

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16277

研究課題名(和文) アミノ酸感知センサーGCN2が高脂肪食負荷により2型糖尿病発症に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of an amino acid sensor GCN2 on the development of type 2 diabetes mellitus during high fat diet feeding

研究代表者

神野 歩 (Kanno, Ayumi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：60757285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らは高脂肪食負荷をした膵細胞におけるGCN2活性化機構を明らかにすることを目的とし研究を行った。代表者らは今までに高脂肪食で飼育されたマウスの膵島ではインスリン合成が亢進し、GCN2が活性化することを明らかにしている。通常食で飼育されたマウスと比較し、高脂肪食で飼育されたマウスの膵島において全般的なアミノ酸濃度が減少し、uncharged tRNAが増加していた。この変化は他の組織では認められなかった。高脂肪食下にはインスリン需要が亢進しインスリン合成のために膵細胞でアミノ酸が消費されてその濃度が減少し、uncharged tRNAが増加しGCN2が活性化すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our objective was to elucidate the mechanism of GCN2 activation in pancreatic β -cells under high fat feeding. We have demonstrated that insulin translation was enhanced and GCN2 was activated in mice islets fed a high fat diet. We discovered that general amino acids were decreased and uncharged tRNAs were increased in the islets of wild type mice fed a high fat diet, compared with those of mice fed a normal chow diet. However, these changes were not seen in other tissues. We considered that during high fat feeding, increased systemic insulin demand increases insulin biosynthesis in pancreatic β -cells, which decreased amino acids and increased tRNA levels, and lead to GCN2 activation.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

糖尿病人口の増加は世界中で重大な問題となっているが、日本においても2型糖尿病人口は急速に増加しており、大きな社会問題となっている。日本人は欧米人よりも相対的に低いBMIで糖尿病を発症しやすく、日本人の膵β細胞は血糖上昇に反応してインスリン分泌を増強させたり量を増大させたりする代償機構が弱い遺伝的素因をもつものが多いことが知られている。

代表者らは以前より2型糖尿病発症に関わる遺伝素因、環境素因双方につき研究を続けてきた。遺伝素因としては近年2型糖尿病感受性遺伝子である*KCNQ1*遺伝子についてその膵細胞における機能不全がエピジェネティックな機構を介して糖尿病発症に関与することを明らかにした(*Proc Natl Acad Sci USA*. 112: 8332-8337, 2015)。

日本人において*EIF2AK4*遺伝子の一塩基置換(SNP)と2型糖尿病に有意な相関が認められることが報告された(*Journal of Human Genetics*, 54: 236-241, 2009)。*EIF2AK4*がコードするgeneral control nonderepressible 2(GCN2)はアミノ酸欠乏を感知する蛋白質であり、アミノ酸欠乏状態で増加するuncharged transfer RNA(tRNA)が結合することにより活性化される。

代表者らは全身性GCN2ホモ欠損マウスを作製し解析を行った。全身性GCN2ホモ欠損マウスを通常食下に飼育するとマウスの耐糖能に異常は認められないが、高脂肪食下に飼育すると糖負荷後の血糖値が有意に上昇しインスリン値が低下して、膵β細胞量が減少することを見出した。GCN2ホモ欠損マウスの膵島を単離し解析したところ、mTORC1シグナルが活性化し、インスリンシグナルが減弱化していた。代表者らの研究室では膵β細胞における慢性的なmTORC1シグナルの亢進はネガティブフィードバックを起こしてインスリンシグナルを減弱化

させ、膵β細胞量を減少させることを明らかにしているが(*Mol Cell Biol*. 28: 2971, 2008, *Diabetes* 63: 2996, 2014)高脂肪食飼育下GCN2ホモ欠損マウスにおいても、膵島におけるmTORC1シグナルの亢進が膵β細胞量減少につながったのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

通常食では特に変化は見られなかったが高脂肪食でのみGCN2ホモ欠損マウスの耐糖能が悪化し膵β細胞量が減少したため、GCN2は膵細胞において高脂肪食下に重要な働きを担っていることが考えられた。そこで通常食と高脂肪食で飼育された野生型マウスの膵島におけるGCN2の活性化(リン酸化)の程度を確認したところ、高脂肪食で飼育したマウスの膵島でGCN2が有意に活性化していた。近年日本において動物性脂肪の摂取比率の増加が2型糖尿病発症と相関していることが示されている。これまでに膵細胞においてのみならず、他の組織においてもGCN2が高脂肪食摂取により活性化するとの報告はなく、GCN2がアミノ酸の欠乏を感知し活性化する分子であることを考えると非常に興味深いと思われた。この経路の解明により、2型糖尿病感受性遺伝子である*EIF2AK4*の変異という遺伝的素質を持つヒトが高脂肪食摂取という環境因子が加わった際に2型糖尿病を発症しやすくなるメカニズムを明らかにすることにつながる。*EIF2AK4*は日本人において認められた2型糖尿病感受性遺伝子であり、SNPの頻度は日本人を含めた東アジア人で高いと言われている。この研究が明らかになれば、今後*EIF2AK4*のリスクアレルを有する場合に早期から生活習慣に介入することにより膵β細胞を保護し、2型糖尿病発症を予防することが可能となる可能性がある。さらに、この予防効果は遺伝的に膵細胞の脆弱性がある

