

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591128

研究課題名（和文）

インスリン分泌を制御する新規のアシル化蛋白の同定とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）

Identification of novel acylated proteins regulating insulin secretion and exploration of their physiological significance

研究代表者

駒津 光久 (KOMATSU MITSUHISA)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：90221978

研究成果の概要（和文）：近年急増している 2 型糖尿病では膵 β 細胞からのインスリン分泌が低下している。本研究ではそのインスリン分泌のあらたなメカニズムを解明する。ブドウ糖は膵 β 細胞の KATP チャンネルを閉鎖することでインスリン分泌を引き起こすとされている。本研究で我々は、ラットランゲルハンス氏島を用いて、糖尿病の治療薬ターゲットとしても注目を集めているインクレチン作用が存在すると KATP チャンネルが関与せずにインスリン分泌を惹起することができる実験モデルを確立した。

研究成果の概要（英文）：Insulin deficiency is an important pathophysiological feature in the evolution of type 2 diabetes. In the processes of insulin release from pancreatic beta-cells, glucose-induced closure of KATP channels is known to be essential. However, we established the experimental model using rat pancreatic islets that glucose triggered acute insulin release in the presence of incretin signaling in a KATP channel-independent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン分泌、ブドウ糖、インクレチン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者でのインスリン分泌障害の原因解明には、生理的なインスリン分泌制御機構の解明が必須であるが、これまでのところ、生理的な血糖値の上昇に応じたインスリン

分泌増加反応の分子基盤の全容は明らかになっていない。我々は、ブドウ糖が ATP 感受性 K^+ チャンネル（KATP チャンネル）の閉鎖を介さずにインスリン分泌刺激を起こすことを世界に先駆けて見出し、そのメカニズム

の解明に努力してきた。その結果、蛋白のアシル化とくにパルミチン化が重要であるという作業仮説に到達した。また、このブドウ糖作用は GLP-1 などのインクレチンと相乗的に作用して生理的なインスリン分泌制御に重要であることも明らかにした。本課題の開始時における目標は、膵β細胞における新規アシル化蛋白の同定であった。この観点で、我々は最終的に2つの具体的な蛋白の同定に至ったが、その蛋白が膵β細胞においてインスリン分泌などの生理的機能の制御を行っていることは証明出来なかった。このテーマは今後をも継続していくことにした。この研究を継続するなかで以下に述べるような、「KATP チャンネル非依存性経路」の生理的意義を考える上で重要な実験モデルの発見に至った。

2. 研究の目的

ブドウ糖によるあらたな「KATP チャンネル非依存性インスリン分泌刺激作用」をしめす実験モデルの確立。

3. 研究の方法

①我々が最近独自に確立した「パルミチン化した蛋白を特異的に同定する方法」と網羅的な蛋白質解析法であるプロテオーム解析を組み合わせ、KATP 非依存性のブドウ糖によるインスリン分泌刺激の分子基盤を解明することを主目的とする。さらに、HPLC を用いて各種細胞内情報伝達物質 (ATP, ADP, GTP, GDP, NADPH, cAMP, 長鎖脂肪酸など) の定量とインスリン分泌実験を組み合わせ、インスリン分泌機構の詳細を検討し、インクレチン作用の分子基盤との関連を明らかにする。Acyl-biotinyl exchange (ABE) 法により細胞内におけるパルミチル化された蛋白質を特異的に精製することを試みた。

ABE 法とは次に示すような三段階の反応から構成される。Step 1 ;蛋白質のシステイン残基に存在する free の SH 基を N-ethylmaleimid (NEM) でブロックする。Step 2;タンパク質に結合しているパルミチル基を Hydroxylamine (HA) で外す。Step 3; Step 2 により新たに作られた free の SH 基を biotin でラベルし、streptavidin-agarose で特異的に biotin-labeled protein を回収する。

②コラゲナーゼ法で単離したラットランゲルハンス氏島 (ラ島) を用いてインスリン分泌を培養実験と灌流実験で、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ を fura-2 の蛍光変化を記録することで測定した。

4. 研究成果

①プロテオーム解析によりパルミチル化される蛋白を網羅的に解析し 151 個の蛋白スポットを認めた。その中でブドウ糖や脂肪酸刺激で変動する蛋白の構造解析をおこなった。しかし、膵β細胞で機能的な役割を果たしていると確信できる分子の同定には至らなかった。これは、今後の継続すべき課題となった。

②ラ島を高濃度ブドウ糖で刺激するとインスリン分泌は著しく増加する。インクレチン作用のセカンドメッセンジャーである cAMP をフォルスコリン (Fs) 刺激で増加させると高濃度ブドウ糖によるインスリン分泌は増強された。一方、ブドウ糖によるインスリン分泌機構で重要とされる KATP チャンネルの閉鎖と電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開放をそれぞれジアゾキシドおよびニフェジピンで抑制するとブドウ糖によるインスリン分泌は完全に抑制された。興味深いことに、ジアゾキシドおよびニフェジピンの存在下でも Fs に

より cAMP を増加させた条件下では、ブドウ糖はインスリン分泌を刺激した。この事実は、生理的条件下では、インクレチン作用が存在するので、KATP チャネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がおこらなくともインスリン分泌が惹起される可能性を示唆するものである。次に我々は、このブドウ糖作用が細胞外の Ca^{2+} 濃度に依存しているかを様々な濃度の Ca^{2+} を含む緩衝液で検討した。その結果、細胞外の Ca^{2+} 濃度を完全に除去するとこの作用は消失した。インスリン分泌のタイムコースを確認する目的で灌流実験をおこなうと、2.2 mM ブドウ糖刺激開始後、約1分でインスリン分泌の急峻な上昇を認めた。ピークは刺激後6分であり、この時のインスリン分泌速度の絶対値は約 30 pg/islet/min で、刺激まえの約6倍となっていた。またこの速度は、通常条件下でのブドウ糖刺激による第1相のピークにほぼ匹敵する値であった。インスリン分泌はその後漸増した。一方、fura-2 を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を測定すると、ジアゾキシドおよびニフェジピンの存在下ではブドウ糖後、 $[Ca^{2+}]_i$ は一過性に低下した。具体的には、刺激後3分で底値となり、10分後には刺激前の値にもどった。それ以降は $[Ca^{2+}]_i$ も漸増した。これらの結果から、刺激後最初の10分間は急峻なインスリン分泌と急峻な $[Ca^{2+}]_i$ の低下がみとめられ、従来の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がインスリン分泌を惹起するのに必須であるという考えに、大きな見直しを迫る結果である。10分以降は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められているので、KATP チャネルや電位依存性 Ca^{2+} チャネルに依存しないメカニズムで Ca^{2+} 流入をもたらす $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させており、これが10分以降の漸増するインスリン分泌と関連しているかもしれない。細胞外 Ca^{2+} を除去するとインスリン分泌が認められなくなったのは、10分以降のインスリン分泌が抑制

されたためと考えられる。もしくは、細胞外の十分な Ca^{2+} の存在がないと細胞膜直下の $[Ca^{2+}]_i$ が十分にたもてずインスリン分泌を引き起こせない可能性もある。この KATP チャネル、電位依存性 Ca^{2+} チャネルに依存しないブドウ糖によるインスリン分泌作用のメカニズムについて次に検討した。この作用は、ミトコンドリアで代謝されるアミノ酸である α -ketoisocaproic acid でもおこり、ミトコンドリアにおける電子伝達系を可逆的に阻害する sodium azide により抑制された。したがって、このブドウ糖作用もミトコンドリアでの代謝により生じた何らかのシグナルで媒介されていると考えられる。KATP チャネル非依存性経路には蛋白のアシル化が関与している可能性をわれわれは想定してきた。したがって、今回の実験系でもアシル化阻害薬であるセルレニンの効果を検討した。セルレニンは予想通り、ブドウ糖作用を濃度依存性に抑制した。このデータは今回見いだしたあらたなブドウ糖によるインスリン分泌刺激作用がミトコンドリアの代謝と何らかの蛋白のアシル化によりもたらされている可能性を示唆している。これらのデータは2011年のヨーロッパ糖尿病学会（リスボン）で発表し、その後 Endocrine Journal に原著論文として発表した。

この課題の研究期間にインスリン分泌機構の研究に関連するものとして、2型糖尿病患者におけるインスリン分泌刺激薬とインクレチン関連薬（DPP4 阻害薬）の併用効果の有用性を確認し、2012年のヨーロッパ糖尿病学会（ベルリン）で発表した。現在論文投稿準備中である。

インクレチンとインスリン分泌機構の関連で、いままでの我々の知見を中心として総説

を Endocrine Journal に、また新たな観点から生理的インスリン分泌機構に関する総説を J Diabetes Invest に執筆できたことも、本研究課題の成果としてあげたい。

今後は、今回発見したあらたな KATP チャネル非依存性のブドウ糖作用を実験モデルとして用いて、具体的なメカニズムの分子基盤を探りたい。プロテーム解析でまだ検討すべきスポットも得られており、さらに信州大学でプロテオーム解析が可能になった環境も活かして、長年追いつけてきた KATP チャネル非依存性のインスリン分泌刺激作用の全容解明に前進したい。

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 4 件)

- ① Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. J Diabetes Invest. 2013. Doi: 10.1111/jdi.12094 (査読有)
- ② Takei M, Dezaki K, Ishii H, Nishio SI, Sato Y, Suzuki S, Yada T, Komatsu M. A new experimental model of ATP-sensitive K⁺ channel-independent insulinotropic action of glucose: a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic beta-cells. Endocrine journal. 2013, 60:599-607 Jan 17. PubMed PMID: 23327802. Epub 2013/01/19. Eng. (査読有)
- ③ Mori J, Sato Y, Ishii H, Komatsu M. Bariatric surgery on type 2 diabetes mellitus patients in Japan. Shinshu

Med J 2011, 59(4):273-279 (査読有)

- ④ Ishii H, Sato Y, Takei M, Nishio S, Komatsu M. Glucose-incretin interaction revisited. Endocr J. 2011;58(7):519-525. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ishii H, Takei M, Nisio S, Sato Y, Suzuki S, Komatsu M. Combination therapy with low dose glimepiride and sitagliptin is reasonably effective for poorly controlled type 2 diabetes patients. 第 48 回ヨーロッパ糖尿病学会, 2012 年 10 月 1 日 ベルリン、ドイツ
- ② Takei M, Ishii H, Nisio S, Sato Y, Komatsu M. Acute triggering of insulin release concomitant with a decrease in cytosolic free Ca²⁺ concentration by a combination of glucose and cAMP. 第 47 回ヨーロッパ糖尿病学会, 2011 年 9 月 16 日 リスボン、ポルトガル

[図書] (計 1 件)

- ① Mori J, Sato Y, Komatsu M. Bariatric surgery on obese type 2 diabetes patients. Advanced Bariatric and Metabolic Surgery: 275-280, Edited by Chin-Kun Huang, In Tech, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒津 光久 (KOMATSU MITSUHIISA)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 90221978

(2) 研究分担者

鏑木 康志 (KABURAGI YASUSHI)

国立国際医療研究センター・代謝疾患研究
部病態代謝研究室・室長

研究者番号：40342927

野田 光彦 (NODA MITSUHIKO)

国立国際医療研究センター・代謝症候群診
療部・部長

研究者番号：90237850

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

