

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18390272  
 研究課題名 (和文) 膵β細胞における ATP と cAMP のシグナル統合の分子メカニズム  
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism of signal integration between ATP and cAMP in pancreatic β-cells  
 研究代表者  
 三木 隆司 (MIKI TAKASHI)  
 千葉大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号：50302568

研究成果の概要 (和文)：血糖降下ホルモンであるインスリンの膵β細胞からの分泌は、①血糖値 (血中のグルコース濃度) と②インクレチン (摂食時に分泌される腸管ホルモン) によって調節されている。それぞれの分泌刺激を伝える膵β細胞内シグナル伝達分子は ATP と cAMP であるが、本研究では、ATP のセンサーである  $K_{ATP}$  チャネルと、cAMP センサーである Epac2 を解析し、ATP と cAMP による分泌制御の相互作用を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Secretion of insulin, the glucose-lowering hormone, from pancreatic β-cells is regulated by blood glucose and a gut hormone incretin. These stimuli increase intracellular concentrations of ATP and cAMP, respectively, activating intracellular signals to elicit insulin secretion. In this study, mutual interaction between these two signals was elucidated with special emphasis on an ATP-sensor  $K_{ATP}$  channel and a cAMP-sensor Epac2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャネル、ATP、cAMP、インスリン、分泌

## 1. 研究開始当初の背景

ATP は生命体のエネルギー源であると共に重要な代謝シグナルとして機能し、膵β細胞ではグルコースによるインスリン分泌を引き起こす引き金として機能する。一方、cAMP は種々の生命体における普遍的な細胞内シグナルであり、膵β細胞ではインスリン分泌

を著明に増強させる。cAMP によるインスリン分泌増強は、食後の血糖上昇の抑制に重要な役割を果たしている。すなわち、健常人では、摂食によって腸内分泌細胞から分泌された GLP-1 や GIP などのホルモン (インクレチン) が、膵β細胞に作用し、細胞内 cAMP 濃度の上昇を介して分泌が増強される。しかしなが

ら、cAMPによるインスリン分泌増強の分子メカニズムはほとんど不明である。

申請者らは、2000年にcAMPの標的分子であるEpac2およびその相互作用分子Rim2を同定し、cAMPによるインスリン分泌増強がPKAリン酸化非依存性に起こることを発見した(Ozaki et al., Nat Cell Biol, 2000)。

cAMPによるインスリン分泌はグルコース濃度上昇時のみで起こる点の特徴である。グルコースによるインスリン分泌にはATPが重要な代謝シグナルとなっており、細胞内ATPの増加はATP感受性 $K^+$ ( $K_{ATP}$ )チャネルを閉鎖しインスリン分泌を惹起する(Miki et al, PNAS, 1998)ことが明らかとなっている。興味深いことにEpac2は $K_{ATP}$ チャネルの調節サブユニットであるスルフホニル尿素受容体と結合し、Rim2とともに、 $K_{ATP}$ チャネルの機能複合体を構成する。このことからEpac2を介したcAMPシグナルと $K_{ATP}$ チャネルを介したATPシグナルのクロストークが考えられた。

一方、申請者らは $K_{ATP}$ チャネル欠損マウスでも、高濃度グルコースとGLP-1の刺激により明らかなインスリン分泌応答が惹起されることも見いだした。その後の解析で、ATPとcAMPが相互作用してインスリン分泌を引き起こすことが示唆された。これらの結果から、 $K_{ATP}$ チャネルの開閉を介さないATPとcAMPの相互作用が、膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌を制御していることも考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の知見を背景に、膵 $\beta$ 細胞におけるATPシグナルとcAMPシグナルの統合メカニズムを、Epac2やRim2を含む $K_{ATP}$ チャネルの機能複合体の機能解析を行うことにより解明することを目的とした。

