

## 2型糖尿病感受性遺伝子 CDKAL1 のインスリン分泌への関与

永松信哉 藤原智徳<sup>1</sup> 竹中均  
岡村匡史<sup>2</sup>

杏林大学医学部生化学

<sup>1</sup> 杏林大学医学部細胞生理学

<sup>2</sup> 国立国際医療センター 感染制御研究部ヒト型動物開発研究室

### 研究の背景

患者が急増している2型糖尿病の遺伝因子に関して、近年、数千人規模の症例・対照群を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS, Genome-Wide Association Study) により、多数の2型糖尿病疾患感受性遺伝子の存在が明らかになってきた。しかし、これらの遺伝因子がどのような機序で2型糖尿病発症に関与するのか未だ不明であり、その解明を目指したポスト GWAS 研究が始まっている。GWAS で得られた2型糖尿病疾患感受性遺伝子には、インスリン分泌障害との関連が示唆されているものの、これらの遺伝子のほとんどが、これまでインスリン分泌との関連が必ずしも想定されてはおらず、またその機能さえ不明の遺伝子も多い。中でも CDKAL1 はインスリン分泌関連2型糖尿病感受性遺伝子として、日本人を含め、多くの民族で再現性高く報告されている (Nat Genet (2007) 39, 770; Science (2007) 316, 1331; Science (2007) 316, 1336; Science (2007) 316, 1341; Diabetes (2008) 57, 791; Lancet (2010) 375, 408)。CDKAL1 遺伝子は、65-kDa の CDKAL1 タンパクをエンコードしているが、CDKAL1 タンパクの機能については不明な点が多い。しかしながら、名前の由来である CDK5 regulatory subunit-associated protein1 (CDK5RAP1) と相関性が高く、CDK5RAP1 が CDK5 (cyclin-dependent kinase 5) 活性化タンパクである p35 に結合し、CDK5 の活性を阻害することから、CDKAL1 も同様に CDK5 の機能を調節していることが推察されてきた。興味深いことに、CDKAL1 リスクアリル保持者では2型糖尿病患者に特徴的なインスリン分泌第1相の低下が見られ、一方、インスリン分泌第2相およびインスリン感受性には相関が

見られないことが報告されている (Diabetologia (2008) 51, 1659; J Clin Endocrinol Metab (2008) 93, 1924)。すなわち CDKAL1 リスクアリルは第1相インスリン分泌障害を介して、2型糖尿病のリスクを上げていると考えられるが、なぜこの遺伝子変異がインスリン第1相分泌低下を生じるのか、また CDK5 の機能調節と関連があるのか不明であり、重要な研究課題となっている。

### 研究の特色

1) CDKAL1 は機能不明のタンパクであり、その機能解析にはノックアウトマウスが強力な研究手段となる。私達は、すでに国立国際医療センターの岡村室長 (本研究連携研究者) と加藤部長らとの共同研究により、CDKAL1 ノックアウトマウスを確立し、解析に着手している。また、CDKAL1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスも確立しつつある。さらに、アデノウイルスを用いた siRNA のβ細胞内導入法も確立しつつある。この CDKAL1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの in vivo における解析、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス由来のβ細胞を用いた解析、および CDKAL1 やその調節分子の siRNA を導入したβ細胞を用いた解析に本研究の独創性、新規性がある。

2) 今回の研究では2相性インスリン分泌における CDKAL1 の役割を詳細に検討しなければならない。私達はこれまで2相性インスリン分泌機構解明に焦点を当てて精力的に研究を進めてきた (Ohara-Imaizumi, (2007) J. Cell Biol.; Nagamatsu & Ohara-Imaizumi (2007) Science)。それら研究を通して、インスリン分泌顆粒開口放出可

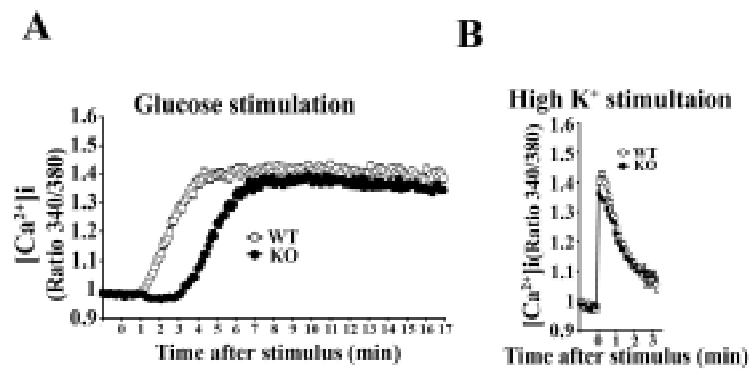


図1 CDKAL1 遺伝子欠損マウス膵β細胞においてCa<sup>2+</sup>流入の遅延が起こる

視化解析法の確立 (insulin-GFP によりインスリン顆粒を特異的にラベルした初代培養膵β細胞と全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いることにより、形質膜におけるインスリン顆粒の docking および fusion を可視化解析する手法)、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定法、β細胞及び islets の perfusion 実験法、膵灌流実験法を確立している。これらの実績ある研究手法を用いて、ノックアウト細胞由来のβ細胞、および CDKAL1 やその調節分子の siRNA を導入したβ細胞における 2 相性インスリン分泌を多角的に詳細に解析する。

