

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590981

研究課題名（和文） ストレス下における GCN2 による膵β細胞量調節機構の解明

研究課題名（英文） GCN2, a type 2 diabetes mellitus susceptibility gene, is associated with the regulation of pancreatic beta-cell mass

研究代表者

木戸 良明 (KIDO YOSHIAKI)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：10335440

研究成果の概要（和文）：細胞内のアミノ酸欠乏状態を感知するキナーゼである GCN2 のノックアウト(GCN2<sup>-/-</sup>)マウスを樹立し、解析をした。高脂肪食飼育により GCN2<sup>-/-</sup>マウスの耐糖能は悪化し、膵β細胞量は減少していた。高脂肪食下にはインスリン需要が増加し、相対的に膵β細胞内のアミノ酸の濃度が低下することにより GCN2 が活性化され、mTORC1 シグナルの恒常的亢進によるインスリンシグナルの低下を介して、膵β細胞量の減少に関与していることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：GCN2 is a molecule activated by amino acid deficiency. We generated generalized GCN2 knockout mice (GCN2<sup>-/-</sup> mice). GCN2<sup>-/-</sup> mice fed a high-fat diet (HFD) exhibited significant aggravation in glucose tolerance and reduction in pancreatic β-cell mass. Our results showed that chronic activation of mTORC1 signal is one of the causes of reduction in pancreatic β-cell mass in GCN2<sup>-/-</sup> mice. In islets from mice fed a HFD, the activation of GCN2, caused by the enhancement of translation of insulin, might contribute to maintenance of pancreatic β-cell mass.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

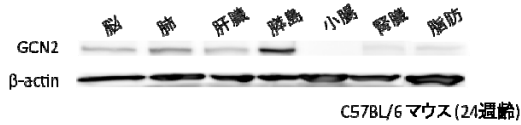
(1) 日本人は欧米人と比較すると、相対的に 2 型糖尿病患者に肥満を呈する症例が少なく、インスリン分泌不全を認める症例が多い。

(2) 日本人における SNP 解析で、general control nonderepressible 2 (GCN2) の SNP と

2 型糖尿病に有意な相関が報告された。GCN2 は、細胞内のアミノ酸欠乏状態を感知するキナーゼである。アミノ酸欠乏状態では、アミノアシル化されていない free tRNA が増加し結合して、GCN2 は活性化される。

(3) マウスの各組織で比較したところ、膵島で GCN2 が強く発現していた。

図1. マウス各組織におけるGCN2発現量の比較



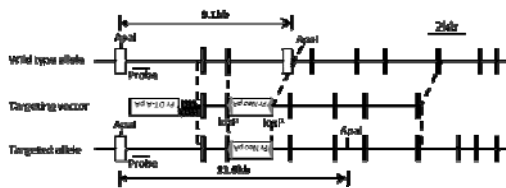
## 2. 研究の目的

- (1) 遊離アミノ酸で活性化される GCN2 の膵β細胞における発現・活性調節および、その mTORC1 活性制御機構を解明する
- (2) GCN2 欠損マウスを用い、成熟後のインスリン抵抗性の状態で、mTORC1 活性及び膵β細胞量調節に果たす役割を解明する。

## 3. 研究の方法

全身性 GCN2 ノックアウトマウス (GCN2<sup>-/-</sup>マウス) を作製し、代謝パラメーター及び組織学的な解析を行い、対照マウスと比較した。GCN2<sup>-/-</sup>マウスの膵島や GCN2 ノックダウン INS-1 細胞を用いてインスリンシグナルの変化を検討した。

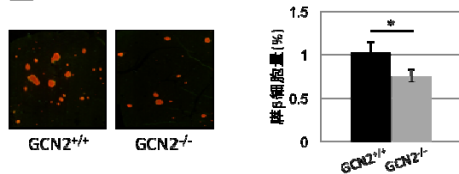
図2. 全身性GCN2ノックアウトマウスのコンストラクト



## 4. 研究成果

- (1) 通常食飼育下 24 週齢 GCN2<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスと比較し、耐糖能や膵β細胞量に変化を示さなかった。しかし、高脂肪食飼育下 24 週齢 GCN2<sup>-/-</sup>マウス (HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウス) の耐糖能は野生型と比べて有意に悪化し、膵β細胞量は有意に減少した。

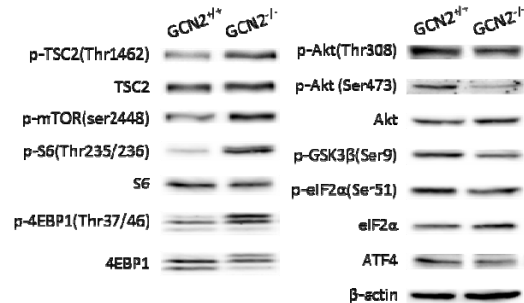
図3. 高脂肪食負荷マウス24週齢の膵β細胞量



- (2) HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウスの膵島では、S6K や S6 のリン酸化が増加するなど mTORC1 活性が亢進していた。さらに、IRS-2 の発現、p-Akt (Thr308, Ser473) や p-GSK3β が低下するなどインスリンシグナルは低下していた。

これらの結果から、HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウスの膵島では mTORC1 シグナルの亢進により、ネガティブフィードバックを介したインスリンシグナル低下をきたし、膵β細胞量が減少していると考えられた。

図4. 高脂肪食負荷マウスの膵島におけるインスリンシグナルの比較



- (3) HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウスの膵島における mTORC1 シグナル亢進の機序を明らかにするため、通常食(NCD)もしくは高脂肪食(HFD)で飼育した C57BL/6J マウスの膵島で GCN2 の活性を比較したところ、HFD マウスの膵島で有意な活性化が認められた。HFD マウスにおいてはインスリン需要の亢進により、膵β細胞でインスリンの翻訳が亢進していると考えられる。膵β細胞にグルコース刺激を行うと、プロインスリンの翻訳が著明に増加することが知られているが、グルコース刺激 INS-1 細胞では GCN2 が活性化され、その活性化はシクロヘキサミドによる蛋白翻訳阻害で、打ち消されることが確認された。さらに in vivo で検討したところ、絶食後の再摂食により、膵島で GCN2 が活性化された。これらの結果を考慮すると、膵β細胞ではインスリンの翻訳が亢進することで、GCN2 が活性化するのではないかと考えられた。

図5. 食餌がマウス膵島のGCN2リン酸化に及ぼす影響

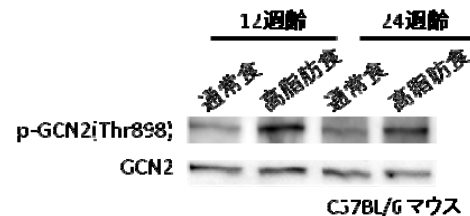
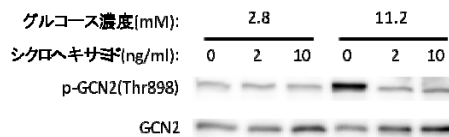
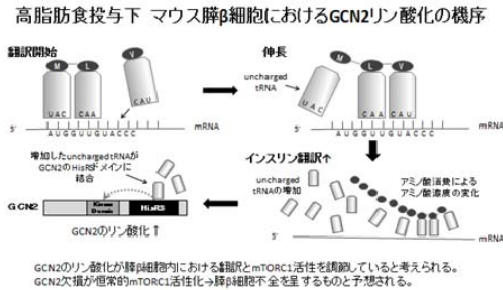


図6. 蛋白合成がGCN2リン酸化に及ぼす影響



(4) HFD マウスではインスリンの需要が高まり、膵β細胞におけるインスリンの翻訳が亢進しているために GCN2 が活性化しているという仮説を構築した。

図 7. 高脂肪食負荷マウス膵β細胞における GCN2 リン酸化の機序



その仮説を検証するため、NCD と HFD 下に飼育したマウスの膵島内におけるアミノ酸濃度を測定したところ、HFD マウスの膵島ではアミノ酸全般の濃度低下が認められた。したがって、膵β細胞でインスリン蛋白の翻訳が亢進し、膵β細胞内のアミノ酸濃度が低下することにより、free tRNA の増加をリガンドとして GCN2 が活性化していることが示唆された。

