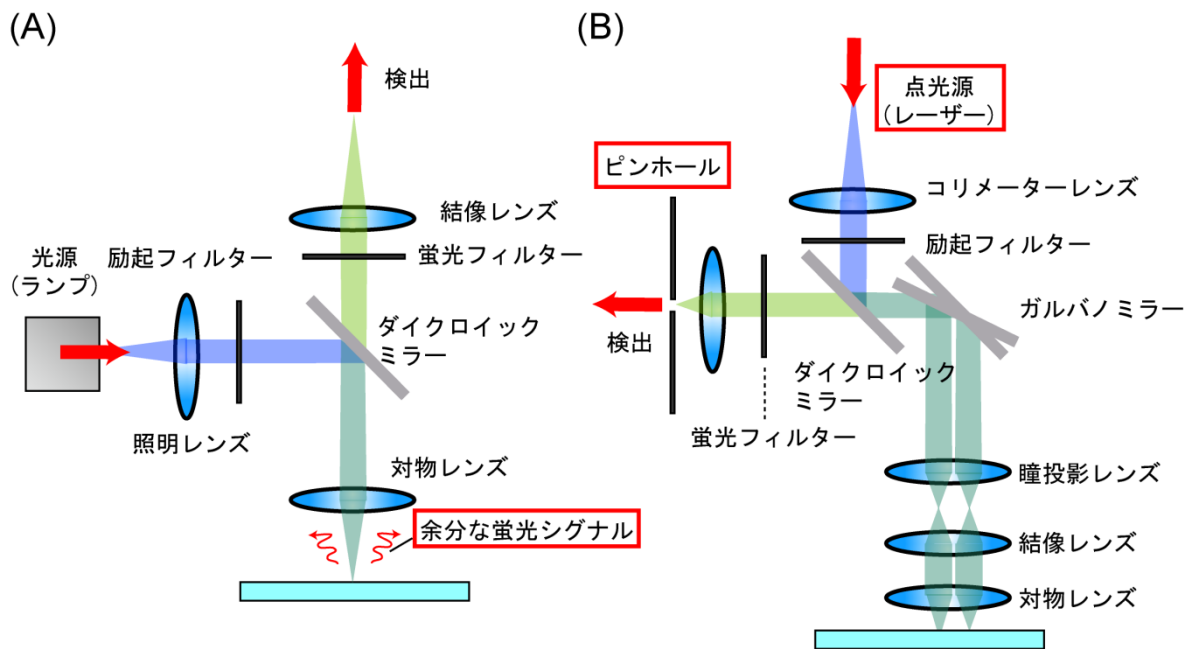


図 1-5. 落射蛍光顕微鏡と共焦点蛍光顕微鏡の模式図（阿部勝行著 特集 裾野が広がる共焦点顕微鏡 総論：共焦点顕微鏡の概要（2009）*Oplus E. 31* より改変）

- (A) 落射蛍光顕微鏡は励起光が焦点位置以外も照明してしまうため、その領域内の余分な蛍光信号を検出してしまい、背景光の強度が強くなる。
- (B) 共焦点蛍光顕微鏡では光ファイバーを通したレーザー光（点光源）をガルバノミラーを用いることで走査して撮影する。ピンホールを通過させることによって、焦点外の蛍光信号は検出されない。

細胞内に活性酸素が発生し、細胞へのダメージとなることや、単焦点走査が必要であるため時間分解能が低いことが問題であった。しかし近年、多数のピンホールを持つディスクを回転させることで、高速走査を可能にしたニポウディスク式共焦点顕微鏡や高速走査を可能にするガルバノミラーなどが開発され、上述の弱点について克服されている。一方、全反射蛍光顕微鏡はレーザーを走査する必要がないため、高時間分解能、かつ落射蛍光顕微鏡と比較して背景光が少ないため、シグナル/ノイズ比の高い像が観察できる。

具体的に全反射蛍光顕微鏡とは、レーザーを照射した際にガラス表面からわずかにしみだすエバネッセント光を利用して、細胞膜近傍の蛍光物質のみを観察することのできる顕微鏡である。

屈折率の異なる物質の界面に対し、臨界角以上で光を入射させると全反射が起こる（図1-6）。このとき、界面上の低屈折率側にごく薄くにじみでる光を、エバネッセント光とよぶ。

エバネッセント光の強度は、界面からの距離に応じて、以下の数式で示す通り指数関数的に減衰する（41）（図1-7A）。

$$I_{eva} = I_0 \cdot e^{-\frac{z}{d}}$$

（ $I_{eva}$  = エバネッセント光の強度、 $I_0$  = 入射光の強度、 $z$  = 界面からの距離、 $d$  = 強度が  $I_0/e$  となる距離）

$d$ の値は以下の式から算出される。媒質の屈折率および、入射させる光の波長にもよるが、エバネッセント光はおよそ全反射面から50 - 100 nmほどしみだす（41）。

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2}}$$

（ $\lambda$  = 光の波長、 $n_1$  = 試料の屈折率、 $n_2$  = ガラスの屈折率、 $\theta$  = レンズが光を集め得る最大角度）

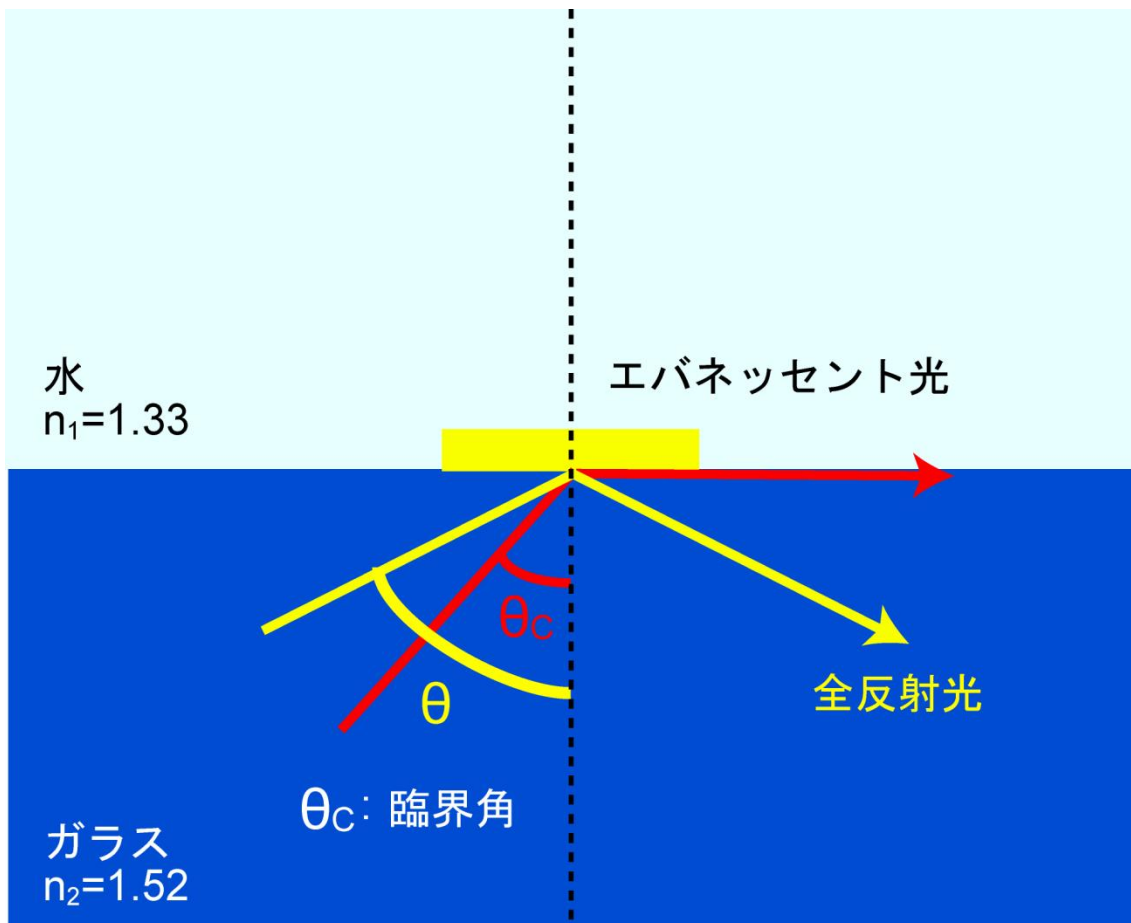


図 1-6. 全反射とエバネッセント光

光を臨界角 ( $\theta_c$ ) 以上の入射角で入射させると、屈折率の異なる 2 物質の界面では全反射が起こる。このときに、屈折率の低い側へ界面からわずかにしみだす光をエバネッセント光という。

(例) ガラスから水に全反射させる際の臨界角は

$$n_2 \sin \theta_c = n_1 \quad (n_1 = 1.33, n_2 = 1.52)$$

より、

$$\theta_c \approx 61.05$$

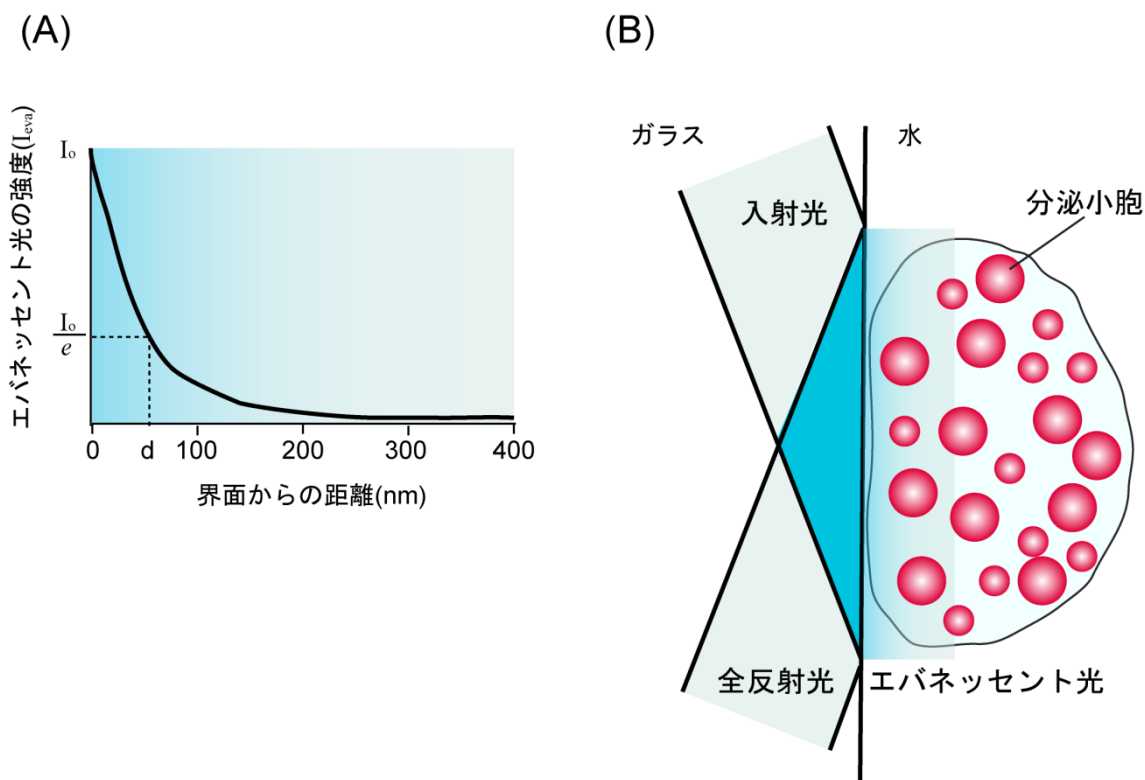


図 1-7. エバネッセント光の性質 (Steyer, J. et. al. (2001) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 268-275 より改変)

(A) エバネッセント光の強度は、指数関数的に減衰する。エバネッセント光は媒質の屈折率および、入射光の波長によるが、全反射面からおよそ 50 - 100 nm しみだす。

(B) エバネッセント光は界面付近の領域内の蛍光分子のみを励起する。したがって、細胞膜近傍で起こる分泌反応の観察に適している。

(例) ガラスから水に全反射させた際のエバネッセント光のしみだす距離  $d$  は

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2}}$$

(水の屈折率  $n_1 = 1.33$ 、ガラスの屈折率  $n_2 = 1.52$ )

$\theta = 75^\circ$  とすると、 $\sin \theta = 0.9659$  より、 $d = 0.128\lambda$

顕微鏡で用いる光の波長は  $\lambda = 400 \sim 700$  nm なので、 $d = 51.8 \sim 89.6$  nm となる。

そのため、エバネッセント光によって照明できる領域は非常に狭く、限られた領域の蛍光分子のみを励起することができる（図1-7B）。したがって、背景光を大きく減少させ、高いシグナル/ノイズ比で観察することが可能である。

全反射蛍光顕微鏡には、プリズム型と対物レンズ型がある（図1-8）（42）。プリズム型全反射蛍光顕微鏡は、試料上のスライドガラスにグリセロールなどで密着させたプリズムに対しレーザー光を入射し、カバーガラスと試料との境界面で全反射させる（図1-8A）。この方法は低倍率の対物レンズを用いることができるため、広範囲を観察可能であるが、上部をプリズムでおおうため、刺激溶液を灌流しながら観察することが困難である。

それに対して、対物レンズ型は溶液を灌流しながら観察することが可能である（図1-8B）。対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡では、レーザー光を対物レンズの端に入射して試料とガラスの間で全反射を起こし、そこで発生したエバネッセント光によって得られる蛍光を、その対物レンズで観察するというしくみである（図1-8B）。開口数の大きい対物レンズを用いる必要があるが、試料の上部にプリズムを接着する必要がないため、溶液を灌流させながら観察することが出来る。

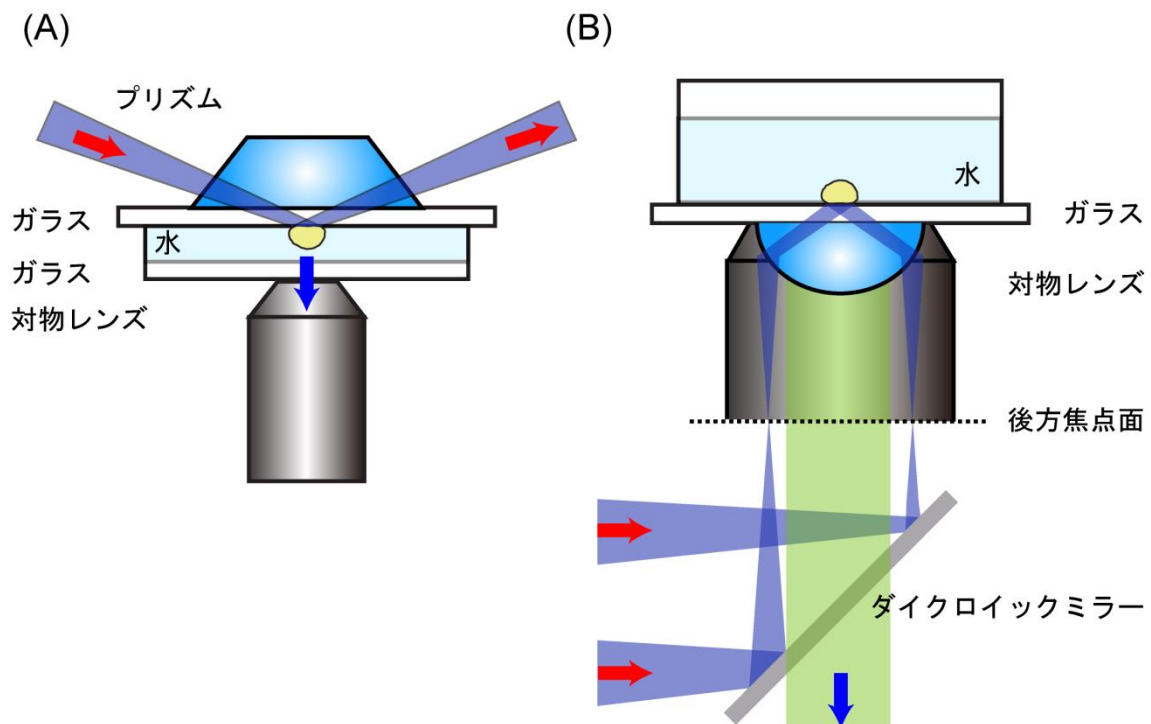


図 1-8. プリズム型全反射蛍光顕微鏡と対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡（小林剛著 染色・バイオイメージング実験ハンドブック（2006）羊土社より改変）

(A) プリズム型全反射蛍光顕微鏡は、試料上のスライドガラスに密着させたプリズムに対してレーザー光を入射し、カバーガラスと試料との境界面で全反射させる

(B) 対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡はレーザー光を対物レンズの後方焦点面に入射して試料とガラスの間で全反射させる。そこで発生したエバネッセント光によって得られる蛍光をその対物レンズで観察する。



対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡には、開口数の大きい対物レンズが用いられる。開口数 (numerical aperture: NA) は以下の式で定義され、レンズによって決まる定数である。

$$NA = n \cdot \sin \theta_{NA}$$

( $n$  = ガラスの屈折率、 $\theta_{NA}$  = レンズの開口角)

$\theta_{NA}$ とは光軸上の1点から出て対物レンズに入る光のうち最大となる角度のことで、開口角とよばれる (図1-9A) (43)。

全反射光による観察を行うためには、図1-9Bの $d_{NA}$ と $d_n$ の間にレーザー光を入射する必要がある。 $d_{NA}$ と $d_n$ は次のように定義される。

$$d_{NA} = f \cdot NA = f \cdot n_2 \sin \theta_{NA}$$

$$d_n = f \cdot n_2 \sin \theta_c = f \cdot n_1$$

( $f$  = 対物レンズの焦点距離、 $n_1$  = 試料の屈折率、 $n_2$  = ガラスの屈折率、 $\theta_c$  = 臨界角)  
 $d_{NA}$ と $d_n$ の間を“全反射の窓”とよび、 $d_{NA} - d_n$ の値を大きくするために、NAの値が大きい対物レンズを用いる必要がある。

これまでに、全反射蛍光顕微鏡は一分子イメージングのツールとして多くの知見をもたらした。たとえば、柳田敏雄らの一連のグループは、モータータンパク質であるキネシンの1分子動態解析 (44) や、酵素反応や分子間相互作用の一分子イメージングを行った (45)。

近年、全反射蛍光顕微鏡は細胞表面でおこる生体现象の可視化ツールとして利用されている。2000年にWolfhard Almersらが、シナプス小胞の分泌反応の可視化に成功した (46)。2000年には坪井貴司らによって、二色の異なる蛍光を同時観察可能にした多重蛍光対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡が開発され、インスリン分泌顆粒の動態解析がおこなわれた (47)。

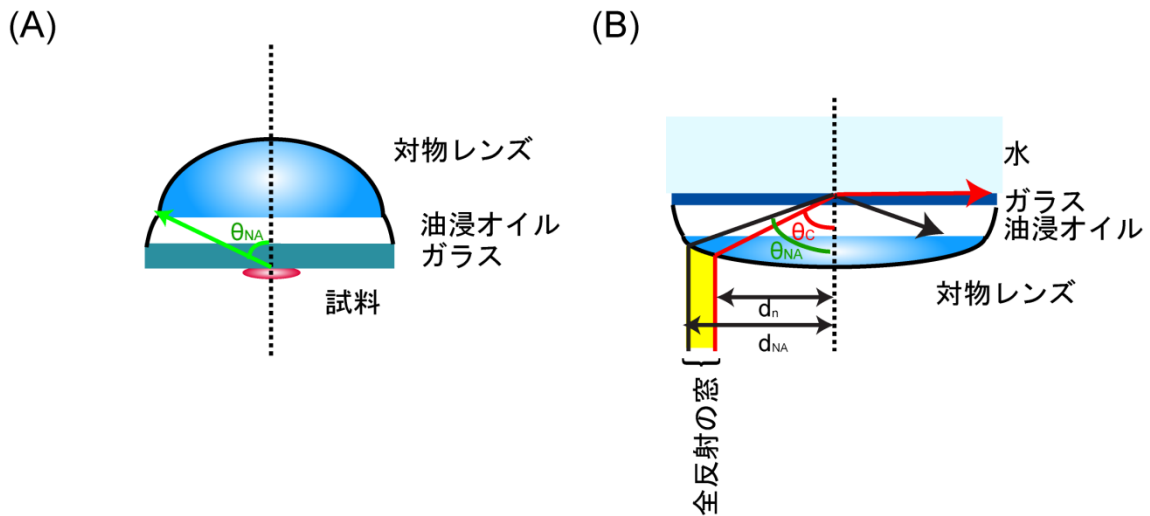


図 1-9. 開口数の大きい対物レンズにおける全反射 (徳永万喜洋著 バイオイメージング  
でここまで理解る (2003) 羊土社より改変)

(A)  $\theta_{NA}$  (開口角) とは光軸上の 1 点から出て対物レンズに入る光のうち最大となる角度  
のことである。

(B) 全反射光による観察を行うためには、 $d_{NA}$  と  $d_n$  の間にレーザー光を入射する必要がある。  
 $d_{NA}$  と  $d_n$  の間を“全反射の窓”とよび、 $d_{NA} - d_n$  の値を大きくするために、  
開口数の大きい対物レンズを用いる必要がある。

(例)  $d_{NA}$  および  $d_n$  の長さは以下の式で表される。

$$d_{NA} = f \cdot NA = f \cdot n_2 \sin \theta_{NA}$$

$$d_n = f \cdot n_2 \sin \theta_C = f \cdot n_1$$

(水の屈折率  $n_1 = 1.33$ 、ガラスの屈折率  $n_2 = 1.52$ )

開口数  $NA = 1.35$  の焦点距離 200 mm、60 倍の通常の対物レンズを用いると

$$\begin{aligned} d_{NA} - d_n &= 200/60 \times 1.35 - 200/60 \times 1.33 \\ &= 0.067 \text{ mm} \quad \text{であるが、} \end{aligned}$$

開口数  $NA = 1.45$  の焦点距離 200 mm、60 倍の全反射蛍光顕微鏡用対物レンズを用い  
ると

$$\begin{aligned} d_{NA} - d_n &= 200/60 \times 1.45 - 200/60 \times 1.33 \\ &= 0.4 \text{ mm} \quad \text{にまで、範囲が広がる。} \end{aligned}$$

以上のように、全反射蛍光顕微鏡は細胞を生きたままで観察することを可能にするツールであり、本研究では、細胞膜近傍でおこる分泌反応を可視化解析するために用いることとした。

### 1-3. 本研究の目的

1902年のアドレナリンの発見から今日まで様々なホルモンが発見されてきた。1980年代は、平滑筋に各臓器の抽出物を滴下し、平滑筋の収縮もしくは弛緩を指標にしてホルモンの探索が行われた。この手法によって南野直人が食欲抑制ホルモンであるニューロメジンを、柳沢正史が血管収縮作用をもつエンドセリンを発見した(48, 49)。90年代になると、PCR法を用いたcDNA解析やゲノム解析から、生体にはリガンド不明のオーファン受容体が数多く存在することが明らかになった。そこで、このオーファン受容体を培養細胞系に発現させ、生理活性ペプチドの探索を行う手法が確立された。櫻井武、柳沢正史によって発見された、睡眠や摂食行動を制御するホルモンであるオレキシン(50)および寒川賢治、児島将康によって発見された食欲を制御するホルモンであるグレリン(51)もその一例である。以上のようにオーファン受容体発現系を用いて多くの新規ペプチドホルモンがこれまでに発見されてきた。

その一方で、各々のホルモン分泌制御機構については不明な点が多く残されている。特に、本研究で注目したGLP-1は、インスリン分泌を介して血糖値を制御するはたらきをもつことから、グルコースによる分泌制御機構については解明が進められてきた。しかし、小腸管腔には、グルコース以外の様々な化学物質が存在することから、グルコース以外の化学物質によるGLP-1の分泌制御機構が存在する可能性が高いと考えられる。

本研究では、全反射蛍光顕微鏡を始めとする可視化解析ツールを駆使することによって化学物質、特にアミノ酸に対する細胞の応答をリアルタイムで検証し、新たな分泌制御機構の解明を試みた。

## 第2章 GLP-1 分泌における GPRC6A の機能に関する研究

### 2-1. 序論

#### 2-1-1. GLP-1 について

1929年にJean M. La Barreらによって発見されたインクレチン (37) は、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵 $\beta$ 細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称である。これまでにグルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド (glucose-dependent insulintropic polypeptide: GIP) とグルカゴン様ペプチド1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) の2つのホルモンがインクレチンとして機能することが確認されている。さらにGLP-1は、インスリン分泌促進以外のはたらきを持つことが知られており、膵 $\alpha$ 細胞からのグルカゴン分泌抑制 (52)、中枢神経における食欲抑制 (53)、心筋機能の保護作用をもつことが明らかになってきている (54)。また、GLP-1、GIPともに膵 $\beta$ 細胞の細胞量を増加させるという報告がある (14)。

膵 $\beta$ 細胞において、インスリンは血中グルコースの増加によって細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が上昇した時に分泌されるが、細胞内サイクリックAMP濃度 ( $[\text{cAMP}]_i$ ) の上昇によってその分泌が増強される。膵 $\beta$ 細胞にはGIPとGLP-1の受容体が発現しており、GIPとGLP-1はそれぞれの受容体にはたらきかけ、 $[\text{cAMP}]_i$ を上昇させる (55)。つまり、インクレチンは血中グルコース濃度が高い場合にはcAMPを介してインスリン分泌を増強するが、血中グルコース濃度が低い場合には分泌を促進しない。この点から、インクレチンを用いた糖尿病治療は、インスリン分泌過多による低血糖のリスクが低いため、安全に高血糖を是正することの出来る方法として注目されている。

臨床試験の結果、GIPはインスリン分泌促進作用を有さないことが報告されている (56)。その一方で、GLP-1を経静脈で持続投与することによってインスリン分泌が十分に促進されることから (57)、GLP-1補充療法が有効な糖尿病治療法として注目されている。しかし、

腸管から血中に分泌されたGLP-1およびGIPは、セリンプロテアーゼであるジペプチジルペプチターゼ (dipeptidyl peptidase-4: DPP-4) によりすみやかに不活性化されるため (58)、近年、DPP-4阻害剤が糖尿病の新規治療薬として注目されている。以上の点から、GLP-1の分泌促進機構を明らかにすることは、II型糖尿病治療のための新たな標的分子の発見につながる可能性があり、重要であると考えられる。

### 2-1-2. GLP-1 分泌制御機構について

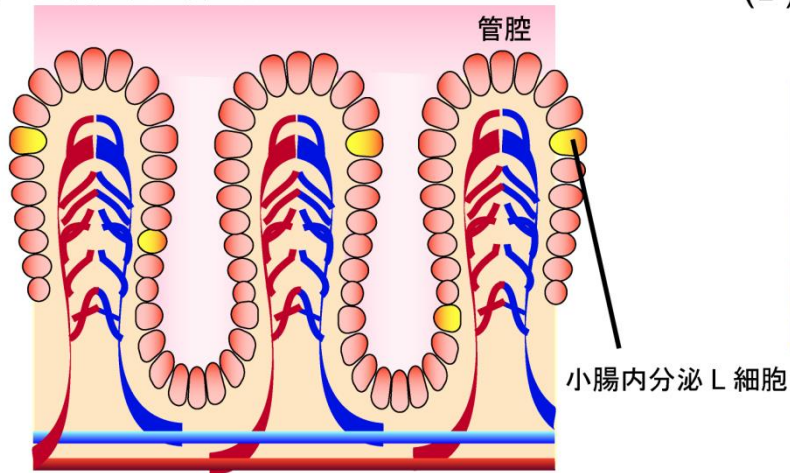
GLP-1の分泌を制御する機構としては、迷走神経を介した制御、他細胞から分泌されるホルモン、および栄養素による直接的な制御が知られている。上部消化管に脂質を与えるだけで、下部L細胞からGLP-1分泌がおこること (59)、*in vitro*でアセチルコリンがGLP-1分泌を促進する一方でムスカリン性アセチルコリン受容体M1サブタイプ (muscarinic acetylcholine receptor M1: M1R) のアンタゴニスト投与によってその分泌が抑制されること (60) から、迷走神経を介したGLP-1分泌制御機構が存在することが示唆されている。

他細胞から分泌されるホルモンによる制御機構の例として、小腸内分泌D細胞から分泌されるソマトスタチンが挙げられる。ソマトスタチンは、L細胞に発現する受容体を介して、アデニル酸シクラーゼの活性を阻害し、 $[cAMP]_i$ を減少させ、GLP-1分泌を抑制する (61)。

GLP-1を分泌する小腸内分泌L細胞は、開放型の内分泌細胞であり、小腸上皮を構成する吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞の中に数%のみ存在する (62)。頂部は小腸管腔側にまで達しており、頂部を覆う微絨毛が管腔側の栄養素を感受するような構造をしている (図2-1)。

これまでの研究から、糖および脂質を中心とした栄養素がインクレチンの分泌制御因子であることが明らかにされてきた (63, 64)。L細胞においてはナトリウム依存性グルコーストランスポーター (sodium dependent glucose transporter 1: SGLT-1) を介したグルコースの細

(A) 小腸上皮 模式図



(B)

GLP-1 抗体 免疫染色

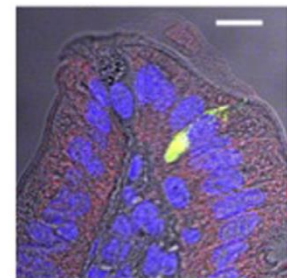


図 2-1. 小腸内分泌 L 細胞の局在

(A) GLP-1 を分泌する小腸内分泌 L 細胞は小腸上皮を構成する細胞中に数%存在する。

(B) Mizokami, A. et. al. (2014) *Bone* **69**, 68-79 より改変。緑が GLP-1 抗体、青は DAPI による染色である。校正棒は、10  $\mu\text{m}$  を示す。

胞内流入と ATP 感受性  $K^+$ チャネル ( $K_{ATP}$  チャネル) の閉口が GLP-1 分泌を制御していると考えられている (63)。しかしフルクトースやスクラロースなどの非代謝性糖類でも GLP-1 分泌を引き起こすことから (65, 66)、G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) の一種である甘味受容体 (taste receptor type 1 member 2: Tas1R2 と member 3: Tas1R3 のヘテロダイマー) の GLP-1 分泌への関与が示唆されている (66)。脂質に関しても GPCR を介して GLP-1 分泌が制御されていることが報告されている (67)。中および長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR40 (free fatty acid receptor 1: FFAR1)、長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR120 は Gq タンパク質を介して、不飽和長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR119 は Gs タンパク質を介して GLP-1 分泌を制御していることが明らかにされている (67) (図 2-2)。このように、3 大栄養素のうち、糖と脂質の小腸内分泌 L 細胞における感受機能については解明が進んでいるが、アミノ酸の感受機構については、不明な点が多く残されている。

### 2-1-3. 消化管における G タンパク質共役型受容体の機能

GPCR は、7 回膜貫通領域におけるアミノ酸配列の相同性や受容体機能の類似性に基づいて、ロドプシン様受容体ファミリーのクラス A、セクレチン受容体ファミリーのクラス B、グルタミン酸受容体ファミリーのクラス C の 3 つに大きく分類される。嗅覚受容体や短鎖脂肪酸受容体 (free fatty acid receptor 3: FFAR3: GPR41) はクラス A に、GIP 受容体や GLP-1 受容体は、クラス B に分類される。クラス C のグルタミン酸受容体ファミリーには、8 種類の代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1-8)、2 種類の  $\gamma$ -アミノ酪酸受容体 ( $GABA_B1$ 、 $GABA_B2$ )、3 種類の味覚受容体 (Tas1R1、Tas1R2、Tas1R3)、2 種類のカルシウム感知受容体 (CaSR、GPCR6A)、5 種類のオーファン受容体 (GPCR5A-D、GPR156) が存在する (図 2-3) (68)。中でも、カルシウム感受性受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR)、L-アミノ酸感受性受容体 (G protein-coupled receptor, family C, group 6, subtype A: GPCR6A)、うまみ受容



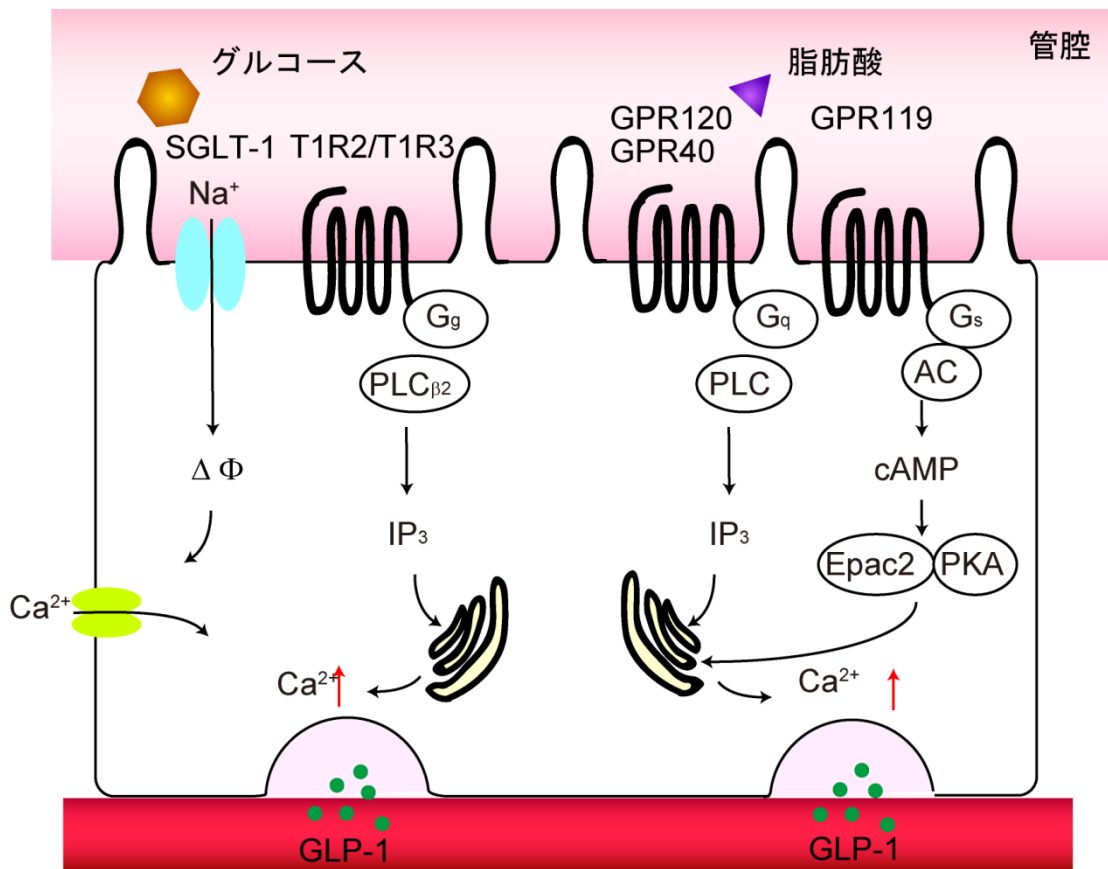


図 2-2. 小腸内分泌 L 細胞における栄養素感受機構の模式図

近年の研究により、L 細胞におけるグルコースの感受機構として、ナトリウム依存性グルコーストランスポーター (SGLT-1) および甘味受容体を介した機構が見出されている。また、脂肪酸に介しては GPR40 (FFAR1)、GPR119 および GPR120 を介した GLP-1 分泌促進機構が発見されている。

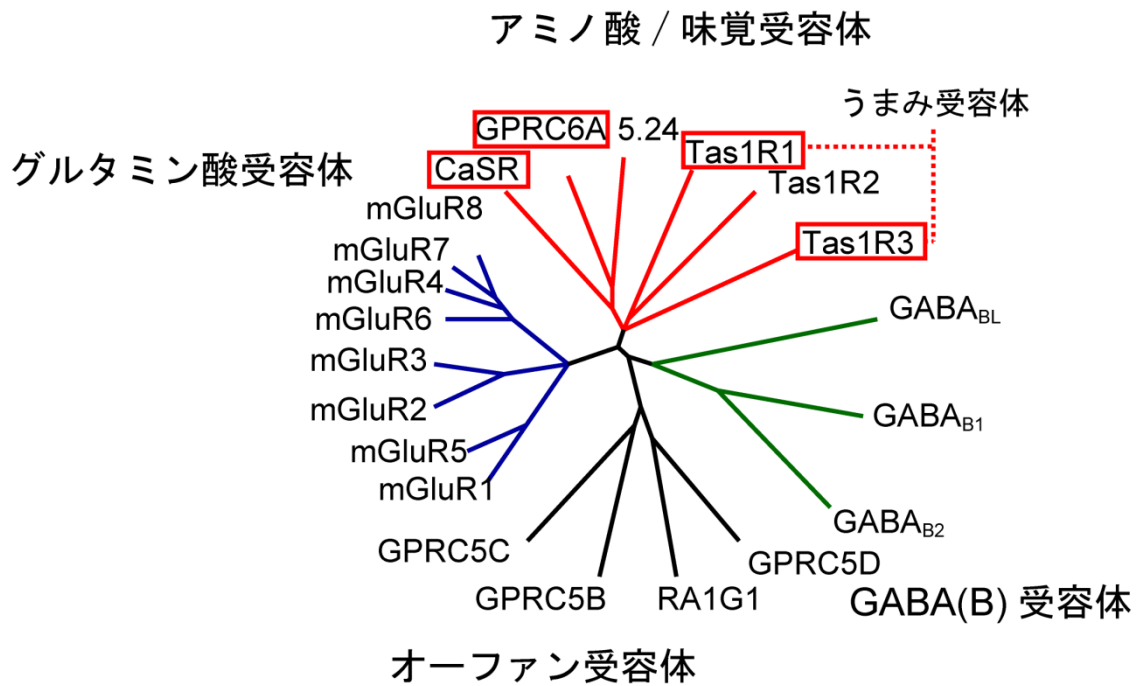


図 2-3. G タンパク質共役型受容体 C ファミリー遺伝子の樹形図 (Conigrave, A. D. et. al. (2007) *The Journal of Nutrition* 137, 1524-1527 より改変)

G タンパク質共役型受容体 C ファミリーは、グルタミン酸受容体、GABA(B)受容体、アミノ酸/味覚受容体、オーファン受容体から構成される。

体 (Tas1R1 と Tas1R3 のヘテロダイマー) および代謝型グルタミン酸受容体は、アミノ酸やジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドによって直接活性化される。

CaSRは、副甲状腺のCa<sup>2+</sup>センサーとして同定され、副甲状腺ホルモン分泌量の調節に関与するが、その後Ca<sup>2+</sup>だけでなく芳香族アミノ酸も感知することが明らかになった (69)。近年、CaSRが、ガストリンを分泌する胃内分泌G細胞 (70)、ソマトスタチンを分泌する胃内分泌D細胞、コレシストキニンを分泌する十二指腸内分泌I細胞に発現することが報告され (71)、CaSR遺伝子欠損マウスでは、L-フェニルアラニン刺激による十二指腸内分泌I細胞からのコレシストキニン分泌量が低下していた (72)。一方GPRC6Aは、幅広いアミノ酸、特に塩基性アミノ酸によって活性化され、2価の陽イオンによってその反応性が上昇する (69)。近年、骨芽細胞から分泌されるオステオカルシンがGPRC6Aのリガンドの1つであり、GPRC6A欠損マウスは骨粗鬆症、雌体化、メタボリックシンドロームを発症することが明らかになった (73)。GPRC6Aは膵β細胞を始め、様々な器官で発現が確認されており、リガンドであるL-アルギニン刺激によってインスリン分泌が増加することが報告されている (74)。消化管では、胃内分泌G細胞や胃内分泌D細胞においてGPRC6Aの発現が報告されているが (75)、GPRC6Aの*in vivo*での機能については、明らかになっていない。

#### 2-1-4. 本研究の目的

これまで述べてきたように、GLP-1は糖尿病治療のターゲットとして近年注目されているため、GLP-1の新たな分泌制御機構を明らかにできれば、糖尿病の新規治療法開発に貢献できると考えられる。

また、各種内分泌細胞にアミノ酸受容体が発現していることが近年報告されている (76)。したがって、小腸内分泌 L 細胞にもアミノ酸受容体が発現しており、これまで明らかにされていなかったアミノ酸感受機構が存在する可能性は高いと考えられる。

私は、先行研究 (77) において膵β細胞株 MIN6 細胞がうまみ受容体を発現しており、アミノ酸を感知することでインスリン分泌を促進する機構を見出した。しかし、血中のアミノ酸の変化量はわずか (30  $\mu$ M $\sim$ 100  $\mu$ M) であるため、生体内においてアミノ酸が調節しているインスリンの分泌量はわずかであると考えられる。その一方で、管腔内のアミノ酸は 0.1 mM から 1 mM まで変化する (78)。そこで本研究では、小腸管腔内のアミノ酸が GLP-1 の分泌量を調節している可能性について検証することとした。

## 2-2. 材料と手法

### 2-2-1. 実験に使用した材料および試薬

GPRC6A および CaSR のリガンドである L-オルニチン、L-アルギニン、L-リシン、L-フェニルアラニンおよび L-トリプトファン、 $K_{ATP}$  チャンネル開口剤であるジアゾキシドおよび電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルであるニフェジピンは、和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。GPRC6A のアンタゴニストであるカリンドールは Santa Cruz Biotechnology 社より購入した (Santa Cruz, CA, USA)。U-73122、2-APB (2-aminoethoxydiphenylborate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) および DDA (2',3'-dideoxyadenosine) は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。GPRC6A 受容体の発現抑制のために用いた stealth small interfering RNA (siRNA) は Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) から購入した。マウス由来小腸内分泌 L 細胞株である GLUTag 細胞はカナダトロント大学の Daniel J. Drucker 博士から寄贈していただいた。マウス由来 GLP-1 産生内分泌細胞株である STC-1 細胞は米国カリフォルニア大学 (現スイス癌研究所) の Douglas Hanahan 博士から寄贈していただいた。

### 2-2-2. 細胞培養および遺伝子導入

GLUTag 細胞および STC-1 細胞は、1.0 g/L グルコース、L-グルタミン、110 mg/L ピルビン酸を含む、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dalbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM (Invitrogen)) に 10% の非働化したウシ血清 (Invitrogen)、50 U/mL ペニシリンおよび 0.05 mg/mL ストレプトマイシンを添加し培養に用いた。培養条件は 37°C、5%CO<sub>2</sub> とした。

観察には 35 mm ガラスボトムディッシュを使用した。GLUTag 細胞を 2 日間ガラスボトムディッシュで培養したのち、1.5  $\mu$ g のプラスミド、3  $\mu$ l のリポフェクトアミン 2000

(invitrogen) を 1 ml の培地に添加することで遺伝子導入を行った。

### 2-2-3. cDNA ライブラリ作成と RT-PCR 法による遺伝子解析

ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて、GLUtag 細胞、STC-1 細胞およびマウス小腸からトータル RNA を抽出した。続いて、DNase (Promega, Madison, WI, USA) を用いてゲノム DNA の消化を行った。1  $\mu$ g のトータル RNA から Prime Script (Takara, Shiga, Japan) を用いて cDNA を合成した。RNA から作成された cDNA ライブラリに対し、アミノ酸を感知する受容体である、GPCR6A、CaSR およびうまみ受容体を構成する Tas1R1、Tas1R3 および GAPDH の発現を逆転写ポリメラーゼ反応 (Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) によって検証した (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。実験に使用したプライマーについては表 1 に示すとおりである。

### 2-2-4. セルソーターを用いた初代培養 L 細胞の単離と定量型 RT-PCR

プログルカゴンのプロモーター下で黄色蛍光タンパク質 (Venus) を発現する遺伝子改変マウスを用いて、初代培養小腸内分泌 L 細胞を単離した。Venus 発現細胞はフローサイトメトリーによって先行研究と同様に単離した (63)。単離した L 細胞から、スモールスケール RNA 精製キット (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を精製したのち、cDNA へ逆転写を行った。定量型 RT-PCR は 7900 HT Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いておこなった。

### 2-2-5. 細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の観察

蛍光指示薬 Fluo3-AM を用いることによって  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を観察した。ガラスボトムディッ

表 1. 各遺伝子のプライマー塩基配列

標的遺伝子名 (Accession NO.)	Sense primer
	Antisense primer
GPRC6A (NM_153071)	5'- CGGGATCCAGACGACCACAAATCCAG -3'
	5'- CCAAGCTTGATTCATAACTCACCTGTGGC -3'
CaSR (NM_013803)	5'- AGCAGGTGACCTTCGATGAGT -3'
	5'- ACTTCCTTGAACACAATGGAGC -3'
Tas1R1 (NM_031867)	5'- CTGCCAAAGGACAGAATCCTC -3'
	5'- GAACCGCATGGCTTGGAAG -3'
Tas1R3 (NM_031872)	5'- TGGGGCCTCTTTGTGTCT -3'
	5'- TGGGTTGTGTTCTCTGGTTGA -3'
GAPDH (NM_007393)	5'- CCATCACCATCTTCCAGGAG -3'
	5'- TTCAGCTCTGGGATGACCTT -3'

シユで2日間培養した GLUTag 細胞を、5  $\mu$ M Fluo3-AM を含む記録用溶液（130 mM NaCl、3.5 mM KCl、0.5 mM NaHPO<sub>4</sub>、0.5 mM MgSO<sub>4</sub>、1.5mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES、2 mM NaHCO<sub>3</sub>、5 mM Glucose）の中で 37°C30 分間インキュベートした。撮影開始3分後からアミノ酸を含む記録用溶液を還流し、倒立型システム顕微鏡 IX71（Olympus, Tokyo, Japan）と開口数 1.35 の油浸 40 倍対物レンズ（Olympus）を用いて観察した。5 秒ごとに 480 nm の励起フィルターを通したキセノン光（Olympus）によって励起し、535-550 nm の吸収フィルター（Olympus）を用いて蛍光画像を electron multiple-charge coupled device（EM-CCD）カメラ（Evolve, Photometrics, Tucson, AZ, USA）で取得した。

#### 2-2-6. 免疫蛍光染色

35 mm ガラスボトムディッシュで2日間培養した GLUTag 細胞に対し、緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein: GFP）融合組織型プラスミノゲン活性化因子（tissue type plasminogen activator: tPA）発現用プラスミド（tPA-GFP）（79）、黄色蛍光タンパク質（Venus）融合脳由来神経栄養素因子（brain-derived neurotrophic factor: BDNF）発現用プラスミド（BDNF-Venus）（80）、Venus 融合ニューロペプチド Y（neuropeptide Y: NPY）発現用プラスミド（NPY-Venus）（81）、および GFP 融合成長ホルモン（growth hormone: GH）発現用プラスミド（GH-GFP）（82）1.5  $\mu$ g と、3  $\mu$ l のリポフェクトアミン 2000（Invitrogen）を 1 ml の培地に添加することで遺伝子導入を行った。遺伝子導入の2日後に培地を PBS(-)で5分間2回洗浄したのち、4%パラホルムアルデヒドで室温 20 分静置し、細胞を固定した。その後 PBS(-)でパラホルムアルデヒドを洗浄したのち、0.1% TritonX-100 および 1% BSA を含む PBS を添加して室温 1 時間静置し、ブロッキングを行った。一次抗体はウサギ抗 GLP-1 抗体（200 倍希釈、Yanaiara Institute Inc., Shizuoka, Japan）を用いた。二次抗体には抗ウサギ IgG Alexa568 標識抗体（Invitrogen）を 1000 倍希釈して用いた。染色したサンプルは、ニポ



ウディスク型共焦点レーザー顕微鏡 (CSU-10, Yokogawa, Tokyo, Japan) を用いて EM-CCD カメラ (C9100-02, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で撮影した。

#### 2-2-7. 全反射蛍光顕微鏡による tPA-GFP の分泌反応の可視化解析

ガラスボトムディッシュで 2 日間培養した GLUTag 細胞に対し、tPA-GFP をカチオニックリポソーム法により遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後に培地を記録用溶液に置換し、全反射蛍光顕微鏡法 (total internal reflection microscopy: TIRFM) によって tPA-GFP の分泌反応を観察した。対物レンズは開口数 1.49 の油浸 100 倍のものを用いた。488 nm 波長の Sapphire 半導体固体レーザー (Coherent, Santa Clara, Canada) を全反射光として使い、535 / 50x 吸収フィルター (Chroma, Bellows Falls, VT, USA) を通して EM-CCD (iXon, Andor, Belfast, UK) カメラにより撮影をおこなった。

撮影開始 30 秒後からアミノ酸を含む記録用溶液を還流し、20 分間の分泌反応の回数を測定した。画像解析には MetaMorph (version 7.7, Molecular Devices, Danaher, WA, USA) を使い、得られたデータは GraphPad Prizm (Version 4.01, GraphPad software, San Diego, CA, USA) によって一元配置分散解析 (One-way ANOVA) を行った。

#### 2-2-8. 蛍光分光光度計を用いた tPA-GFP 分泌量の測定

GLUTag 細胞を  $3.0 \times 10^5$  細胞になるよう 6 well プレート上で培養し、培養二日後に tPA-GFP をカチオニックリポソーム法により遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後に培地を記録用溶液に置換した。記録用溶液中で 30 分 37°C でインキュベート後、1 mM L-オルニチンおよび 1 mM L-オルニチンと各種阻害剤を含む記録用溶液で 2 時間 37°C のインキュベーター中で刺激した。溶液中に分泌された tPA-GFP 量を蛍光分光光度計を用いて測定した (F-7000, Hitachi, Tokyo, Japan)。

#### 2-2-9. 酵素免疫測定法を用いた GLP-1 分泌量の測定

GLUTag 細胞を  $3.0 \times 10^5$  細胞になるよう 6 well プレート上で培養し、培養二日後に培地を記録用溶液に置換した。記録用溶液中で 30 分  $37^\circ\text{C}$  でインキュベート後、1 mM L-オルニチンおよび 1 mM L-オルニチンと各種阻害剤を含む記録用溶液で 2 時間  $37^\circ\text{C}$  のインキュベーター中で刺激した。溶液中に分泌された GLP-1 の量を酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) を用いて測定した (Milipore, Merck, Darmstadt, Germany)。測定にはマルチプレートリーダーを用いた (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Germany)。

#### 2-2-10. RNA 干渉法による GPRC6A の発現抑制

ガラスボトムディッシュで 2 日間培養した GLUTag 細胞に対し、20 pmol/  $\mu\text{l}$  の GPRC6A siRNA (Gprc6a-MSS210013: 5'-UCCAGAUGAUUUCACGACAGGUGUC-3') をカチオニックリポソーム法により遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後に  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングおよび TIRFM による観察を行った。

#### 2-2-11. 解析方法

解析データはそれぞれ、平均値  $\pm$  標準誤差 (S.E.) で示した。また、Graph Pad software を用いて、One-way ANOVA の Newman-Keuls 検定あるいは Dunnet 検定を行った。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 小腸内分泌 L 細胞におけるアミノ酸受容体の発現

先行研究において小腸内分泌 L 細胞が管腔内のアミノ酸濃度の変化を感知する可能性が示唆されている (83, 84)。その感受機構を明らかにするため、マウス由来小腸内分泌 L 細胞株である GLUTag 細胞における、アミノ酸を感知する受容体の発現解析を行った。RT-PCR 法による遺伝子解析により、近年アミノ酸を感知することが明らかとなった CaSR (85) および GPRC6A (86)、アミノ酸の中でも特にグルタミン酸を感知するうまみ受容体 (87) (Tas1R1 と Tas1R3 のヘテロダイマー) が GLUTag 細胞において発現していた (図 2-4A)。GLP-1 を分泌する他の培養細胞である STC-1 細胞において、同様に遺伝子解析を行うと、GPRC6A および Tas1R3 のみ発現していた。マウス小腸から作成した cDNA ライブラリに対し RT-PCR を行うと、GPRC6A、CaSR および Tas1R3 は発現していたが、Tas1R1 の発現は観察されなかった。

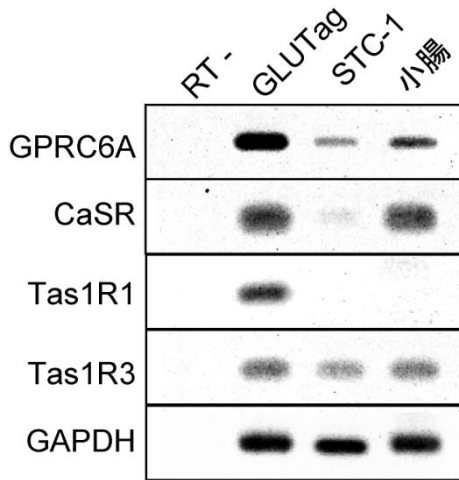
次に、セルソーターを用いて初代培養 L 細胞を単離し、リアルタイム PCR 法によって GPRC6A の発現を解析した。その結果、GLUTag 細胞と比較すると、その発現量は少ないものの、非 L 細胞と比較すると L 細胞における GPRC6A の発現が多い傾向が見られた (図 2-4B)。

うまみ受容体は Tas1R1 と Tas1R3 がヘテロダイマーを形成することによって機能するため、Tas1R3 のみではアミノ酸を感受できないと考えられる。そこで、本研究においては発現が確認された GPRC6A と CaSR について機能を検証することとした。

### 2-3-2. アミノ酸投与時の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度変化

遺伝子解析によって発現が確認されたアミノ酸を感知する受容体である、GPRC6A および CaSR が小腸内分泌 L 細胞において機能しているかを調べるため、アミノ酸投与時の

(A)



(B)

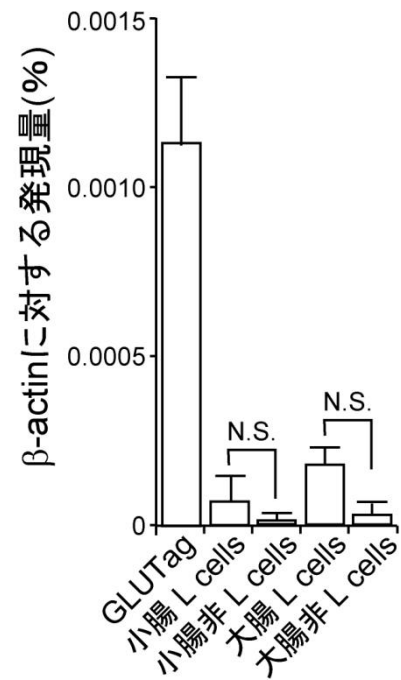


図 2-4. 小腸内分泌 L 細胞におけるアミノ酸受容体の発現

(A) RT-PCR 法による遺伝子解析を行ったところ、GLUTag 細胞においてアミノ酸感受性受容体である GPRC6A、CaSR、うまみ受容体を構成する Tas1R1 と Tas1R3 の発現が確認された。STC-1 細胞においては GPRC6A、Tas1R3 の発現は確認されたが CaSR、Tas1R1 の発現は見られなかった。

(B) 初代培養 L 細胞における GPRC6A の発現を検証すると、GLUTag 細胞に比べ発現量は少ないが GPRC6A が発現していた。N.S.は、有意なしを示す。初代培養の小腸 L 細胞と小腸非 L 細胞、および大腸 L 細胞と大腸非 L 細胞間では GPRC6A の発現量に有意差がなかったが、非 L 細胞に比べ、L 細胞に GPRC6A の発現が多い傾向が見られた。

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化を観察した。GPRC6Aのリガンドである、L-オルニチン、L-アルギニンおよびL-リシンを投与すると(88)、GLUTag細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は上昇した(図2-5)。また、CaSRのリガンドであるL-トリプトファンおよびL-フェニルアラニン(69)投与によっても[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は上昇した(図2-5)。一方、STC-1細胞における[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化を観察すると、GPRC6AのリガンドであるL-オルニチン、L-リシンおよびL-アルギニンに対しては[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇したが、CaSRのリガンドであるL-フェニルアラニンおよびL-トリプトファンを投与しても[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は上昇しなかった(図2-6)。

### 2-3-3. L-オルニチン投与時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化

GLUTag細胞とSTC-1細胞どちらの細胞においても、GPRC6AのリガンドであるL-オルニチン、L-リシンおよびL-アルギニンによって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇した。この3種のアミノ酸の中でも、特にGPRC6A以外の受容体に感知される可能性の低い、GPRC6A特異的なリガンドであるL-オルニチン(89)に対する[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化についてさらに解析を行った。

L-オルニチンの投与濃度を1 μM、10 μM、100 μM、および1 mMと変化させたところ、投与濃度依存的に[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇率が増加した(図2-7)。GPRC6AはGqタンパク質共役型の受容体である(90)。GPRC6Aにリガンドが結合すると、共役するGタンパク質のはたらきによりホスホリパーゼC(phospholipase C: PLC)が活性化され、ホスファチジルイノシトール4,5-2-リン酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PIP<sub>2</sub>)からジアシルグリセロール(diacylglycerol: DAG)とイノシトール3リン酸(inositol trisphosphate: IP<sub>3</sub>)が産生される。IP<sub>3</sub>は小胞体上のIP<sub>3</sub>受容体に結合して、小胞体貯蔵Ca<sup>2+</sup>の放出を促進し、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇する。そこで、PLCおよびIP<sub>3</sub>受容体の阻害剤の及ぼす影響を検証した。PLCの阻害剤であるU-73122、IP<sub>3</sub>受容体の阻害剤である2-アミノエトキシジフェニルボレート(2-aminoethoxydiphenylborate: 2-APB)およびGPRC6Aのアンタゴニストであるカリンドー

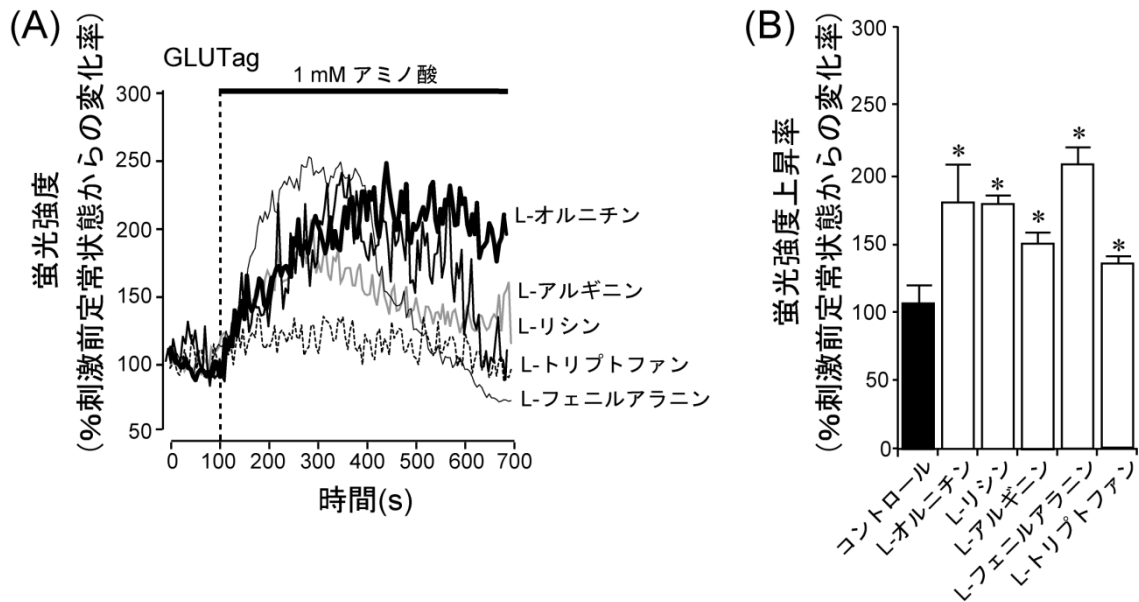


図 2-5. GLUTag 細胞におけるアミノ酸投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化

(A) Fluo3-AM の蛍光強度を測定した後、L-オルニチン投与前からの変化率を算出し、グラフ化した。撮影開始 100 秒後から GPRC6A のリガンドである L-オルニチン、L-リシンおよび L-アルギニンや、CaSR のリガンドである L-フェニルアラニンおよび L-トリプトファンを投与した（太線）。刺激に応答して蛍光強度の上昇が観察された。

(B) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率を算出したところ、各アミノ酸投与により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇することが分かった。データは、各種条件における 8 細胞の平均値と標準誤差で示した。\*は、有意差  $p < 0.05$  を示す。

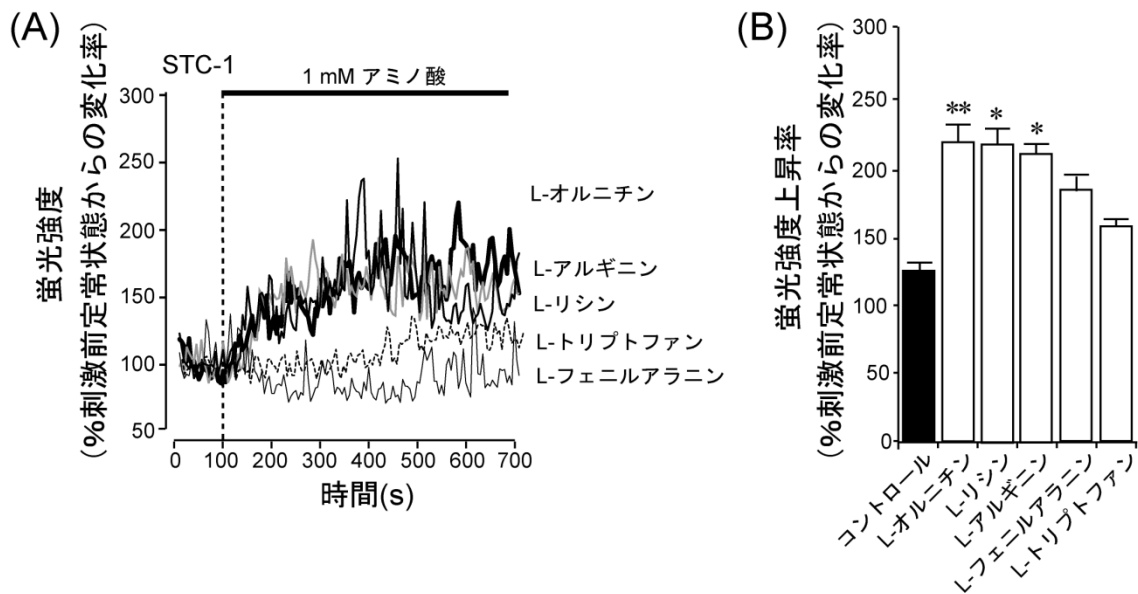


図 2-6. STC-1 細胞におけるアミノ酸投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化

(A) GPRC6A のリガンドである L-オルニチン、L-リシンおよび L-アルギニンに応答して蛍光強度は上昇したが、CaSR のリガンドである L-フェニルアラニンおよび L-トリプトファンに対しては蛍光強度の上昇が観察されなかった。

(B) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率を算出したところ、L-オルニチン、L-リシンおよび L-アルギニン投与により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇することが分かった。データは、各種条件における 8 細胞の平均値と標準誤差で示した。\*および\*\*は、有意差  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  を示す。

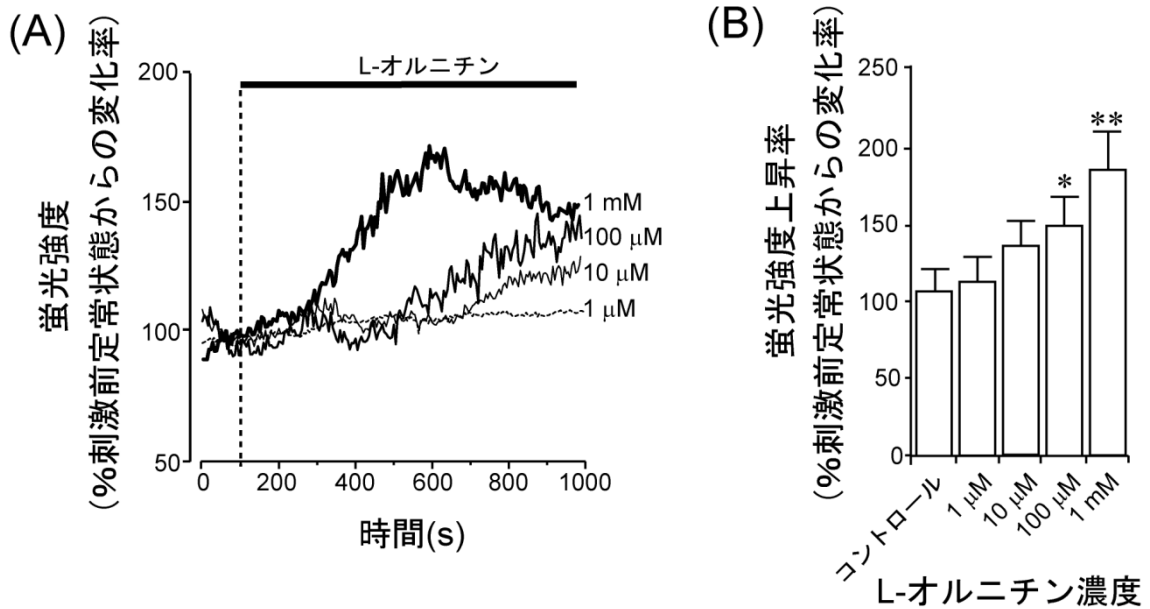


図 2-7. L-オルニチン投与による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化

(A) 撮影開始 100 秒後から L-オルニチン (1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、1 mM) の投与を開始した (太線)。刺激に応答して L-オルニチン濃度依存的な蛍光強度の上昇が観察された。

(B) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率は、L-オルニチン濃度依存的に増加した。データは、各種条件における 7 細胞の平均値と標準誤差で示した。\*および\*\*は、有意差  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  を示す。



ル (91) を L-オルニチンと共投与すると、L-オルニチンによって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が阻害された (図 2-8)。

#### 2-3-4. L-オルニチンが GLP-1 分泌に及ぼす影響

L-オルニチンによって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が、GLP-1 分泌を引き起こすかどうかを調べるため、ホルモン分泌をリアルタイムで観察可能な全反射蛍光顕微鏡法 (TIRFM) を用いて (77, 80, 92, 93)、GLP-1 の分泌の可視化解析を試みた。GLP-1 はプログルカゴンからプロセッシングによって産生されるため (94) (図 2-9)、GLP-1 に直接蛍光タンパク質を融合させて発現させることは困難であると考えられる。そこで、GLP-1 と同じ分泌小胞にターゲットする、別のペプチドに蛍光タンパク質を融合して強制発現させ、GLP-1 分泌の指標として用いた。緑色蛍光タンパク質融合組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA-GFP) (79)、黄色蛍光タンパク質融合脳由来神経栄養素因子 (BDNF-Venus) (80)、黄色蛍光タンパク質融合ニューロペプチド Y (NPY-Venus) (81)、および緑色蛍光タンパク質融合成長ホルモン (GH-GFP) (82) を、それぞれカチオニックリポソーム法により遺伝子導入して強制発現させ、免疫染色によって内在性 GLP-1 と同じ局在を示すものの同定を試みた。その結果 tPA-GFP が最も高い共局在率を示すことが明らかとなった (図 2-10, 11、表 2)。そこで、tPA-GFP を GLP-1 分泌の指標として用いた。

tPA-GFP を強制発現させた GLUTag 細胞を TIRFM によって観察すると、図 2-12A のように、tPA-GFP を含む分泌小胞は輝点として観察された。L-オルニチン投与時の分泌反応の回数を測定すると、L-オルニチンの投与濃度の上昇にともない、分泌回数も増加した (図 2-12B)。

TIRFM によって観察される分泌反応が、実際の分泌量を反映しているか検証するため、分光光度計を用いて実際に分泌された tPA-GFP 量を定量的に測定した。その結果、分光光度計を用いて測定した溶液中の tPA-GFP 量も、L-オルニチンの投与濃度の増加に伴い、増

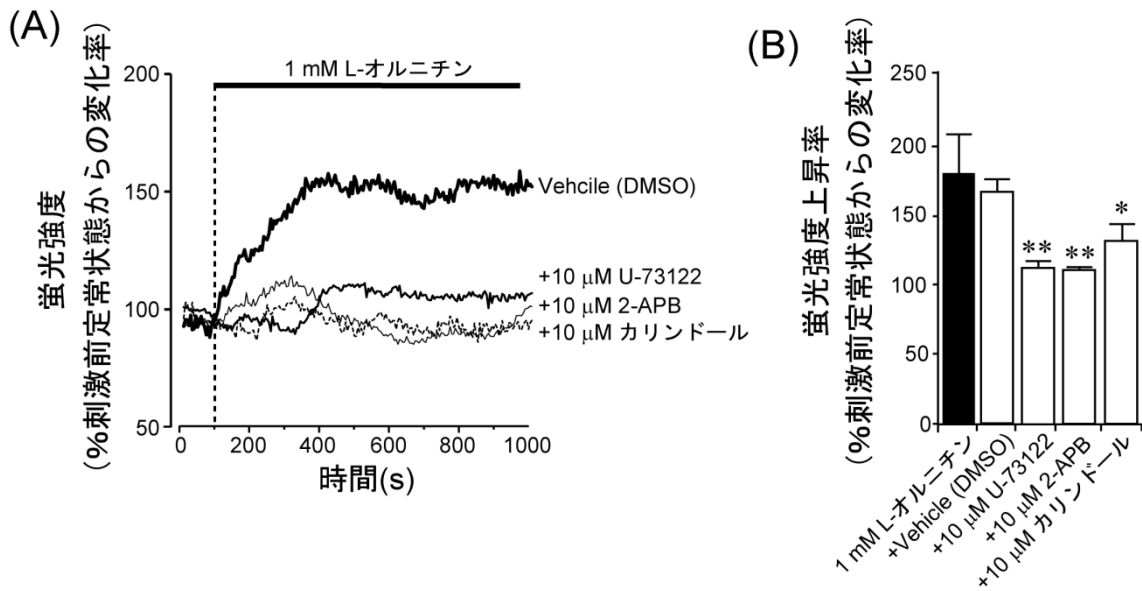


図 2-8. 阻害剤共投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化

- (A) 撮影開始100秒後から1 mM L-オルニチンおよび阻害剤の投与を開始した(太線)。L-オルニチン投与時に観察された蛍光強度の上昇は、阻害剤共投与時に抑制された。
- (B) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率は、阻害剤の共投与により減少した。データは、各種条件における6細胞の平均値と標準誤差で示した。\*および\*\*は、有意差  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  を示す。

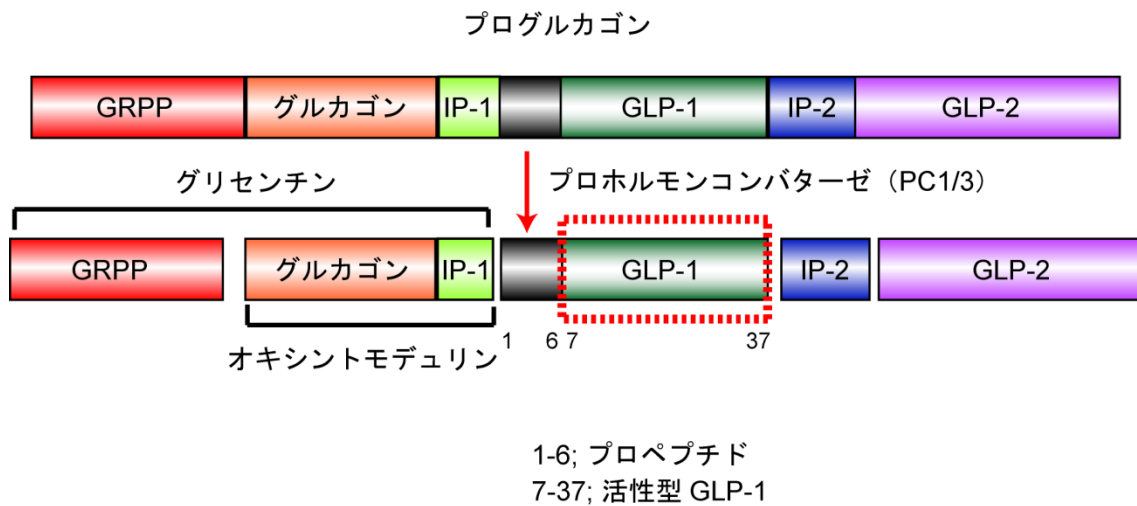


図 2-9. GLP-1 のプロセッシング過程

GLP-1は、プログルカゴンからプロホルモンコンバーターゼ (PC1/3) によってプロセッシングされ、産生される。(GRPP: glicentin-related polypeptide (グリセンチン関連ポリペプチド)、IP-1: intervening peptide-1 (介在ペプチド-1)、IP-2: intervening peptide-2 (介在ペプチド-2)、GLP-2: glucagon-like peptide-2 (グルカゴン様ペプチド-2))

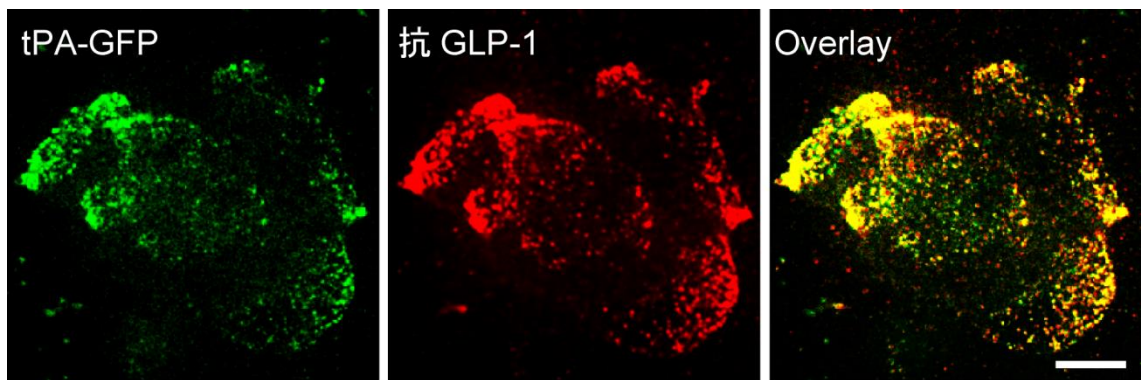


図 2-10. tPA-GFP と GLP-1 の共焦点蛍光顕微鏡像

tPA-GFP を発現させた GLUTag 細胞に対し抗 GLP-1 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。tPA-GFP と GLP-1 は高い共局在性を示した。校正棒は、10  $\mu\text{m}$  を示す。

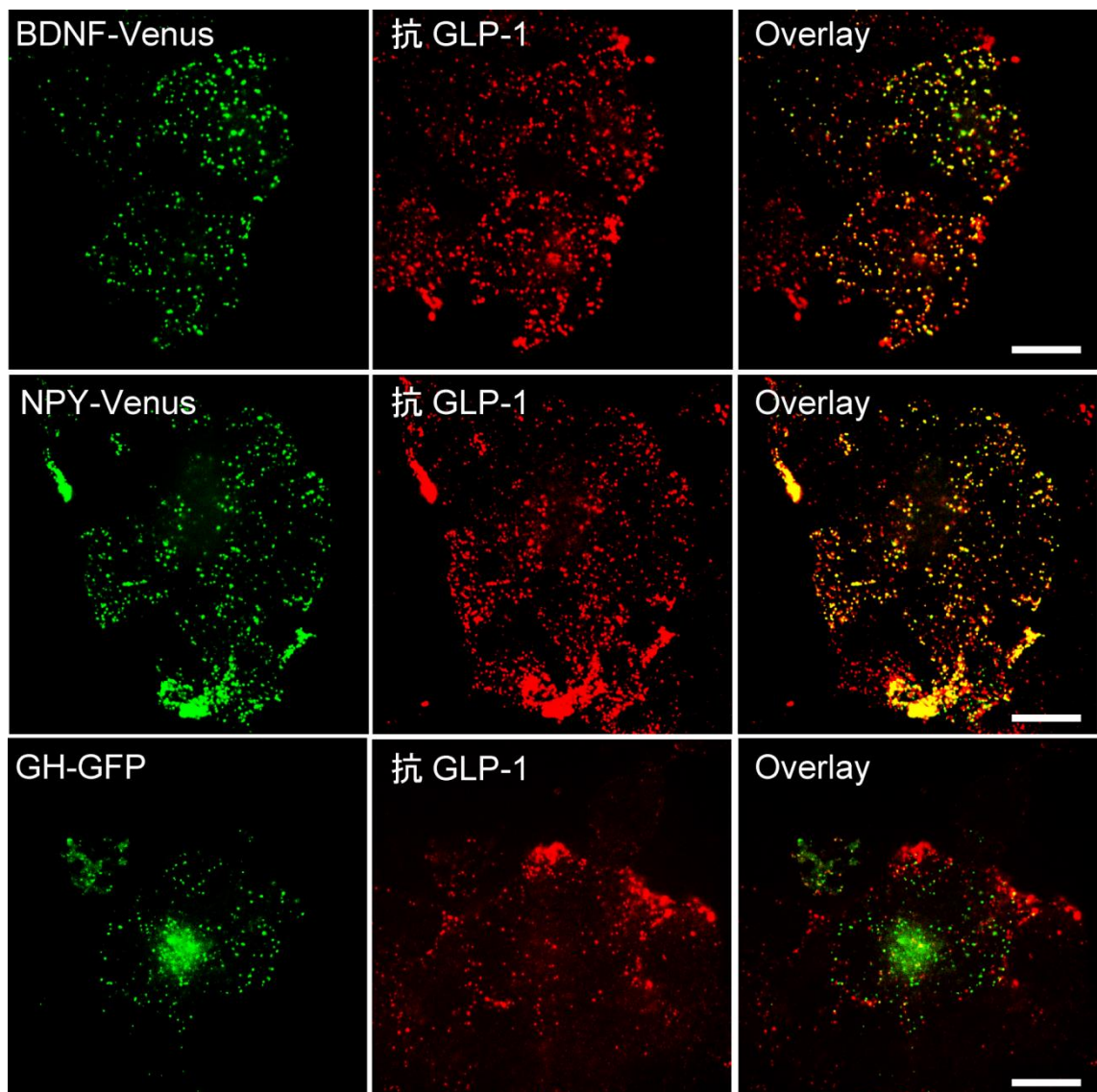


図 2-11. 蛍光タンパク質融合ペプチドと GLP-1 の細胞内共焦点蛍光顕微鏡像

BDNF-Venus、NPY-Venus および GH-GFP を発現させた GLUTag 細胞に対し抗 GLP-1 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。BDNF-Venus および NPY-Venus の一部は GLP-1 と共局在していた。その一方で GH-GFP と GLP-1 は、共局在を示さなかった。校正棒は、10  $\mu\text{m}$  を示す。

表 2. 蛍光タンパク質融合ペプチドと GLP-1 の共局在率

抗 GLP-1 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果から、GLP-1 陽性顆粒に対する蛍光タンパク質融合ペプチドの発現率を算出した。データは、各種条件における 5 細胞の平均値 ± 標準誤差で示した。

プラスミド	共局在率
tPA-GFP	80.3 ± 5.6 % (n = 5 細胞)
NPY-Venus	74.6 ± 6.9 % (n = 5 細胞)
BDNF-Venus	65.3 ± 6.7 % (n = 5 細胞)
GH-GFP	16.3 ± 7.4 % (n = 5 細胞)

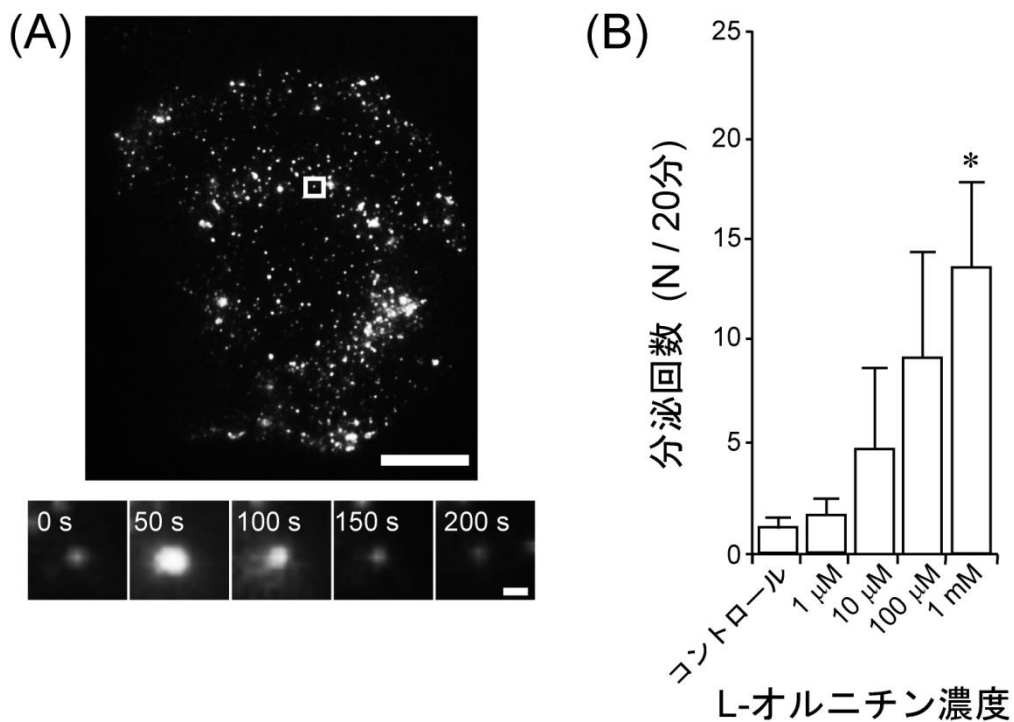


図 2-12. TIRFM による tPA-GFP 分泌反応の観察

(A) tPA-GFP を発現した GLUTag 細胞を TIRFM により観察した。tPA-GFP を含む分泌顆粒は、輝点として観察された (上図)。分泌時には、一過的に輝点の蛍光強度が増加した (下図)。校正棒は、上図 10  $\mu\text{m}$ 、下図 1  $\mu\text{m}$  を示す。

(B) TIRFM を用いて、刺激 20 分間に観察された tPA-GFP の分泌回数を測定した。投与した L-オルニチンの濃度依存的に分泌回数が増加した。データは、各種条件における 5 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*は、有意差  $p < 0.05$  を示す。

加した(図 2-13A)。また、実際に分泌された GLP-1 の濃度を ELISA 法によって測定すると、L-オルニチンの投与濃度の増加にともない、分泌量も増えることが明らかとなった(図 2-13B)。以上の結果から、TIRFM によって観察される分泌反応の回数と実際に分泌されている tPA-GFP および GLP-1 の分泌量には相関性が見られ、tPA-GFP を GLP-1 の分泌の指標とすることに問題はないと考えられる。

次に、L-オルニチンによる GLP-1 分泌制御機構に GPRC6A が関与していることを検証するため、GPRC6A の下流シグナルである PLC および  $IP_3$  受容体の阻害剤を L-オルニチンと共投与した際の、GLP-1 分泌におよぼす影響を観察した。TIRFM によって tPA-GFP の分泌反応を観察すると、PLC の阻害剤である U-73122、 $IP_3$  受容体の阻害剤である 2-APB および GPRC6A の阻害剤であるカリンドールを L-オルニチンと共投与することにより、L-オルニチン単独投与時と比べ、tPA-GFP の分泌反応の回数が減少した(図 2-14A)。また、分光光度計によって定量的に測定した tPA-GFP の分泌量および ELISA によって測定した GLP-1 の分泌量も、U-73122、2-APB およびカリンドールの共投与によって減少した(図 2-14B, C)。以上の結果から、L-オルニチンによる GLP-1 分泌は、Gq タンパク質と共役する GPRC6A を介して制御されていると考えられる。

#### 2-3-5. siRNA による GPRC6A 発現抑制の GLP-1 分泌に及ぼす影響

RNA 干渉法によって GPRC6A の発現を抑制した際の、GLP-1 分泌に及ぼす影響を検証した。RNA 干渉によって GPRC6A の発現が抑制されたことは RT-PCR 法によって確認した(図 2-15A)。GPRC6A の発現を抑制した GLUTag 細胞における  $[Ca^{2+}]_i$  変化を観察すると、L-オルニチンおよび L-リシンの投与に対する  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は観察されなかった(図 2-15B, C)。それに対し、CaSR のリガンドである L-フェニルアラニンの投与に対して  $[Ca^{2+}]_i$  は上昇した(図 2-15B, C)。この結果から、GPRC6A のリガンドである L-オルニチンと L-リシンは GPRC6A、



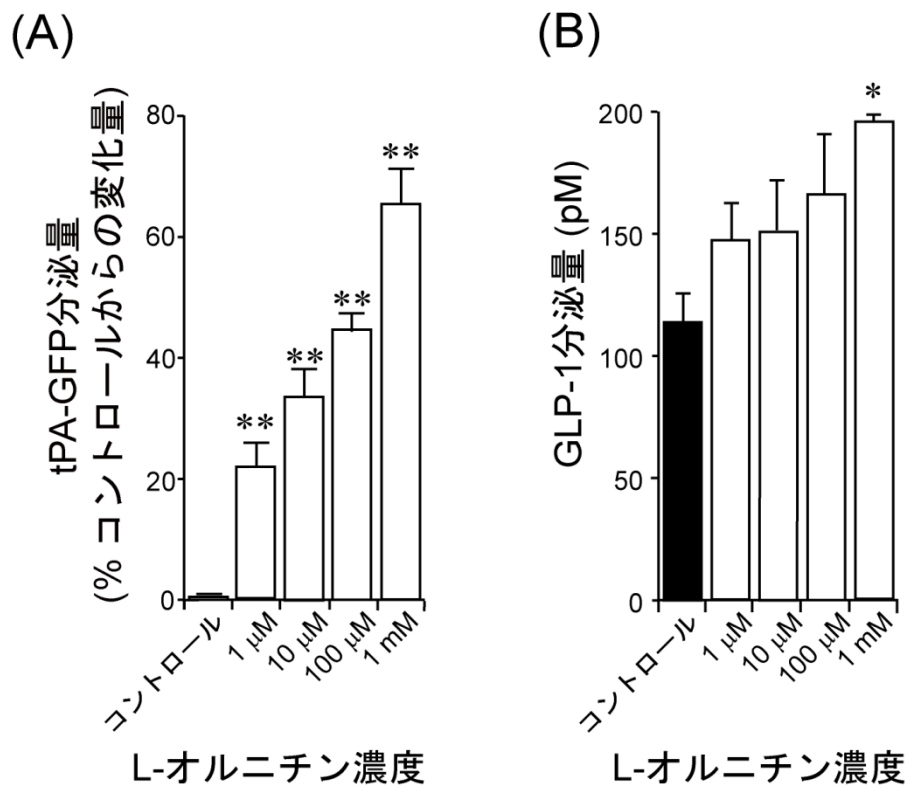


図 2-13. L-オルニチン投与時の tPA-GFP および GLP-1 分泌量の定量的測定

(A) L-オルニチン (1 μM、10 μM、100 μM、1 mM) 投与時の tPA-GFP 分泌量を分光光度計によって測定した。溶液中に分泌された tPA-GFP の蛍光強度は、L-オルニチン濃度依存的に増加した。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*\*は、有意差  $p < 0.01$  を示す。

(B) L-オルニチン (1 μM、10 μM、100 μM、1 mM) 投与時の GLP-1 の分泌量を ELISA によって測定した。GLP-1 の分泌量は、L-オルニチン濃度依存的に増加した。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*は、有意差  $p < 0.05$  を示す。

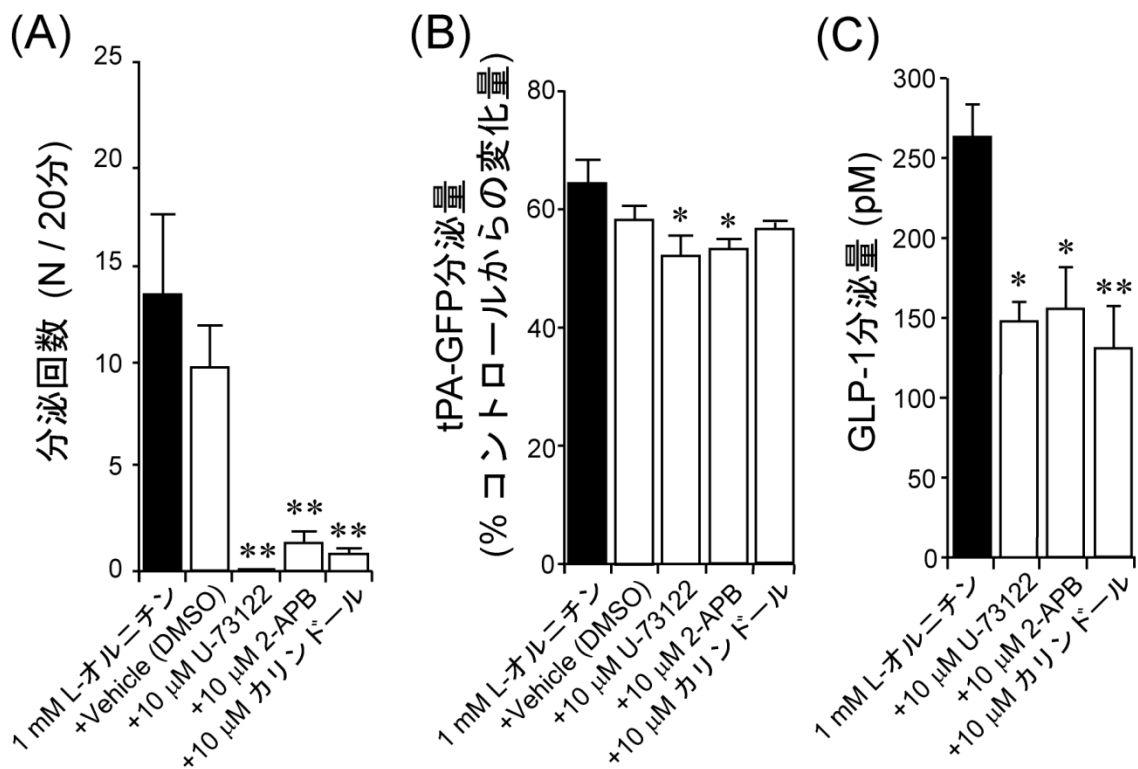


図 2-14. 阻害剤共投与時の tPA-GFP および GLP-1 分泌量の測定

(A) 1 mM L-オルニチン刺激 20 分間に観察された tPA-GFP 分泌回数を測定した。阻害剤により L-オルニチン依存的な tPA-GFP 分泌は阻害された。データは、各種条件における 7 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*\*は、有意差  $p < 0.001$  を示す。

(B) 1 mM L-オルニチン投与時の tPA-GFP 分泌量を分光光度計によって測定した。溶液中に分泌された tPA-GFP の蛍光強度は、阻害剤の共投与により減少した。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*は、有意差  $p < 0.05$  を示す。

(C) 1 mM L-オルニチン投与時の GLP-1 分泌量を ELISA によって測定した。阻害剤の共投与によって GLP-1 分泌が有意に抑制された。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*および\*\*は、有意差  $p < 0.05$  と  $p < 0.01$  を示す。

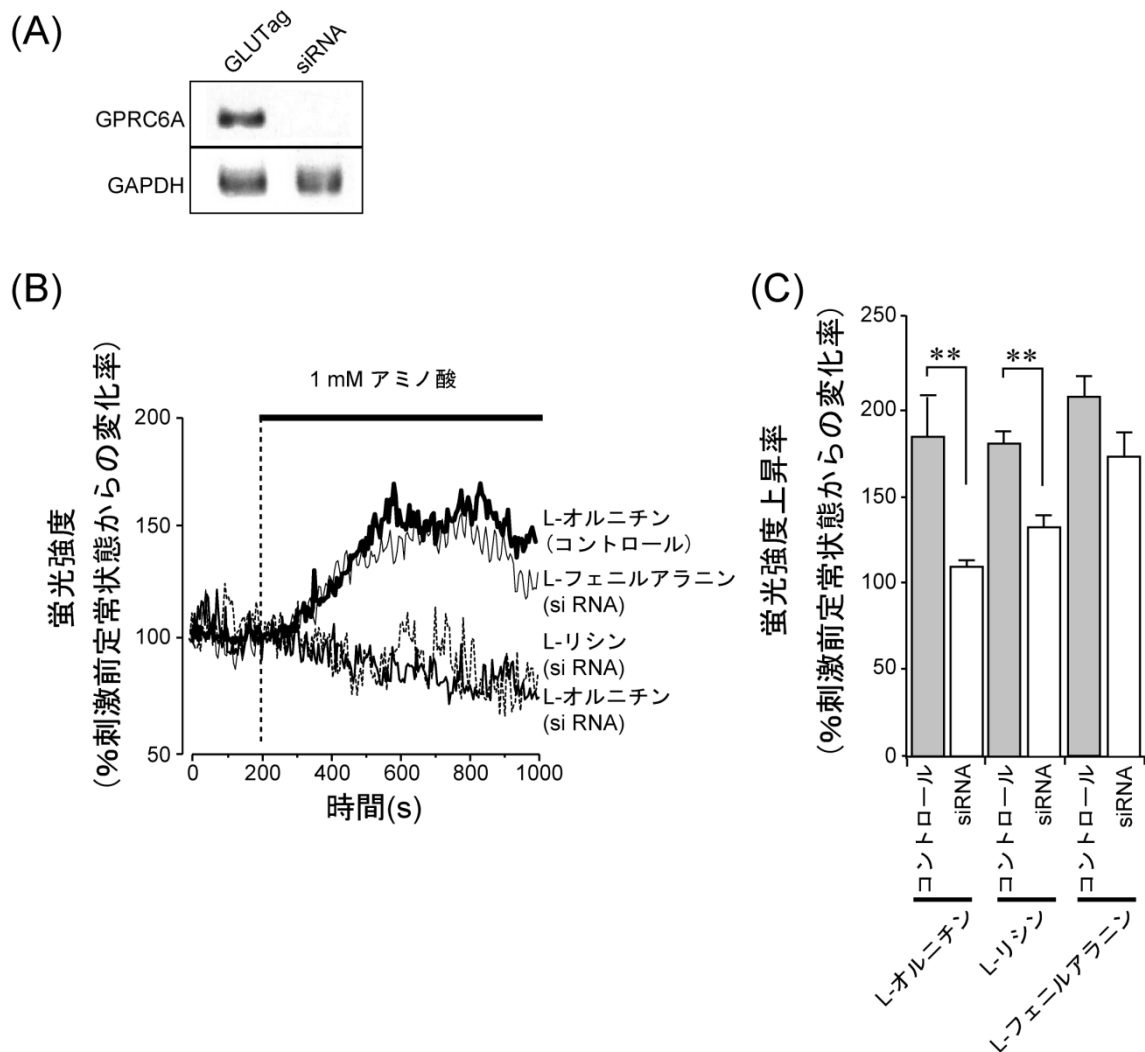


図 2-15. GPRC6A 遺伝子発現抑制細胞における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変化

(A) RT-PCR 法による遺伝子発現解析の結果、siRNA を導入した GLUTag 細胞において GPRC6A 遺伝子の発現が抑制された。

(B) siRNA により GPRC6A 遺伝子の発現を抑制した GLUTag 細胞においては、GPRC6A のリガンドである L-オルニチンおよび L-リシン刺激時の蛍光強度上昇は阻害された。その一方で CaSR のリガンドである L-フェニルアラニンに対しては蛍光強度の上昇が観察された。

(C) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率を算出した。データは、各種条件における 8 細胞の平均値と標準誤差で示した。\*\*は、有意差  $p < 0.001$  を示す。

CaSR のリガンドである L-フェニルアラニンが CaSR に、別々に感知されていると考えられる。

次に、GPRC6A の発現抑制が GLP-1 分泌に及ぼす影響を検証した。L-オルニチン投与時の GLP-1 の分泌量を ELISA によって測定すると、GPRC6A の siRNA 導入時に L-オルニチンによる GLP-1 分泌が抑制された (図 2-16)。

GPRC6A の発現抑制が、GLP-1 を含む分泌小胞形成過程に及ぼす影響を検証するため、TIRFM によって、分泌小胞の可視化解析を行った。その結果、GPRC6A の siRNA を導入した GLUTag 細胞と siRNA を導入していないコントロールの GLUTag 細胞との間で、分泌小胞の数に差は観察されなかった (図 2-17A, B)。その一方で、L-オルニチン投与時におこる tPA-GFP の分泌反応の回数は siRNA を導入した GLUTag 細胞において、有意に減少した (図 2-17C)。

#### 2-3-6. 代謝系および cAMP を介した制御機構の検証

次に、L-オルニチンがミトコンドリアにおける代謝を介した系により、 $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させ、GLP-1 分泌を促進している可能性について検証した。GLUTag 細胞は  $K_{ATP}$  チャネルを発現しているため (95)、L-オルニチンがミトコンドリアにおいて代謝されて ATP が産生されると、 $K_{ATP}$  チャネルを閉じ、電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャネルを介して  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させる可能性がある。そこで、 $K_{ATP}$  チャネル開口剤であるジアゾキシドおよび電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャネルの阻害剤であるニフェジピンを L-オルニチンと共投与、あるいは細胞外  $Ca^{2+}$  のキレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 存在下で L-オルニチンを投与した際の、 $[Ca^{2+}]_i$  変化を観察した。その結果、EDTA の存在下で L-オルニチンを投与すると、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇は阻害された一方、ジアゾキシドおよびニフェジピンの共投与は L-オルニチンによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に影響を及ぼさなかった (図 2-18A, B)。また、これ

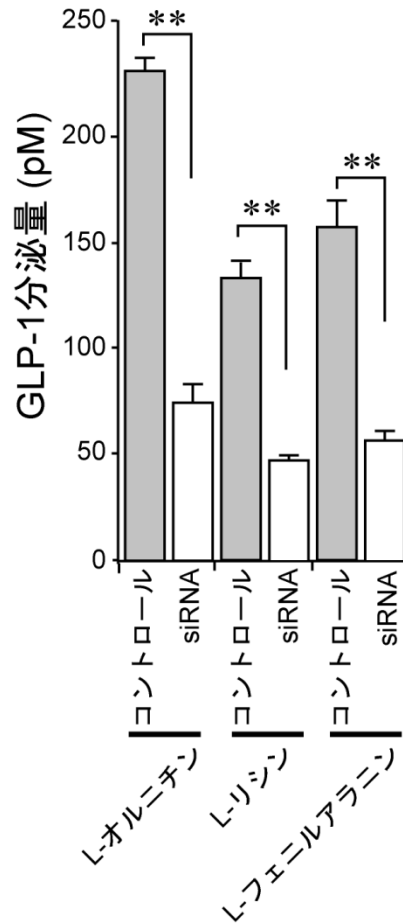


図 2-16. GPRC6A 遺伝子発現抑制 GLUTag 細胞における GLP-1 分泌量の測定

siRNA により GPRC6A 遺伝子の発現を抑制した GLUTag 細胞における、アミノ酸投与時の GLP-1 分泌量を ELISA により測定した。GPRC6A の発現抑制により、GPRC6A のリガンドである L-オルニチンおよび L-リシン、CaSR のリガンドである L-フェニルアラニン投与に対する GLP-1 分泌が抑制された。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。\*\*は、有意差  $p < 0.01$  を示す。

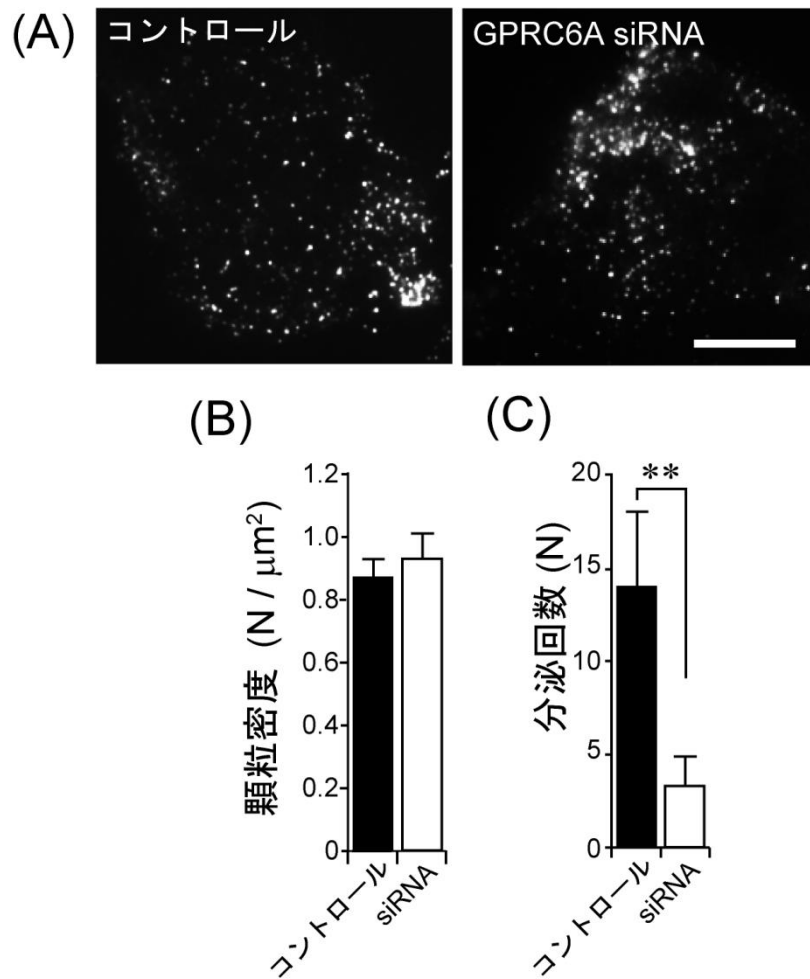


図 2-17. GPRC6A 遺伝子発現抑制 GLUTag 細胞における tPA-GFP 分泌反応の観察

(A) siRNA により GPRC6A 遺伝子の発現を抑制した GLUTag 細胞において tPA-GFP を発現させ、全反射蛍光顕微鏡により観察した。校正棒は、10  $\mu\text{m}$  を示す。

(B) tPA-GFP を含む分泌小胞の密度を測定した。GPRC6A の遺伝子発現の抑制は分泌小胞の密度に関係なく、小胞の形成過程に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(C) siRNA による GPRC6A の発現抑制により、L-オルニチン投与時の tPA-GFP 分泌は阻害された。データは、各種条件における 5 回の試行の平均値と標準誤差で示した。

\*\*は、有意差  $p < 0.01$  を示す。

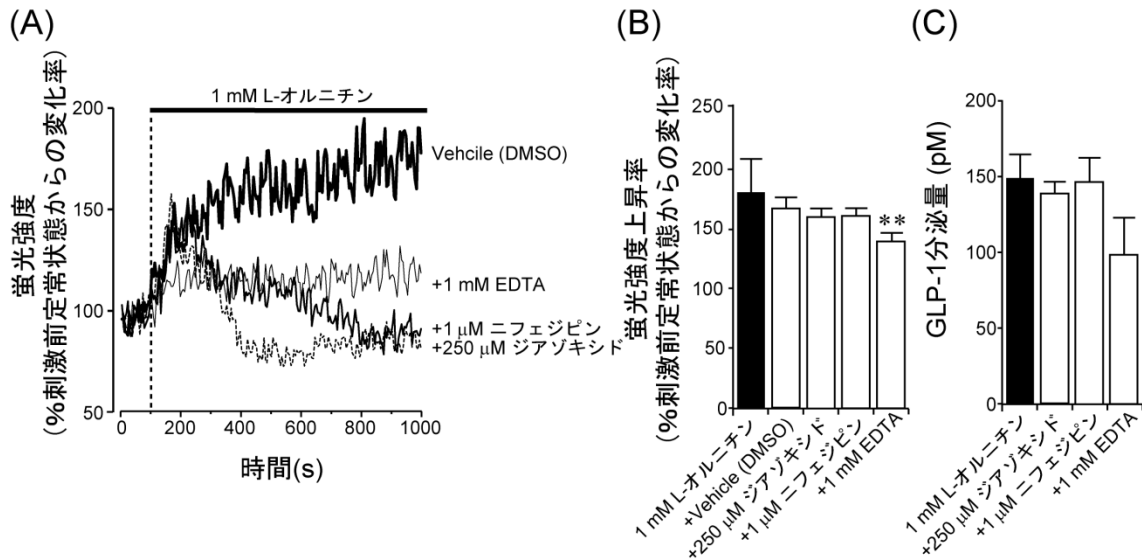


図 2-18.  $K_{ATP}$  チャンネル開口剤および  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤共投与時の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変化および GLP-1 分泌

- (A) 撮影開始 100 秒後から 1 mM L-オルニチンおよび阻害剤の投与を開始した (太線)。 $K_{ATP}$  チャンネル開口剤および  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤を共投与すると、一過的な上昇のちに蛍光強度の減少が観察された。
- (B) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率は、細胞外  $Ca^{2+}$  のキレート剤の存在下で減少した。データは、各種条件における 7 細胞の平均値と標準誤差で示した。\*\*は、有意差  $p < 0.01$  を示す。
- (C)  $K_{ATP}$  チャンネル開口剤および  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤の共投与により、L-オルニチンによる GLP-1 分泌は抑制されなかった。その一方、細胞外  $Ca^{2+}$  のキレート剤の存在下で、L-オルニチンによる GLP-1 分泌は抑制された。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。

ら阻害剤投与による、L-オルニチン依存性 GLP-1 分泌に及ぼす影響を検証したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの観察結果と同様に、EDTA の共投与は L-オルニチン依存的な GLP-1 分泌を阻害する一方で、ジアゾキシドおよびニフェジピンの共投与は GLP-1 分泌に影響を及ぼさなかった (図 2-18C)。

先行研究において、グルタミン投与により GLUTag 細胞内の cAMP 上昇がおり、それにより GLP-1 分泌が起こることが報告されている (83, 84)。この結果は、アミノ酸を感知する Gs タンパク共役型の受容体が GLUTag 細胞において発現していることを示唆している。そこで本研究において、L-オルニチンが cAMP を介して GLP-1 分泌を促進する可能性について検証した。アデニル酸シクラーゼの阻害剤である 2',3'-dideoxyadenosine (DDA) を L-オルニチンと共投与した際の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化と GLP-1 分泌量に及ぼす影響を検証したところ、L-オルニチン投与時に起こる  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇および GLP-1 分泌に影響は及ぼさなかった (図 2-19)。



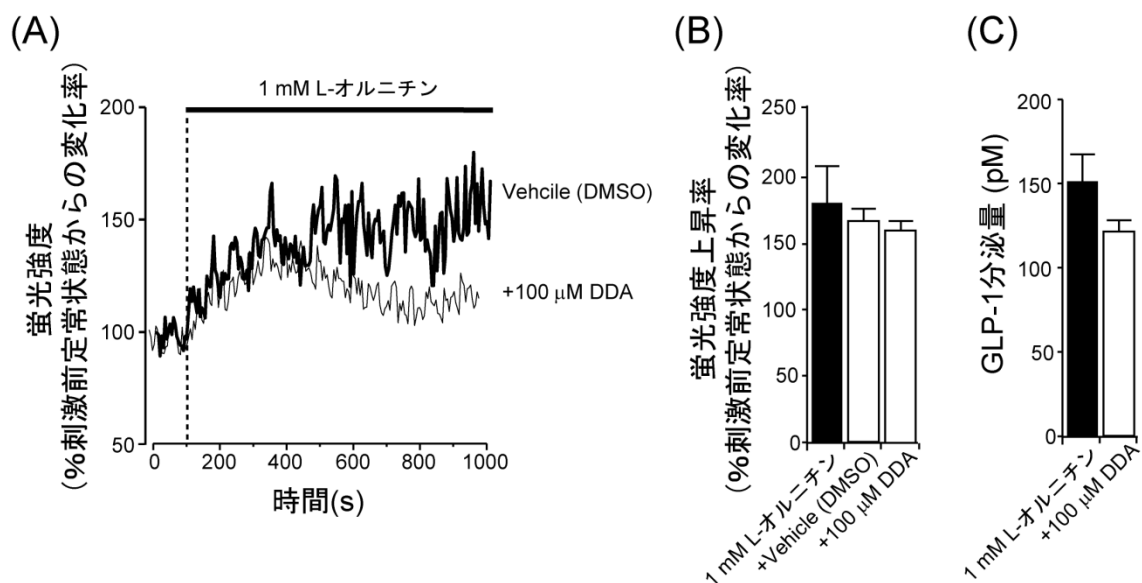


図 2-19. アデニル酸シクラーゼ阻害剤共投与時の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )変化および GLP-1 分泌

(A) 撮影開始 100 秒後から 1 mM L-オルニチンおよびアデニル酸シクラーゼ阻害剤 (DDA) の投与を開始した (太線)。L-オルニチン単独当時と同様に蛍光強度の上昇が観察された。

(B) Fluo3-AM の蛍光強度の上昇率は、L-オルニチン単独投与時と DDA の共投与時とで差はなかった。データは、各種条件における 7 細胞の平均値と標準誤差で示した。

(C) DDA の共投与により、L-オルニチンによる GLP-1 分泌は抑制されなかった。データは、各種条件における 3 回の試行の平均値と標準誤差で示した。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. 小腸内分泌 L 細胞におけるアミノ酸受容体の発現

本研究により、小腸内分泌 L 細胞株 GLUTag 細胞において、GPCR6A および CaSR が発現しており、アミノ酸を感知する受容体として機能していることを明らかにした (図 2-4)。GLUTag 細胞は、うまみ受容体を構成する Tas1R1 および Tas1R3 を発現していた。一方、GLUTag 細胞と同様に GLP-1 を分泌する STC-1 細胞においては、Tas1R1 の発現は検出できなかった。Tas1R1 は、Tas1R3 とヘテロダイマーを構成することでうまみ受容体として機能するため (87)、L 細胞においてうまみ受容体は機能していない可能性が高いと考えられる。また、Tas1R3 は Tas1R2 とヘテロダイマーを形成し、甘味受容体として機能する。先行研究において、この甘味受容体が管腔内のグルコースおよび人工甘味料を感知することによって GLP-1 を分泌するという報告がなされているが (96)、実際の機能については不明な点が多く残されている (38, 63)。

### 2-4-2. アミノ酸感受による GLP-1 分泌制御機構に関する考察

先行研究において、cAMP やミトコンドリアにおける代謝によって産生される ATP を介して、アミノ酸が GLP-1 分泌を引き起こすことが示唆されている (83, 84, 97)。しかし、本研究においてアデニル酸シクラーゼの阻害剤である DDA 共投与時も L-オルニチン投与によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇し、GLP-1 分泌が観察されたことから (図 2-19)、L-オルニチンによる GLP-1 分泌制御においては cAMP の関与は考えにくい。また、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの開口剤や電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの阻害剤共投与時も L-オルニチン投与によっておこる  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇や GLP-1 分泌は阻害されなかったことから (図 2-18)、ミトコンドリアにおける代謝には依存しない GLP-1 分泌促進機構の存在が示唆された。

本研究において、PLC および  $IP_3$  受容体の阻害剤により、L-オルニチンによる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇や GLP-1 分泌が阻害されたことから (図 2-8, 14)、L-オルニチン投与による GLP-1 分泌促進機構には Gq タンパク質を介したシグナル伝達系が関与していると考えられる。CaSR も Gq タンパク質と共役していることから (38)、CaSR を介して L-オルニチンが作用している可能性も考えられる。しかし、GPRC6A のアンタゴニストの共投与や (図 2-8, 14)、RNA 干渉による GPRC6A の発現抑制によって GLP-1 分泌が阻害されることから (図 2-15, 16, 17)、主にオルニチンは GPRC6A を介して GLP-1 分泌を促進していると考えられる。

### 2-4-3. GLP-1 の可視化解析について

GLP-1 はプログルカゴンからプロホルモンコンバーターゼによって切り出されて産生されるため (94)、蛍光タンパク質を融合して発現させることが困難である。先行研究では STC-1 細胞において、ヒト GH-GFP を強制発現させて観察が行われた (98)。本研究においても同様に GH-GFP を遺伝子導入により強制発現させて観察を行ったが、GH-GFP は顆粒状に発現しなかった (図 2-11)。観察に用いた細胞が GLUTag 細胞という先行研究と異なる細胞であったことや、ヒトではなくラット GH-GFP を用いたことによって、研究結果に異なりが見られた可能性がある。そこで、本研究では tPA-GFP、NPY-Venus、および BDNF-Venus を遺伝子導入により強制発現させた GLUTag 細胞を抗 GLP-1 抗体により免疫染色し、内在性 GLP-1 との局在比較を行った (図 2-10, 11、表 2)。そのなかでも、最も共局在率の高かった tPA-GFP を GLP-1 分泌の指標として用いることとした。

免疫染色の結果、tPA-GFP は内在性の GLP-1 と最も高い共局在率を示したが、局在が完全に一致することはなかった。その原因として、GLUTag 細胞には GLP-1 以外にもニューロテンシン、コレシストキニンおよびソマトスタチンなど他のホルモンが発現していることが分かっており (99)、tPA-GFP は GLP-1 以外のホルモンを含む分泌小胞にも貯蔵されて

いる可能性が考えられる。また、tPA-GFP を強制発現させたことによって、本来 GLP-1 を貯蔵する分泌小胞が tPA-GFP のみを貯蔵し、GLP-1 を貯蔵することができなかった可能性も考えられる。

tPA-GFP の分泌回数と ELISA によって測定された GLP-1 分泌量との間において、分泌反応の傾向に異なりが見られた原因は、tPA-GFP の分泌回数は 1 細胞での観察結果であるのに対し、ELISA においては  $10^6$  個以上の細胞からの GLP-1 分泌量を測定したものであるため、母集団数の差による影響を受けている可能性が考えられる。

また、tPA は細胞外基質を分解するプラスミンを生成するはたらきを持つ。そのため、tPA-GFP は開口放出反応後、細胞膜上の何らかのタンパク質に結合した可能性が考えられる。蛍光分光光度計によって測定した tPA-GFP の分泌量と ELISA によって測定した GLP-1 分泌量の測定結果に差が見られた原因は、tPA-GFP の一部が細胞膜上に留まってしまい、開口放出反応を起こした分泌小胞中の tPA-GFP が記録用溶液中にすべて分泌されず、蛍光分光光度計によって検出できていない可能性が考えられる。

#### 2-4-4. 初代培養 L 細胞に関する考察

小腸内分泌 L 細胞は、小腸を構成する細胞の数%ほどしか存在しないため、単離精製し初代培養することが困難である。そこで GLP-1 分泌能を持つ、マウス由来腫瘍細胞株 GLUTag 細胞や STC-1 細胞が *in vitro* での研究において広く使用されている。本研究ではこれらの細胞だけでなく、GLP-1 プロモーター下で蛍光タンパク質 Venus を発現するトランスジェニックマウスの小腸からセルソーターを用いて単離精製した初代培養 L 細胞も用いた。遺伝子解析の結果、初代培養 L 細胞において GPRC6A が発現していることを見出した (図 2-4B)。その一方で、小腸初代培養細胞においては L-オルニチンを投与しても GLP-1 分泌の増加は観察されず、GPRC6A の阻害剤であるカリンドールの投与によってその分泌量が増加した

(図 2-20)。カリンドールは GPRC6A のアンタゴニストである一方、CaSR のアゴニストであるとの報告もある (91)。初代培養 L 細胞では、GPRC6A よりも CaSR が多く発現しているため、カリンドールが CaSR を活性化することで GLP-1 分泌を促進した可能性が考えられる。

#### 2-4-5. *in vivo* での GPRC6A の機能について

近年、骨芽細胞から分泌されるホルモンと考えられているオステオカルシンが GPRC6A のリガンドの1つである可能性が報告された (100)。このオステオカルシンをマウスに経口投与すると、大部分 (約99%) は加水分解されるが、小腸管腔まで到達したオステオカルシンは24時間程度管腔内に留まり、血中インスリン濃度およびGLP-1濃度を上昇させる (101)。

また、GPRC6A欠損マウスにおいてメタボリックシンドローム様の病態が引き起こされ、血中のインスリン濃度が低下するとの報告もあることから (73)、*in vivo*においてオステオカルシンが、GPRC6Aを介してGLP-1分泌を調節している可能性が考えられる。しかし、グルコース耐性やインスリンの血中濃度に異常が見られないとの報告もあるため (102)、*in vivo*におけるオステオカルシンとGPRC6Aの生理機能についてさらなる検証が必要である。

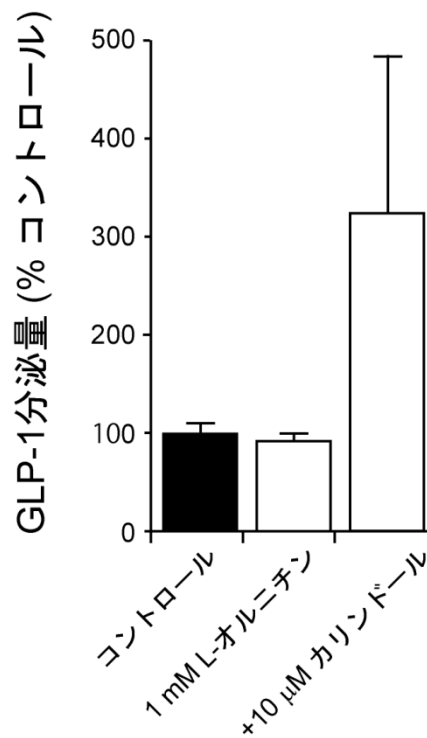


図 2-20. 初代培養 L 細胞における L-オルニチンおよび阻害剤共投与時の GLP-1 分泌量の測定

セルソーターによって単離した初代培養 L 細胞を用いて、1 mM L-オルニチン投与時の GLP-1 分泌量を ELISA によって測定した。分泌量はコントロールと差がなかった。GPRC6A 阻害剤の共投与によって GLP-1 分泌量が増加した。データは、各種条件における 6 回以上の試行の平均値と標準誤差で示した。

### 第3章 総合統括

本研究では、小腸内分泌L細胞において、L-アミノ酸感受性受容体（G protein-coupled receptor, family C, group 6, subtype A: GPRC6A）が発現していることを初めて見出した。そして、GPRC6Aに共役するGqタンパク質を介したシグナル伝達によって、L-オルニチンをはじめとするアミノ酸がGLP-1分泌を促進することを明らかにした（図3-1）。本章では最新の知見に基づき、本研究成果の生理的意義について検証する。

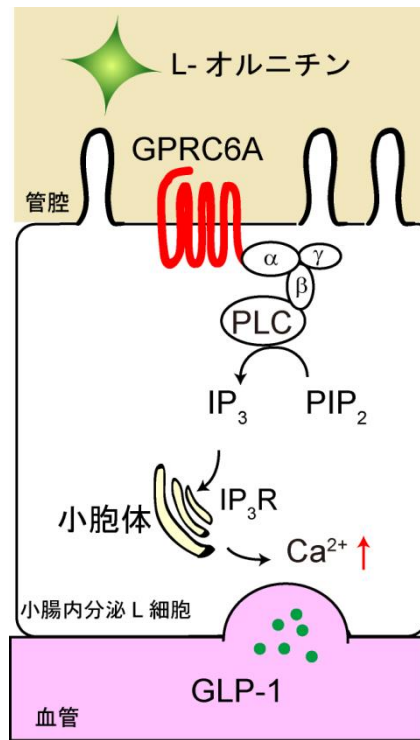


図 3-1. 小腸内分泌 L 細胞における GPRC6A を介したアミノ酸感受機構

小腸内分泌 L 細胞に発現する GPRC6A は共役する Gq タンパク質を介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化し、イノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) を産生する。IP<sub>3</sub> は小胞体上の IP<sub>3</sub> 受容体 (IP<sub>3</sub>R) を介して Ca<sup>2+</sup> を放出させる。細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇によって GLP-1 が分泌される。

### 3-1. 消化管における栄養素感受機構

栄養素感受機構に関する研究は、舌の味蕾を構成する味覚細胞において行われてきた。五大基本味として、甘味、うま味、苦味、塩味および酸味が現在知られている。塩味および酸味の感受はイオンを介して行われるのに対し、甘味、うま味および苦味は食餌中に含まれる化学物質を各々の受容体が感知することによって味覚情報が脳へ伝達される。甘味は甘味受容体 (taste receptor type 1 member 2: Tas1R2 と member 3: Tas1R3 のヘテロダイマー) を介して (103)、うま味はうま味受容体 (taste receptor type 1 member 1: Tas1R1 と Tas1R3 のヘテロダイマー) を介して受容される (87)。苦味は苦味受容体 (taste receptor type 2: Tas2R) によって感受される (104)。ヒトにおいては 25 種の Tas2R が存在し、1 つの物質を特異的に感受するものと、数種の苦味物質を広く感受するものが存在する (105)。

近年、五大基本味以外にも味が存在するという説が唱えられている。2012 年に江藤譲らが、カルシウム感受性受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) が舌の味覚細胞に発現しており、“コク味”の受容体であることを発見した (106)。CaSR は $\gamma$ -グルタミルペプチドを感知することで、甘味、うま味および塩味を増強する。また、中および長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR40 (free fatty acid receptor 1: FFAR1)、長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR120 が味覚細胞に発現しており、“あぶら味”を感知している可能性が示唆されている (107)。

以上のように、舌の味覚細胞における栄養素感受機構に関する研究が進むにつれ、舌と同様に栄養素の濃度変化を感知する、消化管における栄養素感受機構の解析が盛んに行われるようになった。現在明らかになっている、消化管における味覚受容体の発現については、次のとおりである (図 3-2)。

食欲を促進するホルモンであるグレリンを分泌する胃内分泌 X/A 様細胞において、Tas1R3 (108) および Tas2R (109) の発現が確認されている。胃酸分泌を促進するガストリンを分泌する胃内分泌 G 細胞およびソマトスタチンを分泌する胃内分泌 D 細胞において、



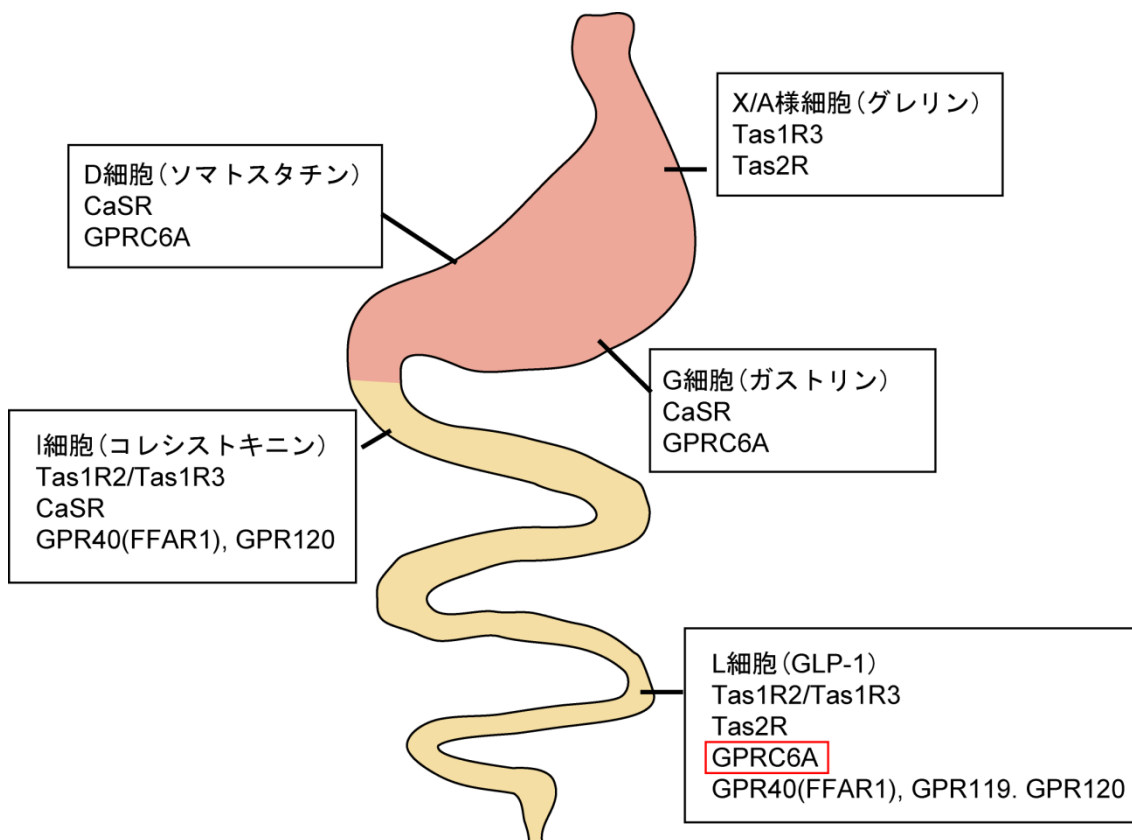


図 3-2. 消化管における栄養素感受機構

グレリンを分泌する胃内分泌X/A様細胞においては味覚受容体T1Rファミリーメンバー3 (Tas1R3) と苦味受容体 (Tas2R) が発現している。ソマトスタチンを分泌する胃内分泌D細胞とガストリンを分泌する胃内分泌G細胞にはカルシウム感受性受容体 (CaSR) とL-アミノ酸感受性受容体 (GPRC6A) が発現している。コレシストキニンを分泌する小腸内分泌I細胞には甘味受容体 (Tas1R2/Tas1R3) およびCaSR、脂肪酸受容体のGPR40、GPR120が発現している。グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) を分泌する小腸内分泌L細胞には甘味受容体 (Tas1R2/Tas1R3)、Tas2R、GPRC6A、脂肪酸受容体のGPR40、GPR119、GPR120が発現している。

アミノ酸受容体である CaSR および GPRC6A が発現している (75)。胆汁の分泌を促進するホルモンである、コレシストキニンを分泌する小腸内分泌 I 細胞には、アミノ酸受容体である CaSR (110) およびうまみ受容体 (Tas1R1 と Tas1R3 のヘテロダイマー) (111)、脂肪酸の受容体である GPR40 (FFAR1) (112) および GPR120 (113) が発現している。

本研究で焦点をあてた、グルカゴン様ペプチド 1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) を産生する小腸内分泌 L 細胞は甘味受容体 (Tas1R2 と Tas1R3 のヘテロダイマー) (66)、脂肪酸の受容体である GPR40 (FFAR1)、GPR119 および GPR120 (67)、苦味受容体 (114) を発現していることが明らかとなっており、今回新たにアミノ酸受容体である GPRC6A の発現を見出した。

### 3-2. GLP-1 分泌制御機構に関する最新の知見

小腸内分泌L細胞におけるGLP-1分泌制御は、前述のとおり栄養素によるものと、神経伝達物質や他のホルモンを介したものがある (図3-3)。

ナトリウム依存性グルコーストランスポーター (sodium dependent glucose transporter 1: SGLT-1) を介してグルコースが細胞内に取り込まれて代謝されると、ATP感受性K<sup>+</sup>チャネル (K<sub>ATP</sub> チャネル) の開口を引き起こし、GLP-1分泌を促進する (63)。その一方で、甘味受容体 (Tas1R2とTas1R3のヘテロダイマー) のGLP-1分泌への関与も示唆されている (66)。脂質に関しては、中および長鎖脂肪酸をリガンドとするGPR40 (FFAR1)、長鎖脂肪酸をリガンドとするGPR120はGqタンパク質を介して、不飽和長鎖脂肪酸をリガンドとするGPR119はGsタンパク質を介してGLP-1分泌を制御していることが明らかにされている (67)。短鎖脂肪酸 (short chain fatty acid: SCFA) はGq タンパク質と共役するGPR43 (free fatty acid receptor 2: FFAR2) に感知されてGLP-1分泌を促進する (115)。

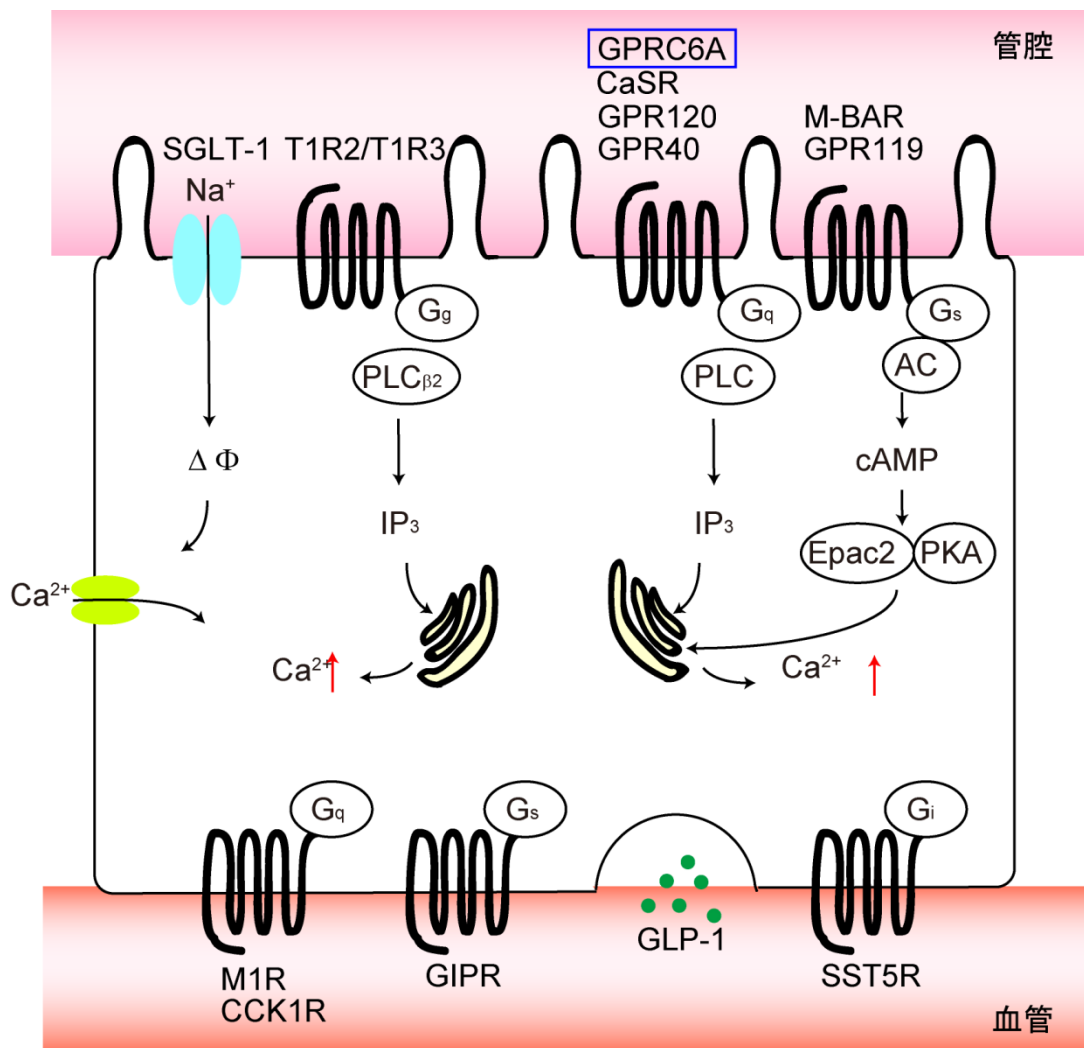


図 3-3. 小腸内分泌 L 細胞における GLP-1 分泌制御機構

グルコースはナトリウム依存性グルコーストランスポーター (SGLT-1) を介して取り込まれる。甘味受容体 (Tas1R2/Tas1R3) は $\alpha$ -gustducin を介してグルコースを感受する。脂肪酸受容体 GPR40 (FFAR1)、GPR120 およびカルシウム感受性受容体 (CaSR) と L-アミノ酸感受性受容体 (GPCR66A) は Gq タンパク質と共役しており、それぞれ脂肪酸とアミノ酸を感受する。脂肪酸受容体 GPR119 および胆汁酸受容体 (M-BAR) は Gs タンパク質と共役しており、それぞれ脂肪酸と胆汁酸を感受する。

ムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 サブタイプ (M1R) および 1 型コレシストキニン受容体 (CCK1) は Gq タンパク質と共役しており、それぞれアセチルコリンとコレシストキニンを感受する。グルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド (GIP) は Gs タンパク質と共役する GIP 受容体 (GIPR) に感受される。ソマトスタチンは Gi タンパク質と共役する 5 型ソマトスタチン受容体 (SST5R) に感受される。

アミノ酸については、グルタミンが GLP-1 分泌を促進することが明らかとなっているが、その詳細な制御機構は不明である。グルタミンがナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーター (sodium-dependent neutral amino acid transporter-2: SNAT2) を介して細胞内に取り込まれる際に、共輸送されるナトリウムイオンが細胞膜の脱分極を引き起こし、GLP-1 分泌を促進すると考えられる (83)。その一方で、グルタミン投与により細胞内サイクリック AMP 濃度 ( $[cAMP]_i$ ) が上昇することから、未知の Gs タンパク質共役型グルタミン受容体の存在が示唆される (84)。また、Gq タンパク質と共役する CaSR が小腸内分泌 L 細胞に発現しており、L-フェニルアラニンが GLP-1 分泌を促進することが報告された (38)。本研究によって、GPCR6A を介して L-オルニチンが GLP-1 分泌を促進することを新たに見出した。

近年、胆汁に含まれる胆汁酸が Gs タンパク質と共役する胆汁酸受容体 (membrane bile acid receptor: M-BAR または GPBAR1) を介して GLP-1 分泌を促進することが明らかとなった (116, 117)。また、小腸内分泌 D 細胞から分泌されるソマトスタチンは Gi タンパク質と共役する 5 型ソマトスタチン受容体 (somatostatin receptor 5: SST5R) を介して GLP-1 分泌を抑制する (118)。小腸内分泌 K 細胞から分泌されるグルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド (glucose-dependent insulintropic polypeptide: GIP) は Gs タンパク質と共役する GIP 受容体 (GIP receptor: GIPR) を介して (119)、コレシストキニン は Gq タンパク質と共役する 1 型コレシストキニン受容体 (cholecystokinin-1 receptor: CCK1R) を介して (120) GLP-1 分泌を促進する。

一方で、神経伝達物質も GLP-1 分泌を制御する。アセチルコリンは、Gq タンパク質共役型のムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 サブタイプ (Muscarinic acetylcholine receptor M1: M1R) を介して GLP-1 分泌を促進する (60)。

以上のように、GLP-1 はさまざまな因子によって分泌が制御されており、今後も新たな分泌制御機構の発見が期待される。

### 3-3. GLP-1 の生理機能

GLP-1 は、膵β細胞に発現する GLP-1 受容体を介してインスリン分泌を増強する。その一方で、近年 GLP-1 の新たな生理機能が明らかとなっている。

GLP-1 が膵β細胞の GLP-1 受容体に感知されると、[cAMP]<sub>i</sub> が上昇し、プロテインキナーゼ A (protein kinase A: PKA) が活性化され、シグナル伝達の下流にある膵臓特異的ホメオボックスタンパク質 1 (pancreatic duodenal homeobox 1: PDX-1) を介して膵β細胞の増殖を促進する (121)。その一方で、[cAMP]<sub>i</sub> の上昇により PI3 キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase: PI3-K) が活性化されるとセリン/スレオニンキナーゼである Akt のリン酸化を介して膵β細胞のアポトーシスを抑制し (122)、全体として膵β細胞の細胞量を増加させる。

また、GLP-1 は膵α細胞からのグルカゴン分泌を抑制する。膵α細胞には GLP-1 受容体は発現しておらず (123)、GLP-1 は膵δ細胞から分泌されるソマトスタチンを介してグルカゴン分泌を抑制すると考えられる。具体的には、GLP-1 が膵δ細胞の受容体にはたらきかけ、ソマトスタチンの分泌を促進する。ソマトスタチンは膵α細胞に発現する 2 型ソマトスタチン受容体 (somatostatin receptor 2: SST2R) を介してグルカゴンの分泌を抑制する (52)。

中枢神経への作用としては、側坐核および腹側視蓋野の神経細胞に発現する受容体を介して GLP-1 が食欲を抑制することが分かっている (13)。また、小腸だけでなく中枢神経においても GLP-1 は産生されている。延髄孤束核には GLP-1 産生ニューロンが存在し、延髄網様体、迷走神経運動角、視床、視床下部の弓状核、室傍核、背内側核などに投射している (124)。その中でも、孤束核から視床下部室傍核および弓状核へ投射している GLP-1 産生ニューロンが、摂食抑制に関与すると考えられている (125, 126)。

また、GLP-1 は骨代謝も制御する。骨代謝は骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収によって骨量を調節しており、そのバランスが破綻すると骨粗鬆症を発症する。GLP-1 受容体ノックアウトマウスにおいて、骨密度の減少が清野裕らによって報告された (127)。

骨芽細胞には GLP-1 受容体が存在しないが、骨吸収を抑制するホルモン、カルシトニンを分泌する甲状腺 C 細胞において GLP-1 受容体が発現している (128)。GLP-1 は甲状腺 C 細胞にはたらきかけ、カルシトニン分泌を促進することで骨吸収を抑制していると考えられる (127)。上述のとおり、GLP-1 は生体の恒常性の維持に、様々なかたちで関与している。

### 3-4. GPRC6A の生理機能

GPRC6A は膵β細胞、脂肪細胞、骨格筋、肝臓、精巣、下垂体前葉において発現しており (図 3-4) (129)、様々な生理機能をもつ。マウスの精巣ライディッヒ細胞特異的に GPRC6A を欠損させると、血中のテストステロン濃度減少と、精巣の縮小が観察された (73)。この結果から、精巣に発現する GPRC6A を介してテストステロン分泌が制御されている可能性が示唆された。また、Christoffer Clemmensen らは GPRC6A のノックアウトマウスにおいて、自発運動による酸素消費量が野生型に比べて減少することを見出した (130)。近年の研究で、報酬行動やエネルギー代謝に関与する視床下部オレキシン産生ニューロンが、アミノ酸投与によって活性化されることが明らかとなった (131)。これらの結果から、アミノ酸受容体である GPRC6A を介して、自発運動量が調節されている可能性が考えられる。

以上の研究から、生体内の様々な臓器に発現する GPRC6A が、生体内の恒常性維持 (血糖値制御、生殖機能の調節、運動量制御など) に関与する可能性が考えられる。

### 3-5. 本研究を通しての所感

本研究では、小腸内分泌 L 細胞における GPRC6A を介した GLP-1 分泌制御機構を解明した。GPRC6A と GLP-1 はそれぞれ受容体とホルモンという異なる機能を持つものであるが、

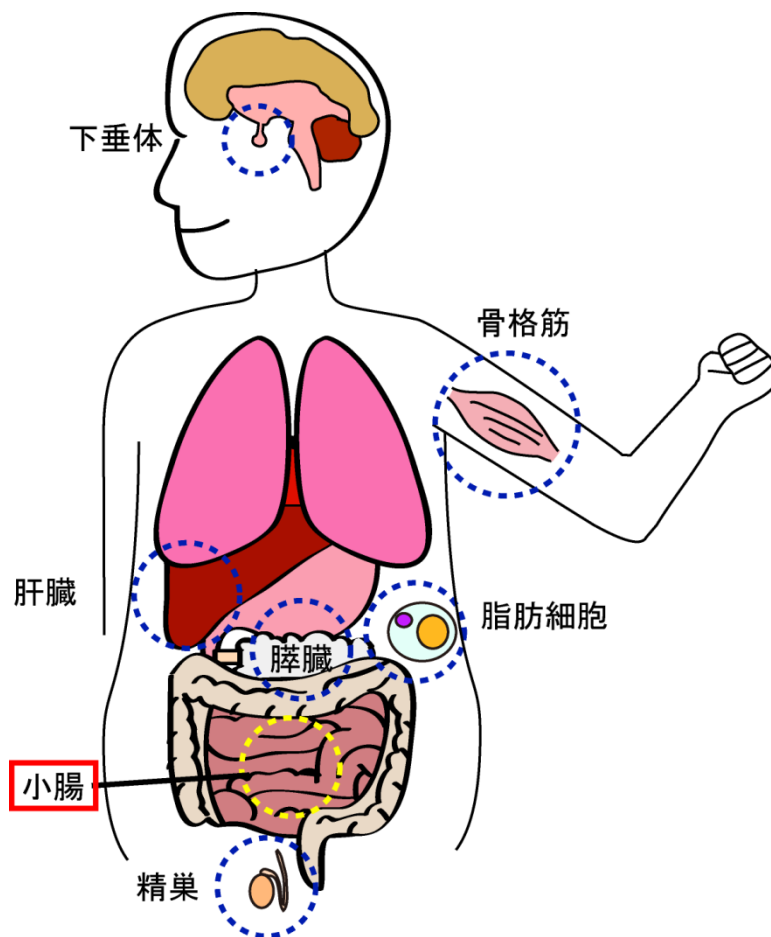


図 3-4. 生体における GPRC6A の局在

これまで、生体内では下垂体、骨格筋、肝臓、膵臓、脂肪細胞、精巣に GPRC6A が発現していることが分かっていた。本研究で新たに小腸内分泌 L 細胞に GPRC6A が発現していることが見出された。

共通することは、中枢神経と末梢組織、両方において様々な生理機能を持ち、生体の恒常性維持に寄与していることである。

わたしたちは、生体機能の多くが神経系によって制御されていると考えがちである。なぜならば、外部環境の変化を脳が感知し、神経を介して末端組織へ情報を伝達するということは、感覚を通じて理解しやすいからである。しかし、その一方で我々の意識にのぼることはなくても、生体内の末端組織が多くの生体機能を担っており、ホルモンを介して各組織に情報を伝達している。特に消化管は食事によって外部から摂取した栄養素の濃度変化を感知し、それに応答してホルモンを分泌することによって、生体の恒常性を維持している。

本研究は、GLP-1 分泌の新たな制御機構を明らかにしただけではなく、その他の消化管内分泌細胞にアミノ酸感知機構が存在する可能性を提唱した。今後の研究によって、アミノ酸受容体を介した新たな生体恒常性維持機構が解明されることが期待される。



## 参考文献

1. 石田三雄. (2012) ホルモンハンター: アドレナリンの発見. 京都大学学術出版会
2. Bordeu, T. D. (1775) Recherches sur les maladies chroniques. *Oeuvres Completes* **2**
3. Berthold, A. A. (1849) Transplantation der Hoden. *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicine* **16**, 42-46
4. Vulpian, E. F. A. (1856) Note sur quelques réactions propres à la substance des capsules surrénales. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **43**, 663-665
5. Brown-Séquard, C. E. (1889) Des effets produits chez l'homme par des injections d'un liquide retiré des testicules frais de cobaye et de chien. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie* **9**, 415-419
6. Bayliss, W. M., and Starling, E. H. (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of Physiology (London)* **28**, 325-353
7. Starling, E. H. (1905) The Croonian lectures: On the chemical correlations of the functions of the body. *Lecture I. Lancet*, 339-341
8. 日本比較内分泌学会. (1988) ホルモンハンドブック. 南江堂
9. Koshimizu, T. A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., and Tanoue, A. (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological Reviews* **92**, 1813-1864
10. Garrison, J. L., Macosko, E. Z., Bernstein, S., Pokala, N., Albrecht, D. R., and Bargmann, C. I. (2012) Oxytocin/vasopressin-related peptides have an ancient role in reproductive behavior. *Science* **338**, 540-543
11. 川島誠一郎. (1995) 動物のホルモン (生命科学シリーズ). 裳華房
12. Gautier, J. F., Fetita, S., Sobngwi, E., and Salaun-Martin, C. (2005) Biological actions of the

incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes.

*Diabetes & Metabolism* **31**, 233-242

13. Alhadeff, A. L., Rupprecht, L. E., and Hayes, M. R. (2012) GLP-1 neurons in the nucleus of the solitary tract project directly to the ventral tegmental area and nucleus accumbens to control for food intake. *Endocrinology* **153**, 647-658
14. Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., and Bonner-Weir, S. (1999) Exendin-4 stimulates both  $\beta$ -cell replication and neogenesis, resulting in increased  $\beta$ -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* **48**, 2270-2276
15. Von Mering, J., Minkowski, O. (1890) Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **26**, 371-387
16. Wrenshall, G. A., and Marcus, A. (1962) The story of insulin; forty years of success against diabetes, *Bodley Head*
17. Harris, J. I., Naughton, M. A., and Sanger, F. (1956) Species differences in insulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **65**, 427-438
18. Steiner, D. F., Rouille, Y., Gong, Q., Martin, S., Carroll, R., and Chan, S. J. (1996) The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes & Metabolism* **22**, 94-104
19. Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H., and Pipeleers, D. G. (2001) Glucose sensing in pancreatic  $\beta$ -cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* **50**, 1-11
20. Hermans, M. P., Schmeer, W., and Henquin, J. C. (1987) Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. *Endocrinology* **120**, 1765-1773
21. Porte, D., Jr., and Williams, R. H. (1966) Inhibition of insulin release by norepinephrine in

- man. *Science* **152**, 1248-1250
22. Pierluissi, J., Pierluissi, R., and Ashcroft, S. J. (1980) Effects of growth hormone on insulin release in the rat. *Diabetologia* **19**, 391-396
  23. Unger, R. H., Ketterer, H., Dupre, J., and Eisentraut, A. M. (1967) The effects of secretin, pancreozymin, and gastrin on insulin and glucagon secretion in anesthetized dogs. *The Journal of Clinical Investigation* **46**, 630-645
  24. Lerner, R. L., and Porte, D., Jr. (1972) Studies of secretin-stimulated insulin responses in man. *The Journal of Clinical Investigation* **51**, 2205-2210
  25. Strowski, M. Z., Parmar, R. M., Blake, A. D., and Schaeffer, J. M. (2000) Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* **141**, 111-117
  26. Dean, P. M., and Matthews, E. K. (1968) Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**, 389-390
  27. Cook, D. L., and Hales, C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* **311**, 271-273
  28. Rajan, A. S., Aguilar-Bryan, L., Nelson, D. A., Yaney, G. C., Hsu, W. H., Kunze, D. L., and Boyd, A. E., 3rd. (1990) Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care* **13**, 340-363
  29. 清野進. (1991) 糖尿病の分子生物学 実験医学 増刊. 羊土社 **9**, 28-35
  30. Floyd, J. C., Jr., Fajans, S. S., Conn, J. W., Knopf, R. F., and Rull, J. (1966) Stimulation of insulin secretion by amino acids. *The Journal of Clinical Investigation* **45**, 1487-1502
  31. van Loon, L. J., Kruijshoop, M., Menheere, P. P., Wagenmakers, A. J., Saris, W. H., and Keizer, H. A. (2003) Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 625-630
  32. Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K.,

- Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., and Fujino, M. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40. *Nature* **422**, 173-176
33. Edkins, J. S. (1906) The chemical mechanism of gastric secretion. *The Journal of Physiology (London)* **34**, 133-144
34. Ivy, A. C., and Oldberg, E. (1928) A hormone mechanism for gall-bladder contraction and evacuation. *American Journal of Physiology* **86**, 599-613
35. 藤田恒夫. (1991) 腸は考える. 岩波新書
36. Moore, B. (1906) On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochemical Journal* **1**, 28-38
37. La barre, J. M. (1932) Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bulletin de l'Académie Royale de Médecine de Belgique* **12**, 620-634
38. Mace, O. J., Schindler, M., and Patel, S. (2012) The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *The Journal of Physiology (London)* **590**, 2917-2936
39. Ford, B. J. (1986) シングル・レンズ-単式顕微鏡の歴史. 法政大学出版局
40. 阿部勝行. (2009) 特集 裾野が広がる共焦点顕微鏡 総論：共焦点顕微鏡の概要. *O plus E* **31**
41. Steyer, J. A., and Almers, W. (2001) A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 268-275
42. 小林剛. (2006) 染色・バイオイメージング実験ハンドブック. 羊土社
43. 徳永万喜洋. (2003) バイオイメージングでここまで理解る. 羊土社
44. Vale, R. D., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y., and Yanagida, T. (1996)

- Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380**, 451-453
45. Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H., and Yanagida, T. (1998) Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* **92**, 161-171
  46. Zenisek, D., Steyer, J. A., and Almers, W. (2000) Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* **406**, 849-854
  47. Tsuboi, T., Zhao, C., Terakawa, S., and Rutter, G. A. (2000) Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event. *Current Biology* **10**, 1307-1310
  48. Minamino, N., Sudoh, T., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1985) Neuromedins: novel smooth-muscle stimulating peptides identified in porcine spinal cord. *Peptides* **6**, 245-248
  49. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415
  50. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., and Yanagisawa, M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573-585
  51. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660
  52. de Heer, J., Rasmussen, C., Coy, D. H., and Holst, J. J. (2008) Glucagon-like peptide-1, but

- not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia* **51**, 2263-2270
53. Turton, M. D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P., Smith, D. M., Ghatei, M. A., Herbert, J., and Bloom, S. R. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* **379**, 69-72
54. Zhao, T., Parikh, P., Bhashyam, S., Bolukoglu, H., Poornima, I., Shen, Y. T., and Shannon, R. P. (2006) Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **317**, 1106-1113
55. Baggio, L. L., and Drucker, D. J. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131-2157
56. Takemura, J., Seino, Y., Tsuda, K., Seino, S., Ikeda, M., Sakurai, H., and Imura, H. (1981) Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide induced by glucose ingestion in diabetes mellitus. *Endocrinologia Japonica* **28**, 17-21
57. Vilsboll, T., Krarup, T., Madsbad, S., and Holst, J. J. (2002) Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* **45**, 1111-1119
58. Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., and Holst, J. J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* **44**, 1126-1131
59. Roberge, J. N., and Brubaker, P. L. (1991) Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology* **128**, 3169-3174

60. Anini, Y., Hansotia, T., and Brubaker, P. L. (2002) Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* **143**, 2420-2426
61. Brubaker, P. L. (1991) Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology* **128**, 3175-3182
62. Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M., and Leiter, A. B. (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* **145**, 2639-2644
63. Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G., Parker, H. E., Rogers, G. J., and Gribble, F. M. (2008) Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metabolism* **8**, 532-539
64. Reimann, F., Tolhurst, G., and Gribble, F. M. (2012) G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation. *Cell Metabolism* **15**, 421-431
65. Ritzel, U., Fromme, A., Otleben, M., Leonhardt, U., and Ramadori, G. (1997) Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetologica* **34**, 18-21
66. Margolskee, R. F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K. S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E. L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., and Shirazi-Beechey, S. P. (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15075-15080
67. Janssen, S., and Depoortere, I. (2013) Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **24**, 92-100
68. Conigrave, A. D., Mun, H. C., and Lok, H. C. (2007) Aromatic L-amino acids activate the calcium-sensing receptor. *The Journal of Nutrition* **137**, 1524-1527
69. Wellendorph, P., Johansen, L. D., and Brauner-Osborne, H. (2009) Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Molecular*

*Pharmacology* **76**, 453-465

70. Ray, J. M., Squires, P. E., Curtis, S. B., Meloche, M. R., and Buchan, A. M. (1997) Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cells in culture. *The Journal of Clinical Investigation* **99**, 2328-2333
71. Conigrave, A. D., and Brown, E. M. (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract. II. L-amino acid sensing by calcium-sensing receptors: implications for GI physiology. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **291**, 753-761
72. Liou, A. P., Sei, Y., Zhao, X., Feng, J., Lu, X., Thomas, C., Pechhold, S., Raybould, H. E., and Wank, S. A. (2011) The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **300**, 538-546
73. Pi, M., Chen, L., Huang, M. Z., Zhu, W., Ringhofer, B., Luo, J., Christenson, L., Li, B., Zhang, J., Jackson, P. D., Faber, P., Brunden, K. R., Harrington, J. J., and Quarles, L. D. (2008) GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One* **3**, e3858
74. Pi, M., Wu, Y., Lenchik, N. I., Gerling, I., and Quarles, L. D. (2012) GPRC6A mediates the effects of L-arginine on insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* **153**, 4608-4615
75. Haid, D., Widmayer, P., and Breer, H. (2011) Nutrient sensing receptors in gastric endocrine cells. *Journal of Molecular Histology* **42**, 355-364
76. Rozengurt, E., and Sternini, C. (2007) Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Current Opinion in Pharmacology* **7**, 557-562
77. Oya, M., Suzuki, H., Watanabe, Y., Sato, M., and Tsuboi, T. (2011) Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6 cells. *Genes to Cells* **16**,



608-616

78. Singer, D., Camargo, S. M., Ramadan, T., Schafer, M., Mariotta, L., Herzog, B., Huggel, K., Wolfer, D., Werner, S., Penninger, J. M., and Verrey, F. (2012) Defective intestinal amino acid absorption in *Ace2* null mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **303**, 686-695
79. Lochner, J. E., Honigman, L. S., Grant, W. F., Gessford, S. K., Hansen, A. B., Silverman, M. A., and Scalettar, B. A. (2006) Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *Journal of Neurobiology* **66**, 564-577
80. Aoki, R., Kitaguchi, T., Oya, M., Yanagihara, Y., Sato, M., Miyawaki, A., and Tsuboi, T. (2010) Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *Biochemical Journal* **429**, 497-504
81. Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology* **20**, 87-90
82. Kawashima, R., Ikematsu, K., Abe, Y., Sato, M., Tsuruya, S., Nakasono, I., Fukushima, H., Inoue, K., and Tsuboi, T. (2010) Effect of glucocorticoid on the biosynthesis of growth hormone-containing secretory granules in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **400**, 225-229
83. Reimann, F., Williams, L., da Silva Xavier, G., Rutter, G. A., and Gribble, F. M. (2004) Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia* **47**, 1592-1601
84. Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H. E., Habib, A. M., Reimann, F., and Gribble, F. M. (2011) Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic

Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Endocrinology* **152**, 405-413

85. Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J., and Hebert, S. C. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580
86. Wellendorph, P., and Brauner-Osborne, H. (2004) Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. *Gene* **335**, 37-46
87. Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**, 199-202
88. Wellendorph, P., and Brauner-Osborne, H. (2009) Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* **156**, 869-884
89. Christiansen, B., Hansen, K. B., Wellendorph, P., and Brauner-Osborne, H. (2007) Pharmacological characterization of mouse GPRC6A, an L- $\alpha$ -amino-acid receptor modulated by divalent cations. *British Journal of Pharmacology* **150**, 798-807
90. Wellendorph, P., Hansen, K. B., Balsgaard, A., Greenwood, J. R., Egebjerg, J., and Brauner-Osborne, H. (2005) Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-  $\alpha$  -amino acid receptor with preference for basic amino acids. *Molecular Pharmacology* **67**, 589-597
91. Faure, H., Gorjankina, T., Rice, N., Dauban, P., Dodd, R. H., Brauner-Osborne, H., Rognan, D., and Ruat, M. (2009) Molecular determinants of non-competitive antagonist binding to the mouse GPRC6A receptor. *Cell Calcium* **46**, 323-332
92. Sato, M., Mori, Y., Matsui, T., Aoki, R., Oya, M., Yanagihara, Y., Fukuda, M., and Tsuboi, T. (2010) Role of the polybasic sequence in the Doc2 $\alpha$  C2B domain in dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* **114**, 171-181
93. Sato, M., Kitaguchi, T., Numano, R., Ikematsu, K., Kakeyama, M., Murata, M., Sato, K.,

- and Tsuboi, T. (2012) The small GTPase Cdc42 modulates the number of exocytosis-competent dense-core vesicles in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420**, 417-421
94. Drucker, D. J. (2003) Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Molecular Endocrinology* **17**, 161-171
95. Reimann, F., and Gribble, F. M. (2002) Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* **51**, 2757-2763
96. Mace, O. J., Lister, N., Morgan, E., Shepherd, E., Affleck, J., Helliwell, P., Bronk, J. R., Kellett, G. L., Meredith, D., Boyd, R., Pieri, M., Bailey, P. D., Pettcrew, R., and Foley, D. (2009) An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *The Journal of Physiology (London)* **587**, 195-210
97. Neu, J., Shenoy, V., and Chakrabarti, R. (1996) Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here ? *FASEB Journal* **10**, 829-837
98. Ohara-Imaizumi, M., Aoyagi, K., Akimoto, Y., Nakamichi, Y., Nishiwaki, C., Kawakami, H., and Nagamatsu, S. (2009) Imaging exocytosis of single glucagon-like peptide-1 containing granules in a murine enteroendocrine cell line with total internal reflection fluorescent microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **390**, 16-20
99. Habib, A. M., Richards, P., Cairns, L. S., Rogers, G. J., Bannon, C. A., Parker, H. E., Morley, T. C., Yeo, G. S., Reimann, F., and Gribble, F. M. (2012) Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology* **153**, 3054-3065
100. Pi, M., Faber, P., Ekema, G., Jackson, P. D., Ting, A., Wang, N., Fontilla-Poole, M., Mays, R. W., Brunden, K. R., Harrington, J. J., and Quarles, L. D. (2005) Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *The Journal of Biological*

101. Mizokami, A., Yasutake, Y., Higashi, S., Kawakubo-Yasukochi, T., Chishaki, S., Takahashi, I., Takeuchi, H., and Hirata, M. (2014) Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone* **69**, 68-79
102. Smajilovic, S., Clemmensen, C., Johansen, L. D., Wellendorph, P., Holst, J. J., Thams, P. G., Ogo, E., and Brauner-Osborne, H. (2013) The L- $\alpha$ -amino acid receptor GPRC6A is expressed in the islets of Langerhans but is not involved in L-arginine-induced insulin release. *Amino Acids* **44**, 383-390
103. Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381-390
104. Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **100**, 703-711
105. Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., and Behrens, M. (2010) The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical Senses* **35**, 157-170
106. Maruyama, Y., Yasuda, R., Kuroda, M., and Eto, Y. (2012) Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. *PLoS One* **7**, e34489
107. Cartoni, C., Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Shigemura, N., Yoshida, R., Godinot, N., le Coutre, J., Ninomiya, Y., and Damak, S. (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *Journal of Neuroscience* **30**, 8376-8382
108. Hass, N., Schwarzenbacher, K., and Breer, H. (2010) T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell and Tissue Research* **339**, 493-504
109. Janssen, S., Laermans, J., Verhulst, P. J., Thijs, T., Tack, J., and Depoortere, I. (2011) Bitter

- taste receptors and  $\alpha$ -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2094-2099
110. Liou, A. P., Sei, Y., Zhao, X., Feng, J., Lu, X., Thomas, C., Pechhold, S., Raybould, H. E., and Wank, S. A. (2011) The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **300**, 538-546
111. Daly, K., Al-Rammahi, M., Moran, A., Marcello, M., Ninomiya, Y., and Shirazi-Beechey, S. P. (2013) Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **304**, G271-282
112. Liou, A. P., Lu, X., Sei, Y., Zhao, X., Pechhold, S., Carrero, R. J., Raybould, H. E., and Wank, S. (2011) The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology* **140**, 903-912
113. Tanaka, T., Katsuma, S., Adachi, T., Koshimizu, T. A., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2008) Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **377**, 523-527
114. Dotson, C. D., Zhang, L., Xu, H., Shin, Y. K., Vignes, S., Ott, S. H., Elson, A. E., Choi, H. J., Shaw, H., Egan, J. M., Mitchell, B. D., Li, X., Steinle, N. I., and Munger, S. D. (2008) Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One* **3**, e3974
115. Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., and Gribble, F. M. (2012) Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **61**, 364-371

116. Parker, H. E., Wallis, K., le Roux, C. W., Wong, K. Y., Reimann, F., and Gribble, F. M. (2012) Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion. *British Journal of Pharmacology* **165**, 414-423
117. Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matak, C., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2009) TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metabolism* **10**, 167-177
118. Chisholm, C., and Greenberg, G. R. (2002) Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **283**, 311-317
119. Herrmann-Rinke, C., Vogt, A., Hess, M., and Goke, B. (1995) Regulation of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum by neurotransmitters and peptides. *Journal of Endocrinology* **147**, 25-31
120. Beglinger, S., Drewe, J., Schirra, J., Goke, B., D'Amato, M., and Beglinger, C. (2010) Role of fat hydrolysis in regulating glucagon-like Peptide-1 secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **95**, 879-886
121. Li, Y., Cao, X., Li, L. X., Brubaker, P. L., Edlund, H., and Drucker, D. J. (2005)  $\beta$ -Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* **54**, 482-491
122. Park, S., Dong, X., Fisher, T. L., Dunn, S., Omer, A. K., Weir, G., and White, M. F. (2006) Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic  $\beta$  cell growth and function. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 1159-1168
123. Tornehave, D., Kristensen, P., Romer, J., Knudsen, L. B., and Heller, R. S. (2008) Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas. *Journal of*

*Histochemistry and Cytochemistry* **56**, 841-851

124. Merchenthaler, I., Lane, M., and Shughrue, P. (1999) Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* **403**, 261-280
125. McMahon, L. R., and Wellman, P. J. (1998) PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *American Journal of Physiology* **274**, 23-29
126. Tang-Christensen, M., Vrang, N., and Larsen, P. J. (1998) Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. *Diabetes* **47**, 530-537
127. Yamada, C., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Yamada, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Tanaka, K., Drucker, D. J., Seino, Y., and Inagaki, N. (2008) The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology* **149**, 574-579
128. Lamari, Y., Boissard, C., Moukhtar, M. S., Jullienne, A., Rosselin, G., and Garel, J. M. (1996) Expression of glucagon-like peptide 1 receptor in a murine C cell line: regulation of calcitonin gene by glucagon-like peptide 1. *FEBS Letters* **393**, 248-252
129. Pi, M., and Quarles, L. D. (2012) Multiligand specificity and wide tissue expression of GPRC6A reveals new endocrine networks. *Endocrinology* **153**, 2062-2069
130. Clemmensen, C., Smajilovic, S., Madsen, A. N., Klein, A. B., Holst, B., and Brauner-Osborne, H. (2013) Increased susceptibility to diet-induced obesity in GPRC6A receptor knockout mice. *Journal of Endocrinology* **217**, 151-160
131. Karnani, M. M., Apergis-Schoute, J., Adamantidis, A., Jensen, L. T., de Lecea, L., Fugger, L., and Burdakov, D. (2011) Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids. *Neuron* **72**, 616-629

## 謝辞

本研究を行うにあたり、実験から論文作成、博士論文審査すべての過程にわたり、常に温かいご指導ご鞭撻賜りました、坪井貴司准教授に心より感謝申し上げます。

初代培養L細胞を用いた実験にご協力くださった、ケンブリッジ大学 Fionna Gribble 教授、Frank Reimann 博士、Ramona Pais 博士に心より感謝申し上げます。

GLUtag 細胞を御供与下さった、トロント大学の Daniel J. Drucker 博士、STC-1 細胞を御供与下さったカリフォルニア大学 Douglas Hanahan 博士に、この場をお借りして御礼申し上げます。

そして、日々の研究を支えてくださった坪井研究室の皆さまに心より感謝申し上げます。

最後に、いつも心の支えとなってくれた家族や友人に心より感謝申し上げます。