と考えられる日本人においてより大きいと考えられる。

代表者らは高脂肪食下の膵β細胞におけるGCN2活性化機構について明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

通常食もしくは高脂肪食で飼育されたマウスより膵島を単離し、CE-MSを用いたメタボローム分析法を用いてそれぞれのアミノ酸濃度を測定した。同様の方法で、血漿、視床下部、肝臓においてもアミノ酸濃度を測定した。また、同様に単離した膵島においてtRNAを抽出し、脱アミノアシル化処理してそのアミノ酸濃度を測定することにより、charged tRNAを測定した。この測定されたcharged tRNAからuncharged tRNA量を算出した。また、それ以外にインスリン合成が亢進することが予想されるモデルを用いてインスリン翻訳とGCN2活性化のレベルについて検討した。

ヒトにおいてブドウ糖負荷試験、グルコースクランプ法を行い、インスリン分泌、インスリン抵抗性に関するパラメーターについてEIF2AK4のリスクアレルの有無によって比較検討した。

4. 研究成果

通常食と高脂肪食で飼育されたマウスの血漿におけるアミノ酸濃度を測定したところ、高脂肪食で多くのアミノ酸濃度が増加しており、三種類のアミノ酸濃度が減少していた。これらの減少していたアミノ酸は、マウスの餌に含まれるアミノ酸濃度の違いを反映したものであると考えられた。次に、肝臓におけるアミノ酸濃度を測定すると、高脂肪食で多くのアミノ酸濃度が増加していた。視床下部におけるアミノ酸濃度は通常食と高脂肪食で特に変化は認められなかった。一方、膵島において測定したところ、高脂肪食で多

くのアミノ酸濃度が減少していた。そこで、膵島においてcharged tRNAの濃度を測定したところ、通常食と比較し高脂肪食で飼育されたマウスの膵島で多くのuncharged tRNAが増加していることが明らかになった。代表者らは以前、通常食と比較し、高脂肪食では膵島におけるインスリンの合成が約3倍に増加することを明らかにしている (Biochem Biophys Res Commun. 458 : 681-686, 2015)。これらのデータと合わせると、高脂肪食下には膵細胞においてインスリンの合成が亢進し、そのために消費されて膵細胞内アミノ酸濃度が減少し、uncharged tRNA量が

増加し、増加したuncharged tRNAがGCN2に結合することによってGCN2の活性化が引き

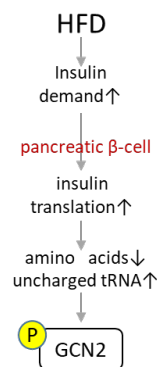


図1 高脂肪食によるGCN2の活性化

起こされると考えられた (図1)。

次に、代表者らは高脂肪食飼育下マウス膵島以外にインスリン合成が亢進していると思われるモデルにおいて、インスリン翻訳とGCN2の活性化に相関があるかにつき検討した。膵細胞株であるINS-1細胞において

