

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19770111

研究課題名 (和文) インスリン分泌を制御する新規分子 PRIP の役割解明研究

研究課題名 (英文) Functional analysis of the role of PRIP in regulating insulin secretion.

研究代表者

塩井 誠次郎 (SHIOI SEIJIRO)

福岡大学・RI センター・助教

研究者番号：80423531

研究成果の概要：PRIP-KO マウス(若齢)は、高インスリン血症かつ低血糖を示した。そこで、培養ラ氏島及び膵β細胞株(MIN6)を高グルコースや高 KCl で刺激したときのインスリン分泌量を調べたところ、PRIP 遺伝子欠損型では有意にインスリン分泌量が亢進していた。さらに、β細胞の電子顕微鏡解析では、形質膜付近の分泌顆粒数が野生型に比べて増加傾向にあった。本研究の成果により、PRIP-KO マウスではインスリン顆粒の開口放出が亢進していることが示唆された。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホルモンと生理活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

本研究で取り上げるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸結合性タンパク質、PRIP (PLC-Related catalytically Inactive Protein) 分子は、 $IP_3/Ca^{2+}$  シグナリング系や  $GABA_A$  受容体の構築/輸送・形質膜上での受容体チャネル活性調節・エンドサイトーシスといった  $GABA_A$  受容体の一生の様々な素過程に関わる分子である。PRIP-DKO マウスを長期に亘って飼育する過程で、このマウスは、「(1)野生型に比べ、メスでは体重が50%程度増加するが、オスでは逆に15%程度少ない。(2)食餌量は15~40%程度増える。(3)血

糖値が20~30%程度低い。(4)組織学的に膵臓のラ氏島は大きく、β細胞が肥厚している」など、 $GABA_A$  シグナリングが関わるとされる行動学的な異常とは別に代謝異常と考えられる表現型を示した。さらに、初代培養ランゲルハンス島からの生理的な刺激によるインスリン分泌量が野生型に比べて増加傾向にあった。以上のように PRIP 欠損型が示すインスリン分泌過多の現象には、これまでに明らかにされていない新たな PRIP の機能が存在することを示唆していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、PRIP 分子の欠損によって引き起こされるインスリン分泌異常について、その分子メカニズムを解明し、PRIP 分子の新たな機能を見出すことを第一の目的としている。さらに、PRIP 分子が関わる生活習慣病発症のメカニズムを明らかにし、生活習慣病の予防や治療に応用することを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

### β 細胞からの分泌されるインスリン量の解析

培養ラ氏島をグルコースで刺激して、そこから分泌されるインスリンを経時的に定量した。これにより、グルコース刺激分泌の違いが、どの相目にあるかを調べた。さらに、培養ラ氏島を KCl で刺激し、細胞を強制的に脱分極させた際に分泌されるインスリン量を野生型と比較した。この KCl 刺激により第 1 相目の分泌を選択的に観測することができるので、グルコース刺激による実験結果と合わせて第 1 相目のインスリン分泌への PRIP 分子の関与を調べた。これらの初代培養ラ氏島の結果が、培養細胞株(MIN6)で再現できるかを確認するため、PRIP 遺伝子発現をノックダウンさせた MIN6 細胞株を調整し、インスリン分泌能を野生型と比較した。また、培養ラ氏島から分離単層で培養した β 細胞を調製して、グルコース刺激を行なった時の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化を野生型と比較した。

### β 細胞の形態学的・組織学的解析

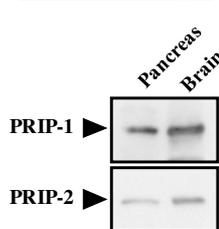
分離ラ氏島を用いて β 細胞の電子顕微鏡像を作成し、形態学的変化を観察した。β 細胞のサイズや β 細胞内のインスリン分泌顆粒の空間的な個数を計測し、インスリン分泌のどのステップ(分泌顆粒の輸送・分泌顆粒の膜への融合など)が調節不全に落ち込んでいるかを形態学的な変化で解析した。GFP を融合した PRIP (GFP-PRIP)を一過性に発現させた MIN6 細胞を各種細胞器のマーカータンパク質抗体で染色し、細胞内 PRIP の局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。また、MIN6 細胞内のインスリンを抗インスリン抗体で染色し、PRIP がインスリン分泌顆粒への共局在を調べた。

