

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750040

研究課題名(和文)高脂肪食による糖尿病発症機序における細胞内アミノ酸濃度センサーGCN2の役割

研究課題名(英文)Role of GCN2 in the onset of type 2 diabetes induced by high fat diet.

## 研究代表者

木村 真希(小柳真希)(Maki, Kimura-Koyanagi)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膵細胞におけるGCN2の役割と2型糖尿病発症の関与を考え、解析を行った。GCN2のSNPの有無による耐糖能の変化をクランプにより評価した結果、リスクアレルをもつ群でインスリン分泌の指標が有意に低下していた。高脂肪食(HFD)で飼育したGCN2<sup>-/-</sup>マウスの解析では、耐糖能の悪化と膵細胞量の減少、膵島におけるmTORC1活性の亢進とインスリンシグナルの減弱化が明らかとなった。HFDマウスの膵島でGCN2が有意に活性化していた。HFD下の膵細胞では、NCD下と比較し、複数のアミノ酸の濃度が有意に低下しuncharged tRNAが増加した。

研究成果の概要(英文)：Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis of Japanese diabetes patients has revealed a significant correlation between a general control nonderepressible 2 (GCN2) SNP and type 2 diabetes mellitus (T2DM). GCN2<sup>-/-</sup> mice fed a NCD did not exhibit any changes in glucose tolerance or pancreatic  $\beta$ -cell mass. However, GCN2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD exhibited significant aggravation in glucose tolerance and reduction in pancreatic  $\beta$ -cell mass. Islets isolated from GCN2<sup>-/-</sup> mice showed significant increase in mTORC1 activity and decrease in insulin signaling. We compared amino acid levels in islets from wild-type mice fed a NCD with those fed an HFD, and found that a lot of amino acids are decreased in islets from mice fed an HFD. Moreover, we found decreases in charging level of tRNAs in islets from mice fed an HFD. From our data, we consider that activated GCN2 contributes to the maintenance of pancreatic  $\beta$ -cell mass.

研究分野：2型糖尿病

キーワード：アミノ酸 mTORC1

## 1. 研究開始当初の背景

近年、肥満や糖尿病人口の急速な増加は世界的に深刻な問題であり、日本においても重大な問題となっている。国民健康・栄養調査によると 1960 年代と比較して日本人の総エネルギー摂取量は減少しているが、2010 年までに脂肪の摂取量が著明に増加し、総脂肪摂取率は総エネルギー量の 1/4 前後を占めるようになってきている。脂肪摂取量の増加は食習慣の欧米化に伴う栄養摂取バランスの変化が原因と思われる。この食習慣の変化や身体活動量の低下が原因となり、日本人の 2 型糖尿病の有病率は増加していると考えられる。高脂肪食摂取により、肥満や 2 型糖尿病が増加することはすでに示されている。

2 型糖尿病発症において、インスリン抵抗性とともインスリン分泌不全が重要であることはよく知られている。欧米人と比較すると日本人はより低い BMI でも 2 型糖尿病を発症する症例が多いことから、日本人には膵  $\beta$  細胞機能不全を生じやすい特有の遺伝的背景をもつ者が多いと考えられている。そうした点から、我々は以前から膵  $\beta$  細胞不全発症機序解明を目的とした研究を行っている。2 型糖尿病患者では膵  $\beta$  細胞量が減少しているとの報告は多くあるが、我々の研究室では、膵  $\beta$  細胞量の維持にインスリンシグナルが重要であるが (Nat Genet 38: 589, 2006) その慢性的亢進はネガティブフィードバックを介し膵  $\beta$  細胞量を減少させることを明らかにしている (Mol Cell Biol 28: 2971, 2008) 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。我々はこれまで一貫して膵  $\beta$  細胞における mTORC1

