

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461352

研究課題名(和文) 膵細胞におけるGCN2活性化機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of GCN2 activation in pancreatic beta cells

研究代表者

木戸 良明 (Kido, Yoshiaki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10335440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病原因遺伝子の一つと考えられるGCN2を欠損させたマウスでは、膵細胞量が減少することにより耐糖能異常を呈することを我々は明らかにしている。本研究計画では、その分子機序を解明することを目的とした。その結果、膵細胞においてはインスリン合成亢進時に、GCN2が活性化されることによってmTORC1活性を調節し、翻訳を調節していることが明らかとなった。その制御機構が破綻することによって膵細胞不全が引き起これることが今回解明された。

研究成果の概要(英文)：We have previously clarified that GCN2 deficient mice displayed a reduced pancreatic beta cell mass. In this study, we aimed at elucidating the mechanism of the phenotype. As a result, GCN2 was found to regulate global translation by suppressing mTORC1 activity in beta cells when insulin translation was upregulated. This study showed that GCN2 inactivation or deficient resulted in pancreatic beta cell failure.

研究分野：糖尿病学

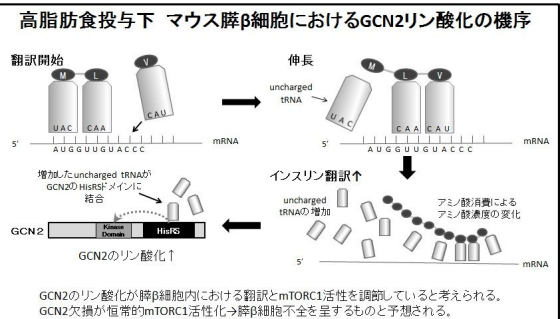
キーワード：膵細胞 アミノ酸 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の発症において、インスリン抵抗性と並んで膵β細胞分泌不全の重要性が注目されている。近年膵β細胞機能は糖尿病発症初期から既に障害されていることが明らかとなってきた。インスリン分泌の障害とともに、膵β細胞量も 2 型糖尿病において減少していることは、多くの報告より確かなものとなってきたが、糖尿病発症のどのステージでどのようなメカニズムが関与して減少するのかについては、いまだ不明な点が多い。

代表者を含む膵β細胞研究者らによって、膵β細胞においては過剰なインスリン合成やインスリンシグナル亢進が膵β細胞量減少に寄与している可能性が報告されている。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 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 (一塩基多型) 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。代表者は平成 22 年度科学研究費において「ストレス下における GCN2 による膵β細胞量調節機構の解明」をテーマとして採択され、以下のことを明らかとしている。1) 代表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。しかしながら通常食下では GCN2 欠損マウスにおける表現型が認められず、高脂肪食負荷がどのようなメカニズムで恒常的 mTORC1 活性化をきたし、膵β細胞量を減少させるのかについては明らかでない。代表者は高脂肪食負荷マウスにおいて膵島特異的に 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構築した(下図)。



2. 研究の目的

これまでに GCN2 が欠損すると膵β細胞量が減少することは明らかにしているが、2 型糖尿病のどのような状態で GCN2 が機能しているかについては全く分かっていない。代表者は過食などによるインスリン過剰合成が GCN2 を活性化し、膵β細胞量を調節しているという仮説を考え、その機序として、過食(高脂肪食)によってインスリンが過剰に合成されると膵β細胞内のアミノ酸需要が供給を上回ることによって「相対的に」欠乏すると予想した。その結果、膵β細胞内における free tRNA 濃度が上昇し、GCN2 が活性化されるものと考えた。そこで、高脂肪食負荷

マウスの膵β細胞におけるアミノ酸濃度および free tRNA 量の検討を行った。さらに膵β細胞量減少がインスリン抵抗性による二次的効果でない事を実証するため、膵β細胞特異的 GCN2 ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷することで膵β細胞量や代謝データに関しての検討も行っている。

### 3. 研究の方法

通常食ならびに高脂肪食を与えた全身性 GCN2 ノックアウトマウスの血清、視床下部、肝臓、膵島を単離し、質量分析法によって細胞内のアミノ酸濃度を測定した。また同様に単離した膵島を用いて、質量分析法で charged tRNA の定量を行った。

GCN2 floxed マウスを Ins-Cre マウスと交配することによって、膵β細胞特異的 GCN2 ノックアウトマウスを作成し、血糖値・血清インスリン値・膵β細胞量などを測定した。