## 4. 研究成果

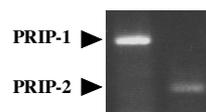
### (1) 初代培養ラ氏島における PRIP 遺伝子の発現確認

野生型マウスから単離したランゲルハンス島を用いて、PRIP 遺伝子の発現を確認した。PRIP-1,-2 が共に発現している。

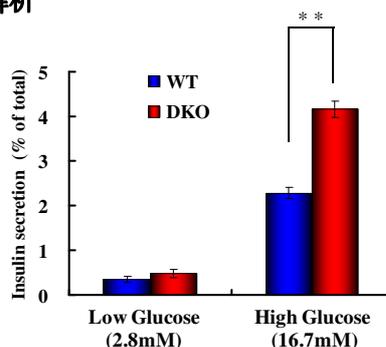
### Western Blot Analysis



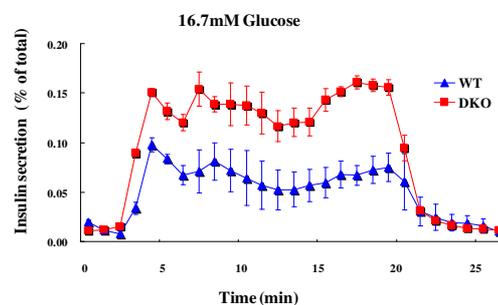
### RT-PCR Analysis Isolated Islet of Langerhans



### (2) グルコース刺激によるインスリン分泌量の解析

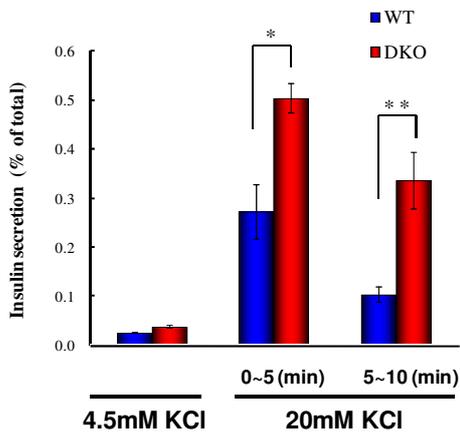


培養ラ氏島をグルコース刺激した際のインスリン分泌量の変化を野生型 DKO で比較した。刺激前における分泌量に有意な差は認められなかったが、グルコース刺激によって分泌されるインスリン量は、DKO で約 1.5 倍程度、上昇していた。

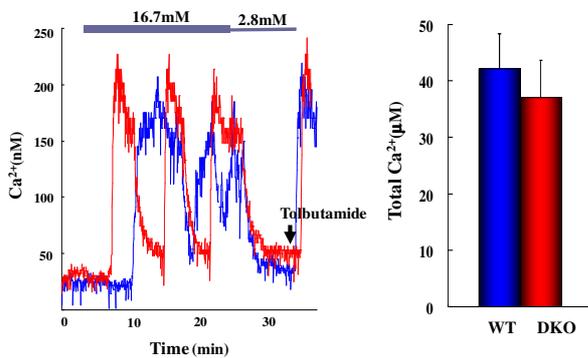


グルコース刺激による分泌量の上昇が、どの相で生じているのかを調べるため、培養ラ氏島を生理的な溶液で還流させた状態でグルコース刺激を行い、経時的にインスリン分泌量を定量し野生型と比較した。その結果、DKO では刺激後数分して分泌される第 1 相及び引き続いて起こる第 2 相の分泌共に野生型より有意に上昇していた。

KCl で培養ラ氏島の細胞膜を脱分極刺激し、RRP (readily releasable pool)からの小胞分泌を優先的に促したところ、DKO でインスリン分泌量は上昇していた。このことから、(1)生理的な刺激前の定常状態における細胞膜直下の分泌顆粒数に差が生じている、(2)分泌を惹起する細胞内カルシウム濃度が上昇していることが予想されたため、それらの解析を行った。

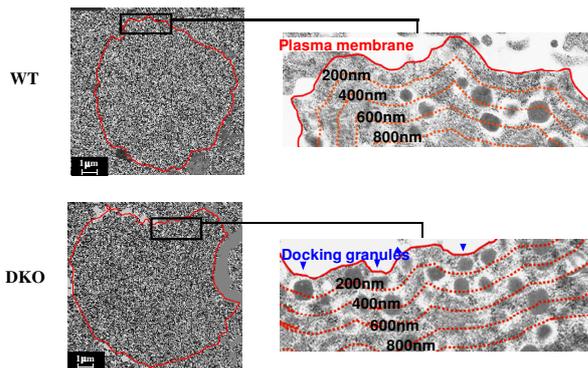


### (3) グルコース刺激における細胞内カルシウム濃度の比較

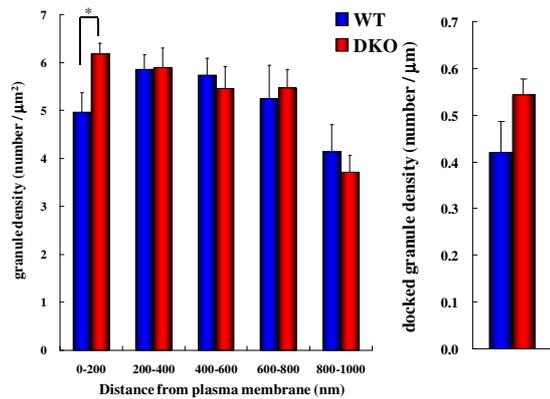
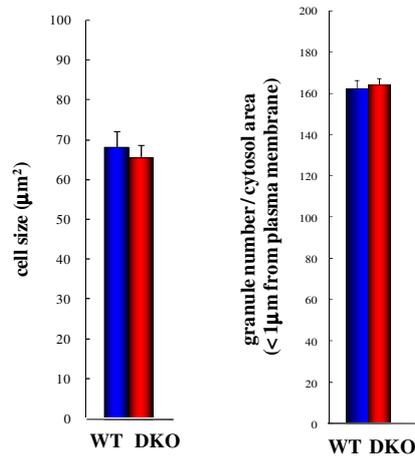


培養ラ氏島の細胞塊をコラゲナーゼ処理し、単層にしたβ細胞内カルシウム流入量をグルコース刺激で比較した。しかしながら、刺激前後で細胞内カルシウム濃度上昇に有意な差は認められなかった。

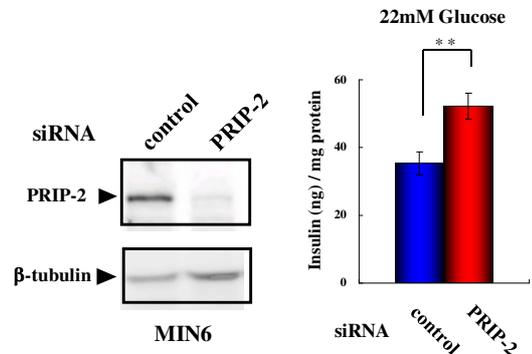
### (4) 電子顕微鏡によるβ細胞の形態学的解析



培養ラ氏島を用いて、β細胞の電子顕微鏡像を解析した。β細胞の大きさや細胞内に含まれる分泌顆粒数及びその密度に有意な差は認められなかった。さらに、細胞膜から200nm間隔で領域を分画し、各領域に含まれるインスリン分泌顆粒数及びその密度を比較した。その結果、細胞膜と直に接している分泌顆粒数に有意な差は認められなかったが、細胞膜直下(<200nm)の領域で分泌顆粒数がDKOで増加している傾向にあった。



### (5) インスリンノーマ培養細胞株(MIN6)を用いたPRIP分子の機能解析



膵β細胞株(MIN6)のPRIP発現を、siRNA法を用いて抑制した細胞株を樹立した。現在のところ、PRIP-2遺伝子の発現をノックダウンさせた細胞株の作成に成功している。インスリン分泌量を野生型の細胞株と比較したところ、培養ラ氏島の結果に一致して、インスリン分泌量の上昇が確認された。

今回の研究により、PRIP分子の欠損によってインスリン分泌量が増加することが強く示唆された。MIN6細胞を用いて、PRIPの細胞内局在をGFPにより可視化して解析を行ったが、現在のところ、インスリン分泌顆粒への直接的な結合や局在を明確に観測することはできていない。しかしながら、PRIP分子は、開口分泌を負に制御する因子として、インスリン分泌顆粒の開口放出に

関与していることが示唆される。今後、開口分泌における PRIP 分子の役割についての分子メカニズムを明らかにしていく。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 兼松隆, 塩井誠次郎, 平田雅人  
PRIP 分子によるインスリン分泌制御  
平成 19 年 12 月 13 日  
第 80 回 日本生化学会 横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塩井 誠次郎 (SHIOI SEIJIRO)  
福岡大学・RI センター・助教  
研究者番号：80423531

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし