

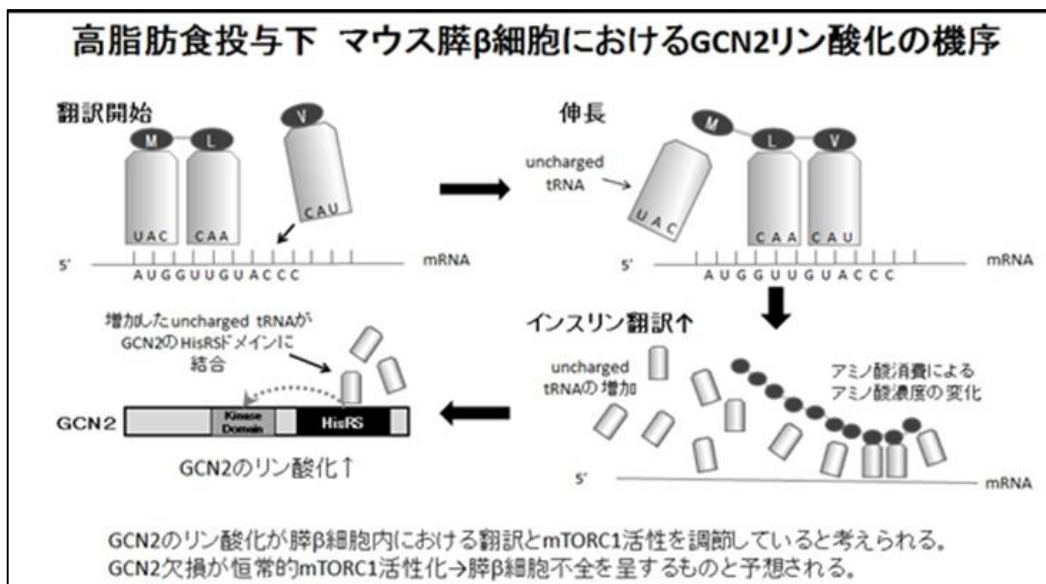
日本人2型糖尿病候補遺伝子 GCN2 による膵β細胞量調節機構の解明
神戸大学大学院保健学研究科 病態解析学領域 分析医科学分野
木戸良明

○研究の背景と目的

近年我が国で糖尿病人口が増加している背景には、日本人特有の膵β細胞の脆弱性に加え、食生活の欧米化の影響が大きく関与している。国民栄養調査から日本人の食習慣の推移をみると、現在総エネルギー摂取量は減少傾向を示しているものの、摂取栄養素が変化しており動物性脂肪摂取の増加傾向がみられる。一方、我々の研究室では以前から2型糖尿病感受性遺伝子による糖尿病発症機序の研究を行っており、日本人特有の遺伝因子が重要と考えている。

General control nonderepressible 2(GCN2)は、細胞内アミノ酸濃度を感知するタンパクであり、アミノ酸欠乏状態では uncharged tRNA(free tRNA)が GCN2 に結合することによって活性化を引き起こすことが知られている。また日本人の2型糖尿病患者における SNP (一塩基多形) 解析から、GCN2 に有意な変異が存在することが報告されている(*Nat Genet.* 40: 1092, 2008)。申請者はこれまでの実験結果より、以下のことを明らかとしている。1) 申請者の研究室で作製された全身性 GCN2 欠損マウスに高脂肪食を与えると、野生型マウスと比してインスリン抵抗性に差は見られないが、経口ブドウ糖負荷試験による耐糖能異常とインスリン分泌の低下が認められる。2) 高脂肪食負荷をした全身性 GCN2 欠損マウスでは、野生型と比べて膵β細胞量の減少が認められる。3) 通常食、すなわちインスリン抵抗性がない状態では、GCN2 欠損マウスと野生型マウスで膵β細胞量および代謝データに差は認められない。4) GCN2 欠損マウスの膵ラ氏島では、インスリンシグナル下流の翻訳因子 mTORC1 活性の恒常的活性化が認められる。5) 高脂肪食負荷マウスの膵ラ氏島では GCN2 のリン酸化亢進が認められるが、脳や肝臓などではリン酸化は認められない。以上の結果から、GCN2 欠損マウスに高脂肪食負荷を与えることによって膵β細胞における mTORC1 活性が恒常的に活性化され、膵β細胞量が減少し耐糖能異常を呈することが示された。

さらに申請者は、高脂肪食負荷マウスにおいて膵ラ氏島特異的に GCN2 が活性化される点に注目し、インスリン抵抗性存在下での膵β細胞におけるインスリン過剰合成が、膵β細胞内のアミノ酸消費亢進を誘導し、相対的なアミノ酸欠乏を呈することによって GCN2 が活性化されるという仮説を立てた(下図)。そこで本研究計画では、GCN2 活性化がどのように為され、また GCN2 欠損がどのような経路で恒常的 mTORC1 活性化を引き起こすかについて、より詳細な分子機構を明らかにすることを目的として研究を開始した。



○研究方法・研究内容

1) 高脂肪食負荷マウスの膵β細胞におけるアミノ酸解析

申請者は、膵臓の1%の容量に過ぎない膵β細胞が、全身の血糖値を制御するほどの大量のインスリンを合成・分泌している点に着目した。血液中のアミノ酸濃度は全身において一定であるが、組織内のアミノ酸濃度はそれぞれの臓器によって異なると思われる。膵β細胞はプロインスリンを継続的に、食後は大量に合成する必要があるため、アミノ酸の消費量が他臓器と比べて多い組織と考えられる。そこで他臓器（肝臓、脳）や血液、および単離した膵ラ氏島をサンプルとして各組織のアミノ酸濃度をメタボローム解析によって測定し、さらに各組織の総タンパク量で補正した。これを通常食負荷マウスの各組織においても同様に行い、両群間で比較検討を行った。

2) 各種刺激下のマウス膵β細胞株における GCN2 活性化の解析

マウスの膵ラ氏島は1匹あたりの採取量が少なく、また膵α細胞なども含まれることから、培養細胞による実験系で個体同様の現象が起こるかを検討する必要がある。マウス膵β細胞株 MIN6 細胞を用いて、インスリン合成を促進する条件と促進させない条件に分けて負荷を行う。申請者はこれまでの検討で、MIN6 細胞への短時間の KCl 刺激では分泌は促進されるもののインスリン合成は亢進していないことを明らかにしている。また同じ短時間でもグルコース刺激においてはインスリン合成が亢進していることもわかっている。そこで、両負荷による MIN6 細胞での GCN2 活性化を検討した。また他にも抗糖尿病薬(Sulphonylurea 剤)や遊離脂肪酸を負荷した後に、MIN6 細胞の GCN2 活性化を検討した。

3) 高脂肪食負荷マウスの膵β細胞における tRNA 定量解析

これまでに高脂肪食負荷マウスの膵ラ氏島では GCN2 活性化が亢進していることを明らかにしている。そこで1)のアミノ酸濃度解析に続いて tRNA 定量解析を行った。1)同様に高脂肪食および通常食負荷マウスそれぞれの膵ラ氏島を単離し、解析に用いた。GCN2 を活性化するのは free tRNA のみであるため、質量分析法(CE-MS 法)を用いた方法によって、各アミノ酸におけるアミノアシル化 tRNA (非 free tRNA) の定量を行った。これにより、free tRNA の比較検討が可能と考えられる。

4) 膵β細胞における GCN2 と free tRNA の結合能に関する検討

GCN2 は free tRNA が結合することによって活性化されることが知られている。これまでの検討から、高脂肪食負荷マウスの膵β細胞では増加した free tRNA が GCN2 に結合することによって活性化させていると予想される。そこで GCN2 と tRNA の結合を RIP(RNA Immunoprecipitation)法にて検討を行った。具体的には高脂肪食負荷マウスと通常食負荷マウスそれぞれから単離した膵ラ氏島をサンプルとし、免疫沈降により落とした GCN2 に結合している tRNA を real-time PCR 法にて定量を行った。

○研究成果

1) 高脂肪食負荷マウスの膵β細胞におけるアミノ酸解析

通常食および高脂肪食にて飼育した各マウスの24週齢において、血清、肝臓、脳、膵ラ氏島をそれぞれ単離し、組織内のアミノ酸濃度を測定した。血清においては、一部のアミノ酸が低下していたものの、全体としてのアミノ酸濃度は高脂肪食負荷マウスのサンプルで増加傾向にあった(図1)。また単離した肝臓や脳についても測定したところ、同様に高脂肪食負荷マウスにおいてアミノ酸濃度は増加していた。しかしなが

ら、豚ラ氏島においては、濃度が低下しているアミノ酸の方が多く傾向であった。これは、高脂肪食負荷マウスの豚β細胞ではインスリン合成が亢進していることによって、「アミノ酸の消費による濃度低下」という事前に立てた仮説を支持する結果と考えられた。

図 1. 通常食（黒）および高脂肪食（白）負荷マウスの血清中におけるアミノ酸濃度

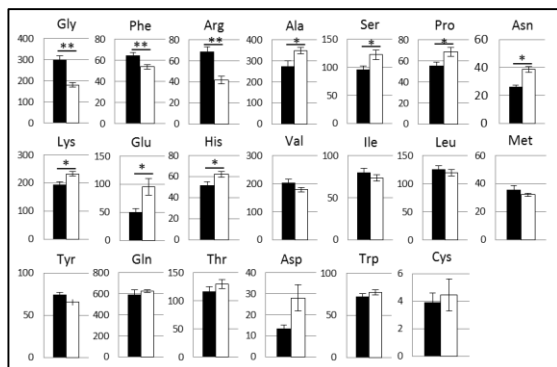
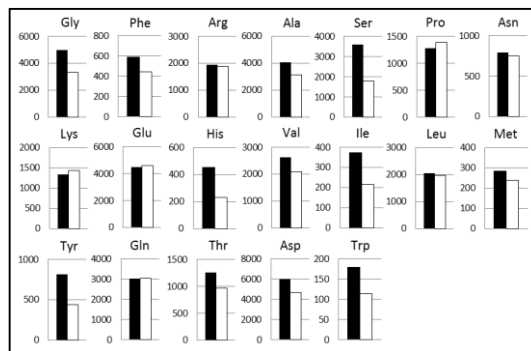


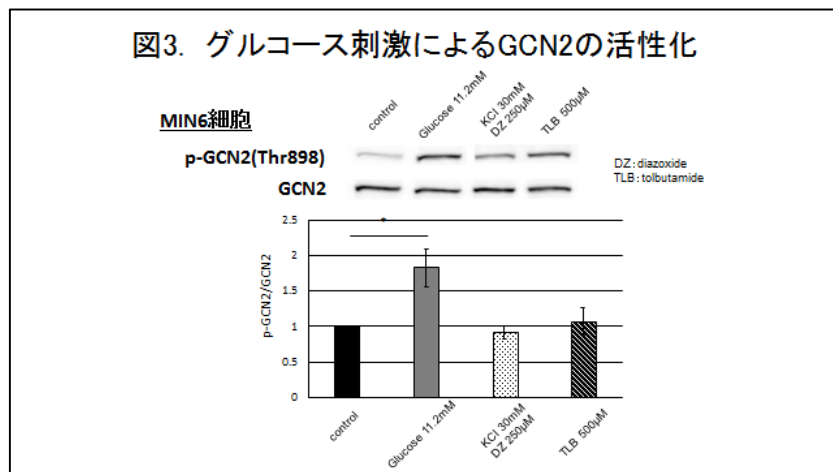
図 2. 通常食（黒）および高脂肪食（白）負荷マウスの豚ラ氏島におけるアミノ酸濃度



2) 各種刺激下のマウス豚β細胞株における GCN2 活性化の解析

1) の結果より、高脂肪食負荷マウスの豚ラ氏島ではアミノ酸濃度が低下していることが明らかとなり、このことが高脂肪食負荷マウスの豚ラ氏島で GCN2 が活性化している原因であると考えられる。これは、インスリン合成が亢進していることに起因するものと予想されるが、実際にインスリン合成と GCN2 活性化に関連があるかについての検討を行う必要がある。そこで MIN6 細胞に、グルコース、KCl、抗糖尿病薬 (tolbutamide) など

を MIN6 細胞に負荷して GCN2 活性化を検討したところ、グルコースによるのみ明らかな GCN2 活性化が認められた (図 3)。いずれも分泌促進刺激であるが、インスリン合成効果があるのはグルコースのみである。またその活性化は、翻訳阻害剤であるシクロヘキサミド負荷によっ

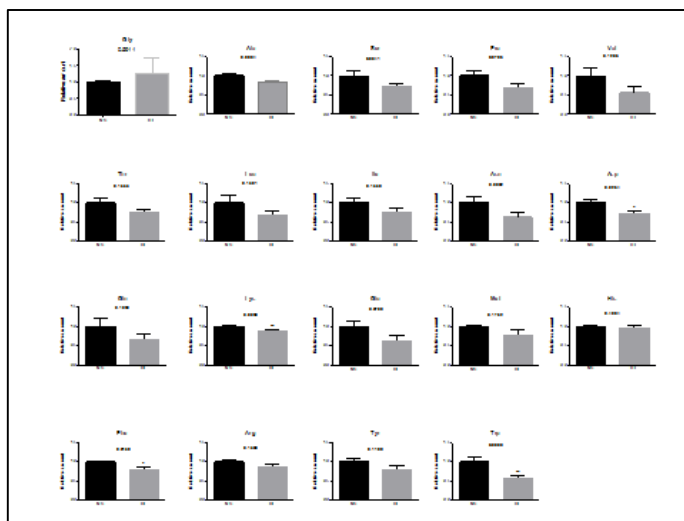


てキャンセルされることから、やはりグルコースによるインスリン合成（翻訳）が GCN2 活性化に重要であることを見出した。

3) 高脂肪食負荷マウスの豚β細胞における tRNA 定量解析

まず質量分析法(CE-MS 法)を用いて、それぞれのマウスから単離した腓ラ氏島に含まれるアミノアシル化 tRNA (charged tRNA)の定量を行った。その結果、通常食負荷マウスと比べて、高脂肪食負荷マウスの腓ラ氏島で有意にアミノアシル化 tRNA が減少していることが示された(図 4)。このことは、高脂肪食負荷マウスにおいて uncharged tRNA が増加していることを示すものである。すなわち、これにより GCN2 が活性化されるものと考えられる。

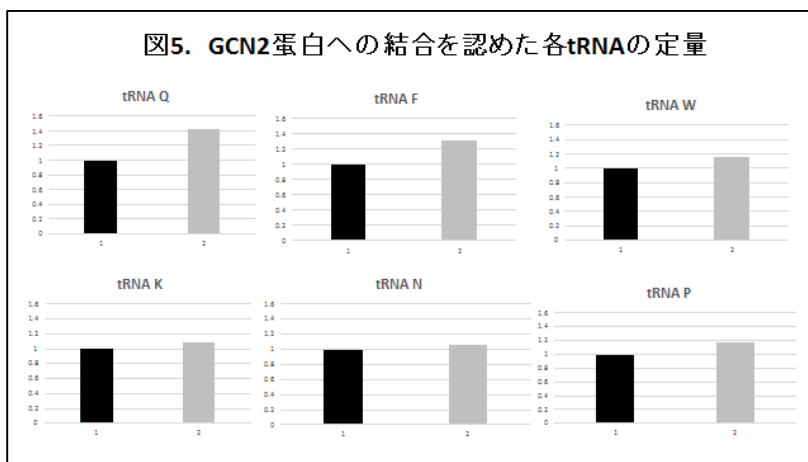
図 4. 通常食 (黒色) および高脂肪食 (灰色) 負荷マウスの腓ラ氏島におけるアミノアシル化 tRNA の定量



4) 膵β細胞における GCN2 と free tRNA の結合能に関する検討

通常食 (黒色) および高脂肪食 (灰色) 負荷マウスの腓ラ氏島を単離し、GCN2 に結合している tRNA をアミノ酸別に real-time PCR によって定量した。対応するアミノ酸として、グルタミン(Q)、フェニルアラニン(F)、トリプトファン(W)、リジン(K)、アスパラギン(N)、プロリン(P)について検討を行った(図 5)。今回の検討では、グルタミンとトリプトファンにおいては高脂肪食負荷マウス(灰色)の腓ラ氏島で GCN2 との結合が亢進傾向にあると思われたが、有意な差は認められなかった。条件検討 (単離膵島の保存状態など) も含めて、今後も実験を重ねる必要があると思われる。

図5. GCN2蛋白への結合を認めた各tRNAの定量



○研究がもたらす効果及び波及効果

本研究成果は、現在論文投稿準備中であるが、これまでに糖尿病学会や内分泌学会において研究奨励賞などを受賞しており、一定の注目を集めている。特に、質量分析法を用いた膵ラ氏島におけるアミノ酸濃度および tRNA 定量は、新しい知見であり、今後応用が期待される結果であった。また本邦における GCN2 遺伝子の SNP 保有者が、今回申請者が明らかにした機序で 2 型糖尿病を発症していると仮定すれば、ゲノム遺伝子における SNP 診断によって、適切な治療法を選択することも可能になると期待される。