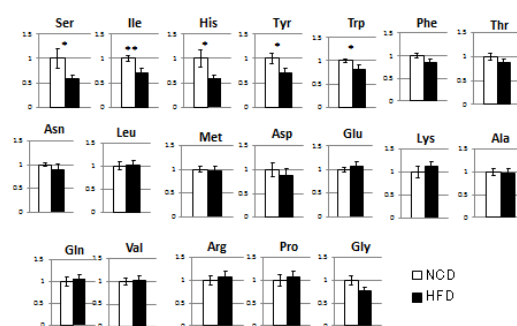
またラット膵β細胞株 INS-1 細胞に対して GCN2、ATF4、Sestrin2 の siRNA を負荷し、それぞれのノックダウン細胞を作成した。それぞれの細胞から RNA、蛋白を抽出し、リアルタイム PCR ならびに Immunoblot を行った。

### 4. 研究成果

はじめに、ラット膵β細胞株である INS-1 細胞を用いて GCN2 欠損で変化する下流シグナルを検討した。GCN2 ノックダウン細胞では転写因子 ATF4 の発現が低下していたことから、siRNA による ATF4 ノックダウン細胞を解析したところ、やはり mTORC1 活性の亢進が認められた。ATF4 によって発現調節を受ける分子を検討したところ、Sestrin2 の発現低下が確認された。この Sestrin2 は MEF などで mTORC1 活性を抑制することが報告されている。siRNA によって Sestrin2 をラット膵β細胞株でノックダウンしたところ、mTORC1 活性の亢進が認められた。すなわち、GCN2 欠損によって ATF4 発現およ

び Sestrin2 の発現が低下し、mTORC1 の恒常的活性化を引き起こしたと考えられる。

Mechanisms that elevate GCN2 phosphorylation in islets of mice fed an HFD  
Amino acid measurement by CE-MS (mouse pancreatic islet)



一方、高脂肪食負荷マウスの膵島で GCN2 が活性化される機序についても検討を行った。高脂肪食負荷マウスの膵島では細胞内アミノ酸濃度が低下しているという仮説をたて、通常食ならびに高脂肪食を負荷したマウスの血清、視床下部、肝臓および膵島を用いて、質量分析法で解析を行った。血清、視床下部、肝臓においては、高脂肪食群でアミノ酸濃度が上昇傾向を示すか、もしくは変化しない状態であったのに対し、膵島においては高脂肪食群で有意にアミノ酸濃度が低下するという結果が得られた(上図)。

さらに通常食と高脂肪食を負荷したそれぞれのマウスの膵島を用いて、質量分析法で charged tRNA の定量を試みた。その結果、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、リジンなどに結合した charged tRNA が高脂肪食負荷群で有意に低下しており、またアミノ酸全体としても高脂肪食負荷群で明らかに charged tRNA が低下している傾向を認めた。以上の結果から、GCN2 活性化の機序として、高脂肪食負荷マウスの膵島において free (uncharged) tRNA が増加しているという仮説が証明された。

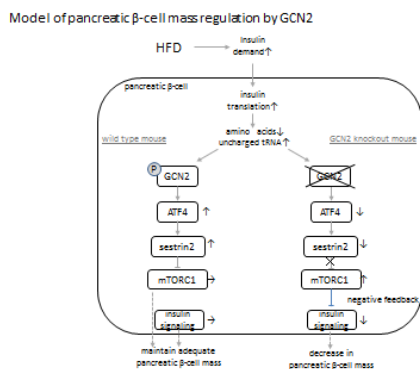
全身性 GCN2 ノックアウトマウスの解析のみでは、膵β細胞以外の臓器による影響も考慮する必要があるため、膵β細胞特異的 GCN2 ノックアウトマウスを作成し、解析を行った。その結果、通常食負荷マウスではコ

ントロールマウスとの差を認めなかったが、高脂肪食負荷によって、全身性ノックアウトマウス同様に高血糖ならびに血清インスリン値の低下が認められた。膵β細胞量においても、やはり有意に減少しており、膵β細胞の GCN2 欠損による反応と考えられた。

これまでの結果から、以下のような分子機序を我々は考えている。高脂肪食によってインスリン合成が亢進した膵β細胞では、アミノ酸濃度が相対的に低下することにより、GCN2 が活性化し、Sestrin2 を介して mTORC1 活性を抑制する。しかしながら GCN2 が欠損あるいは不活化された状態では、Sestrin2 の発現量が増加しないため mTORC1 の抑制が効かず、ネガティブフィードバックを介してインスリンシグナルが低下し、膵β細胞量が減少すると考えられた（下図）。

またラット膵β細胞株ならびにマウス膵島を用いて、活性化された GCN2 における free tRNA の結合を RNA immunoprecipitation

Fig. 6 mechanisms that elevate GCN2 phosphorylation in islets of mice fed an HFD



assay によって検討しようと試みたが、条件設定が難渋し、再現性のある結果が得られなかった。哺乳類細胞を用いた tRNA の定量 PCR に関する報告が少なく、プライマー設計などに問題があったのではないかと考えている。今後、再度条件設定などを行っていく予定である。