図 8. 通常食（白）および高脂肪食（黒）負荷野生型マウスの血漿におけるアミノ酸濃度

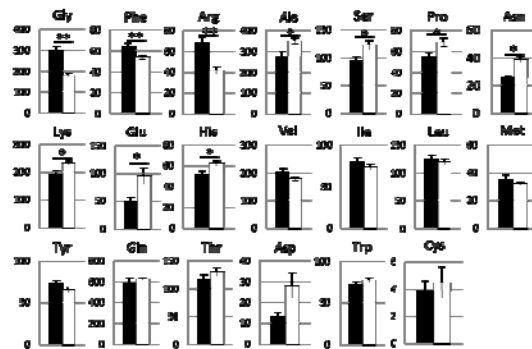
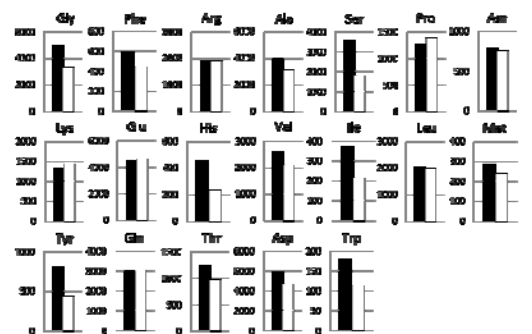
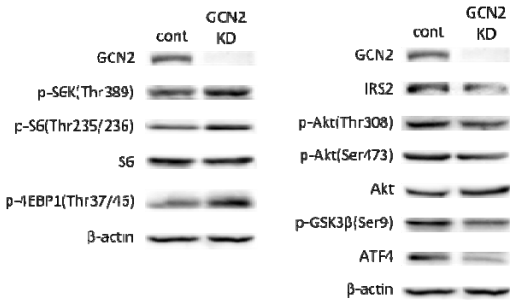


図 9. 通常食（白）および高脂肪食（黒）負荷野生型マウスの膵島におけるアミノ酸濃度



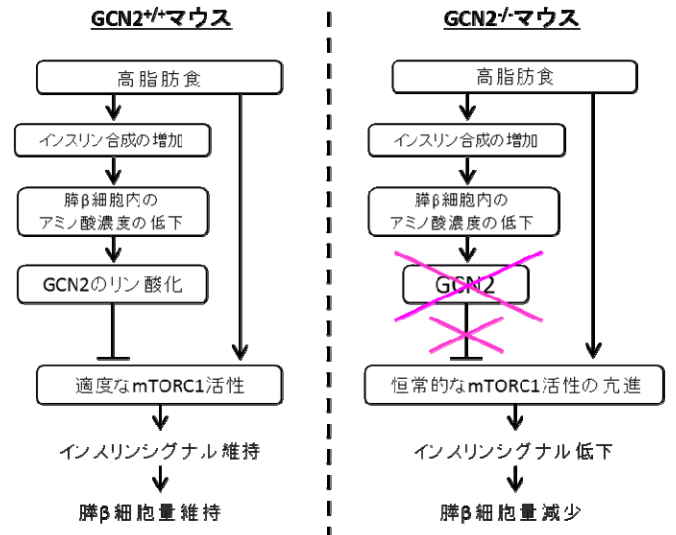
(5) アミノ酸の濃度低下が及ぼす影響を検討すべく、GCN2 ノックダウン INS-1 細胞のメディウム中のアミノ酸の一部を欠乏させて実験を行った。その結果、HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウスの膵島と同様に、mTORC1 シグナルの亢進とインスリンシグナルの低下が確認された。

図 10. GCN2 ノックダウン INS-1 細胞におけるインスリンシグナルの比較



(6) 以上より、HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウスは膵β細胞量の減少を示し、mTORC1 シグナルの恒常的亢進によるネガティブフィードバックが、インスリンシグナルの低下から膵β細胞量を引き起こす一因であると考えられた。HFD でインスリン需要が増加し、相対的に膵β細胞内のアミノ酸の濃度が低下することにより GCN2 が活性化され、膵β細胞量の維持に参与していることが示唆された。HFD GCN2<sup>-/-</sup>マウスは、GCN2 に SNP を有する 2 型糖尿病患者における過食、インスリン過剰合成を背景とした膵β細胞不全、糖尿病発症機構のモデルの一つとなる可能性が期待される。

図 11. 高脂肪食負荷マウスにおける膵β細胞量調節メカニズム



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 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

①吉富理紗、神野歩、浅原俊一郎、松田友和、木村真希、渋谷由紀、春日雅人、清野進、木戸良明、2型糖尿病発症における eIF2 $\alpha$  キナーゼ GCN2 の機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012. 12. 12、福岡

②神野歩、吉富理紗、浅原俊一郎、松田友和、木村真希、渋谷由紀、春日雅人、清野進、木戸良明、2型糖尿病発症における eIF2 $\alpha$  キナーゼ GCN2 の機能解析、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012. 05. 19、横浜

③吉富理紗、神野歩、浅原俊一郎、松田友和、木村真希、渋谷由紀、春日雅人、清野進、木戸良明、2型糖尿病発症における eIF2 $\alpha$  キナーゼ GCN2 の機能解析、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012. 04. 21、名古屋

④神野歩、吉富理紗、浅原俊一郎、松田友和、小柳真希、渋谷由紀、春日雅人、清野進、木戸良明、 $\beta$  細胞における eIF2 $\alpha$  キナーゼ GCN2 の機能解析、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011. 05. 20、札幌

〔図書〕（計 0 件）

〔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

木戸 良明 (KIDO YOSHIAKI)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：10335440

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：