HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	消化管内分泌細胞におけるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）分泌制御因子に関する研究［全文の要約］
Author(s)	續木, 惇
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2668 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14965号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86052
Type	doctoral thesis
File Information	TSUZUKI_Atsushi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

消化管内分泌細胞における

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)

分泌制御因子に関する研究

(Studies on regulation factors of

glucagon-like peptide-1 secretion

in intestinal endocrine cells)

2022 年 3 月

北海道大学

續木　惇

学位論文（要約）

消化管内分泌細胞における

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)

分泌制御因子に関する研究

(Studies on regulation factors of

glucagon-like peptide-1 secretion

in intestinal endocrine cells)

2022 年 3 月

北海道大学

續木　惇

【背景と目的】

糖尿病はインスリン分泌障害もしくはインスリン抵抗性に基づく慢性高血糖を主徴とする代謝疾患群である。インクレチンは食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞に作用しインスリン分泌を促進する。インクレチンには上部小腸 K 細胞由来の glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) と下部小腸 L 細胞由来のグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon like peptide-1、GLP-1) があり、両者はともに食餌依存性に分泌され、血糖依存性のインスリン分泌増強作用をもつ。加えて、GLP-1 はグルカゴン分泌抑制を介した血糖改善作用と食欲抑制作用を併せ持つが、GIP は脂肪蓄積作用や GLP-1 によるグルカゴン分泌抑制への拮抗が知られている。本研究では、糖代謝の改善に重要な役割を担っている GLP-1 に着目した。

ペプチドホルモンの分泌過程をライブセルイメージングすることは、その分泌機序の検証や分泌制御因子のスクリーニングに有効な方法である。しかし、一般的にペプチドホルモンは前駆体から複雑なプロセシングを経て生成されるため、蛍光タンパク質等での標識は容易でなく、GLP-1 の開口放出を直接可視化した先行研究は存在しない。これまでは分泌顆粒内で GLP-1 と共局在することが知られている human growth hormone (hGH)、neuropeptide Y (NPY)、tissue plasminogen activator (tPA) などの分子を蛍光タンパク質と融合し、それら融合タンパク質の開口放出を GLP-1 のそれとみなして解析が行われてきた。

そこで本研究では、GLP-1 アミノ酸配列の途中に蛍光タンパク質を挿入し、N 末端側にシグナルペプチドを付加することで、内在性 GLP-1 と同様にプロセシングされ、分泌顆粒に局在する蛍光プローブを作製した。このプローブを用いて GLP-1 開口放出過程のライブセルイメージングを行い、GLP-1 分泌制御機構の解明を目指した。

【材料と方法】

マウス GLP-1 の全長をコードする遺伝子配列の途中に蛍光タンパク質のコード配列を挿入し、GLP-1 配列の N 末端側にシグナルペプチドのコード配列を付加することで、シグナルペプチド、GLP-1 および蛍光タンパク質の融合タンパク質の発現ベクター、pFXII-spGLP-1-FPs を作製した。蛍光タンパク質は、赤色蛍光タンパク質 mCherry、mOrange2、DsRed、緑色蛍光タンパク質 enhanced GFP (EGFP)、superfolder GFP (sfGFP)、黄色蛍光タンパク質 Venus を用いた。マウス腸管 L 細胞のモデル細胞として、GLUTag 細胞および STC-1 細胞を用いた。GLUTag 細胞に spGLP-1-FPs を発現させ、共焦点顕微鏡下でその局在を観察した。spGLP-1-sfGFP の STC-1 細胞からの開口放出過程は全反射照明蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscope: TIRFM) 観察下で分泌顆粒と細胞膜の融合に伴う一過性の輝度上昇 (flash event) を定量することにより評価した。細胞から培地中に分泌された spGLP-1-mCherry の量は、分泌刺激因子を含むバッファーで培養した後、その培養上清の蛍光強度をマルチモードマイクロプレートリーダーで測定することにより評価した。

【結果】

spGLP-1-FPs のうち、フォールディング効率の高い蛍光タンパク質 (mCherry、Venus、sfGFP) を用いた場合に分泌顆粒状の細胞内局在を示したが、フォールディング効率の比較的低い蛍光タンパク質 (EGFP、mOrange2、DsRed) を用いた場合や、シグナルペプチドを付加しない GLP-1-mCherry、シグナルペプチドのみを付加した spmCherry は細胞質にびまん性の局在を示した。spGLP-1-mCherry と、分泌

顆粒マーカーであるNPYないしはtPAをGLUTag細胞に共発現させ、共焦点顕微鏡で観察したところ、両者は共局在を示したが、初期エンドソームマーカーのRab5とは局在が一致しなかった。

またspGLP-1-mCherry発現GLUTag細胞をKClもしくはforskolinで刺激し、回収した培地の蛍光強度をマルチモードプレートリーダーで測定した。未刺激のサンプルと比較して、KClおよびforskolin刺激したサンプルではmCherry由来の蛍光輝度が上昇した。

GLP-1-sfGFP発現STC-1細胞をTIRFMにて観察したところ、グルコースやグルタミンなどの栄養因子やforskolinの存在下においてflash eventが確認された。これらの栄養因子に加え、ピルビン酸が培地中に存在する条件下では、単位面積あたりのflash event数が3〜5倍に増加した。ピルビン酸によるGLP-1開口放出の誘発は、STC-1細胞では認められたが、一方でGLUTag細胞ではほとんど認められなかった。STC-1細胞ではピルビン酸の受容体および輸送体として知られるGPR31、GPR81、およびMCT-1の発現を認めたが、GLUTag細胞ではこれらの発現量がSTC-1細胞に比して低かった。GLUTag細胞でこれらの分子を過剰発現しTIRFM観察下でflash event数の変化を検証したが、同細胞においてピルビン酸誘発性のGLP-1開口放出を認めることはなかった。

【考察】

GLP-1 開口放出過程を spGLP-1-FPs を用いてライブセルイメージングするためには、mCherry や sfGFP などフォールディング効率の高い蛍光タンパク質を選択する必要があった。フォールディング効率の低い蛍光タンパク質を用いた場合には、spGLP-1-FPs がミスフォールドタンパク質として調節性分泌経路から排除された可能性が考えられる。しかし、フォールディング効率の低い EGFP や mOrange2 などを用いてペプチドホルモンの可視化に成功している例も報告されていることから、可視化に適した蛍光タンパク質は対象となるホルモンの種類や、その挿入部位により異なると考えられる。

また、ピルビン酸がSTC-1細胞においてGLP-1開口放出を促進させることが明らかとなった。ピルビン酸は腸内細菌の代謝産物として腸管内に存在するため、生体内においてもピルビン酸が GLP-1 分泌の調節因子として作用している可能性が示唆され、腸内細菌叢と GLP-1 分泌の関係も興味深い。今後、*in vivo* 実験を含めさらなる検証を行うことでより詳細な機序が明らかになると見込まれる。

従来、GLP-1 分泌の評価に用いられてきた ELISA 法では、プログルカゴンの転写・翻訳から最終的な GLP-1 の開口放出に至るまでの全過程の結果としての GLP-1 分泌量を測定することしかできなかった。spGLP-1-FPs は、ホルモンの生成過程と最終段階の開口放出過程を切り分けて評価することができる初めてのバイオセンサーである。GLP-1 開口放出のメカニズムを解明し、その制御因子を同定することは、内因性 GLP-1 分泌を促進し、耐糖能の改善を図る新たな治療法・創薬につながる可能性がある。また、本研究で樹立したペプチドホルモンの蛍光プローブ作製法は、現時点で開口放出過程の可視化に成功していない他のペプチドホルモンにも応用可能と期待され、内分泌領域における蛍光イメージング研究を力強く推進する可能性を秘めている。

【結論】

GLP-1 のアミノ酸配列の途中に蛍光タンパク質を挿入し、GLP-1 の N 末端側にシグナルペプチドを付加した蛍光プローブを作製したことにより、GLP-1 の開口放出過程のライブセルイメージングに成功した。このプローブを用いた検証により、ピルビン酸が L 細胞における GLP-1 分泌促進因子であることが同定された。