さらに、 $K_{ATP}$ チャネル非依存性のATPとcAMPの相互作用の存在も想定されることから、 $K_{ATP}$ チャネル欠損マウスを用いてこのメカニズムと生理的役割を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1)Epac2やRim2を含む $K_{ATP}$ チャネル機能複合体の機能解析と、(2) $K_{ATP}$ チャネル非依存性のATPとcAMPの相互作用の解析の2つのアプローチにより、膵 $\beta$ 細胞におけるATPとcAMPの統合シグナルの解明を目指した。この目的で、前者についてはEpac2およびRim2の欠損マウスを作製し、さらにこれらの遺伝子発現を欠く膵 $\beta$ 細胞株を樹立し、ATPおよびcAMPの作用を解析した。また、後者については $K_{ATP}$ チャネル欠損マウスを用いて、 $K_{ATP}$ チャネル依存性のATPおよびcAMPの作用を解析した。さらに、Epac2の機能解析を進めている過程で、 $K_{ATP}$ チャネルの阻害剤であるスルフホニル尿素薬がEpac2に直接結合し、Epac2の活性化を介してインス

リン分泌を引き起こすことが明らかになり、スルフホニル尿素薬が $K_{ATP}$ チャネルの閉鎖とはまったく異なる機序で、インスリン分泌を引き起こすことが示された。

## 4. 研究成果

(1)  $K_{ATP}$ チャネル機能複合体の機能解析  
 $K_{ATP}$ チャネル分子集合体の構成するEpac2とRim2の膵 $\beta$ 細胞におけるcAMPとATPの細胞内シグナルを解明した。

### ①Epac2の機能解析

Epac2はcAMP依存性に低分子量G蛋白であるRap1を活性化する分子である。申請者らはEpac2の遺伝子欠損マウスを作製し、 $K_{ATP}$ チャネルの閉鎖を介したグルコース応答性分泌とcAMPによるインスリン顆粒の開鎖放出を全反射顕微鏡で解析した。するとEpac2欠損マウスの膵 $\beta$ 細胞ではグルコースによる開口放出は野生型マウスと同等であったが、cAMPによるインスリン分泌増強が初期相のみで消失していた(文献13)。このことからEpac2はcAMP依存性にインスリン顆粒の細胞膜への輸送あるいは開口放出に関与していることが明らかになった。

さらに、Epac2欠損マウスを作製する過程で、Epac2には既知の構造(Epac2Aと命名)よりアミノ末端が欠損したアイソフォームが存在することが明らかになった。このアイソフォームは副腎皮質に特異的に発現するスプライス変異体であることが明らかになり、あらたにEpac2Bと命名した。Epac2AとEpac2Bの機能を比較検討した結果、Epac2Aのアミノ末端が $K_{ATP}$ チャネルの存在部位である細胞膜への極在化に寄与しており、Epac2AがcAMP依存性のグルコース応答性インスリン分泌の惹起に重要であることが示された(文献5)。

以上の結果から、Epac2Aは $K_{ATP}$ チャネルの機能複合体の構成分子としてSUR1と結合するのみならず、アミノ末端を介して細胞膜に極在することが明らかになった。さらにホルモン分泌実験や全反射顕微鏡を用いた解析から、cAMPによるインスリン顆粒の輸送あるいは開口放出に関与することが分かった。

### ②Rim2の機能解析

申請者らは、 $K_{ATP}$ チャネルを構成するSUR1と結合するEpac2と、さらに結合する分子を探索した結果Rim2を同定した。申請者らは、Rim2欠損マウスとRim2欠損膵 $\beta$ 細胞株を作製し、Rim2の機能を解析した。まず、インスリン分泌を検討したところ、Rim2欠損膵 $\beta$ 細胞株ではグルコースによるインスリン分泌が高度に障害されており、Rim2は $K_{ATP}$ チャネルの閉鎖を介したインスリン分泌に重要であることが明らかになった。さらに、インス

リン分泌顆粒を蛍光蛋白で可視化し、全反射顕微鏡を用いて細胞膜直下に存在するインスリン顆粒の数を計測した。すると、KO 膵β細胞株では細胞膜近傍のインスリン顆粒数が激減していたことから、Rim2 は分泌顆粒の細胞膜へのドッキングに重要であることが示された(論文投稿中)。さらに、Rim2 を含む  $K_{ATP}$  チャンネル機能複合体と膜電位のセンサーである電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル(VDCC)の相互作用を明らかにする目的で、VDCC と Rim2 を共発現させ VDCC の活性を電気生理学的手法により検討したところ、Rim2 が VDCC チャンネル活性を調節していることが示され、 $K_{ATP}$  チャンネルと VDCC の機能的な相互作用が示された。

## (2) $K_{ATP}$ チャンネル非依存性の ATP と cAMP の相互作用の解析

### ① $K_{ATP}$ チャンネル欠損マウスによる解析

申請者は以前、膵β細胞での ATP センサーである  $K_{ATP}$  チャンネルを欠損したマウス(Kir6.2<sup>-/-</sup>マウス)でも ATP と cAMP の両者が増加した時には、グルコース濃度依存性のインスリン分泌を惹起できることを見いだした(Miki et al., Diabetes, 2005)。そこで、本研究では、ATP と cAMP による  $K_{ATP}$  チャンネル非依存性のインスリン分泌の惹起メカニズムを解析した。この目的で、膵灌流による種々の分泌実験と電気生理学の実験を行い、ATP と cAMP がともに増加した際には、ニフルム酸感受性のイオンチャンネル(現在分子実体は不明)が活性化され、膜の脱分極を介して分泌を引き起こしていることが示された。電気生理学の実験でもニフルム酸存在下では cAMP 依存性グルコース依存性の細胞膜脱分極が消失した(文献 4)。さらに、このメカニズムを介したインスリン分泌は僅かなグルコース濃度の変化により惹起されることが明らかになり、このメカニズムが生理的条件下で重要な役割を果たしていることが考えられた。

### ②Epac2 欠損マウスによる解析

膵β細胞の cAMP センサーである Epac2 は cAMP が結合することにより活性化される。申請者らは、Epac2 の活性化を蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)を用いて解析し、 $K_{ATP}$  チャンネルを閉鎖しインスリン分泌を惹起させるスルホニル尿素剤が、Epac2 を活性化することにより、インスリン分泌を惹起することを見いだした(文献 2)。すなわち Epac2 を用いた FRET プローブを作製したところ、cAMP 非存在下では FRET が起こるものの、cAMP で刺激すると FRET が消失した。この条件下で、スルホニル尿素剤であるトルブタミドとグリ

ベンクラミドを処置すると FRET が消失し、Epac2 の活性化が示唆された。さらに結合実験により Epac2 とグリベンクラミドの結合が示され、Rap1 の活性化を指標として、トルブタミドおよびグリベンクラミドによる Epac2 の活性化を直接的に確認された。スルホニル尿素剤の Epac2 活性化を介したインスリン分泌への効果を検討する目的で、Epac2 欠損マウスで検討したところ、Epac2 欠損マウスではスルホニル尿素剤によるインスリン分泌は減弱していた。これらの結果から、スルホニル尿素剤は ATP センサーである  $K_{ATP}$  チャンネルを閉鎖するのみならず、cAMP センサーである Epac2 活性化を介してインスリン分泌を引き起こすことが示された。

以上の結果から、膵β細胞においては ATP と cAMP が相互作用することでインスリン分泌が引き起こされており、この機序には  $K_{ATP}$  チャンネル複合体である Epac2 や Rim2、さらに膵β細胞のニフルム酸感受性イオンチャンネルが寄与していることが明らかになった。

## 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 24 件)

1. Granot Z (他 14 名。Miki T は 6 番目). LKB1 regulates pancreatic beta cell size, polarity, and function. Cell Metab 10:296-308, 2009. 査読あり
2. Zhang CL (他 9 名。Miki T は 9 番目). The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. Science 325:607-610, 2009. 査読あり
3. Zlatkovic J (他 5 名。Miki T は 4 番目). Proteomic profiling of  $K_{ATP}$  channel-deficient hypertensive heart maps risk for maladaptive cardiomyopathic outcome. Proteomics 9:1314-1325, 2009. 査読あり
4. Fujimoto W, Miki T (他 6 名). Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by

