

## 論文の内容の要旨

氏名：河野 玄太

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：グルコース応答性インスリン分泌における TCA 回路酵素の役割の検討

グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) のシグナル伝達経路において、ミトコンドリア由来の citrate、glutamate などの代謝産物は、インスリン分泌の 2 相目に関与していると考えられている。Adam らは、*Fh1* (*Fumarate hydratase 1*) ノックアウトマウスを用いて、TCA 回路酵素である *Fh1* を欠損させると、重篤な糖尿病になると報告している (Cell Rep. 2017)。しかし、細胞レベルで GSIS が障害されているかは不明であり、MIN6 細胞を用いて、*Fh1* ノックダウン (KD) 細胞を作成し検討した。さらに、TCA 回路を構成する酵素の一つである、*Ogdh* (*Oxoglutarate dehydrogenase*)、*OgdhL* を KD した細胞も作成し検討した。ドキシサイクリン (DOX) 誘導性に、*Fh1*、*Ogdh*、*OgdhL* 遺伝子に対する shRNA を発現する細胞を作成し、放射性同位体標識グルコースを用いた [5-3H]glucose 代謝及び [U-14C]glucose 代謝の測定、GSIS の測定、細胞抽出液のメタボライト解析を行った。メタボライト解析は、3-NPH または MTBSTFA で誘導化し、LC-MS/MS を用いて解析を行った。

*Fh1*KD では、解糖系流量は有意に増加し ( $100 \pm 8$  (任意単位) (DOX-) vs.  $120 \pm 10$  (DOX+),  $p = 0.0370$ ,  $n = 3$ )、ATP/ADP 比は保たれていたが、citrate は減少 ( $100 \pm 12$  vs.  $90 \pm 12$ ,  $p = 0.0330$ ,  $n = 5$ )、glutamate も減少して ( $100 \pm 12$  vs.  $82 \pm 9$ ,  $p = 0.0041$ ,  $n = 5$ )、GSIS は低下した ( $100 \pm 13$  vs.  $76 \pm 12$ ,  $p = 0.0405$ ,  $n = 4$ )。また、*Ogdh*KD では、解糖系流量は減少 ( $100 \pm 9$  vs.  $78 \pm 8$ ,  $p = 0.0240$ ,  $n = 3$ )、ミトコンドリア代謝は減少し ( $100 \pm 11$  vs.  $82 \pm 11$ ,  $p = 0.0460$ ,  $n = 3$ )、ATP/ADP 比が小さくなる傾向で、citrate を含む多くの代謝産物が減少しているにもかかわらず、glutamate の増加を認め ( $100 \pm 13$  vs.  $125 \pm 19$ ,  $p = 0.0297$ ,  $n = 5$ )、GSIS が維持された ( $100 \pm 18$  vs.  $98 \pm 26$ ,  $p = 0.7964$ ,  $n = 3$ )。さらに、*Ogdh*KD では、グルコース還流実験において、インスリン分泌の第 2 相が相対的に増加した。*Ogdh*LKD では、*Ogdh*KD と同様の方向の結果であった。citrate に比較して、glutamate が、より大きく GSIS に関連する結果となり、glutamate が、ミトコンドリア由来の分泌シグナル形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。