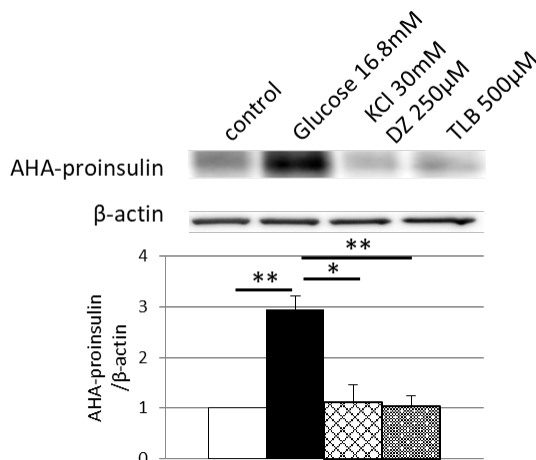


図2 グルコースによるインスリンの翻訳

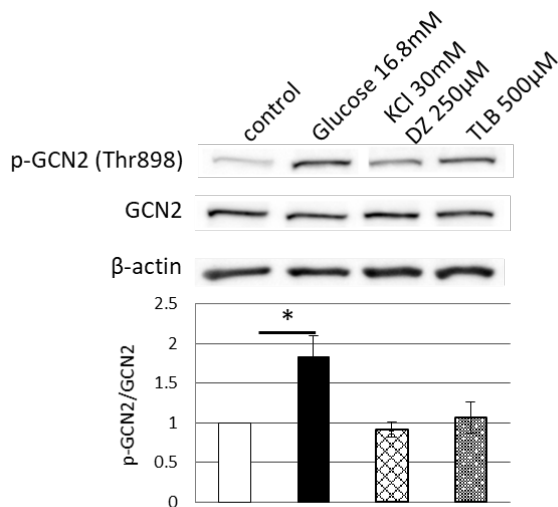


図3 グルコースによるGCN2の活性化

高グルコース刺激を行うと、コントロールと比較しインスリンの合成は約3倍に増加した。一方、インスリン分泌刺激作用をもつカリウム刺激、スルホニルウレア薬刺激を行ったところ、インスリンの翻訳の程度に変化は認められなかった(図2)。同様の刺激を行ったINS-1細胞においてGCN2の活性化につき検討すると、高グルコース刺激を行った場合にはGCN2が有意に活性化したが、カリウム刺激、スルホニルウレア薬を用いて刺激した場合にはGCN2の活性に変化は認められなかった(図3)。同様の実験を高グルコース刺激をしたINS-1細胞と、高グルコース刺激とともに蛋白翻訳阻害剤であるシクロヘキサミドを添加したINS-1細胞においても行った。その結果、高グルコース刺激により亢進したインスリン翻訳はシクロヘキサミド添加によって有意に抑制され、高グルコース刺激によって亢進したGCN2の活性はシクロヘキサミド添加でコントロールレベルまで抑制されることが確認された。また、一晩絶食させた後に再摂食させたマウスから膵島を単離しインスリン翻訳レベルを解析したところ、再摂食後にインスリン翻訳は増加しており、GCN2は有意に活性化した。これらのデータも図に示した機序を支持するものであった。アミノ酸の欠乏を感知し活性化するGCN2はもともと飢餓状態を生き延びる

という働きを有する分子であるが、高脂肪食という現代の過剰な栄養状態での働きも有する可能性が明らかになった。

しかし、高グルコース刺激を行ったINS-1細胞におけるアミノ酸濃度を測定したところ、コントロールと比較し有意な差は認められなかった。高脂肪食で長期間飼育するマウス膵島と比較し、高グルコース刺激は非常に短時間であるため、差が認められなかったのではないかと考えられた。

次に、GCN2をコードする遺伝子*EIF2AK4*に変異を有するヒトにおいては実際に耐糖能に変化が認められるかどうかにつき検討を行った。その結果、変異を有するヒトにおいては正常耐糖能群でブドウ糖負荷試験を行った際のinogenic indexと境界型群においてグルコースクランプ法を行った際のfirst phase insulin secretionに低下が認められた。一方、インスリン抵抗性の指標については変化が認められなかった。さらに膵β細胞機能を表すとされるdisposition indexについては、リスクアリルを持つ場合にはBMIが上がるほど低下する傾向があることが明らかとなった。この結果から、*EIF2AK4*のリスクアリルを有することでインスリン分泌が低下し、BMIが増加するほどその低下の程度が大きくなる可能性が示唆された。

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3件)

Suzuki E, Matsuda T, Kawamoto T, Takahashi H, Mieda Y, Matsuura Y, Takai T, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Asahara SI, Inoue H, Ogawa W, Kido Y. Docosahexaenoic acid reduces palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress

in pancreatic β cells. **Kobe J. Med. Sci.** 査読有 in press

Takai T, Matsuda T, Matsuura Y, Inoue K, Suzuki E, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Asahara SI, Hatano N, Ogawa W, Kido Y. Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBP β in pancreatic β cells. **Biochem Biophys Res Commun** 査読有 497: 451-456, 2018

Kawada Y, Asahara SI, Sugiura Y, Sato A,, Furubayashi A, Kawamura M, Bartolome A, Terashi-Suzuki E, Takai T, Kanno A, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Hashimoto N, Kido Y. Histone deacetylase regulates insulin signaling via two pathways in pancreatic β cells. **PLoS One** 査読有 12: e0184435, 2017

〔学会発表〕(計4件)

古林鮎子、神野歩、浅原俊一郎、松田友和、木村真希、木戸良明、2型糖尿病感受性遺伝子 GCN2 は Sestrin2 を介して膵細胞量の調節に關与する、第91回日本内分泌学会学術総会、2018年4月26日、フェニックス・シーガイアリゾート(宮崎県)

古林鮎子、神野歩、浅原俊一郎、木戸良明、高脂肪食負荷 GCN2 欠損マウスの膵島における mTORC1 シグナル調節機構の解明、第40回日本分子生物学会年会、2017年12月7日、神戸国際会議場(兵庫県)

Shun-Ichiro Asahara, Regulation of pancreatic beta cell mass through type 2 diabetes susceptibility genes, Asia Islet Biology & Incretin symposium, Mar 2nd, 2017, The Catholic University (Korea)

神野歩、増田勝久、浅原俊一郎、松田友和、木村真希、廣田勇士、横井伯英、小川涉、春日雅人、清野進、木戸良明、2型糖尿病感受性遺伝子 GCN2 は膵細胞量の調節に關与する、第89回日本内分泌学会学術総会、2016年4月21日、国立京都国際会館(京都府)

〔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

神野 歩 (Kanno, Ayumi)

神戸大学大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号 : 60757285