

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08906

研究課題名(和文)日本人2型糖尿病感受性遺伝子GCN2が膵細胞機能に及ぼす影響に関する検討

研究課題名(英文) Evaluation of the effect of Japanese type 2 diabetes susceptibility gene GCN2 on pancreatic beta cell function.

研究代表者

木村 真希(小柳真希)(Maki, Kimura-Koyanagi)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：40623690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GCN2は、細胞内アミノ酸欠乏状態で増加したuncharged tRNAが結合することにより活性化される。

GCN2機能不全が膵細胞のインスリン分泌能に影響を与えるメカニズムを解明することが本研究の目的である。本研究課題において、高脂肪食下において膵島でGCN2がATF4、Sestrin2の発現亢進を介してmTORC1を適正に制御していること、および、mTORC1活性は14-3-3をTSC2とL-asparaginaseが競合的結合するため、L-asparaginase発現亢進下では、TSC2がmTORC1活性を適切に調整する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人2型糖尿病患者とGCN2のSNPとの関連が報告されており、日本人2型糖尿病患者に近い生理的な動態としてGCN2<sup>-/-</sup>マウスを用いた解析を行った。本研究において、高脂肪食負荷下では、インスリン需要が増大し、膵細胞におけるインスリン合成が亢進しアミノ酸濃度が減少することにより、GCN2のリン酸化が惹起され、mTORC1活性の調整がSestrin2やL-asparaginaseを介して行われる新たなメカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：EIF2AK4, which encodes the amino acid deficiency-sensing protein GCN2, has been implicated as a susceptibility gene for type 2 diabetes in the Japanese population. However, the mechanism by which GCN2 affects glucose homeostasis is unclear.

L-Asparaginase, which is expressed downstream of GCN2, was found to bind 14-3-3 and thereby to inhibit its binding to the T1462 phosphorylation site of TSC2 and contribute to TSC2 activation and mTORC1 inactivation upon TSC2 dephosphorylation.

研究分野：糖尿病

キーワード：GCN2 膵細胞 mTORC1活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において、糖尿病人口は増加の一途をたどっている。日本の糖尿病診療にかかる医療費は世界第5位となり、大きな社会問題となっている。特に日本人2型糖尿病の発症・進展には膵β細胞の機能障害が重要な因子であることが明らかとなっている。

代表者は現在まで一貫して糖尿病発症における膵β細胞の量的異常(膵β細胞量の減少)および質的異常(インスリン分泌不全)の調節機構に関する研究に従事してきた。膵β細胞においては、タンパク合成因子である mTORC1 活性調節が細胞量を規定する重要な因子であること (Mol Cell Biol, 2008; J Clin Invest, 2010; Diabetes 2014) のみならず、ミトコンドリア生合成促進を介して膵β細胞のインスリン分泌能を亢進させること (PLoS ONE. 6, e23238, 2011) を明らかにしている。日本人2型糖尿病患者の GWAS 解析から、アミノ酸欠乏状態で活性化されるタンパク質キナーゼ GCN2 をコードする遺伝子 EIF2AK4 の変異が有意に上昇していることが報告されている。代表者の検討により、高脂肪食負荷 GCN2 欠損マウスでは、GCN2 の機能不全により mTORC1 シグナルが抑制されなくなり、恒常的な mTORC1 活性亢進を介して膵β細胞量が減少することが分かった (JCI insight.2020)。

ここまでの研究において、GCN2 の機能不全が膵β細胞の量的異常を導くことを解明したが、2型糖尿病の発症・進展には、膵β細胞の質的異常も重要なメカニズムである。特に、2型糖尿病患者のインスリン分泌能は低下に陥る前の段階で一時的に分泌亢進を認めることが知られており、βGCN2-/-マウスにおけるインスリン分泌能の経時的な変化や、インスリン分泌能に与える影響について解明されていないことが多い。

## 2. 研究の目的

上述の通り、日本人2型糖尿病患者と GCN2 の SNP との関連が報告されている。また、戦後わが国では脂質摂取量が急激に増加していることから、高脂肪食負荷 βGCN2-/-マウスは現代の日本人2型糖尿病モデルマウスと位置付けることができる。βTSC2-/-マウスと異なり、βGCN2-/-マウスを用いることで日本人2型糖尿病患者に近い生理的な動態を明らかにすることができると考えている。モデルマウスの膵島において、膵β細胞機能に関連する変化を明らかにすることが本研究の目的であり、これにより日本人2型糖尿病患者もしくは SNP 保有者への糖尿病発症予防策および新規治療法の確立に繋がることが期待される。

本研究で用いる βGCN2-/-マウスは代表者らが独自に作成したマウスであり、また膵β細胞における mTORC1 活性の役割についても、代表者の研究室が独自に見出してきたものである。これまで解析を続けてきた βTSC2-/-マウスは非常に表現型が強く興味深いマウスであるが、実際の2型糖尿病患者にどのように関連するかについてはわかっていなかった。代表者が「日本人2型糖尿病モデルマウス」と位置づけている高脂肪食負荷 βGCN2-/-マウスの

膵島で mTORC1 活性亢進に関連した機能解析をすることは、独自性ならびに創造性においても高い研究計画と考えている。

### 3 . 研究の方法

ヒト被験者における T2DM に関連する GCN2 の SNP 多型と代謝パラメータとの関係を評価し、リスク対立遺伝子を有する被験者では 75gOGTT 試験ならびにインスリンランプ試験にてインスリン分泌が減少していることを見出した。

次に、全身性 GCN2 ノックアウトマウスに高脂肪負荷を行った際に、耐糖能異常および膵β細胞量減少をきたすことを確認した。そこで、膵β細胞特異的 GCN2 欠損マウス (βGCN2-/-マウス)を用いてインスリン分泌能を評価したところ、高脂肪食負荷後の耐糖能異常および膵β細胞量減少を認めた。この現象には、GCN2 欠損による mTORC1 活性亢進およびインスリンシグナルの低下が関係していることが示唆された。そこで、GCN2 の下流に存在する eIF2 のリン酸化と蛋白翻訳の低下、ATF4 の選択的な翻訳促進が報告されているため、高脂肪食負荷全身性 GCN2 ノックアウトマウスの膵島および GCN2 ノックダウン INS-1 細胞のイミュノプロット解析により ATF4 の発現低下を確認した。加えて ATF4 ノックダウン INS-1 細胞において mTORC1 活性の亢進とインスリンシグナルの低下を認め、その過程に Sestrin2 の発現低下が関係していることが明らかとなった。この Sestrin2 が mTORC1 活性をネガティブコントロールしていることが培養細胞において確認済である。

続いて我々は、mTORC1 活性調節に重要な TSC2/14-3-3 結合に干渉しうる分子を同定するため、アミノ酸欠損下で培養したコントロール INS-1 細胞と GCN2 ノックダウン INS-1 細胞においてプロテオーム解析を行った。4つの候補分子の中から、L-asparaginase が糖負荷により MIN-6 細胞および高脂肪食負荷マウスにおいて発現が上昇することを見出した。ここまでの結果において、高脂肪食負荷において、インスリン需要が増大し、膵β細胞におけるインスリン合成が亢進しアミノ酸濃度が減少することにより、GCN2 のリン酸化が惹起され、mTORC1 活性の調整が Sestrin2 や L-asparaginase を介して行われる新たなメカニズムの存在が示唆された。

### 4 . 研究成果

GCN2 をコードしている EIF2AK4 遺伝子は 2008 年に日本人において 2 型糖尿病原因遺伝子の一つとして同定された遺伝子であり、遺伝子内の SNP (一塩基多型) が 2 型糖尿病の発症リスクに関係することが報告されている。本研究課題において、高脂肪食下において膵島で GCN2 が ATF4、Sestrin2 の発現亢進を介して mTORC1 を適正に制御していること、および、mTORC1 活性は 14-3-3 を TSC2 と L-asparaginase が競合的結合するため、L-asparaginase 発現亢進下では、TSC2 が mTORC1 活性を適切に調整する可能性が示唆された。2 型糖尿病における膵β細胞量の調整に mTORC1 活性が中心的に関与していることは研究代表者も含めて過去の研究結果から明らかとなっているため、本研究は、強い関心もたれているにもかかわらず、十分に解明されていない膵β細胞機能における GCN2 の役割について、一石を投じる

ものになると考えている。代表者らが独自に保有する  $\beta$ GCN2-/-マウスの解析によってのみ可能な研究と考えており、非常に意義深い研究計画であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanno A, Asahara S-I, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei F-Y, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic cell mass by sensing intracellular amino acid levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e128820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.128820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Seike M, Asahara SI, Inoue H, Kudo M, Kanno A, Yokoi A, Suzuki H, Kimura-Koyanagi M, Kido Y, Ogawa W.	4. 巻 652
2. 論文標題 l-Asparaginase regulates mTORC1 activity via a TSC2-dependent pathway in pancreatic beta cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 121-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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
研究分担者	木戸 良明 (Kido Yoshiaki) (10335440)	神戸大学・保健学研究科・教授  (14501)	
研究分担者	堀 裕一 (Hori Yuichi) (80248004)	神戸大学・保健学研究科・教授  (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------