3) CDKAL1 とインスリン分泌に関する研究では、ヒトでの CDKAL1 リスクアレル保持者と非保持者との比較検討が先行している (CDKAL1 リスクアレル保持者ではインスリン分泌第 1 相が低下している (Diabetologia (2008) 51, 1659; J Clin Endocrinol Metab (2008) 93, 1924))。最近、熊本大学の富澤らは CDKAL1 分子機能に着目し、その解析により、CDKAL1 がトランスファー RNA (tRNA) の修飾酵素 (methylthiotransferase) として機能することを報告した (J Biol Chem (2010) 285, 28425)。しかし、この tRNA における CDKAL1 の機能のインスリン分泌へ影響は不明である。また、彼らは CDKAL1 についてノックアウトマウスを含めた解析の学会発表を行っているが、論文発表に至っておらず、私達の CDKAL1 ノックアウトを用いた CDKAL1 機能解析 (Ohara-Imaizumi et al. PLoS ONE (2010) 5, e15553) が先行している状況である。

4) 本研究により CDKAL1 の第 1 相インスリン分泌における役割が解明される。また CDKAL1 の発現低下および機能不全と第 1 相インスリン分泌低下の関連が明確になることで、2 型糖尿病発症の機序が明らかになる。結果として、CDKAL1 が新しい 2 型糖尿病治療のターゲットとなる可能性があり、新規治療法の開発、並びに創薬への展開につながる。

#### 研究の方法

本研究では CDKAL1 の第 1 相インスリン分泌における役割の解明を目的とする。そのため、1) CDKAL1 ノ

ックアウトマウスの *in vivo* 解析、あるいは 2) ノックアウトマウスから調製したβ細胞、また 3) siRNA を導入したβ細胞を主に用いて、2 相性インスリン分泌の徹底解析 (インスリン分泌顆粒開口放出イメージング解析法、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定法、β細胞及び islets の perfusion 実験法、膵灌流実験法) を行い、第 1 相分泌のどの過程が障害を受けているかを明らかにし、第 1 相分泌における CDKAL1 の機能を明確にする。次いで、生化学的、分子生物学的手法を用いて、小胞体に局在する CDKAL1 の発現低下および機能不全がどのようなメカニズムで第 1 相インスリン分泌低下を引き起こすのかを解明し、2 型糖尿病発症の機序を考察する。

#### 研究成果

CDKAL1 欠損マウスの膵ラ氏島の形状は、正常のそれと変化なく、β cell mass も変化なく、cell size にも変化は見られなかった。インスリン顆粒数も正常と変化なく、インスリン含量にも変化はみられなかった。ノックアウト (KO) マウスより膵ラ氏島を調整し、16.7mM の高濃度のグルコースで 30 分間刺激、インスリン分泌量を測定したところ、正常のそれと比べ大きな変化はなかった。次に、インスリン顆粒をインスリン-GFP にて標識し、我々の研究室が開発した TIRF 法を用いて、インスリン開口放出を画像解析したところ、CDKAL1 欠損マウスのβ細胞では、第 1 相のインスリン分泌が著減していた。しかし、形質膜に結合しているインスリン顆粒数を TIRF 法と免疫組織染色法を融合した方法を用いて測定したところ、docking インスリン顆粒数に変化はなかった。一方 Fura2 を用いた細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態を測定したところ、KO β細胞では、Ca<sup>2+</sup> の細胞内への流入が遅延していた。そこで、電気生理学的手法を用いて K<sub>ATP</sub> チャネル活性を測定したところ、K<sub>ATP</sub> チャネルの応答性の低下が認められた。実際、細胞内 ATP 濃度を測定したところ、ATP 生成の低下が観察された。一方、KO 細胞における CDK5 活性は、野生型細胞との間で違いは認められなかった。以上の結果より、CDKAL1 は CDK5 以外の経路を介して、ATP 生成、K<sub>ATP</sub> チャネルの応答性、