シグナルの役割についての研究に従事してきた。これまでに、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  $\beta$  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.)。加えて恒常的 mTORC1 活性モデルマウスである膵  $\beta$  細胞特異的 TSC2 遺伝子欠損マウス ( $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウス) を用いて、高週齢の  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>マウスは膵  $\beta$  細胞量減少による膵  $\beta$  細胞不全をきたすことに加えて、膵  $\beta$  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, 2971-2979, 2008.)。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  $\beta$  細胞不全を引き起こすと考えられた。前述の高脂肪食負荷 GCN2 欠損マウスにて mTORC1 シグナルが亢進していることを踏まえると、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  $\beta$  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  $\beta$  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は 2 型糖尿病の発症メカニズムの解明に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

General control nonderepressible 2 (GCN2) は、アミノ酸欠乏を感知する分子であり、細胞内アミノ酸欠乏状態で増加した uncharged transfer RNA (tRNA) が結合することにより活性化される。日本人における

SNP (一塩基多形) 解析で、GCN2 の SNP と 2 型糖尿病発症に有意な相関が報告された (Nat Genet 40: 1092, 2008)。マウスの各組織で比較したところ、GCN2 は膵 β 細胞に非常に多く発現していた。我々はマウスを通常食で飼育した際には GCN2 は活性化されないが、高脂肪食で飼育した際に膵 β 細胞においてのみ活性化することを見出した。全身性 GCN2 ホモ欠損マウスを高脂肪食下に飼育すると、膵 β 細胞量が有意に減少することによって、インスリン分泌能が低下して耐糖能の悪化が認められた。GCN2 欠損マウスの単離膵島においては 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、膵 β 細胞不全の原因であると考えられた。GCN2 に変異をもつ 2 型糖尿病患者では膵 β 細胞における GCN2 の活性が低下し、特に高脂肪食摂取や過食などを背景として耐糖能異常を呈している可能性がある。我々はさらに膵 β 細胞株にグルコース負荷を行うことにより GCN2 の活性が亢進し、この活性は蛋白翻訳阻害剤により抑制されることを明らかにした。一方、インスリン分泌促進剤や脂肪酸負荷、小胞体ストレス負荷などによって GCN2 は活性化されなかった。また最近、高脂肪食飼育下ではマウスの膵 β 細胞においてインスリン合成が亢進することを報告している (Biochem Biophys Res Commun 458: 681-686, 2015)。これらのデータより、GCN2 は膵 β 細胞においてインスリン合成が亢進した際に活性化される可能性を考慮している。膵 β 細胞における GCN2 活性化機構について明らかにし、膵 β 細胞における GCN2 の役割と 2 型糖尿病発症の関連について明らかにすることを研究の目的としている。

### 3 . 研究の方法

ヒトにおける GCN2 の SNP と耐糖能の相関を検討するために、被験者 113 人でグルコースクランプ法を行った

GCN2 欠損マウスにおいて mTORC1 活性が慢性的に亢進したことがインスリンシグナルの減弱化から膵 β 細胞量の減少を引き起こしたと考えられることから、GCN2 と mTORC1 シグナルをつなぐ経路につき検討することとした。GCN2 活性化が認められる高脂肪食負荷マウスの膵島においてアミノ酸濃度とアミノアシル化 tRNA の測定を行い、通常食飼育マウスの膵島と比較することとした。また膵島以外の各組織においてもアミノ酸濃度の測定を行った。

### 4 . 研究成果

GCN2 の SNP の有無による耐糖能の変化をグルコースクランプ法により評価した結果、リスクアリルをもつ群でインスリン分泌の指標が有意に低下していた。

膵 β 細胞における GCN2 活性化メカニズムの解明

現在までに GCN2 活性化のメディエーターとして唯一知られている機序はアミノ酸欠乏とそれに伴うアミノアシル化されていない uncharged tRNA の増加と GCN2 への結合である。したがって、GCN2 活性化が認められる高脂肪食負荷マウスの膵島においてアミノ酸濃度とアミノアシル化 tRNA の測定を行い、通常食飼育マウスの膵島と比較することとした。

1) マウス膵島とその他各組織におけるアミノ酸濃度の測定

通常食もしくは高脂肪食で飼育したマウスの膵島における各アミノ酸濃度について質量分析を用いて測定したところ、高脂肪食で飼育したマウスの膵島においては多くのアミノ酸濃度が低下していた。一方、高脂肪食負荷マウスの血清や肝臓においては多くのアミノ酸濃度が増加しており、視床下部においては高脂肪食負荷を行ってもアミノ酸濃度にはほとんど変化が見られなかった。

## 2) マウス膵島におけるアミノアシル化 tRNA の測定

通常食もしくは高脂肪食で飼育したマウスの膵島における各アミノアシル化 tRNA 量について質量分析法で測定、比較したところ高脂肪食負荷マウスの膵島ではアミノアシル化 tRNA が全般的に減少していた。すなわち、高脂肪食負荷マウスの膵島では uncharged tRNA が増加していた。また、Ser-tRNA のアミノアシル化について脱アミノアシル化処理をしたものと比較することにより Northern-blot 法を用いて検討したところ、通常食マウスにおいてよりアミノアシル化 Ser-tRNA が多いことが明らかとなった。つまり、高脂肪食マウスの膵島においては uncharged Ser-tRNA が増加していた。

本研究により通常食マウスと高脂肪食負荷マウスの各組織における検討から、高脂肪食負荷マウスにおいては膵島特異的にアミノ酸濃度の減少がおり、さらに uncharged

tRNA の増加を介して GCN2 が活性化したものと考えられた。GCN2 と mTORC1 はともにアミノ酸を感知するシグナルであり、二つのシグナル間に相互作用が存在する可能性が示唆されてきたが、その間の経路について解明することが出来たと考える。また、現在までに膵β細胞においてはインスリン翻訳が亢進する際に GCN2 が活性化する可能性を考慮しているが、本研究により膵β細胞におけるインスリン翻訳亢進時には膵β細胞内アミノ酸濃度が低下し uncharged tRNA が増加することが明らかとなった。血漿や肝臓、視床下部といった組織ではアミノ酸の濃度は低下していないが、膵島においてアミノ酸濃度が低下したことは膵β細胞における大量のインスリン合成に伴うアミノ酸の消費が原因ではないかと考えるが、アミノ酸トランスポーターの発現や局在の変化が原因となっている可能性も考慮される。

これまでに、GCN2 が mTORC1 活性を制御するメカニズムについては明らかにされておらず、この経路の解明により、GCN2 の発現が低下している日本人 2 型糖尿病患者において mTORC1 活性を適正に保ち、膵β細胞量を維持する介入方法の一助となると考えられる。すなわち本研究は、2 型糖尿病候補遺伝子 GCN2 の SNP を有する患者が過食による膵β細胞不全を未然に防ぎうる手段を講じることに役立ち、将来的には SNP 解析によって割り出した疾患感受性遺伝子と食生活などの環境因子を加味した上で、患者個々に応じたオーダーメイド治療の実現へ導くものと考えられた。

## 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 1 件)

Kanno A, Asahara S, Masuda K, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Seino S, Ogawa W, Kido Y. Compensatory hyperinsulinemia in high-fat diet-induced obese mice is associated with enhanced insulin translation in islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 681-686,2015

〔学会発表〕(計 7 件)

Katsuhisa Masuda, GCN2,a Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility Gene, Is Associated with the Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass.51st EASD Annual Meeting 2015.9.14-18, Stockholm(Sweden)

Ayumi Kanno, GCN2,a Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility Gene, Is Associated with the Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions 2015,6,7-8, Boston(USA)

増田 勝久、2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 GCN2 は膵  $\beta$  細胞量の調節に関与する、第 88 回日本内分泌学会学術総会、2015.4.23、ホテルニューオータニ(東京)

神野 歩、2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 GCN2 は膵  $\beta$  細胞量の調節に関与する、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会、2015.2.14、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」(京都)

増田 勝久、2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 GCN2 は膵  $\beta$  細胞量の調節に関与する、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.25、パシフィコ横浜(神奈川)

増田 勝久、2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 GCN2 は膵  $\beta$  細胞量の調節に関与する、第 57 回日本糖尿病学会学術総会、2014.5.23、大阪国際会議場(大阪)

神野 歩、2 型糖尿病疾患感受性遺伝子 GCN2 は膵  $\beta$  細胞量の調節に関与する、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014.4.23、福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

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 医学研究員

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 :