

# グルタミン酸による膵臓ラ氏島内の インスリン分泌制御機構

Studies on the molecular mechanism of the regulation for insulin secretion by  
glutamatergic signal transmission among islet cells.

研究代表者 岡山大学大学院・医歯学総合研究科 助手 山田 浩司

Department of Neuroscience, Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama University

和文 アブストラクト

株化細胞である MIN6 細胞に、AMPA 型グルタミン酸受容体のイソフォームである GluR2 が発現しており、AMPA 刺激により細胞内にエンドサイトーシスされることを見いだした。このエンドサイトーシスは、細胞外グルコースが低濃度の場合に顕著に起こり、AMPA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストである GYKI52466 により阻害された。さらに、細胞外の Na イオン、Ca イオンを除くことにより阻害された。従って、GluR2 のエンドサイトーシスは、グルタミン酸の受容体への結合と細胞膜の脱分極が必要であることが示唆された。さらに、蛍光ラベルした GluR2 (GFP-GluR2) を MIN6 細胞に強制発現させ、AMPA 刺激で、GluR2 のエンドサイトーシスを反映していると考えられる蛍光スポットの移動が観察できた。現在、GluR2 のエンドサイトーシスの調節機構の詳細を解析中である。

Abstract

In islets of langerhans, beta cell express AMPA receptors. However, the physiological functions of AMPA receptor is hardly clarified. In this study, we demonstrated that MIN6 cells, pancreatic beta cell line, expressed GluR2, an isoform of AMPA receptor. And the receptors were endocytosed by stimulation of the cells with AMPA or glutamate. The AMPA-induced endocytosis was strongly inhibited by GYKI52466, depletion of Na<sup>+</sup> or Ca<sup>2+</sup> and hypertonic treatment. KCl also stimulated endocytosis of AMPA receptors, but it did not potentiate the endocytosis by AMPA. These results indicate that AMPA receptors are internalized by ligand binding and receptor activation. Now detection of GluR2 movement in living MIN6 cells are in process. Thus, MIN6 cells provide a good mode system to determine AMPA receptor trafficking in the cells.

研究目的

膵臓ランゲルハンス氏島（ラ氏島）は、血糖を調節するホルモンを分泌する内分泌器官である。ラ氏島 細胞からは、血糖を下降させるインスリンが、細胞からは血糖を上昇させるグルカゴンが分泌されている。我々は、細胞が、グルカゴンを分泌する以外にグルタミン酸も分泌し、細胞

の AMPA 型グルタミン酸受容体を介して情報伝達する可能性を見いだした。本研究では、細胞における AMPA 型受容体を介するグルタミン酸刺激の受容機構の詳細を調べることを目的とした。

研究経過

我々は、ラ氏島内の 細胞に、グルタミ

ン酸が濃縮されており、分泌されることを見いだした。また、インスリンを分泌する細胞には、グルタミン酸受容体の存在が示唆されていたが、グルタミン酸神経由来のグルタミン酸により刺激をうけるものと考えられていた。我々は、細胞から分泌されたグルタミン酸が、隣接する細胞に作用することを見いだした。従って、細胞と細胞間にはグルタミン酸情報伝達機構が存在する。この細胞間情報伝達機構のうち、細胞からのグルタミン酸の分泌機構については、断片的であるがその詳細が明らかになってきている。しかしながら、グルタミン酸情報を受容機構の詳細は、全く不明であった。

ごく最近、神経において AMPA 受容体は、カチオンチャンネルであるのみならず、エンドサイトーシスにより、細胞内に取り込まれることが報告された。その結果としてグルタミン酸信号の伝達が抑制されることが明らかになった。膵臓にグルタミン酸受容体のアゴニストである AMPA を還流すると、インスリン分泌が促進される。このインスリン分泌に対する増強作用は、グルタミン酸刺激後速やかに減衰するため、神経と同様な調節機構が存在している可能性がある。

本研究では、細胞における AMPA 型受容体の詳細とそのエンドサイトーシスの可能性を調べ、それに関わる蛋白群を同定及びその機能を確定することにより、AMPA 型受容体を介するインスリンの分泌調節機構の解明を目的とした。

研究成果

#### MIN6 細胞における GluR2 の機能的発現

MIN6 細胞に発現しているグルタミン酸

受容体のイソフォームをその特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法及び免疫染色法を用い調べた結果、GluR2 の発現を確認した(図 1A)。GluR2 と 3 は、C 末は同じ配列をもっており、抗体の反応性からは、GluR3 の発現は確定できなかった。

