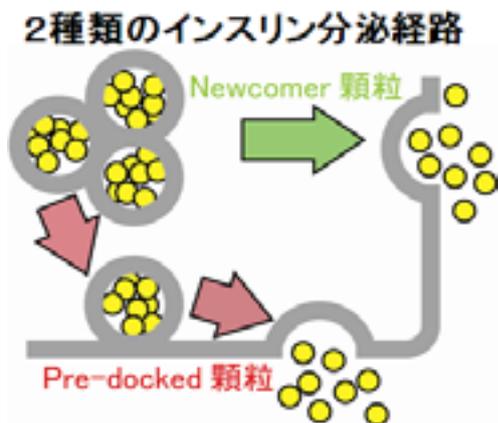


第2相インスリン分泌機構の解明

青柳 共太

杏林大学医学部生化学

日本における糖尿病患者の多くは膵臓からのインスリン分泌不全を成因としている。インスリンは機構が異なる第1相分泌と第2相分泌から構成される2相性分泌により膵β細胞から分泌される。第1相分泌については分子機序が明らかになりつつある一方、第2相分泌の分子機序は全く不明である。本研究は第2相インスリン分泌の分子機序を明らかにすることと共に、第2相インスリン分泌増強による新たな糖尿病治療法を見いだすことを目的として行った。



インスリン分泌の実時間可視化解析から、2相性分泌を構成する第1相分泌と第2相分泌には挙動の異なるインスリン顆粒が関与することが当研究室のグループにより報告されている。第1相分泌では刺激前から細胞膜にあらかじめドッキングしていた顆粒 (Pre-docked 顆粒) からインスリンが分泌されるのに対し、第2相では刺激後に細胞内から細胞膜近傍へと移行し、細胞膜へ到達するやいなや開口放出する Newcomer 顆粒からインスリンが分泌される。このうち Newcomer 顆粒からの分泌機構は未だ不明である。従って第2相インスリン分泌の分子

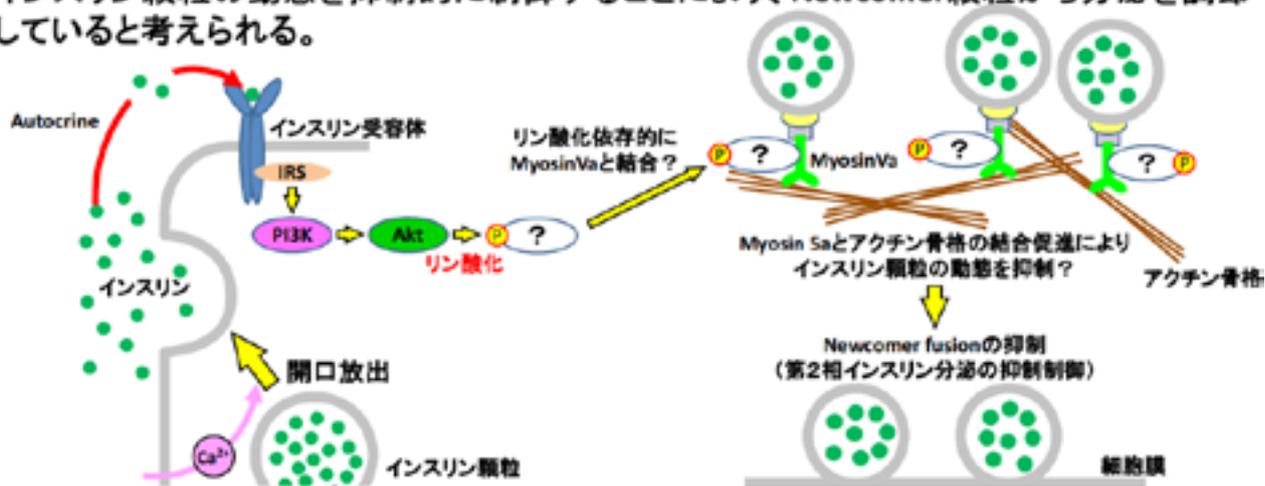
機序を明らかにするためには Newcomer 顆粒からの分泌機構を明らかにすることが重要である。

