

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790286

研究課題名 (和文) スフィンゴ脂質によるインスリン分泌制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of insulin secretion by sphingolipids

研究代表者

矢野 正人 (YANO MASATO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60315299

研究成果の概要 (和文) : スフィンゴミエリン合成酵素 1 (SMS1) は、セラミドをスフィンゴミエリンに変換する酵素であり、細胞内のスフィンゴ脂質の恒常性を維持する重要な役割を担っている。本研究では、SMS1 欠損マウスの示すインスリン分泌不全の原因を調べた。その結果、SMS1 欠損マウスの膵β細胞では、スフィンゴ脂質組成の異常により、ミトコンドリア機能が低下し、酸化ストレスが亢進することにより、インスリン分泌機能が低下していると考えられた。また、抗酸化剤で酸化ストレスを抑制することにより、インスリン分泌を部分的に回復できることがわかった。

研究成果の概要 (英文) : Sphingomyelin synthase 1 (SMS1) catalyzes the conversion of ceramide to sphingomyelin, and has a central role in controlling sphingolipid homeostasis in the cell. In this study, we analyzed the pathogenesis of SMS1 null mice, which exhibit insulin secretion deficiency. As results, we found that disturbance of sphingolipid homeostasis and increased oxidative stress accompanied with mitochondrial dysfunction underlies insulin secretion deficiency observed in pancreatic beta-cells of SMS1 null mice. Furthermore, anti-oxidant treatment recovered insulin secretion deficiency in SMS1 null mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：スフィンゴ脂質、セラミド、インスリン、酸化ストレス、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴミエリン合成酵素 1 (SMS1) は、ゴルジ体においてセラミドをスフィンゴミエリンに変換する酵素である。一般に、小胞体で *de novo* 合成されたセラミドはゴルジ体へと輸送され、そこで SMS1 によりスフィンゴミエリンに変換される。それらは必要に

じて、さらにスフィンゴ糖脂質にも変換された後、細胞膜へと輸送される。これら細胞膜のスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質は、コレステロールとともに、脂質ラフトを構成する主要成分であり、細胞膜タンパク質の膜貫通ドメインと直接相互作用することにより様々な生理活性を示すことが知られ

ている。よって、本研究で解析を行った SMS1 ノックアウトマウス (SMS1-KO マウス) では、セラミドのスフィンゴミエリンへの変換が十分に行われないうえ、細胞膜のスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質類が減少し、細胞の脂質ラフトの構成に異常が生じ、イオンチャンネル等の脂質ラフト依存性膜タンパク質が正しく機能しなくなる可能性が予想されていた。また、SMS1 はゴルジ体に局在する酵素であるため、SMS1-KO マウスでは、小胞体で合成されたセラミドが、ゴルジ体や小胞体、さらには小胞体と相互作用するミトコンドリアなどにも蓄積し、細胞機能に障害を与えている可能性も予想されていた。

一方、当時、我々が行った SMS1-KO マウスの解析により、SMS1-KO マウスではグルコース刺激によるインスリン分泌が顕著に低下していることがわかっていた。さらに、このインスリン分泌低下は、個体レベルだけでなく、インスリンを分泌する膵β細胞を含む膵島レベルでも観察されることが明らかになりつつあった。

2. 研究の目的

一般に、インスリンが分泌されるまでのシグナル伝達経路としては、1) 膵β細胞膜上のグルコーストランスポーター GLUT2 を介した細胞内へのグルコースの取り込み、2) グルコース代謝に伴うミトコンドリアにおける ATP の合成、3) ATP 量の上昇に伴う ATP 依存性カリウムイオンチャンネル (KATP channel) の不活性化による細胞膜電位の脱分極、4) 膜電位依存性カルシウムイオンチャンネル (VDCC) の活性化による細胞内へのカルシウムの流入 (この後、膜電位依存性カリウムイオンチャンネル (Kv channel) が再分極してカルシウムイオンの流入を停止させようとする)、5) 細胞内カルシウムイオン濃度上昇によるインスリンの分泌促進 (SNARE 複合体を介したインスリン分泌小胞と細胞膜との融合によるインスリン分子の細胞外への放出)、という一連の経路が知られている。よって、SMS1-KO マウスの膵β細胞では、これらの過程のいくつかが正しく機能していない可能性が予想されていた。

そこで、本研究では、『スフィンゴ脂質によるインスリン分泌制御機構の解明』を目的とし、SMS1-KO マウスにおいて、インスリン分泌シグナル伝達経路 (すなわち、膵β細胞におけるグルコースの取り込み、ミトコンドリアでの ATP の合成、各種イオンチャンネルの開閉、インスリン分泌開口部の SNARE 複合体形成など) のどの段階に異常が生じているかを調べ、スフィンゴ脂質代謝異常とインスリン分泌機能不全との因果関係を明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

(1) マウスからの膵島の単離は Wollheim らの方法に従って行った (Wollheim *et al.*, *Methods Enzymol.* (1990) 192, 188-223.)。具体的には、以下の方法を用いた。①マウスの膵臓にコラゲナーゼおよび aprotinin を含む Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) を注入し、37°C で 20 分間震盪する。②氷上に 20 分静置し、自然沈降した膵島を HBSS でリンスする。③さらに氷上で 20 分静置し、自然沈降した膵島を顕微鏡下で回収する。

(2) 単離した膵島からのインスリン分泌量の測定は以下の方法で行った。①単離した膵島を、2.2mM もしくは 22mM のグルコースを含む HKRB buffer (カルシウムイオンをよび HEPES を含む Kerbs-Ringer bicarbonate buffer) 中において 37°C で 1 時間インキュベートする。②上澄み中に分泌されたインスリン量を ELISA キットで定量的に解析する。

(3) 膜電位依存性カリウムイオンチャンネル (Kv channel) の機能解析はパッチ・クランプ法により行った。Kv channel は、脂質ラフト依存的に機能すると考えられるので、SMS1-KO マウスの膵β細胞では、イオンチャンネル機能が異常になっている可能性が予想されていた。しかし、結果的には、SMS1-KO マウスの膵β細胞の Kv channel 機能に有意な低下は見出せなかった (data not shown)。

(4) SMS1-KO マウス膵島の ATP 含量の測定は以下の方法で行った。①単離した膵島を、2.2mM もしくは 22mM のグルコースを含む HKRB buffer 中において 37°C で 1 時間インキュベートする。②膵島を 0.1% トリクロロ酢酸で処理し、ATP を回収した後、トリス酢酸緩衝液で抽出液を中和する。③ルシフェラーゼアッセイにより ATP 含量を測定する。

(5) 膵島のミトコンドリア膜電位は、蛍光色素 JC-1 を細胞に取り込ませた後、蛍光顕微鏡下で観察するとともに、蛍光プレートリーダーを用いて定量的に解析した。また、膵島中の活性酸素種 (ROS) の量は、蛍光色素 CM-H₂DCFDA を細胞に取り込ませた後、蛍光プレートリーダーを用いて定量的に解析した。

(6) 膵島から抽出したタンパク質の ROS による酸化修飾状態は、抗 4-hydroxy-2-neonal (4-HNE) 抗体を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。

(7) 膵島における各種遺伝子 (酸化ストレス応答因子、ミトコンドリア生合成関連因子、ミトコンドリア呼吸鎖複合体構成因子) の mRNA 発現量は、リアルタイム PCR 法により解析した。

(8) 抗酸化ストレス剤である NAC (*N*-acetyl cysteine) のマウスへの投与は、飲料水中に 40mM の NAC を添加することにより行った。NAC の投与は、親ヘテロマウスの交配時から開始し、出生した SMS1-KO マウスを解析に使用する時期 (生後 20~24 週齢) まで継続した。

(9) マウス個体へのグルコース負荷試験は、1g/kg のグルコースを腹腔内に注射投与することで行った。血中のグルコース濃度は、マウスの眼底から採血して測定した。また、採集した血液から血清を回収し、血清中のインスリン濃度を ELISA キットを用いて定量的に解析した。

4. 研究成果

これまでの研究から、SMS1-KO マウスではグルコース負荷試験時に血中に放出されるインスリン量が低下していることがわかっていった。そこで、まず、SMS1-KO マウスから単離した膵島を用いて、グルコース刺激時のインスリン分泌が低下しているか調べた。具体的には、単離した膵島を、2.2mM グルコース (低グルコース) もしくは 22mM グルコース (高グルコース) で刺激し、放出されたインスリン量を調べた。その結果、高グルコース刺激時には、SMS1-KO マウスの膵島からのインスリン分泌が著しく低下することがわかった (図 1)。よって、SMS1-KO マウスが示す血中へのインスリン分泌不全は、膵島レベルでの膵β細胞からのインスリン分泌不全が直接的な原因であることが明らかとなった。

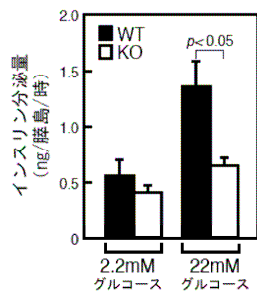


図 1: 野生型 (WT) および SMS1-KO (KO) マウスから単離した膵島を、グルコース溶液中において 37°C で 1 時間インキュベートし、上澄中に分泌されたインスリンを ELISA キットを用いて定量した。

次に、膵島からのインスリン分泌不全が、膵β細胞のインスリン分泌機構のどの段階段階で起っているか調べることにした。膵β細胞におけるグルコース流入に伴うミトコンドリアにおける ATP 産生は、インスリン分泌シグナル伝達経路の第二段階として重要である。しかし、小胞体とミトコンドリアの間には脂質の輸送経路があり、SMS1-KO マウスの膵島では、小胞体に蓄積したセラミド類が、小胞体と相互作用しているミトコンドリアにも輸送され、それらがミトコンドリア機能を阻害し、ATP 合成が阻害されている可能性が予想された。そこで、SMS1-KO マウスの膵β細胞でミトコンドリアにおける ATP 合成量が低下している可能性を解析した。実際、

単離した膵島を、2.2mM グルコース (低グルコース) もしくは 22mM グルコース (高グルコース) で刺激した際の膵島内の ATP 含量をルシフェラーゼアッセイにより調べたところ、低グルコースで刺激した場合には、野生型および SMS1-KO マウスの膵島中の ATP 量には大きな変化が見られなかった。一方、高グルコースで刺激した場合には、野生型マウスの膵島では ATP 量の増加が認められたが、SMS1-KO マウスの膵島では ATP 量の増加が低下していた (図 2)。この結果から、SMS1-KO マウスの膵β細胞ではミトコンドリアの機能に異常が生じており、グルコース刺激に応じた ATP 産生増加が十分に行われていないと考えられた。

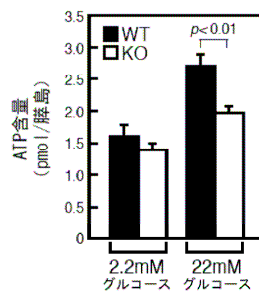


図 2: 野生型 (WT) および SMS1-KO (KO) マウスから単離した膵島を、グルコース溶液中において 37°C で 1 時間インキュベートした後、膵島から ATP を回収し、ルシフェラーゼアッセイにより、ATP 含量を定量した。

次に、SMS1-KO マウスの膵β細胞のミトコンドリアで実際にどのような異常が生じているか調べた。まず、ミトコンドリア膜電位を調べたところ、膵島を 2.2mM グルコース (低グルコース) もしくは 22mM グルコース (高グルコース) のいずれかで刺激した場合にも、SMS1-KO マウスの膵島のミトコンドリア膜電位は、野生型マウスの膵島の場合に比べて大きく上昇していた (図 3)。この結果から、SMS1-KO マウスの膵β細胞ではミトコンドリアの電子伝達系が活性化され、ミトコンドリア膜電位が上昇していると考えられた。

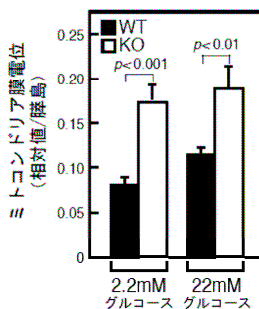


図 3: 野生型 (WT) および SMS1-KO (KO) マウスから単離した膵島に、ミトコンドリア膜電位測定試薬である JC-1 を添加し、グルコース溶液中において 37°C で 1 時間インキュベートした後、蛍光強度を測定することにより、ミトコンドリア膜電位を測定した。

このように、SMS1-KO マウスの膵β細胞のミトコンドリアでは、ミトコンドリア機能に異常が生じ、グルコース刺激に応じた ATP 産生増加が十分に行われていないことが示された (図 2)。一方で、SMS1-KO マウスの膵β細胞のミトコンドリアでは、電子伝達系が活性化され、ミトコンドリア膜電位が上昇していることが示された (図 3)。これらのことから、SMS1-KO マウスの膵β細胞では、ミト

ミトコンドリア内膜の電子伝達系により作られるプロトン勾配(ミトコンドリア膜電位)が、プロトン勾配のエネルギーを利用してATPを合成するATP合成酵素と上手く共役していない可能性が考えられた。この場合、ミトコンドリア内膜の電子伝達系では、電子が行き場を失い、活性酸素種(ROS)が増加すると予想された。実際、ROSの量を測定したところ、SMS1-KOマウスの膵島ではROSが増加していた(図4A)。また、膵島のタンパク質について、ROSによる修飾を調べたところ、SMS1-KOマウスの膵島では、タンパク質のROSによる修飾が増加していた(図4B)。また、膵臓から単離したミトコンドリアのスフィンゴ脂質組成を調べたところ、SMS1-KOマウスのミトコンドリアでは、セラミドの量が増加していた(data not shown)。これらの結果から、SMS1-KOマウスの膵β細胞では、ミトコンドリア膜のスフィンゴ脂質組成に異常が生じ、ミトコンドリア内膜の電子伝達系とATP合成酵素が上手く共役して働かず、電子伝達系からROSが過剰に生成し、タンパク質がROSによる修飾を受け、ミトコンドリア機能が低下するとともに、細胞全体の機能が低下していると考えられた。

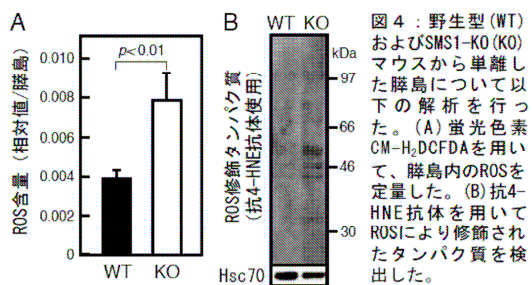


図4：野生型(WT)およびSMS1-KO(KO)マウスから単離した膵島について以下の解析を行った。(A)蛍光色素CM-H₂DCFDAを用いて、膵島内のROSを定量した。(B)抗4-HNE抗体を用いてROSにより修飾されたタンパク質を検出した。

次に、ROSの過剰産生に対して、実際どのような細胞応答が起っているか調べることにした。まず、酸化ストレス応答関連遺伝子に関して解析した結果、SMS1-KOマウスの膵島では、酸化ストレス除去因子であるcatalaseの発現が有意に上昇していることがわかった(図5A)。また、有意差は見られなかったものの、グルタチオンペルオキシダーゼ(Gpx1)の発現も上昇していた。さらに、ミトコンドリアの生成に関わる因子(PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α)やPGC-1 β など)の発現が上昇していた(図5B)。また、ミトコンドリア電子伝達系構成因子の発現が上昇していた(図5C)。これらの結果から、SMS1-KOマウスの膵β細胞では、ROSの過剰産生によるダメージを軽減するために、酸化ストレスを除去するとともに、ミトコンドリアの機能を回復するような細胞応答が起きていると考えられた。しかし、SMS1-KOマウスの膵β細胞において、酸化ストレス除去因子やミトコンドリア電子伝達系の構成因子の発現が増加しても、ミトコンドリアの

スフィンゴ脂質組成に異常があるため、根本的にはROSの産生が抑制されていないと考えられた。

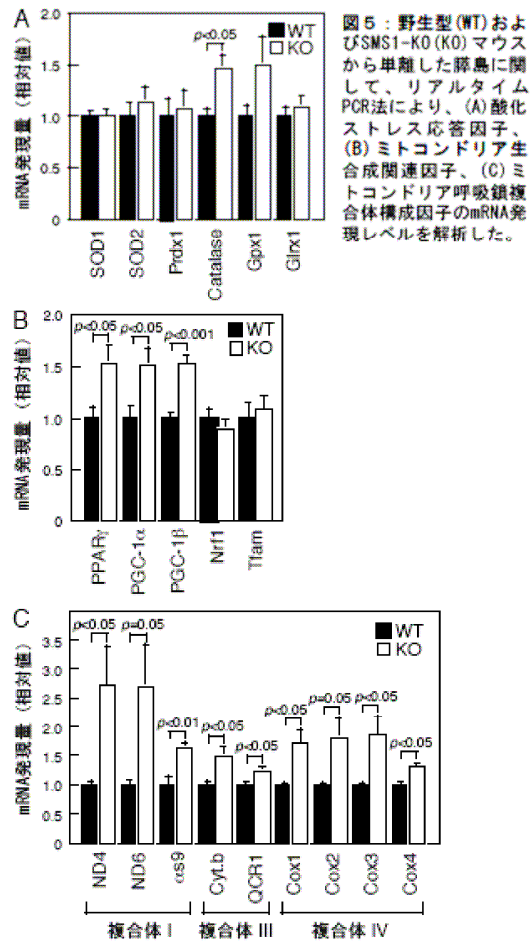


図5：野生型(WT)およびSMS1-KO(KO)マウスから単離した膵島に関して、リアルタイムPCR法により、(A)酸化ストレス応答因子、(B)ミトコンドリア生成関連因子、(C)ミトコンドリア呼吸鎖複合体構成因子のmRNA発現レベルを解析した。

さらに、上記の結果から、『ミトコンドリアのスフィンゴ脂質組成異常による酸化ストレスの亢進(ROSの増加)が、膵β細胞におけるインスリン分泌不全の原因』であると予想された。そこで、SMS1-KOマウスに抗酸化ストレス剤であるNAC(*N*-acetyl cysteine)を投与することにより、SMS1-KOマウスのインスリン分泌が改善されるか検討した(図6)。グルコース負荷試験を行った結果、NACを摂取させたSMS1-KOマウスでは、糖の取り込みが改善されていた(図6A)。また、NACを摂取させたSMS1-KOマウスでは、グルコース刺激によるインスリンの分泌が改善されていた(図6B)。

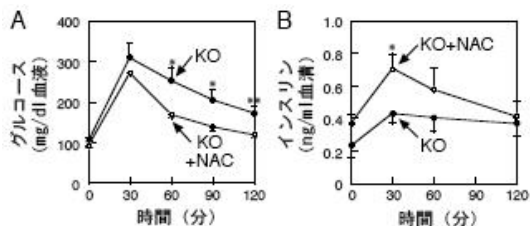


図6：通常飲料水(KO)もしくはNACを含む飲料水(KO+NAC)を摂取させたSMS1-KOマウスに関して、グルコース負荷試験を行った。(A)グルコース投与後の血中グルコース濃度を測定した。(B)グルコース投与後の血清中のインスリン濃度を測定した。

以上の結果から以下のことが示された。
1) SMS1 の欠損により、膵β細胞ミトコンドリアのスフィンゴ脂質組成に異常が生じる。
2) SMS1 の欠損により、膵β細胞のミトコンドリア機能 (ATP 産生能力) が低下するとともに、酸化ストレスが亢進し、膵β細胞が機能不全 (インスリン分泌不全) を起こす。
3) 薬剤で酸化ストレスを抑制することにより、SMS1 欠損マウスの示すインスリン分泌不全を部分的に回復することが可能である。

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 2 件)

1) Masato Yano, Ken Watanabe, Tadashi Yamamoto, Kazutaka Ikeda, Takafumi Senokuchi, Meihong Lu, Tsuyoshi Kadomatsu, Hiroto Tsukano, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, Shohei Yamaoka, Toshiro Okazaki, Hisanori Umehara, Tomomi Gotoh, Wen-Jie Song, Koichi Node, Ryo Taguchi, Kazuya Yamagata, Yuichi Oike. Mitochondrial Dysfunction and Increased Reactive Oxygen Species Impair Insulin Secretion in Sphingomyelin Synthase 1-null Mice. The Journal of Biological Chemistry (2011) 286, 3992-4002. (査読あり)

2) Hiroto Tsukano, Tomomi Gotoh, Motoyoshi Endo, Keishi Miyata, Hirokazu Tazume, Tsuyoshi Kadomatsu, Masato Yano, Takao Iwawaki, Kenji Kohno, Kimi Araki, Hiroshi Mizuta, Yuichi Oike. The Endoplasmic Reticulum Stress-C/EBP Homologous Protein Pathway-Mediated Apoptosis in Macrophages Contributes to the Instability of Atherosclerotic Plaques. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (2010) 30, 1925-1932. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1) 矢野 正人、山本 格士、渡部 研、池田 和貴、瀬ノ口 隆文、門松 毅、東野 寛人、後藤 知己、岡崎 俊朗、田口 良、山縣 和也、尾池 雄一. スフィンゴミエリン合成酵素 1 ノックアウトマウスにおける ROS 産生増加と致死性・インスリン分泌不全・脂肪萎縮との関連性の解析. 第 83 回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド), 2010 年 12 月 9 日. (口頭発表およびポスター発表)

2) 矢野 正人、Wang Difei、池田 和貴、瀬ノ口 隆文、門松 毅、山縣 和也、田口

良、渡部 研、尾池 雄一. スフィンゴミエリン合成酵素 1 による脂質および糖代謝制御に関する解析. 第 82 回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド), 2009 年 10 月 24 日. (ポスター発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 正人 (YANO MASATO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 60315299

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし