

論文の内容の要旨

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

[背景と目的]

消化管は、摂取した食餌を消化し栄養素を吸収するだけでなく、ホルモンを分泌することで他臓器の生理機能を調節する。小腸内分泌 L 細胞から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1; GLP-1) と小腸内分泌 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刺激ポリペプチドは、インクレチンと呼ばれ、特に GLP-1 は膵β細胞からのインスリン分泌を促進する。そのため、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。

GLP-1 を分泌する小腸内分泌 L 細胞の頂端部は管腔に面しており、頂端部を覆う微絨毛には管腔内の栄養素の濃度変化を感受するための種々の受容体が発現している。そして、頂端膜側で栄養素を感受すると、基底膜側から GLP-1 を毛細血管へと分泌する。例えば、頂端膜にはナトリウム依存性グルコーストランスポーターが発現しており、管腔内のグルコースを細胞内に取り込む。その際、ナトリウムイオンも細胞内に共輸送され、L 細胞の細胞膜の脱分極を引き起こし、GLP-1 の分泌を誘導する。また、頂端膜に

は、中および長鎖脂肪酸を感受する G タンパク質共役型受容体である GPR40 と GPR120、そして不飽和長鎖脂肪酸を感受する GPR119 が発現している。GPR40 および GPR120、そして GPR119 が脂肪酸を感受すると、それぞれ細胞内サイクリック AMP および細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が起こり、GLP-1 が L 細胞から分泌される。しかしながら、食餌中に含まれるアミノ酸を L 細胞が感知して GLP-1 を分泌する機構については、未だに明らかにされていない。そこで本研究では、L 細胞におけるアミノ酸感受機構について解明を試みた。

[結果と考察]

1. L 細胞におけるアミノ酸を感知する受容体の遺伝子発現解析

L 細胞は、小腸を構成する細胞中の数%ほどしか存在しないため、生体から単離精製し、培養することが困難である。そこで本研究では、GLP-1 分泌能を持つ、マウス由来 L 細胞株 GLUTag 細胞および STC-1 細胞を用いた。まず、GLUTag 細胞および STC-1 細胞におけるアミノ酸を感知する受容体の発現を RT-PCR により解析した。その結果、L-アミノ酸感受性受容体である G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPCR6A) およびカルシウム感知受容体 (calcium sensing receptor; CaSR) の発現を見出した。

次に、GPCR6A および CaSR のリガンドである、L-オルニチンおよび L-フェニルアラニンを GLUTag 細胞に投与した際の細胞内シグナル伝達動態の可視化解析を行った。その結果、L-オルニチンおよび L-フェニルアラニンの投与により、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された。以上の結果から、GLUTag 細胞において GPCR6A および CaSR がアミノ酸を感知する受容体として機能している可能性が示唆された。

2. GPCR6A を介した GLP-1 分泌機構の解析

L 細胞から GLP-1 が分泌される反応を全反射蛍光顕微鏡によって可視化解析することを試みた。しかし、GLP-1 は、プロホルモンコンバーターゼ 1/3 によりプログルカゴンから切断されることで産生されるため、GLP-1 に蛍光タンパクを直接融合し、L 細胞に発現させることは困難と考えられる。そこで、様々なホルモンに蛍光タンパクを融合させたものを GLUTag 細胞に強制発現させ、内在性の GLP-1 と同じ分泌顆粒に局在するものの同定をまず試みた。解析の結果、緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein; GFP) を融合させた組織型プラスミノゲン活性化因子 (tissue type plasminogen activator; tPA)

(tPA-GFP) を含む分泌顆粒が内在性の GLP-1 と高確率で共局在することを見出した。そこで、tPA-GFP を発現させた L 細胞に GPRC6A のリガンドである L-オルニチンを投与したところ、L-オルニチン投与濃度の増加に伴い tPA-GFP 分泌反応数の増加が観察された。また、細胞外に分泌された GLP-1 を ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) により測定したところ、L-オルニチン投与濃度の増加に伴い GLP-1 分泌量も増加した。

次に、ホスホリパーゼ C の阻害剤である U-73122、イノシトール 3 リン酸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および GPRC6A のアンタゴニストであるカリンドールを L-オルニチンと共に L 細胞に投与すると、分泌反応および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制された。

また、RNA 干渉法により内在性の GPRC6A 遺伝子をノックダウンすると、L-オルニチン投与によって起こる分泌反応および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制された。一方、ATP 感受性カリウムチャネル (ATP-sensitive potassium channel; K_{ATP} チャネル) の開口剤であるジアゾキシドおよび電位依存性 L 型カルシウムチャネルの阻害剤であるニフェジピンを L-オルニチンと共に L 細胞に投与しても、分泌反応および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、抑制されなかった。

[考察]

本研究結果から考えられる、GLUTag 細胞におけるアミノ酸感受機構は以下のとおりである。頂端部に発現している L-アミノ酸感受性受容体 GPRC6A は小腸管腔のアミノ酸を感知すると、受容体に共役する Gq タンパク質を介して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、GLP-1 を分泌する。

L-オルニチンは細胞内に取り込まれ、代謝されて ATP を産生し、 K_{ATP} チャネルを介して GLP-1 分泌を促進する可能性も考えられる。しかし、 K_{ATP} チャネルの開口剤であるジアゾキシドおよび電位依存性 L 型カルシウムチャネルの阻害剤であるニフェジピンを L-オルニチンと共に投与した際に、L-オルニチン投与によって起こる GLP-1 分泌が阻害されなかったことから、L-オルニチンの多くが GPRC6A 受容体・Gq タンパク質を介した経路で感受されると考えられる。

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受機構が存在する可能性を提唱した。今後の研究によって、舌の味覚細胞と同様の栄養素感受機構が、消化管においても見出され、種々の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。