阻害剤を用いた薬理的解析からホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) および Akt の活性を阻害すると、グルコース刺激依存的な Newcomer 顆粒からの分泌が増強し、第2相インスリン分泌が増強することが先行研究により明らかになっていた。そこで本研究では、まず分子生物学的手法を用いて薬理的解析から得られた結果を再度確認することを行った。PI3K は PDK1-Akt 経路以外にも様々な経路を活性化することが報告されている。そこで PI3K と分泌をつなぐことが知られている PI3K-PDK1-Akt 経路、PI3K-Vav/Sos-Rac1 経路および PI3K-ARNO-Arf6 経路について検討を行った。PDK の構成的活性化変異体 (CA 変異体) を膵島に発現させると PI3K 阻害剤処理によるグルコース刺激依存的な分泌増強は抑制された。一方 Rac1 および Arf6 の CA 変異体は PI3K 阻害剤処理による分泌増強を抑制しなかった。さらに PDK1 選択的阻害剤処理は PI3K 阻害剤と同様、インスリン分泌を増強することを明らかとした。次に PDK1 の下流分子である Akt と aPKC について検討を行った。PI3K 阻害剤処理によるグルコース刺激依存的な分泌増強は Akt の CA 変異体発現により抑制されたが、aPKC の CA 変異体発現では抑制されなかった。さらに Akt 阻害剤処理によるインスリン分泌増強は第2相分泌においてグルコース刺激依存的な Newcomer 顆粒からの分泌が選択的に増加することに起因することを実時間可視化解析により明らかにした。

次に、Akt による Newcomer 顆粒からの分泌制御を介した第2相インスリン分泌制御機構を明らかにするために、Akt の基質となる分子の探索を行った。Akt は様々な分子をリン酸化することが知られており、現在までに 100 以上のタンパク質が Akt のリン酸化基質として報告されている。本研究ではその中から直接的に分泌に関

Conclusion

PI3K-PDK1-Akt経路を阻害するとNewcomer顆粒からのインスリン分泌が増加することにより第2相分泌が選択的に増強される。AktはMyosinVaが関与する経路を介して細胞内インスリン顆粒の動態を抑制的に制御することにより、Newcomer顆粒から分泌を調節していると考えられる。



連する分子及び細胞内小胞輸送に関連する分子である CSP α , Synip, AS160/TBC1D4, Slp1/JCF1 および MyosinVa について検討を行った。CSP α , Synip, AS160, Slp1 については Akt リン酸化部位に変異を導入したリン酸化不能変異体を作成し膵島に導入して、Akt 阻害剤処理によるグルコース刺激依存的な分泌増強作用への影響について検討を行った。その結果 CSP α , Synip, AS160, Slp1 は Akt 阻害剤処理によるグルコース刺激依存的な分泌増強作用に関与していないことが明らかとなった。一方、MyosinVa については優性阻害変異体 (DN 変異体) を作成し膵島に導入したところ、Akt 阻害剤処理によるグルコース刺激依存的な分泌増強を抑制した。ところが Akt による MyosinVa のリン酸化部位にリン酸化不能変異および偽リン酸化変異を導入した変異体を発現させても Akt 阻害剤処理によるグルコース刺激依存的な分泌増強は阻害されなかった。さらに抗 MyosinVa 抗体を用いて膵島から MyosinVa を単離し解析しても Akt によるリン酸化は検出されなかった。これらの結果から、

Akt は本研究で検討した V つの分子以外の分子をリン酸化することにより第2相分泌における Newcomer 顆粒からの分泌を増強していると考えられた。また第2相分泌を Akt 依存的に制御するそのような分子は MyosinVa を介して Newcomer 顆粒からの分泌を制御している可能性が示唆された。今後は Akt 活性依存的に MyosinVa への結合が変化する分子を探索し、第2相インスリン分泌機構の解明へとつなげていく予定である。

List of Publications

なし (現在投稿中)

講演記録

1. 第84回日本生化学会大会 2011年9月21-24日, 京都
2. 東京インスリン分泌研究会 2012年2月23日, 東京
3. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012年5月17-19日, 横浜
4. 新学術領域「細胞内ロジスティクス」第4回班会議 2012年6月13-15日, 仙台