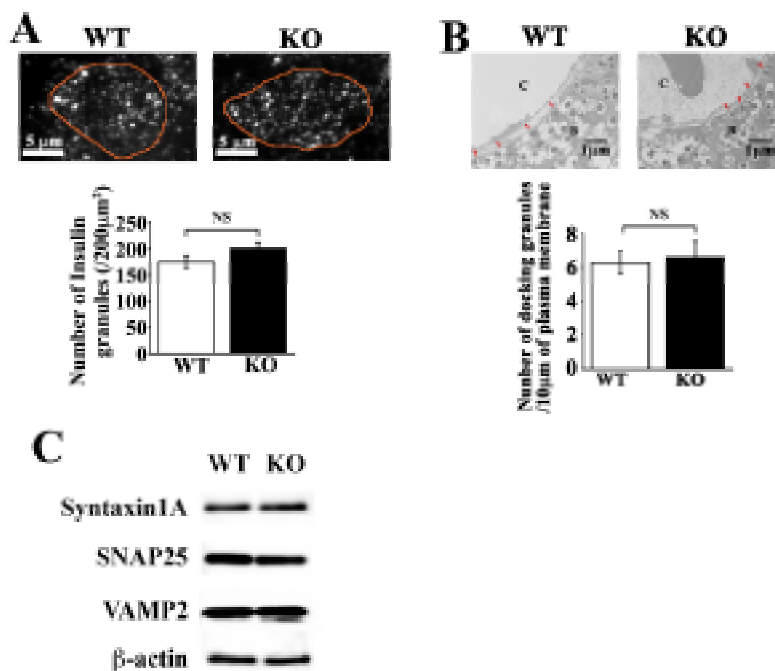


図2 野生型マウスと CDKAL1 欠損マウスとの比較

- A,B 形質膜に docking しているインスリン顆粒数に変化はない  
 C 開口放出関連タンパク質の量的変化はない

細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を促進することにより、第1相インスリン分泌をコントロールしていること、従って2型糖尿病においては、CDKAL1 の variant により、 $K_{ATP}$  チャネル応答性の遅延による  $Ca^{2+}$  流入の遅延、結果として第1相インスリン分泌の低下が引き起こされることが推察された。

#### List of publications

- Shinya Nagamatsu, Mica Ohara-Imaizumi, Yoko Nakamichi, Kyoto Aoyagi, Chiyono Nishiwaki (Department of Biochemistry, Kyorin Univ Sch Med) DPP-4 inhibitor des-F-sitagliptin treatment increased insulin exocytosis from db/db mice  $\beta$  cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412: 556-560, 2011
  - 服部信孝<sup>1</sup>, 江口博人<sup>1</sup>, 今泉美佳<sup>2</sup>, 斉木臣二<sup>1</sup>, 佐藤栄人<sup>1</sup>, 永松信哉<sup>2</sup>, (<sup>1</sup>順天堂大・医・脳神経内科, <sup>2</sup>杏林大・医・生化学) 若年性パーキンソン病の病態解明: インスリン開口機構からその病因に迫る *臨床神経* 51:986-987, 2011
- (2) 講演記録
- 今泉美佳<sup>1</sup>, 青柳共太<sup>1</sup>, 吉田昌史<sup>2</sup>, 斎藤太郎<sup>3</sup>, 岡村匡史<sup>4</sup>, 竹中均<sup>1</sup>, 中道洋子<sup>1</sup>, 西脇知世乃<sup>1</sup>, 久永真市<sup>3</sup>, 加計正文<sup>2</sup>, 永松信哉<sup>1</sup> (杏林大学・医・生化学<sup>1</sup>, 自治医科大学附属さいたま医療センター<sup>2</sup> 首都大学東京 神経分子機能<sup>3</sup>, 国立国際医療センター研究所<sup>4</sup>) CDKAL1 の第1相インスリン分泌における役割. 第54回日本糖尿病学会年次

学術集会, 札幌, 2011年5月19日~21日

- 今泉美佳<sup>1</sup>, 青柳共太<sup>1</sup>, 永松信哉<sup>1</sup> (杏林大学・医・生化学<sup>1</sup>) 糖尿病原因究明のためのイメージングによるインスリン開口放出機構解明. 文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」第3回 細胞内ロジスティクス班会議, 鳥羽, 2011年6月1日~3日
- Kyoto Aoyagi<sup>1</sup>, Mica Ohara-Imaizumi<sup>1</sup>, Chiyono Nishiwaki<sup>1</sup>, Yoko Nakamichi<sup>1</sup>, Shinya Nagamatsu<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept of Biochem, Kyorin Univ Sch Med) Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. 第84回日本生化学会, 京都, 2011年9月21~24日
- 青柳共太<sup>1</sup>, 今泉美佳<sup>1</sup>, 永松信哉<sup>1</sup> (杏林大・医・生化学) 第2相インスリン分泌制御における PI-3 kinase と PDK1-Akt 経路の役割の検討 第16回東京インスリン分泌研究会, 東京, 2012年2月23日
- 永松信哉, (杏林大・医・生化学): 膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌機構の最新の情報 第11回 糖尿病を考える会, 東京, 2012年1月20日
- 永松信哉, (杏林大・医・生化学): インスリン分泌顆粒の可視化とインクレチンによる制御機構 第4回 糖尿病治療の新たなステージを考える会, 金沢, 2012年3月6日

#### (3) 出版物

- 永松信哉<sup>1</sup> (杏林大・医・生化学) インスリン分泌の可視化. *糖尿病・代謝・内分泌*, 中外医学社, 東京 p181-190. 2012年2月