

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390494

研究課題名（和文）肥満やインスリン分泌異常を引き起こす新規分子の役割解明研究

研究課題名（英文）Studies on the role of PRIP in insulin secretion

研究代表者

兼松 隆（KANEMATSU TAKASHI）

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：10264053

研究成果の概要：

我々は、PRIP 分子を新規イノシトール 1,4,5-三リン酸結合性タンパク質として見出し、PRIP-1/-2 ダブルノックアウトマウス(DKO マウス)を作製しその表現型解析を行った。そして、DKO マウスが高インスリン血症を示すことを明らかにし、その原因がインスリン開口放出が亢進したことによることを見出した。さらに、これは PRIP とタンパク質脱リン酸化酵素複合体によるリン酸化制御異常によることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、歯科薬理学、インスリン、開口分泌、ノックアウトマウス、2光子レーザー顕微鏡、脾臓 細胞

1. 研究開始当初の背景

最近の歯科医療界の中心的命題の一つは、「科学的根拠に基づき歯科疾患と全身疾患との関係を明らかにし健康科学に大いに貢献すること」である。例えば、臨床疫学的な研究により、歯周病は糖尿病等の増悪因子であり、また原因ともなりうる事が明らかとなった。このような科学的根拠に基づき歯科診療をおこなう EBD (Evidence-based dentistry) が今注目をあびている。このような状況にあって、臨床の現場からは歯科基礎医学研究から得た evidence を臨床応用に結

びつけていくことが期待されている。本申請では、臨床応用の基盤となる基礎研究をおこない、その evidence を臨床応用研究へと展開させることを目指す。

申請者は、PRIP 分子を新規イノシトール三リン酸[Ins(1,4,5)P₃]結合性分子として発見し (J Biol Chem, 1992) 遺伝子クローニングを行ない (Biochem J, 1996) そのノックアウトマウスの作製を行なった (EMBO J, 2002) として、これまでに以下のことを明らかにしている。

(1) PRIP とは、PLC-Related catalytically

Inactive Protein の略で、PLC- と類似領域を持つものの、PLC 酵素活性を持たない新しいタンパク質である。

(2) PRIP は、Ins(1,4,5)P₃/Ca²⁺放出シグナリング系において、産生された Ins(1,4,5)P₃ を細胞質中でトラップすることで Ins(1,4,5)P₃ シグナルの維持/増強に関わることを明らかにした。

(3) PRIP 相互作用分子 [GABARAP (GABA_A receptor associated protein)・GABA_A receptor subunit・PP-1, -2A(protein phosphatase-1, -2A)]を明らかにし、これら相互作用分子の機能的役割から、GABA_A 受容体の一生(輸送・活性制御・エンドサイトーシス)における PRIP の役割を明らかにした。

1 GABARAP とは GABA_A 受容体の 2 サブユニットに結合して受容体の形質膜発現を調節する分子であるが、PRIP は GABARAP 分子の機能を調節して、2 サブユニットを含んだ GABA_A 受容体の膜発現量調節に関わることを明らかにした。2 サブユニットは、ジアゼパム(抗不安薬)の標的分子である。よってこの成果は、GABA_A 受容体の構築・輸送のメカニズムを解明する上で重要な発見であった。

2 PRIP は、プロテインホスファターゼ(PP-1, PP-2A)に結合しその活性を制御することで GABA_A 受容体の形質膜上での脱リン酸化(チャネル活性)を制御する。

3 PRIP は、GABA_A 受容体 サブユニットに結合して、受容体のエンドサイトーシス過程を制御する。

そして、このノックアウト(PRIP-KO)マウスの表現型解析を更に進める中、肥満・糖尿病研究において以下に挙げる興味深い表現型に気がついた。

1) PRIP-KO マウスは、野生型に比べ、メスでは体重が30%程度増加するが、オスでは逆に体重が減少する傾向を認めた。

2) 食餌量はオスでもメスでも15~40%程度増える。(過食)

3) オスでもメスでも血糖値が20~30%程度低い。(低血糖)

これらの研究背景をもとに、本研究提案をおこなった。

2. 研究の目的

肥満・糖尿病といった生活習慣病と歯周病との関連が明らかになりつつあるなか、未だ肥満や糖尿病発症のメカニズムには不明な点が多く、医科歯科を問わずその分子病態を明らかにすることが求められている。我々は、新規分子(PRIP)を発見しその機能解析を進める中、この分子が肥満や糖尿病に関係する分子であることを見出した。本研究では、PRIP 分子の変異や欠損が引き起こす肥満状態やインスリン分泌異常の分子メカニズムを明らかにし、肥満や糖尿病に起因する歯周

病憎悪の病態進行メカニズムを理解することを第一の目的とする。さらに、将来的に PRIP 分子に関わる生活習慣病発症のメカニズムを明らかにすることを目指して、その分子基盤に迫ることを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) DKO マウスの系統維持と戻し交配

DKO マウスの系統維持のための交配や実験に供するマウスの交配をおこない、DKO マウスの維持管理を行なった。また、C57BL/6J マウスへの戻し交配を PRIP-1 KO と PRIP-2 KO 別々に順次進め、両系統の維持と戻し交配を実行した。作出されたマウスは、それぞれ遺伝子型を判定して、必要な野生型および DKO マウスを選別し飼育し、必要に応じて、戻し交配が進んだマウス同士の交配により、再び DKO マウスを作製して、バックグラウンドの整ったマウス作出を行った。

(2) DKO 表現型の基本的解析

DKO マウスと野生型マウスの体重変化をモニターしながら、食餌量、基礎代謝量、血糖値変化・耐糖能・インスリン抵抗性等の解析を行った。また、高脂肪食を与えた時の体重変化等を調べた。

(3) 細胞の形態学的・組織学的解析

DKO マウスの膵臓の組織学的解析により膵臓ラ氏島の形態(サイズ)を組織学的に観察した。また、単離したラ氏島を用いて細胞・細胞を抗グルカゴン抗体・抗インスリン抗体で染色し、形態学的変化を光学・蛍光あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞・細胞のサイズや量を計測し、細胞の形態変化の解析を行った。さらに、単離したラ氏島を用いて電子顕微鏡解析を行い、インスリン分泌顆粒の分布の違いを検討した。

(4) 細胞のインスリン分泌解析

DKO マウスと野生型マウスの膵臓ラ氏島の分離培養をおこない、グルコース刺激・KCl 刺激等を行なった時のインスリン・グルカゴン分泌量を測定した。PRIP は小胞輸送に関与すると考えられるので、新たに膜にドッキングして分泌されるインスリン量が増加していると推察されたため、刺激後短期間におこるインスリン分泌量に着目して解析を進めた。野生型・DKO マウスでインスリン分泌量がことなることが明らかとなったため、2光子レーザー顕微鏡を用いてインスリンの開口放出の可視化実験を行い、開口放出過程を詳しく解析した。

(5) 細胞の Ca²⁺濃度変化解析

インスリンの分泌過程には、細胞内 Ca²⁺濃度変化[細胞外からの Ca²⁺流入(主にこれが重要)や細胞内 Ca²⁺ストアからの放出]が重要である。そこで、膵臓ラ氏島から分離培養した細胞を用いて、グルコース刺激を行なった時の細胞内 Ca²⁺濃度変化を野生型と比較して

測定した。

(6) PRIP 機能発現に重要な相互作用分子解析

PRIP ミュータントをもちいて PRIP の機能発現に重要な領域や必要な相互作用分子の同定を行った。そして、タンパク質脱リン酸化酵素によるシグナリング調節が重要であることを見出したため、2光子レーザー顕微鏡を用いた解析と組み合わせて、タンパク質リン酸化・脱リン酸化反応の開口放出に及ぼす役割を解析した。

4. 研究成果

1. DKO マウスの作出と維持管理は、予定していた通りにはこんだ。また、C57BL/6J マウスへの戻し交配 (PRIP-1 KO と PRIP-2 KO 別々に順次進めた) も予定通りにおこなえた。そして、最終的に受精凍結胚の形で保存することができた。しかしながら、戻し交配が進んだマウス同士を交配し、再び DKO マウスを作製してバックグラウンドの整ったマウスを作出したところ、出産や子育てに問題が出てきたため、当初の計画を変更して、戻し交配を重ねていない世代で実験を行うことにした。

2. DKO マウスと野生型マウスの体重変化を測定し、n 数を増やし解析しなおしたところ、やはり、雌マウスで体重の増加が有意に観察された。しかしながら、雄マウスでの体重変化は、雌マウスのように野生型に比べて大きくなく肥満というよりは痩せ型の傾向をしました。そこで、基礎代謝を測定したところ、代謝量の亢進があることがわかった。食餌量は、雌雄ともに DKO マウスで有意に過食であった。血糖値変化は、雌雄ともに DKO マウスで野生型に比べて低い値で推移した。耐糖能実験でも、インスリンの過剰分泌を示唆する結果となった。しかしながら、インスリン抵抗性実験では、このマウスはインスリン抵抗性を示すことはなく、PRIP 遺伝子欠損によるインスリン過剰分泌とインスリン抵抗性には相関関係がないことがわかった。(むしろインスリン抵抗性を改善するように働いている可能性を示唆しているかもしれない)。

3. DKO マウスの膵臓の組織学的解析により膵臓ラ氏島の形態 (サイズ) を組織学的に観察した結果膵臓ラ氏島の肥大化が疑われた。また、単離したラ氏島を用いて細胞・細胞を抗グルカゴン抗体・抗インスリン抗体で染色し、形態学的変化を光学・蛍光あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、両者に分布の差は認められなかった。また、細胞数の大きな変化がなく、よって、一つ一つの細胞の肥大化が示唆できた。これは、インスリン分泌能の亢進がおこる一つの要因である可能性を示唆するかもしれない。また、電子顕微鏡解析の結果、DKO マウスでは形質膜

から 200 nm までで区切られる分画の分泌顆粒の数が増加していることがわかった。

4. DKO マウスと野生型マウスの膵臓ラ氏島の分離培養をおこない、インスリン・グルカゴンの含有量を測定した結果、両者に大きな違いは見られなかった。その後、膵臓ラ氏島の分離培養細胞塊を用いて perfusion assay を行った結果、インスリンの分泌量の更新を認めた。そこで、2光子レーザー顕微鏡を用いてインスリンの開口放出の可視化実験を行い、開口放出過程を詳しく解析した。2光子レーザー顕微鏡の可視化実験は、自然科学機構生理学研究所脳機能解析学センター根本知己先生に協力 (共同研究) を依頼し解析を行った。その結果、インスリンの開口放出頻度の昂進が認められた。一方、インスリン顆粒の大きさなどインスリンの放出を亢進させる他の要因には、大きな変化がないことがわかった。

5. グルコース刺激時のインスリン分泌過程でみられる細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定したところ、DKO マウスと野生型マウスでは Ca^{2+} 流入量に大きな差がなかった。

6. 2光子レーザー顕微鏡解析を行って、タンパク質リン酸化・脱リン酸化反応制御が PRIP の開口放出制御機構に大いにかかわることを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Takashi Kanematsu, Atsushi Yasunaga, Yoshito Mizoguchi, Akiko Kuratani, Josef T. Kittler, Jasmina J. Jovanovic, Kei Takenaka, Kei-ichi Nakayama, Kiyoko Fukami, Tadaomi Takenawa, Stephen J. Moss, Junichi Nabekura, Masato Hirata.

Modulation of GABA_A receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition.

J Biol Chem. 281:2006, 22180-22189.

査読あり

2. Satoko Yanagihori, Miho Terunuma, Kiyoshi Koyano, Takashi Kanematsu, Sung Ho Ryu, Masato Hirata.

Protein phosphatase regulation by PRIP, a PLC-related catalytically inactive protein--implications in the phospho-modulation of the GABA_A

receptor.
Adv Enzyme Regul. 46:2006,203-222.
査読あり

3 . Takashi Kanematsu, Makoto Fujii, Akiko Mizokami, Josef T. Kittler, Junichi Nabekura, Stephen J. Moss, Masato Hirata.

Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABA(A) receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex.

J Neurochem 101, 2007:898-905.
査読あり

4 . Akiko Mizokami, Takashi Kanematsu, Hitoshi Ishibashi, Taku Yamaguchi, Isei Tanida, Kei Takenaka, Kei-ichi Nakayama, Kiyoko Fukami, Tadaomi Takenawa, Eiki Kominami, Stephen J. Moss, Tsuneyuki Yamamoto, Junichi Nabekura, Masato Hirata

Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA_A receptors to the cell surface.

J Neurosci. 27:2007, 1692-1701.
査読あり

5 .Hiroaki Wake, Miho Watanabe, Andrew J. Moorhouse, Takashi Kanematsu, Shoko Horibe, Noriyuki Matsukawa, Kiyofumi Asai, Kosei Ojika, Masato Hirata, Junichi Nabekura.

Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation.

J Neurosci. 27:207, 1642-1650.

6 . Jing Gao, Hiroshi Takeuchi, Zhao Zhang, Makoto Fujii, Takashi Kanematsu and Masato Hirata

Binding of phospholipase C-related but catalytically inactive protein to phosphatidylinositol4,5-bisphosphate via the PH domain

Cellular signalling

in press

査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1 . 兼松 隆、平田雅人
インスリン分泌における新規分子 (PRIP) の
関わり
2007 .9.

2 . Takashi Kanematsu, Seijiro Shioi, Masato Hirata

Action of PRIP, an Ins(1,4,5)P₃ binding protein, in insulin secretion.

Biochemistry and Molecular Biology 2007

2007. 12. 11~15

横浜市

3 . 兼松隆、根本知己、平田雅人

PRIP 遺伝子欠損マウスは高インスリン血症を示す

第 82 回日本薬理学会年会

2009.3.17

横浜市

4 . 兼松隆

インスリン分泌に関わる新奇分子 PRIP の役割

平成 21 年度日本生化学会九州支部例会

シンポジウム「開口分泌の分子基盤」

2009.5.17

福岡市

〔図書〕(計 2 件)

1 . Masato Hirata, Takashi Kanematsu, Akiko Mizokami

Springer

Interface Oral Health Science 2007

2007, 385 ページ

2 . 兼松 隆

ケバプロ

ブレインサイエンスレビュー2008(新奇分子を介した GABA_A 受容体輸送調節の分子基盤解明)

2009, 290 ページ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

兼松 隆 (KANEMATSU TAKASHI)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号 : 17102941

(2)研究分担者

塩井 誠次郎 (SHIOI SEIJIRO)

九州大学・大学院歯学研究院・特任助手(H18)

福岡大学・RI センター・助教(H20)

研究者番号 : 80423531

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

根本 知己 (NEMOTO TOMOMI)

自然科学機構・生理学研究所・准教授

溝上 顕子 (MIZOKAMI AKIKO)
九州大学・大学院歯学研究院・学振特別研究員

恒松 加代子 (TSUNEMATSU KAYOKO)
九州大学・大学院歯学研究院・技能補佐員