

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790944

研究課題名(和文) 膵細胞機能調節に関する eIF2 キナーゼ GCN2 の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of GCN2 in the regulation of pancreatic beta-cell mass.

研究代表者

木村 真希(小柳真希)(Kimura-Koyanagi, Maki)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40623690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：HFD GCN2^{-/-}マウスは膵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、膵細胞量の維持に関与していることが示唆された。HFD GCN2^{-/-}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。

研究成果の概要(英文)：GCN2^{-/-}mice fed a normal-chow diet (NCD) didn't exhibit any changes in glucose tolerance or pancreatic beta-cell mass. GCN2^{-/-}mice fed a high-fat diet (HFD) exhibited significant aggravation in glucose tolerance and reduction in pancreatic beta-cell mass. Islets isolated from GCN2^{-/-}mice showed significant increase in mTORC1 activity and decrease in insulin signaling. Next, we found that GCN2 was markedly activated in islets from mice fed a HFD. We also measured the concentration of amino acids, and found that it is reduced in islets from mice fed a HFD.

Our results showed that chronic activation of mTORC1 signal is one of the causes of reduction in pancreatic beta-cell mass in GCN2^{-/-}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 beta-cell mass. We expect that GCN2^{-/-}mice could be the models of the pathogenesis of T2DM in patients who have a SNP in GCN2.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：糖尿病

キーワード：日本人2型糖尿病 GCN2 アミノ酸 膵細胞量

1. 研究開始当初の背景

いまや糖尿病の脅威が確実に拡大している。その大半を占める 2 型糖尿病の発症要因にインスリン標的臓器におけるインスリン抵抗性および膵β細胞のインスリン分泌不全が挙げられる。近年、日本人を含むアジア人においては、インスリン分泌低下が糖尿病の発症に重要であることが明らかとなった。膵β細胞機能障害は膵β細胞からのインスリン分泌障害(質的障害)および膵β細胞量の減少(量的障害)からなる。2 型糖尿病患者の膵β細胞では質的・量的障害が正常耐糖能のときから障害されていることが明らかとなってきたが、そのメカニズムについては遺伝子変異や環境因子を含め報告は出つつあるが、詳細は明確にはなっていない。

これまでに mTORC1 が、インスリンなどの増殖因子や細胞内エネルギー状態により活性制御を受けるシグナル経路については明らかにされてきたが、近年、新たにアミノ酸が mTORC1 活性を調節するシグナル伝達経路が解明されつつある。さらに、メタボローム解析によりアミノ酸の値と糖尿病発症リスクが非常に高い関連を示すことが明らかとなり (Nature Medicine, 17:448-453, 2011) アミノ酸が mTORC1 活性を介して膵β細胞機能を制御している可能性が考えられる。mTORC1 は、タンパク質合成や細胞増殖など細胞の基本的な機能の制御において重要な働きを担うシグナル分子である。代表者は mTORC1 シグナルがミトコンドリア生合成を促進させることによって、膵β細胞のインスリン分泌能を亢進させることを報告している (PLoS ONE. 6, e23238, 2011.)。また、インスリンシグナル伝達経路が膵β細胞の量とサイズを規定していることが明らかにされており (Nat Genet. 38, 589, 2006) 代表者は恒常的 mTORC1 活性モデルマウスである膵β細胞特異的 TSC2 遺伝子欠損マウス (βTSC2^{-/-}マウス) を

用いて、高週齢の βTSC2^{-/-}マウスは膵β細胞量減少による膵β細胞不全をきたすことに加えて、膵β細胞不全は mTORC1 活性によるインスリンシグナルのネガティブフィードバックにて惹起されることを明らかにした (Mol Cell Biol. 28, 2971)。以上のことから mTORC1 活性は適度に保たれている必要があり、慢性的な mTORC1 過剰亢進は膵β細胞不全を引き起こすと考えられた。

General control nonderepressible 2(GCN2)は、細胞内アミノ酸濃度を感知するタンパク質である。興味深いことに、日本人の 2 型糖尿病患者における SNP (一塩基置換) 解析から、GCN2 に有意な変異が存在することが報告された (Nat Genet. 40: 1092, 2008)。すなわち日本人の 2 型糖尿病患者においては、膵β細胞の GCN2 活性が低下している可能性があると考えられる。近年の欧米化した食生活下では、日本人における GCN2 活性は膵β細胞量維持において mTORC1 シグナルを調節するという重要な役割を担っている可能性が考えられた。日本人 2 型糖尿病患者で発現が低下していると考えられる GCN2 が、膵β細胞において mTORC1 活性を調節するメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。