- cyclic AMP in mice. *Diabetologia* 52:863-872, 2009. 査読あり
5. Niimura M, Miki T (他 4 名). Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2A in its sub-cellular localization and function *J Cell Physiol* 219:652-658, 2009. 査読あり
  6. Ravier MA, Nenquin M, Miki T, Seino S, Henquin JC. Glucose controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> and insulin secretion in mouse islets lacking ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels owing to a knockout of the pore-forming subunit Kir6.2. *Endocrinology* 150:33-45, 2009. 査読あり
  7. Yamada S (他 8 名。 Miki T は 5 番目). Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy. *Stem Cells* 26:2644-2653, 2008. 査読あり
  8. Kentner AC (他 6 名。 Miki T は 4 番目). The effects of rewarding ventral tegmental area stimulation and environmental enrichment on lipopolysaccharide-induced sickness behavior and cytokine expression in female rats. *Brain Res* 1217:50-61, 2008. 査読あり
  9. Fukuzaki K, Sato T, Miki T, Seino S, Nakaya H. Role of sarcolemmal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the regulation of sinoatrial node automaticity: an evaluation using Kir6.2-deficient mice. *J Physiol* 586: 2767-2778, 2008. 査読あり
  10. Seino Y, Miki T (他 9 名). Intestine specific homeobox (ISX) participates in the maintenance of vitamin A metabolism by regulation of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase (bcmo1) expression. *J Biol Chem* 283:4905-4911, 2008. 査読あり
  11. Reyes S, Kane GC, Miki T, Seino S, Terzic A. K<sub>ATP</sub> channels confer survival advantage in cocaine overdose. *Mol Psychiatry* 12:1060-1061, 2007. 査読あり
  12. Xu J (他 9 名。 Miki T は 8 番目). K<sub>ATP</sub> channel deficient pancreatic β-cells are streptozotocin resistant due to lower GLUT2 activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:H1706-713, 2007. 査読あり
  13. Shibasaki T (他 10 名。 Miki T は 3 番目). Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19333-19338, 2007. 査読あり
  14. Fujimoto W\*, Shiuchi T\*, Miki T\* (\*; contributed equally) (他 7 名). Dmbx1 is essential in agouti-related protein action. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15514-15519, 2007. 査読あり
  15. Miyake A, Yamada K, Kosaka T, Miki T, Seino S, Inagaki N. Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice. *Eur J Neurosci* 25, 2349-2363, 2007. 査読あり
  16. Olson TM (他 9 名。 Miki T は 6 番目). K<sub>ATP</sub> channel mutation confers risk for adrenergic atrial fibrillation originating from vein of Marshall. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4, 110-116,

2006. 査読あり
17. Gumina R (他 9 名。 Miki T は 7 番目).  $K_{ATP}$  channel knockout worsens myocardial calcium stress-load in vivo and impairs recovery in stunned heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1706-1713, 2006. 査読あり
  18. Kane GC (他 9 名。 Miki T は 8 番目). Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1  $K_{ATP}$  channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. *FASEB J* 20, 2271-2280, 2006. 査読あり
  19. Yamada S (他 8 名。 Miki T は 7 番目). Protection conferred by myocardial ATP-sensitive  $K^+$  channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant. *J Physiol* 577, 1053-1065, 2006. 査読あり
  20. Kane GC, (他 9 名。 Miki T は 8 番目). KCNJ11 gene knockout of the Kir6.2  $K_{ATP}$  channel causes maladaptive remodeling and heart failure in hypertension. *Hum Mol Genet* 15, 2285-2297, 2006. 査読あり
  21. Choëiri C, Staines WA, Miki T, Seino S, Renaud JM, Teutenberg K, Messier C. Cerebral glucose transporters expression and spatial learning in the K-ATP Kir6.2(-/-) knockout mice. *Behav Brain Res* 172, 233-239, 2006. 査読あり
  22. Oyama K, Minami K, Ishizaki K, Fuse M, Miki T, Seino S. Spontaneous recovery from hyperglycemia by regeneration of pancreatic beta-cells in Kir6.2G132S transgenic mice. *Diabetes* 55, 1930-1938, 2006. 査読あり
  23. Deacon RM (他 7 名。 Miki T は 6 番目). Behavioral phenotyping of mice lacking the K(ATP) channel subunit Kir6.2. *Physiol Behav* 87, 723-733, 2006. 査読あり
  24. Sun HS, Feng ZP, Miki T, Seino S, French RJ. Enhanced neuronal damage after ischemic insults in mice lacking Kir6.2-containing ATP-sensitive  $K^+$  channels. *J Neurophysiol* 95, 2590-2601, 2006. 査読あり
- [学会発表] (計 10 件、国際学会と国内シンポジウムのみ)
1. Miki T A novel glucose-sensing mechanism in pancreatic  $\beta$ -cells. 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus (November 20, 2009) (Jeju, Korea)
  2. 三木隆司 摂食障害の発症分子メカニズムの探究 -神経性食思不振症モデルマウスの応用-第 30 回日本肥満学会 (10/9, 2009) (浜松)
  3. Miki T Mechanism of cAMP-dependent Glucose-responsiveness in Pancreatic  $\beta$ -cells. Asia Islet Biology & Incretin Symposium 2009 (August 2, 2009) (Seoul, Korea)
  4. 三木隆司 転写因子 Dmbx1 の破綻によるエネルギー代謝異常 第 29 回日本肥満学会 (10/17, 2008) (大分)
  5. Seino S. Roles of exocytosis-associated proteins in pancreatic beta-cells Keystone Symposia (April 9, 2008) (Salt lake city, USA)
  6. Fujimoto W. Lack of diabetogenic effect of AgRP in Dmbx1 deficient mice. 14th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus (October 5, 2007) (Kyoto, Japan)

