



## Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion

Ghupurjan Gheni

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6258号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006258>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学位論文の内容要旨

**Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion**

グルタミン酸はグルコース代謝とインクレチン/cAMP作用を共役する鍵となるシグナルとして機能し、インスリン分泌を増強する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
糖尿病・内分泌・総合内科学

(指導教員：小川 渉 教授)

吾甫尔江 艾尼

### 【背景および目的】

膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌は、血中グルコースレベルを正常範囲内で維持するために様々な細胞内シグナルによって正確に調節されている。グルコース代謝はインスリン分泌の最も基本となるメカニズムである。一方、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) およびグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) などのインクレチンは、食事摂取に応じてそれぞれ腸管内分泌L細胞およびK細胞から分泌され、膵 $\beta$ 細胞に作用しcAMPシグナルを介してインスリン分泌を増幅する。これらは、食後高血糖の是正のために重要な役割を担っている。インクレチン/cAMPシグナルは、グルコース依存的にインスリン分泌を増強することが知られているが、インスリン分泌におけるグルコース代謝とインクレチン/cAMP作用を共役するメカニズムは不明である。

本研究では、インクレチン応答性および非応答性の $\beta$ 細胞株を用いた比較メタボロミクスによってグルコース代謝とインクレチン/cAMP作用を共役するメカニズムを検討した。

### 【結果】

インクレチン応答性および非応答性のマウス膵 $\beta$ 細胞株におけるグルコース代謝プロファイルの違い

最近我々は、インクレチン応答性および非応答性の $\beta$ 細胞株を樹立し、MIN6-K8 および -K20 と名付けた (Iwasaki et al., J Diabetes Investig, 2010)。初代培養膵 $\beta$ 細胞と同じく MIN6-K8 細胞はグルコースおよびインクレチンに応答するが、MIN6-K20 細胞はグルコースに応答するもののインクレチンに応答しない。両細胞において GLP-1 および GIP による cAMP 産生や cAMP の下流シグナルに差は認められなかった。グルコース刺激下で両細胞のメタボローム解析を行い、得られたデータについて階層的クラスター分析を行うと、両細胞は 2 つの異なるクラスターに別れた。このことから、グルコース刺激に対する代謝応答が異なることが示された。単変量解析では G6P, F6P, FBP, NADH, グルタミン酸およびアスパラギン酸の含量が MIN6-K8 細胞において MIN6-K20 細胞より多かった。これらの結果から、インクレチン応答性の MIN6-K8 細胞ではリンゴ酸-アスパラギン酸 (MA) シャトルがインクレチン非応答性の MIN6-K20 細胞より活性化していることが示唆された。

インクレチンによるインスリン分泌増強におけるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの役割

次に、MA シャトルの阻害薬である AOA を用いて、MA シャトルのグルコース依存性インスリン分泌 (GIIS) およびインクレチンによるインスリン分泌増強における役割について検討した。AOA 処置は MIN6-K8 細胞の GIIS に影響を与えたが、GLP-1 および GIP などのインクレチンによるインスリン分泌増強を著しく減弱した。マウス膵

島を用いた検討でも AOA 处置により同様な結果が得られた。さらに、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST1, AST2) およびアスパラギン酸-グルタミン酸輸送担体 (Aralar1) のノックダウンによる MA シャトルの阻害は GIIS に影響を与えたかったが、インクレチニによるインスリン分泌増強を抑制した。一方、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPD1, GPD2) のノックダウンによるグリセロールリン酸 (GP) シャトルの阻害は GIIS やインクレチニによるインスリン分泌増強に影響を与えたかった。これらの結果から、インクレチニによるインスリン分泌増強は MA シャトルに依存していることが示された。

#### 細胞質グルタミン酸のグルコース濃度依存的産生および cAMP/PKA によるインスリン顆粒への輸送

次に我々は、MA シャトルとインクレチニの関係について検討した。初めに、インクレチニによる MA シャトルの直接的な活性化を考えた。しかし、GLP-1 刺激によって解糖系や MA シャトルの代謝物の量に相違が認められなかったこと、GLP-1 刺激によって MA シャトルの活性に必要である AST1 およびリンゴ酸脱水素酵素 (MDH1) の活性上昇が認められなかったことから、インクレチニによるインスリン分泌増強は MA シャトルの直接活性化ではないことが示唆された。

そこで我々は、以前にインスリン分泌のシグナルとして提唱されていたグルタミン酸に着目した。細胞全体のグルタミン酸含量はグルコース濃度依存性に増加したが、GLP-1 の影響は認められなかった。質量分析計により <sup>13</sup>C 同位体標識グルコース刺激時の細胞質におけるグルタミン酸アイソトポマーの量を測定したところ、M+2～M+5 のグルタミン酸アイソトポマー (<sup>13</sup>C 標識グルコースから產生されたもの) が有意に増加していた。また、MA シャトルの阻害薬 AOA の処置により、グルコース刺激時の細胞内および細胞質のグルタミン酸の产生が抑制された。さらに、インスリン顆粒内のグルタミン酸含量がグルコース刺激単独ではなく、GLP-1 を加えた場合に GLP-1 濃度依存的に増加した。これらの結果から、MA シャトルを介して產生される細胞質グルタミン酸がインクレチニによるインスリン分泌増強を仲介することが示唆された。

#### グルタミン酸はインクレチニによるインスリン分泌増強のシグナルである

次に、グルタミン酸のインスリン顆粒開口分泌における役割を検討した。グルタミン酸は、cAMP 存在下において開口分泌を著しく増加したが、その増加は PKA の阻害薬である PKI により抑制された。さらに、細胞膜透過性のグルタミン酸前駆体であるジメチルグルタミン酸の効果を検討した。全反射型蛍光顕微鏡 (TIRFM) による解析により、ジメチルグルタミン酸がグルコース依存性開口分泌の第 1 相と第 2 相の両方を増加させることが明らかとなった。インクレチニ非応答性の MIN6-K20 細胞において、細胞質グルタミン酸含量はグルコース刺激で増加しなかったが、ジメチルグルタミン酸の処置に

よりインスリン分泌が著しく増加した。これらの結果から、グルタミン酸はインクレチニによるインスリン分泌増強のシグナルであることが示された。

#### グルタミン酸のインスリン顆粒への輸送はインクレチニによるインスリン分泌増強に必要である

神経細胞や腸管内分泌細胞では、グルタミン酸は小胞膜グルタミン酸輸送担体 (VGLUTs) を介して分泌顆粒に取り込まれる。量的リアルタイム RT-PCR 解析と免疫組織学的解析により、MIN6-K8 細胞および脾島において VGLUT1 がインスリン顆粒と共に局在することがわかった。グルタミン酸の分泌顆粒への輸送を阻害する試薬である Evans blue の処置および VGLUT1 のノックダウンにより、GIIS は障害されなかつたが、インクレチニによるインスリン分泌増強は抑制された。同様に、VGLUT1 ノックアウトマウスの脾島においても GIIS ではなくインクレチニによるインスリン分泌増強のみが障害されていた。重要なことにジメチルグルタミン酸処置によりインスリン分泌が回復した。次に我々は、小胞内グルタミン酸輸送に関与する V-ATPase のインスリン分泌における役割を検討した。V-ATPase のサブユニット D のノックダウンおよび V-ATPase の阻害剤である Bafilomycin 処置の何れも GIIS に影響しなかつたが、インクレチニによるインスリン分泌増強は抑制された。さらに、ジメチルグルタミン酸が Bafilomycin 処置時のインスリン分泌を回復した。これらの結果から、グルタミン酸の VGLUT1 を介するインスリン顆粒への輸送がインクレチニによるインスリン分泌増強に必要であることが示された。

#### グルタミン酸のインスリン分泌における病態生理学的意義

疾患状態におけるインスリン分泌とグルタミン酸産生の関係を明らかにするために、正常の Wistar、糖尿病の GK および肥満の ZF ラットにおける GIIS とインクレチニによるインスリン分泌増強を比較した。Wistar ラットの脾島に比べて、GK ラットにおける GIIS は著しく減少していたが、インクレチニ反応は保持されていた。肥満モデルの ZF ラット（レプチン受容体遺伝子変異体）では、GK および Wistar ラットと異なりインクレチニに応答しなかつた。インクレチニに応答しない ZF ラットにおいても、ジメチルグルタミン酸処置はインスリン分泌を増強した。次に我々は、脾島におけるグルコースによるグルタミン酸の产生を検討した。GK ラットでは Wistar ラットよりものグルコースによるグルタミン酸の产生が認められたが、ZF ラットでは产生が認められなかつた。これらの結果から、グルコースによるグルタミン酸産生の増加と GLP-1 によるインスリン分泌増強が相關することが示唆された。

#### 【結論】

本研究では、グルコース濃度依存性に MA シャトルを介して產生される細胞質グルタ

ミン酸がインクレチニン応答性を規定すること、インクレチニン/cAMP/PKA シグナルによるグルタミン酸のインスリン顆粒への取り込みがインスリン分泌を増強することが示された。これより、インクレチニンによるインスリン分泌増強において、細胞質グルタミン酸がグルコース代謝とインクレチニン/cAMP 作用を共役するシグナルとして機能することが明らかとなった。グルタミン酸シグナルの解明により、糖尿病の病態生理が明らかになるだけでなく、新たな治療戦略のための道が開かれることが期待される。

## 神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2458 号	氏名	吾甫尔江 艾尼
論文題目 Title of Dissertation	<p>Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion</p> <p>グルタミン酸はグルコース代謝とインクレチン/cAMP 作用を共役する鍵となるシグナルとして機能し、インスリン分泌を増強する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 木戸 良明 Chief Examiner</p> <p>副査 匂坂 敏朗 Vice-examiner</p> <p>副査 南 康博 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

## 【背景・目的】

膵β細胞はグルコース代謝によりインスリンを分泌し、インクレチン(GLP-1, GIP)はcAMPシグナルを介してグルコース濃度依存性にインスリン分泌を増強する。しかしながらグルコース代謝とインクレチン/cAMPシグナルの相互作用は未だ明らかではない。本研究は、インクレチン応答性と非応答性のマウス膵β細胞株を用いたメタボローム解析を基盤とする研究により、膵β細胞におけるグルコース代謝とインクレチン/cAMPシグナルとの相互作用を明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

インクレチン応答性(MIN6-K8)と非応答性(MIN6-K20)のマウス膵β細胞株を用いて、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)により、16.7 mM グルコース刺激時の網羅的メタボローム解析を行った。MIN6-K8細胞あるいはマウスの膵島を用いて、薬剤やshRNAによるグルコース依存性インスリン分泌(GIIS)およびインクレチンによるインスリン分泌増強について検討した。MIN6-K8細胞において、安定同位体標識グルコースおよびGLP-1刺激時のグルタミン酸含量を測定した。初代培養マウス膵β細胞を用いて、細胞膜容量測定および全反射型蛍光顕微鏡(TIRFM)による開口分泌の評価を行った。また、糖尿病および肥満モデルラットの膵島を用いて、インスリン分泌やグルタミン酸産生について検討した。

## 【結果】

グルコース刺激下で、MIN6-K8細胞とMIN6-K20細胞のメタボローム解析を行ったところ、G6P, F6P, FBP, NADH, グルタミン酸およびアスパラギン酸の含量がMIN6-K8細胞においてMIN6-K20細胞より多かった。この結果から、MIN6-K8細胞ではリンゴ酸-アスパラギン酸(MA)シャトルが亢進していることが示唆された。

MAシャトルの阻害薬であるAOAの処置は、MIN6-K8細胞およびマウス膵島のGIISに影響を与えるなかつたが、インクレチンによるインスリン分泌増強を著しく減弱した。さらに、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST1)のノックダウンによるMAシャトルの阻害によつても同様の結果が得られた。これらの結果から、インクレチンによるインスリン分泌増強はMAシャトルに依存していることが示された。

グルコース刺激によって細胞質のグルタミン酸が有意に増加したが、AOA処置により増加が抑制された。インスリン顆粒内のグルタミン酸含量は、GLP-1濃度依存的に増加した。また、グルタミン酸はcAMP存在下において開口分泌を著しく増加した。さらに、細胞膜透過性のグルタミン酸前駆体であるジメチルグルタミン酸は、インスリン分泌を増強した。これらの結果から、グルタミン酸はインクレチンによるインスリン分泌増強のシグナルであることが示された。

小胞膜グルタミン酸輸送担体(VGLUT1)ノックアウトマウスの膵島においてインクレチンによるインスリン分泌増強のみが障害され、それがジメチルグルタミン酸処理により回復する。

復した。この結果から、グルタミン酸の VGLUT1 を介するインスリン顆粒への取り込みがインクレチンによるインスリン分泌増強に必要であることが示された。

正常の Wistar ラットに比べて、糖尿病モデルの GK ラットにおける GIIS は著しく減少していたが、インクレチン反応は保持されていた。肥満モデルの ZF ラットは、インクレチンに応答しなかった。GK ラットでは Wistar ラットより少ないもののグルコースによるグルタミン酸の産生が認められたが、ZF ラットでは産生が認められなかった。これらの結果から、グルコースによるグルタミン酸産生の増加と GLP-1 によるインスリン分泌増強が相関することが示唆された。

#### 【考察】

本研究では、グルコース濃度依存性に MA シャトルを介して產生される細胞質グルタミン酸がインクレチン応答性を規定すること、インクレチン/cAMP シグナルによるグルタミン酸のインスリン顆粒への取り込みがインスリン分泌を増強することが示された。これにより、インクレチンによるインスリン分泌増強において、細胞質グルタミン酸がグルコース代謝とインクレチン/cAMP 作用を共役するシグナルとして機能することが明らかとなつた。グルタミン酸シグナルの解明により、糖尿病の病態生理が明らかになるだけでなく、新たな治療戦略のための道が開かれることが期待される。

本研究は、脾  $\beta$  細胞からのインスリン分泌におけるグルコース代謝とインクレチン/cAMP シグナルとの相互作用について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた細胞質グルタミン酸シグナルによるインスリン分泌制御機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。