GluR2 が、機能的に発現していることをグルタミン酸及び AMPA 刺激による細胞内カルシウム濃度上昇から確認した。続いて、上記細胞における GluR2 の局在を調べた。GluR2 は、細胞膜のみならず細胞質にもドット状に局在していた(図 1B)。細胞質における GluR2 は、細胞内に取り込まれたものと考えられる。

#### MIN6 細胞における GluR2 のエンドサイトーシス

神経細胞では、GluR2 を含む AMPA 型受容体は AMPA、グルタミン酸、インスリン刺激により細胞内にエンドサイトーシスされる。そこで、MIN6 細胞の GluR2 のエンドサイトーシスを 2 種類の方法を用いて検討した。まず、細胞膜蛋白質の細胞外に露出している部分を NHS-SS-biotin を用いて無作為に標識した後、AMPA を加え刺激する。その後、細胞膜に残った蛋白質に結合した NHS-SS-biotin を還元型グルタチオンを加えることにより biotin 部分を除き、エンドサイトーシスされた NHS-SS-biotin 結合型膜蛋白質をビオチン・アビジンの結合を利用してアビジンビーズで沈降する。ビーズと共に沈降した GluR2 をウエスタンブロッティング法により検出した。この方法においても AMPA 刺激による GluR2 のエンドサイトーシスが検出できた(図 2)。また、GluR2 は、その N 末端部分が細胞外に

大きく露出しており、その細胞外部分の特異的に認識する抗体を培養した MIN6 細胞に加え細胞膜上の GluR2 を標識した後、AMPA を加え刺激した。その後、酸性緩衝液にて細胞表面に残った抗体を除き、細胞内に GluR2 とともに取り込まれた抗体を免疫染色法にて検出した。とりこまれた GluR2 は、2 次抗体にラベルされた蛍光色素 (Rhodamin) により、赤く観察される。実際にそれらの刺激によりエンドサイトーシスが起ることが確認できた。この AMPA 刺激による GluR2 のエンドサイトーシスは、その非競合的アンタゴニストである GYKI52466 によって、ほぼ完全に阻害された (図 2)。従って、細胞には GluR2 を含む AMPA 型受容体が機能的に発現しており、リガンド依存性にエンドサイトーシスされることが判明した。

細胞外に多量のカリウムイオン (30mM 以上) を加えると人工的に細胞膜の脱分極を誘発することができる。NHS-SS-biotin で標識した MIN6 細胞に脱分極刺激を与え、エンドサイトーシスされた GluR2 を同様に定量した。脱分極刺激のみで、GluR2 のエンドサイトーシスが起った。以上より、脱分極刺激のみでも、GluR2 のエンドサイトーシスが起ることが判明した。

GFP と GluR2 の融合蛋白質を発現する遺伝子を作製し、MIN6 細胞に強制発現させた (図 3)。GFP-GluR2 に由来する蛍光は、細胞質及び細胞膜に認められた。この細胞を、AMPA で刺激すると、細胞膜から細胞質に移動する蛍光スポットが観察された。今後、この蛍光スポットの移動がエンドサイトーシスに依るものかどうかを含め、その詳細な解析を進める予定である。

## 今後の課題と発展

膵臓ラ氏島細胞の AMPA 型受容体は、グルタミン酸刺激によりエンドサイトーシスされることを実証した。AMPA 刺激による GluR2 のエンドサイトーシスは、観察した時間経過においては、ほぼ神経細胞のそれと同様であった。神経細胞の GluR2 は、その C 末に PDZ ドメインを持つ蛋白質 (GRIP、PICK1、ABP) 及び NSF、AP2 が結合し、そのエンドサイトーシスを調節している可能性が示唆されている。MIN6 細胞の GluR2 の C 末から 100 残基をシーケンスしたところ、神経系のそれと 100% 一致した。

現在、MIN6 細胞における GluR2 の C 末に結合する蛋白質を解析中である。さらに、これらの蛋白質の細胞外のグルコース濃度の変化によりその局在が変化するののかも興味深い課題である。米国エール大学 DeCamilli 教授よりエンドサイトーシス関連タンパクのノックアウトマウスの供与を受け、そのマウスの膵臓の機能を解析する予定である。我々の研究結果並びに、これから得られるであろう知見は、膵臓のインスリン分泌制御機構の研究のみならず、神経系の AMPA 型受容体のエンドサイトーシスの調節機構に関して重要な知見を与えるものと考えられる。

なお、本研究は、岡山大学大学院自然科学研究科 森山 芳則教授との共同研究として進めた。

発表論文リスト  
なし。

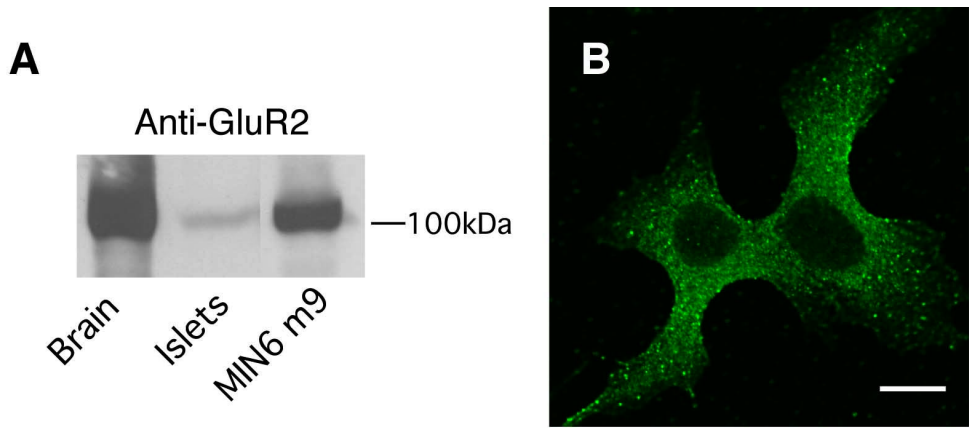


図1 AMPA型受容体(GluR2)の発現

A Western blotting法による細胞膜画分におけるAMPA型受容体(GluR2)の発現  
 B MIN6 m9細胞におけるGluR2の局在 Bar: 10µm

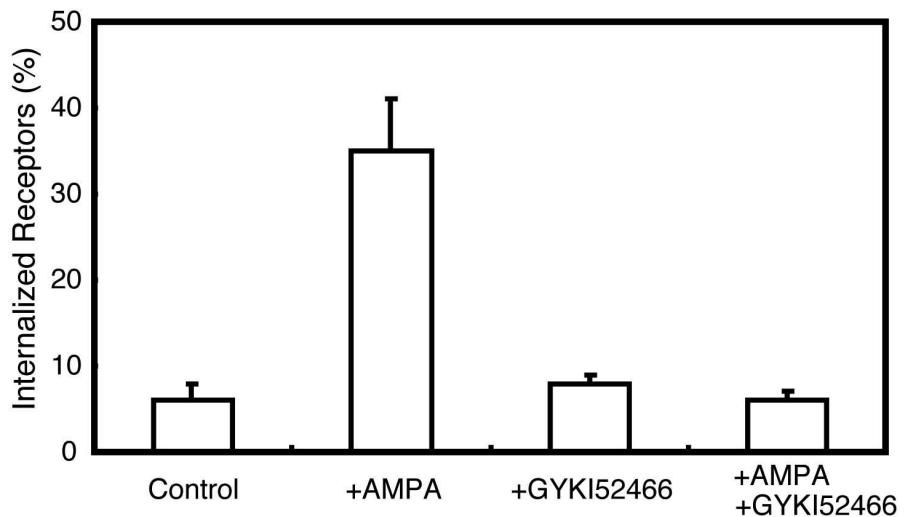


図2 NHS-SS-biotin標識法を用いたAMPA刺激によるGluR2のエンドサイトーシスの定量

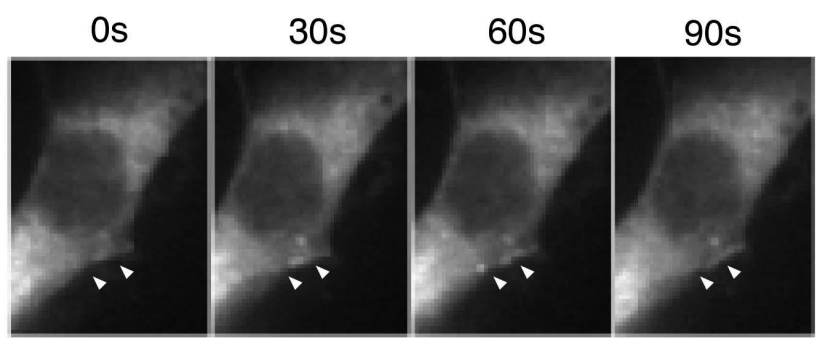


図3 GFP-GluR2の蛍光を指標にしたGluR2のエンドサイトーシスの可視化