

メタボローム解析を用いた
グルコース応答性インスリン分泌における
解糖系酵素の役割の検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系糖尿病代謝内科学専攻

山名 碧

修了年 2019 年

指導教員 石原 寿光

【背景・緒言】

2 型糖尿病は、肥満などの環境因子に伴うインスリン抵抗性と膵 β 細胞からのインスリン分泌不全によって発症する。個々の症例によりその病態は不均一であり、遺伝因子の影響が大きいことが示されている。ゲノムワイド関連解析により、2 型糖尿病の発症には多くの座位が関与していることが報告されているが[1, 2]、これら遺伝子と糖尿病との因果関係は不明な点が多い。このような背景から、膵 β 細胞の機能に関連する遺伝子の抽出・検討を行うことが重要と考える。

インスリン分泌刺激に最も重要な分子はグルコースである。現在、提唱されているインスリン分泌機構の概要は以下の通りである。グルコースが膵 β 細胞内に取り込まれると、解糖系とそれに続く TCA 回路で代謝され、電子伝達系を介して ATP が大量に産生される。細胞質 ATP/ADP 比が増大すると K_{ATP} チャンネルが閉鎖し細胞膜の脱分極が起こることで、電位依存性の Ca チャンネルが開口し、Ca が細胞内に流入することでインスリン分泌が惹起される[3, 4, 5]。また、ミトコンドリアを直接刺激する α ケトイソカプロン酸は強力なインスリン分泌刺激分子であることが知られているが、その作用はグルコースより弱く、このことは解糖系の重要性を示唆している。

現在、インスリン分泌機構の研究においてメタボローム解析が応用されつつあるが、技術・学術的には発展途上にありまだその端緒についたばかりである。これまでのところ、グルコース刺激したインスリン分泌細胞のメタボロームを解析した報告は少なく[6]、また、解糖系および関連酵素の発現を抑制したインスリン分泌細胞でのメタボローム解析は行われていない。

【目的】

グルコース応答性インスリン分泌機構における解糖系関連酵素の役割を解明するために、MIN6 細胞を用いて、解糖系関連酵素や解糖系に影響を及ぼす酵素の遺伝子修飾を行い、インスリン分泌実験とメタボローム解析をくみあわせることで、その役割を検討する。

【方法】

本研究では Glucokinase (Gck)、Pyruvate dehydrogenase alpha 1 (Pdha1)、Phosphoglycerate

kinase 1 (Pgk1)の発現を抑制、また、Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pck1)を強制発現させたドキシサイクリン誘導性インスリン分泌安定 MIN6 細胞株を作成した。遺伝子発現修飾には当教室で開発した recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) 法を応用した方法を使用し、ほぼ 100%の効率の良い遺伝子導入が可能となっている[7, 投稿中]。遺伝子発現の抑制には short hairpin RNA を用いた RNA interference を使用した。

5 mM、12.5 mM、20 mM グルコース 1 時間培養時のインスリン分泌実験を行い、また、ヒューマンメタボロームテクノロジー社の受託解析を利用しグルコース負荷後の細胞のメタボローム変化を検討した。解糖系関連酵素の発現を修飾することによるインスリン分泌応答と細胞内代謝の変化を比較して、その関連を検討した。

【結果】

Gck ノックダウン細胞では、Glucose-6-phosphate (G6P) は減少し、3-Phosphoglycerate (3PG) 以降の解糖系と TCA 回路の代謝産物も減少した。ATP/ADP も減少していた (0.47 倍 (14.37 \pm 0.06 vs. 6.70 \pm 0.10, $p < 0.0001$, $n = 3$))。20 mM グルコース負荷において、インスリン分泌量の減少を認めた (0.48 倍 (209.6 \pm 53.5 ng/well (DOX なし) vs. 99.8 \pm 35.9 (DOX 1.0 μ g/ml) , $p = 0.0106$, $n = 4$))。

次に Pdha1 ノックダウン細胞では、3PG、2-Phosphoglycerate(2PG)、Pyruvate は増加、Citrate 以降の TCA 回路中間体は減少した。ATP/ADP は減少した (0.45 倍 (14.37 \pm 0.06 vs. 6.5 \pm 0.36, $p < 0.0001$, $n = 3$))。細胞内インスリン含有量は増加し (2.18 倍 (2890.35 \pm 334.84 vs. 6129.59 \pm 279.23, $p < 0.01$, $n = 4$))、インスリン分泌量は変化しなかった。インスリン分泌応答を評価するためにインスリン分泌量/インスリン含有量を計算し、12.5 mM グルコース負荷において減少した (0.32 倍 (9.29 \pm 1.00% vs. 2.93 \pm 0.66, $p = 0.0152$, $n = 4$))。Ins1、Ins2 の mRNA 発現量についてはコントロールと比較し、変化を認めなかった。

次に、Pgk1 ノックダウン細胞では、3PG、2PG、Phosphoenolpyruvate (PEP)は減少し、Pyruvate は変化しなかった。TCA 回路の中間体は全体的に低下し、ATP/ADP は減少した (0.72 倍 (14.37 \pm 0.06 vs. 10.3 \pm 0.56, $p = 0.0002$, $n = 3$))。20 mM グルコースでインスリン分泌は増加し (1.47 倍 (247.54 \pm 74.60 vs. 364.02 \pm 71.09, $p = 0.0424$, $n = 3$))、インスリン含有量も増

加した (1.60 倍 (39.79 ± 14.90 vs. 63.50 ± 12.59 , $p = 0.0180$, $n = 3$)). インスリン分泌/インスリン含有量は有意な変化を認めなかった。Ins1、Ins2 mRNA 発現量については、Ins1 は増加し (1.28 倍 (1.00 ± 0.21 (DOX なし) vs. 1.28 ± 0.25 (DOX 1.0 $\mu\text{g/ml}$), $p = 0.0481$, $n = 3$)), Ins2 では変化しなかった。ただし、コントロール群において Ins1 mRNA の絶対量は Ins2 に比して約 1/1000 と、発現量に大きく差が生じる結果となった。

最後に、Pck1 を過剰発現させた細胞では、3PG、PEP が増加し、TCA 回路の生成物は減少した。ATP/ADP (0.65 倍 (14.37 ± 0.06 vs. 9.37 ± 0.31 , $p < 0.0001$, $n = 3$)) は減少した。20 mM グルコースによるインスリン分泌は低下し (0.53 倍 (1.96 ± 0.78 vs. 1.05 ± 0.64 , $p = 0.0280$, $n = 3$)), インスリン含有量、インスリン分泌/インスリン含有量は変化を認めなかった。

【考察】

本研究では解糖系関連酵素の遺伝子発現を修飾することにより、インスリン分泌実験とメタボローム解析を組み合わせ、その変化をみることで、インスリン分泌 MIN6 細胞のグルコース代謝とインスリン分泌のメカニズムの関連を検討した。

まず、Gck ノックダウン細胞では G6P の低下、TCA サイクル代謝物、ATP の低下を認めることができ、インスリン分泌の低下を説明できる結果と考えられる。予想された結果であるが、MIN6 細胞におけるメタボローム解析が、インスリン分泌機構の解明の新たな方法になることが検証できたと考えられる。

Pdha1 ノックダウンにおいても、TCA 回路以降の抑制、ATP 産生低下が認められ、インスリン分泌応答機能は低下していた。興味深いことに、インスリン産生の増加が認められたが、Ins1、Ins2 mRNA 発現量に変化はみられず、mRNA の翻訳以降のインスリン合成過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、pyruvate の代謝が進まないために、解糖系中間体が蓄積していた。過去の報告では解糖系下位中間体がインスリン遺伝子プロモーターの活性化に重要であることが示されている[8]。重要な役割を果たす解糖系中間体を絞り込むために、Pgk1 のノックダウン、Pck1 の強制発現により更なる検証を行った。

Pgk1 ノックダウン細胞では ATP の低下が認められるにも関わらず、インスリン含有量の増加のため、インスリン分泌量も増加していた。Ins1、Ins2 mRNA 発現量の検討では、Ins1

のみ有意な増加が認められたが、Ins1 mRNA 量は継代経過とともに大幅に減少することが報告されており[9]、Ins1 mRNA の増減によるインスリン合成への影響は少ないと推測される。Pck1 を強制発現させた細胞では、解糖系下位中間体は増加したが、インスリン含有量は変化しなかった。

以上より、すべての細胞において、TCA 回路代謝産物の低下、ATP 産生の低下を認め、インスリン分泌量の変化に違いはみられたものの、含有インスリンに対する分泌の割合は低下 (Ggk1 ノックダウンについては低下傾向) を認め、K_{ATP} 依存性のインスリン分泌機構から説明できる結果となった。

また、解糖系中間体の変化とインスリン含有量の増加から、解糖系中間体によるインスリン合成制御の可能性が示唆された。測定できた中間体からはインスリン含有量に関わる中間体を特定できず、1,3-bisphosphoglycerate、Glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P)、Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) の可能性が残る。また、インスリン合成制御のメカニズムについてはインスリン遺伝子の mRNA への転写レベルへの影響は否定的であり、mRNA の翻訳以降のインスリン合成過程に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。最近の報告で、PGK1 の抑制により増えた GA3P、DHAP から methylglyoxal が大量に産生され、KEAP1-NRF2 シグナルを活性化させ、NRF2 が転写因子となって細胞の抗酸化作用を示すということが示された[10]。NRF2 の活性化がインスリン分泌を増加させることは、過去に報告されており[11]、この報告からも、今回の考察が支持されるのではないかと考えた。

解糖系酵素の発現を修飾した細胞のメタボローム解析により、グルコース刺激時のメタボライト生成の流れが明らかとなった。しかし、多くの代謝経路が連動して作動しており、1 つの代謝経路のみを修飾することができないため、これだけである特定の代謝経路の役割を明らかにすることは難しい。また、今回のメタボローム解析は、測定項目に関しては、感度等が考慮されて規定されているため、すべての解糖系の代謝産物が測定されないという限界があった。システムとしてとらえて解析する方法論が必要であり今後検討していく。

【結語】

グルコース代謝に関連する遺伝子の発現を修飾したインスリン分泌細胞におけるインスリンの分泌と含有量を検討し、またその時のメタボロームの変化を明らかにした。その結果、解糖系中間体がインスリン産生に重要な役割を果たす可能性が示唆され、糖尿病の前段階における発症のメカニズム解明の新たな一歩になりうると考えられた。

【引用文献】

1. Rodes CJ: Type 2 diabetes-a matter of β -cell life and death? *Science*. 307: 380-384, 2005.
2. Morris AP, Benjamin FV, Tanya MT, Teresa F, Ayellet V, et al.: Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 44: 981-990, 2012.
3. Jensen MV, Joseph JW, Ronnebaum SM, Burgess SC, Sherry AD, Newgard CB: Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295: E1287-E1297, 2008.
4. Newsholme P, Gaudel C, McClenaghan NH: Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. *Adv Exp Med Biol*. 654: 91-114, 2010.
5. Newsholme P, Krause M: Nutritional regulation of insulin secretion: Implications for diabetes. *Clin Biochem Rev*. 33: 35-47, 2012.
6. Guay C, Joly E, Pepin E, Barbeau A, Prentki M, et al.: A role for cytosolic isocitrate dehydrogenase as a negative regulator of glucose signaling for insulin secretion in pancreatic β -cells. *PLoS One*. 8: e77097, 2013.
7. 古川麻美: 高効率遺伝子導入を可能とするインスリン分泌細胞株の樹立とその応用. 日本大学医学研究科博士課程, 学位論文, 2015.
8. German MS: Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: The key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *PNAS*. 90: 1781-1785, 1993.
9. Roderigo MH, Hauge EAC, Persaud SJ, Jones PM: Differential expression of insulin genes 1 and 2 in MIN6 cells and pseudoislets. *Biochem Biophys Res Commun*. 296: 589-595, 2002.
10. Bollong MJ, Lee G, Coukos JS, Yun H, Zambaldo C, Moellering RE, et al.: A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling. *Nature*. 562: 600-604, 2018.

11. Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Yamamoto M. et al.: The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol.* 33: 2996-3010, 2013.