7. Fujimoto W. Lack of Agouti-related protein action in Dmbx1 deficient mice. 68th Annual Meeting of the American Diabetes Association (June 8, 2007) (San Francisco, USA)
8. 三木隆司 組織間ネットワークによるグルコース恒常性の維持機構 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/25, 2007) (仙台)
9. Miki T Identification and characterization of a novel member of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunit family, Kir6.3, in zebrafish. 20th IUBMB (the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (June 21, 2006) (Kyoto, Japan)
10. 三木隆司 グルコースホメオスターシスにおける ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルの重要性-遺伝子改変動物による研究- 第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/25, 2006) (東京)

[図書] (計 9 件)

1. 李恩瑛, 三木隆司 視床下部による糖代謝制御機構. 内分泌・糖尿病科, 科学評論社 29, 59-65, 2009.
2. 大石賢吾, 三木隆司. 転写因子 Dmbx1 機能の破綻による摂食障害の分子メカニズム. 最新医学 64, 最新医学社, 125-129, 2009.
3. 藤本和歌子, 三木隆司, 清野進. 2型糖尿病モデル・トランスジェニックマウス、新時代の糖尿病学 1, 日本臨床増刊号, 日本臨床社, 648-652, 2008.
4. 尾山和信, 南幸太郎, 三木隆司, 柴崎忠雄, 清野進. Kir6.2G132S マウス: in vivo における膵β細胞再生のモデル. 分子糖尿病学の進歩-基礎から臨床まで-2008-, 金原出版, 29-39, 2008.

5. Seino S, Miki T, Shibasaki T. PKA-independent mechanism of cAMP in insulin secretion. In: Pancreatic beta cell in health and disease, ed S. Seino and G.I. Bell, Section II, Chapter 8, Springer-Verlag, Tokyo Japan, 2007:133-146, 2007.
6. 三木隆司. cAMPによるインスリン分泌増強メカニズム. カラー版 糖尿病学 基礎と臨床, 西村書店, 97-100, 2007.
7. 三木隆司, 清野進. cAMPによるインスリン分泌の分子メカニズム. 糖尿病学の進歩 2006, 診断と治療社, 40, 137-142, 2006.
8. 三木隆司, 清野進. 膵β細胞からのインスリン分泌制御シグナルとその破綻. シグナル受容の解明が導く創薬・治療への躍進, 羊土社, 196-201, 2006.
9. 三木隆司. グルコースホメオスターシスにおける ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルの重要性-遺伝子改変動物による研究-. 糖尿病 49, 日本糖尿病学会, 778-780, 2006.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件) 該当なし
- 取得状況 (計 0 件) 該当なし

[その他]

ホームページ等  
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 隆司 (MIKI TAKASHI)  
 千葉大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号: 50302568

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし