

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08651

研究課題名(和文) 藤島 細胞のインスリン分泌におけるミオシン軽鎖キナーゼの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MLCK during insulin secretion in islet beta cells

研究代表者

藤川 誠 (Fujikawa, Makoto)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90573048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食後のインスリン分泌ではインスリンを分泌する細胞内でカルシウム濃度の上昇と共にATP(生物のエネルギー)量が増加することが知られている。また、アクチン-ミオシンによる収縮運動(例えば筋肉)を活性化するMLCKはカルシウム応答性のりん酸化酵素であるとともにインスリン分泌に関わっていることが知られていた。そこで、MLCKの機能を阻害したところミトコンドリアにおけるATP合成活性が低下すると共にグルコースで促進されるインスリン分泌量も低下することが分かった。しかし、細胞内のATP量をリアルタイムに測定したところ、予想に反して、MLCKの機能を阻害した方がATP量が高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン分泌において細胞内ATP量の上昇は重要であるが、少なくともMLCKのインスリン分泌に果たす機能についてはATP量変化とは区別されるべきである。今回は2つの疑問が解明できなかった。1つはミトコンドリアATP合成酵素が阻害されても細胞内ATP量が増加すること。もう1つは細胞内ATP量がインスリン分泌に重要なレベルに達してもMLCKを阻害するとインスリン分泌が低下すること。前者は解糖系-ミトコンドリアによるATP合成系とATP消費との総合的な研究がエネルギー代謝制御の分野において益々必要である。後者はMLCKはATP亢進後の段階(分泌顆粒の輸送など)で重要な役割を担っていると結論づける。

研究成果の概要(英文)：It is known that intracellular calcium and ATP increase in islet beta cells during insulin secretion after eating. Moreover, actin-myosin contraction (eg muscle) is regulated by MLCK, which is calcium-responsive protein kinase. It is reported that the MLCK is relative to insulin secretion. Then, we established MLCK knockdown cell lines and checked the secretion activity. MLCK-knockdown cells have lower activities of insulin secretion and ATP synthesis in mitochondria. However, intracellular ATP levels in MLCK-knockdown cells are higher than ones in the control cells, in contrary to our expectation.

研究分野：生体エネルギー

キーワード：糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インスリン分泌機構は以下の4段階で行われることが知られている。1) 膵島β細胞がグルコースを取り込み解糖系が亢進する。2) 解糖系で合成されるATPがカリウムチャンネルを阻害する。3) カリウム透過が阻害された結果、細胞膜の脱分極が生じる。4) 電位依存性カルシウムチャンネルが開口しカルシウム刺激によりインスリン分泌が惹起される。それに加えて、2014年Tanakaらの報告により、β細胞がインスリンを分泌する際にミトコンドリアにおけるATP合成もインスリン分泌に重要であることが示唆された。しかし、ミトコンドリアによるATP合成がどのように引き起こされるかについては不明であった。

一方、我々はミトコンドリアによるATP合成活性の簡便かつ多検体同時に測定できるMASC法 (mitochondrial activity of SLO-permeabilized cells assay) を開発し、キナーゼ阻害剤ライブラリを用いたスクリーニングを行った結果、smMLCK (平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ) がミトコンドリアATP合成酵素の活性に寄与していることが明らかとなった。smMLCKはカルシウム刺激により活性化することから、上述したインスリン分泌機構と考え合わせると、グルコース刺激により亢進するカルシウムシグナルがsmMLCKを活性化した結果、ミトコンドリアATP合成活性を活性化し、一連のインスリン分泌を惹起しているという仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、実際にsmMLCKの活性を化学的または遺伝学的に抑制したときにインスリン分泌にどのような影響を及ぼすのかを明らかにした上で、実際にsmMLCKがミトコンドリアATP合成酵素を活性化してどのようにインスリン分泌に寄与するのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

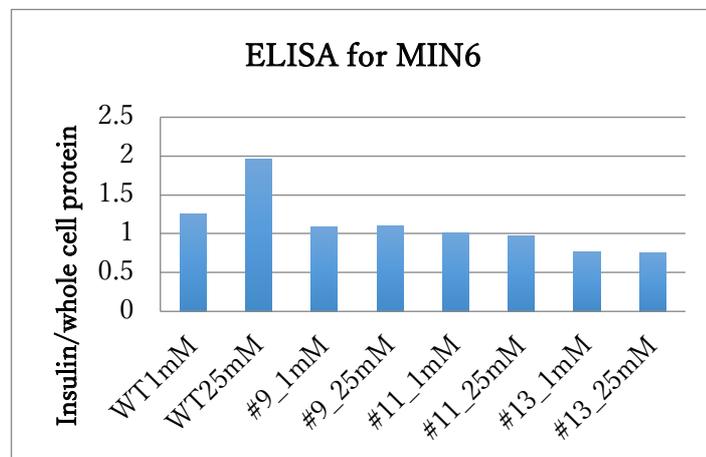
smMLCKの化学的阻害はML18と呼ばれるMLCK特異的な阻害ペプチドを用いて行った。また、遺伝学的阻害についてはsmMLCK mRNAを標的としたmicro RNAを用いたノックダウン株およびゲノム上のORFを標的としたCRISPR/Cas9を用いたノックアウト株を作成して検討した。細胞株はマウス膵島β細胞由来インスリンノーマであるMIN6細胞を用いた。

上記の細胞株を用いて、MASC法によりMIN6細胞株においてもsmMLCKのミトコンドリアATP合成酵素への関与を調べ、同時にELISA法を用いてグルコース刺激によるインスリン分泌 (GSIS: glucose-stimulated insulin secretion) 量を調べた。

更に、細胞内ATP量のリアルタイム測定を行うため、ATPのFRETプローブとして知られるATeamを用いて、GSIS時における細胞内ATP動態を調べた。

4. 研究成果

MLCK特異的阻害剤ペプチドML18を用いたATP合成活性への影響をMASC法で調べたところ、ML18を投与するとミトコンドリアにおけるATP合成活性を部分的に阻害することが確認できた。また、ELISA法によるGSIS活性を測定したところATP合成活性と同様、部分的にインスリン分泌を阻害したものの顕著な差は認められなかったことから、CRISPR/Cas9によるsmMLCKノックアウト細胞株を作成する事とした。MIN6の元株からsmMLCKノックアウト候補株を薬剤選択により選別して、ゲノムPCRによりsmMLCK遺伝子領域の欠失の有無を調べた結果、薬剤選別された150株以上を調べたにも関わらずノックアウト株は得られず、全てヘテロ欠失型であった。そこでこのヘテロ欠失型MIN6細胞株を用いてELISAによるインスリン分泌能を調べた (右図)。smMLCK-ヘテロ欠失型MIN6細胞では、グルコース刺激前の基底状態においてもインスリン分泌が低下していた (clone ID #9, #11, #13)。更に、グルコース刺激を行ってもsmMLCK-ヘテロ欠失型MIN6細胞のインスリン分泌量は全く増減しなかった。このことからsmMLCKは基底状態のインスリン分泌に部分的に寄与しており、GSISにおいてより重要な役割を果たしていることが示唆された。また、micro RNAを用いたノックダウン株においてもヘテロ欠失型MIN6細胞と同様の結果を得た。



次に、MLCKの発現が抑制された細胞におけるGSIS時の細胞内ATP動態を調べた。全く予期しなかったことに、MLCKノックダウン株の方が顕著に細胞内ATP量が増加していることが分か

った（右上図）。この結果は、smMLCK阻害剤 ML18 を用いた実験でも同様であった（右下図）。

右下図では、糖尿病治療薬(SU 剤)のグリベンクラミド、同じく糖尿病治療薬(ピグアノイド系)のメトホルミン、ML18、ロテノン(呼吸鎖 I 阻害剤)を投与したときの GSIS 時の細胞内 ATP 動態を FRET で測定した結果である。

MLCK を KD したとき(右上図)と同様に MLCK を阻害すると予想とは逆に細胞内 ATP 量が増加していることが分かる。ロテノンを投与した場合、基底状態の細胞内 ATP 量が低下してグルコース投与後も変化しないことから、ATeam による細胞内 ATP 動態検出自体は問題ないと考えられる。またカリウムチャネル阻害剤であるグリベンクラミドを投与した場合、グルコース刺激のない基底状態から細胞内 ATP 量が増加していることから、カリウムチャネル阻害によるカルシウムシグナルが細胞内 ATP 量を増加させている事が推察される。

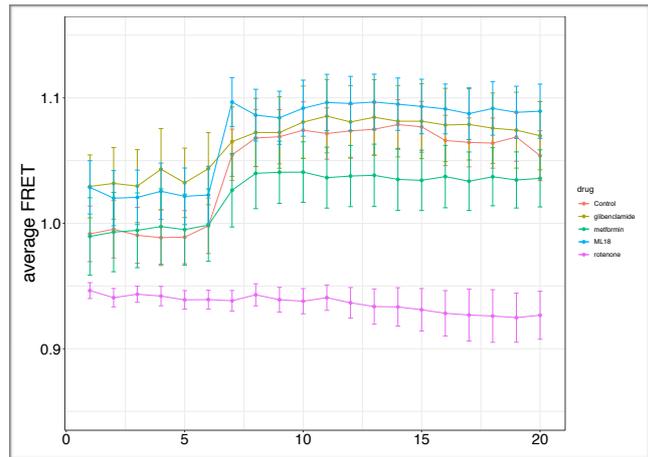
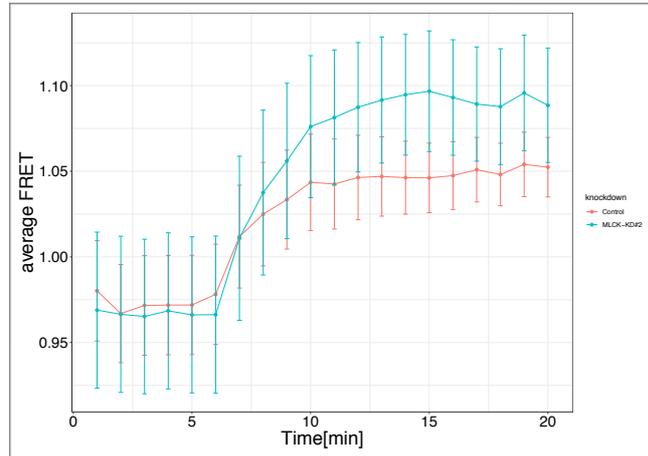
これらの実験結果から、MLCK の活性を阻害するとミトコンドリア ATP 合成活性は阻害されるにも関わらず細胞内 ATP 量が増加することが明らかとなった。

当初の仮説と矛盾する上記の結果を得たことについて考察する。MLCK の発現を抑えたり阻害剤を投与するとミトコンドリアによる ATP 合成活性が低下するにも関わらず細胞内 ATP 量が増加したのは、解糖系の亢進あるいは細胞内 ATP 消費の減弱が考えられる。

ミトコンドリアによる ATP 合成が阻害されると解糖系が亢進する可能性について、このことは以前、私達が行った研究でミトコンドリア膜電位を消失させた際の細胞内 ATP 動態を調べた研究でも観察された (JBC 2012 vol. 287 pp. 18781-7)。ミトコンドリアによる ATP 合成を阻害した数分後には解糖系による ATP 合成亢進で細胞内 ATP 濃度を補完することが分かっている。しかしながら、ロテノン(1 μ M)を用いて呼吸鎖 I を完全に阻害すると細胞内 ATP 量は基底状態で既に低くなっておりグルコース刺激でも変化しないことから、解糖系亢進だけで ML18 投与時の ATP 動態を説明することができない。

もう一つの可能性として、MLCK の発現抑制や活性阻害でミオシンによる運動が低下した結果、ATP 消費量も低下して細胞内 ATP が増加した可能性である。しかし胸腺細胞を用いた研究から ATP 消費の大半は蛋白質や RNA 合成で占められている (Biochem. J. 1995 vol. 312 pp. 163-7)。MIN6 細胞を含め膵島 β 細胞で全く同じ事が言えるかはわからないが、細胞運動や小胞輸送に関与するミオシンによる運動で消費される ATP 量は限定的のように思われる。

以上のように、今回の研究では MLCK は基底レベルのインスリン分泌だけでなく GSIS におけるインスリン分泌に寄与しており、またミトコンドリアの完全な ATP 合成活性に必要であったが、細胞内 ATP 量は MLCK の発現や活性を抑制した方が高いという結論に至った。このことから、MLCK はインスリン分泌機構において、解糖系亢進・細胞内 ATP 上昇よりも後の段階で重要な役割を果たしていると言える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----