2. 研究の目的

本研究計画においては、1) 膵β細胞特異的 GCN2 欠損マウスにおける膵β細胞機能を評価し、その結果を踏まえて GCN2 が膵β細胞において膵β細胞量およびインスリン分泌能に果たす役割 2) 膵β細胞における GCN2 のアミノ酸依存性 mTORC1 活性調節に果たす役割を解明する。

3. 研究の方法

日本人において GCN2 の SNP と 2 型糖尿病に有意な相関が報告された。GCN2 はアミノ酸欠乏時に free tRNA の増加をリガンドとして活性化される分子である。我々の検討では GCN2 は膵島に強く発現しており、膵β細胞に

における GCN2 の役割と 2 型糖尿病発症の関与を考え解析を開始した。本研究計画において、1) 膵 β 細胞特異的 GCN2 欠損マウスの作成および膵 β 細胞量および糖代謝パラメータの解析を行う。2) 膵 β 細胞特異的 GCN2 欠損マウスに高脂肪食負荷を行い、高インスリン血症が GCN2 の発現・活性に与える影響、および表現型の解析を行う。3) 膵 β 細胞株を用いて各種アミノ酸欠乏状態における GCN2 の発現・活性化、および mTORC1 活性を評価する。4) 全身性 GCN2 欠損マウスに高脂肪食を与えた際の各種アミノ酸濃度を測定し、高脂肪食により相対的に欠乏状態となるアミノ酸を抽出する。膵 β 細胞特異的 GCN2 ヘテロ欠損マウスに該当アミノ酸を高濃度含有した食餌を投与し、膵 β 細胞量の推移を解析する。

4 . 研究成果

GCN2 欠損マウスに高脂肪食負荷を与えることによって膵 β 細胞における mTORC1 活性が恒常的に活性化され、膵 β 細胞量が減少し耐糖能異常を呈することが示された。しかしながら通常食下では GCN2 欠損マウスにおける表現型が認められなかった。膵細胞株 INS-1 細胞を用いた検討により、GCN2 は高グルコース濃度 (11.2mM) の条件下においてリン酸化が増加し、パルミチン酸やアルギニンなどによっては活性化しないことが明らかとなった。高脂肪食 (HFD) 下飼育 GCN2^{-/-}マウスの耐糖能は悪化し膵 β 細胞量は減少した。膵島では mTORC1 活性の亢進とインスリンシグナルの減弱化が認められた。その機序を明らかにする為、通常食 (NCD) と HFD で飼育したマウスの膵島で比較すると、HFD 下の膵島で GCN2 が有意に活性化しており、複数のアミノ酸の濃度が有意に低下していた。

高脂肪食負荷膵 β 細胞特異的 GCN2 欠損マウスは膵 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 細胞量の維持に関与していることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 (東京) 2014 年 2 月 13 日

2 型糖尿病感受性遺伝子 GCN2 は膵 β 細胞量の調節に関与する

神野 歩、吉富 理紗、増田 勝久、小柳 真希、松田 友和、浅原 俊一郎、春日 雅人、清野 進、木戸 良明

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 2013 年 5 月 16 日

2 型糖尿病感受性遺伝子 GCN2 は膵 β 細胞量の調節に関与する

神野 歩、吉富 理紗、増田 勝久、小柳 真希、松田 友和、浅原 俊一郎、春日 雅人、清野 進、木戸 良明

Beta cell wrk shop 2013 (京都)

GCN2, a type 2 diabetes mellitus susceptibility gene, is associated with the regulation of pancreatic β cell mass
2013 年 4 月 23 日

神野 歩、吉富 理紗、小柳 真希、松田 友和、浅原 俊一郎、春日 雅人、清野 進、木戸 良明

日本分子生物学会年会 (福岡)

2012 年 12 月 14 日

Functional analysis of eIF2 kinase GCN2 in the onset of type 2 diabetes

神野 歩、吉富 理紗、小柳 真希、松田 友和、浅原 俊一郎、春日 雅人、清野 進、

木戸 良明

第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会（横浜） 2012 年 5 月 18 日

2 型糖尿病発症における eIF2 キナーゼ GCN2 の機能解析

神野 歩、吉富 理紗、小柳 真希、松田 友和、浅原 俊一郎、春日 雅人、清野 進、木戸 良明

第 85 回日本内分沁学会学術総会（名古屋） 2012 年 4 月 20 日

2 型糖尿病発症における eIF2 キナーゼ GCN2 の機能解析

神野 歩、吉富 理紗、小柳 真希、松田 友和、浅原 俊一郎、春日 雅人、清野 進、木戸 良明

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 真希（小柳 真希）（Maki Kimura-Koyanagi）

神戸大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：40623690

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：