## 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 22 件)

1. 浅原俊一郎、木戸良明 アジア人型感受性遺伝子 *Kcnq1* 欠失マウスを用いた病態解析 Diabetes Frontier in press, 2016 査読無

2. Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Central insulin-action activates Kupffer cells by suppressing hepatic vagal activation through nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor. Cell Rep 14(10):2362-2374, 2016 査読有

3. Asahara S, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartolome A, Hashimoto N, Matsuda T, Koyanagi-Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matsumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Paternal allelic mutation at the *Kcnq1* locus reduces pancreatic  $\beta$  cell mass via epigenetic modification of *Cdkn1c*. Proc Natl Acad Sci USA. 112(27):8332-8337, 2015 査読有

4. Matsuda T, Takahashi H, Mieda Y, Shimizu S, Kawamoto T, Matsuura Y, Takai T, Suzuki E, Koyanagi-Kimura M, Asahara S, Bartolome A, Yokoi N, Inoue H, Ogawa W, Seino S, Kido Y. Regulation of pancreatic  $\beta$  cell mass by cross-interaction between CCAAT enhancer binding protein  $\beta$  induced by endoplasmic reticulum stress and AMP-activated protein kinase activity. PLoS ONE. 10:e0130757, 2015 査読有

5. Kanno A, Asahara S, Masuda K, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Seino S, Ogawa W, Kido Y. Compensatory hyperinsulinemia in high-fat diet-induced obese mice is associated with enhanced insulin translation in islets. Biochem Biophys Res Commun. 458 : 681-686, 2015 査読有

6. Cook JR, Langlet F, Kido Y, Accili D. Pathogenesis of selective insulin resistance in isolated hepatocytes. J Biol. Chem. 290:13972-80, 2015 査読有

7. Inaba Y, Furutani T, Kimura K, Watanabe H, Haga S, **Kido Y**, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, Inoue H. Growth arrest and DNA damage-inducible 34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 61:1343-56, 2015 査読有
8. 浅原俊一郎、**木戸良明** 膵β細胞量の調節因子 *最新医学* 70: 487-495, 2015 査読無
9. 浅原俊一郎、**木戸良明** 膵β細胞のインスリン抵抗性 *Diabetes Frontier* 26: 321-325, 2015 査読無
10. Matsuda T, Iwasaki M, Yoshioka N, Hirota Y, Hamaguchi H, **Kido Y**, Sakaguchi K, Ogawa W. A case of hemiplegia with hypoglycemia possibly associated with hemodynamic change. *Diabetol Int.* 6: 336-340, 2015 査読有
11. Nakarai C, Osawa K, Akiyama M, Matsubara N, Ikeuchi H, Yamano T, Hirota S, Tomita N, Usami M, **Kido Y**. Expression of AKR1C3 and CNN3 as markers for detection of lymph node metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Med* 15: 333-341, 2015 査読有
12. Alberto Bartolomé、**木戸良明** 膵β細胞における mTORC1 シグナルとオートファジー *内分泌・糖尿病・代謝内科* 40: 439-444, 2015 査読無
13. 木村真希、松田友和、**木戸良明** SU薬 *月刊糖尿病* 7: 88-94, 2015 査読無
14. Bartolomé A, Kimura-Koyanagi M, Asahara S, Guillén C, Inoue H, Teruyama K, Shimizu S, Kanno A, García-Aguilar A, Koike M, Uchiyama Y, Benito M, Noda T, **Kido Y**. Pancreatic β cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes* 63:2996-3008, 2014 査読有
15. **木戸良明** 膵β細胞量調節とエピジェネティクス *糖尿病と妊娠* 14: 39-43, 2014 査読無
16. Yoshida Y, Fuchita M, Kimura-Koyanagi M, Kanno A, Matsuda T, Asahara S, Hashimoto N, Isagawa T, Ogawa W, Aburatani H, Noda T, Seino S, Kasuga M, **Kido Y**. Contribution of insulin signaling to the regulation of pancreatic beta-cell mass during the catch-up growth period in a low birth weight mouse model. *Diabetol Int* 5: 43-52, 2014 査読有
17. 松田友和、**木戸良明** ER ストレスと膵β細胞不全 *内分泌・糖尿病・代謝内科* 38: 312-319, 2014 査読無
18. Asahara S, Shibutani Y, Teruyama K, Inoue H, Kawada Y, Etoh H, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Hashimoto N, Sakahara M, Fujimoto W, Takahashi H, Ueda S, Hosooka T, Satoh T, Inoue H, Matsumoto M, Aiba A, Kasuga M, **Kido Y**. Rac1 regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. *Diabetologia* 56:1088-1097, 2013 査読有
19. **木戸良明** 膵β細胞量の調節因子 *Diabetes Frontier* 24:507-512, 2013 査読無
20. Kimura K, Nakamura Y, Inaba Y, Matsumoto M, **Kido Y**, Asahara S, Matsuda T, Watanabe H, Maeda A, Inagaki F, Mukai C, Takeda K, Akira S, Ota T, Nakabayashi H, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Histidine augments the suppression of hepatic glucose production by central insulin action. *Diabetes* 62: 2266-2277, 2013 査読有
21. Shibutani Y, Asahara S, Teruyama K, Inoue H, Matsuda T, Seino S, **Kido Y**. Constitutive activation of Rac1 in pancreatic β cells facilitates F-actin depolymerization but exerts no influence on the increase of pancreatic β cell mass and facilitation of insulin secretion. *Kobe J Med Sci* 59:72-80, 2013 査読有
22. **木戸良明** 糖尿病学の進歩 *臨床病理* 61:941-947, 2013 査読無
- 〔学会発表〕(計 14 件)
1. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (シンポジウム)  
浅原俊一郎、**木戸良明**  
Regulation of pancreatic beta cell mass through type 2 diabetes susceptibility genes  
2016 年 5 月 19 ~ 21 日  
京都国際会館 (京都府)
2. 7th AASD Scientific Meeting  
Sugiura Y, Asahara S, Kawada Y, Ihara Y, Hara M, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Seino S, Ogawa W, **Kido Y**.



Histone Deacetylase Regulates Insulin Signaling via Two Pathways in Pancreatic  $\beta$ -cells  
2015年11月21~22日  
香港(中国)

3. 51st EASD Annual Meeting.  
Masuda K, Kanno A, Yoshitomi R, Asahara S, Matsuda T, Kimura M, Shibutani Y, Yokoi N, Kasuga M, Seino S, **Kido Y.**  
GCN2, a type 2 diabetes mellitus susceptibility gene, is associated with the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass.  
2015年9月14~18日  
ストックホルム(スウェーデン)

4. 関西実験動物研究会第126回研究会  
**木戸良明**  
膵 $\beta$ 細胞機能のエピゲノム制御  
2015年6月12日  
神戸大学(兵庫県)

5. 75th Scientific Session of American Diabetes Association.  
Asahara S, Ihara Y, Inoue H, Teruyama K, Hara M, Kimura M, Matsuda T, Seino S, **Kido Y.**  
Reduction in Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass Caused by Enhanced Expression of Cdkn1c via Interaction between C/EBP $\beta$  and Epigenetic Control.  
2015年6月5~9日  
ボストン(アメリカ)

6. 75th Scientific Session of American Diabetes Association  
Kanno A, Masuda K, Asahara S, Kimura M, Matsuda T, Kasuga M, Ogawa W, Seino S, **Kido Y.**  
GCN2, a type 2 diabetes mellitus susceptibility gene, is associated with the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass.  
2015年6月5~9日  
ボストン(アメリカ)

7. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
2型糖尿病疾患感受性遺伝子による膵 $\beta$ 細胞量調節機構  
2015年5月21~23日  
海峡メッセ下関(山口県)

8. 第15回日本内分泌学会近畿支部学術集会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
膵 $\beta$ 細胞量の維持に向けた糖尿病治療  
2014年11月8日  
兵庫医科大学(兵庫県)

9. 第51回日本臨床分子医学会学術総会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
膵 $\beta$ 細胞と epigenetics  
2014年4月11~12日  
東京国際フォーラム(東京都)

10. 第43回日本心臓血管作動物質学会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
膵 $\beta$ 細胞量からみた糖尿病治療  
2014年2月15~16日  
神戸国際会議場(兵庫県)

11. 第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
小胞体ストレスによる膵 $\beta$ 細胞不全の分子メカニズム  
2014年2月14~15日  
宮崎市民プラザ(宮崎県)

12. 第58回日本臨床検査医学会 近畿支部例会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
糖尿病学の進歩  
2013年6月1日  
神戸大学(兵庫県)

13. 第29回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
膵 $\beta$ 細胞量調節とエピジェネティクス  
2013年11月1~2日  
長良川国際会議場(岐阜県)

14. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム)  
**木戸良明**  
膵 $\beta$ 細胞機能のエピゲノム制御  
2013年5月16~18日  
熊本ホテルキャッスル(熊本県)

〔図書〕(計 1件)  
1. 浅原俊一郎、**木戸良明** *Kcnq1* 遺伝子領域による膵 $\beta$ 細胞量調節機構 糖尿病学 2016 19-27, 2016

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-diabetes/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
木戸 良明(Kido, Yoshiaki)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号:  
10335440