

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目

**Role of NADH Shuttle System in Glucose-Stimulated Insulin Secretion**  
**- Novel Pathway for Glucose Signalling in Pancreatic  $\beta$  Cells -**

グルコース応答性インスリン分泌における NADH シャトル機構の役割  
- 膵 $\beta$ 細胞における新規のグルコースシグナル伝達経路の解明 -

氏 名 江 藤 一 弘

膵 $\beta$ 細胞からのグルコース応答性インスリン分泌に際して、グルコースは解糖系代謝に引き続いてミトコンドリア内の TCA 回路において代謝されたのち、電子伝達系において ATP が産生される。ATP は KATP チャネル依存性経路、および KATP チャネル非依存性経路を介してインスリン分泌に必須の役割を果たす。従来、グルコース応答性インスリン分泌におけるグルコース代謝の概念では、解糖系代謝はピルビン酸のみによりミトコンドリア代謝と連結されると考えられてきた (図 A)。しかし、膵 $\beta$ 細胞においてピルビン酸はグルコースと同程度に良く酸化されるものの、単独ではインスリン分泌をほとんど惹起しえない、また、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送をある程度阻害しても、グルコース刺激によるインスリン分泌が抑制されない、などの実験事実は、ピルビン酸以外のなんらかの解糖系中間代謝産物や、そこから派生するシグナルもグルコース応答性インスリン分泌にとって必須の coupling factor であることを示唆していた。

その coupling factor の候補として、解糖系のグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素反応の段階で  $\text{NAD}^+$  から産生される NADH が挙げられた。NADH の電子は、NADH シャトル機構によりミトコンドリア内に伝達され、直接的に電子伝達系での ATP 産生を亢進させることから、ピルビン酸と並ぶ解糖系からミトコンドリアへの代謝シグナルを構成しうる。NADH シャトル機構はグリセロールリン酸シャトルとリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルから構成される。膵 $\beta$ 細胞においては、グリセロールリン酸シャトルの構成要素であるミトコンドリアグリセロール 3 リン酸脱水素酵素 (mGPDH: mitochondrial glycerol-3 phosphate dehydrogenase) が、肝臓の数十倍に高発現していることが知られ、インスリン分泌低下を呈する糖尿病モデル動物やヒト 2 型糖尿病では膵 $\beta$ 細胞特異

的な mGPDH の発現低下が認められるなど、グリセロールリン酸シャトルがグルコース応答性インスリン分泌になんらかの役割を果たしている可能性が推測されてきた。しかしながら、糖尿病に認められる mGPDH 活性の低下は糖尿病の一次的な原因というよりもブドウ糖毒性によりもたらされる間接的な結果である可能性が高く、グリセロールリン酸シャトル、ひいては、NADH シャトル機構全体としてのグルコース応答性インスリン分泌不全における病因論的な意義は不明であった。今回、mGPDH 欠損マウス、すなわちグリセロールリン酸シャトル欠損マウスを作製し、これから単離した膵島にリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの阻害剤であるアミノオキシ酢酸(AOA)を併用することにより、両方の NADH シャトル機能を停止させたモデル膵島を樹立した。この系を用いて NADH シャトル機構のグルコース応答性インスリン分泌における役割について検討することが可能となった。

mGPDH ホモ欠損マウスは正常の耐糖能を示し、単離した膵島からのグルコース応答性インスリン分泌にも障害を認めず、グリセロールリン酸シャトルの停止のみではインスリン分泌不全をきたさないことが明らかとなった。野生型膵島に AOA を作用させ、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルのみを停止させた状態でもグルコース応答性インスリン分泌はほぼ保たれていた。しかしながら、mGPDH ホモ欠損膵島に AOA を作用させ両シャトル機構を停止させると、グルコース応答性インスリン分泌はほぼ完全に廃絶し、NADH シャトル機構の働きがグルコース応答性インスリン分泌に必須の役割を果たすことが初めて明らかにされた。グリセルアルデヒドに対するインスリン分泌にも障害が認められたことから、NADH シャトル機構は解糖系において NADH を産生しうる分泌刺激物質特異的に、インスリン分泌応答に必須であることが示された。

従来の概念によれば、解糖系のグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素による反応で  $\text{NAD}^+$  が NADH に還元されたのち、NADH シャトル機構の停止によって  $\text{NAD}^+$  への再酸化が不十分あるいは不可能となれば、解糖系の代謝回転が阻害されることが考えられた。しかし、NADH シャトル機構の停止状態下でも解糖系でのグルコース利用には有意な低下は認められず、インスリン分泌の廃絶は解糖系代謝回転の阻害では説明され得なかった。ところが、TCA 回路におけるグルコース酸化を反映する  $[6-^{14}\text{C}]$  グルコースの酸化は、正常の約 50% に減少していた。また、グルコース刺激後の NAD(P)H 自家蛍光産生の増大も正常の約 32% に低下していた。NAD(P)H 自家蛍光の大部分はミトコンドリア内に局在する NADH 由来であると考えられており、シャトル機構を介してのミトコンドリア内 NADH 産生の廃絶に加え、TCA 回路でのグルコース酸化および NADH 産生の大幅な減少という状況に矛盾しない。両 NADH シャトルを介しての NADH と  $\text{FADH}_2$  産生が廃絶し、さらに TCA 回路に由来する NADH と  $\text{FADH}_2$  産生が大きく減少した状態を反映し、グルコース刺激後のミトコンドリア内膜電位形成は、正常の約 25% に低下していた。同じくミトコンドリア内膜電位に依存する ATP 合成酵素の活性を反映するグルコース刺激後の ATP 含量増加、あるいは ATP/ADP 含量比上昇も大きく障害されていた。

また、NADH シャトル機構停止状態では、グルコース刺激後のミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇はまったく観察されず、NADH シャトル機構がミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の調節に重要であることが示

された。ミトコンドリア内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入障害とこれに伴う  $\text{Ca}^{2+}$  依存性酵素群の活性化障害が、TCA 回路でのグルコース酸化が半減する一因であると考察された。

NADH シャトル機構停止時の TCA 回路の活性低下の意義を検討するため、野生型膵島に TCA 回路のアコニターゼの阻害剤であるモノフルオロ酢酸を投与し、NADH シャトル機構が正常に機能している状態で TCA 回路でのグルコース酸化のみを約 50% 阻害した条件を再現したが、NAD(P)H 自家蛍光産生、ミトコンドリア内膜電位形成、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇はほとんど影響を受けず、インスリン分泌も正常に保たれていた。このことは、NADH シャトル機構停止時の分泌廃絶は TCA 回路の約 50% の阻害のみでは説明されず、NADH シャトル機構の停止自体の方に重要な意味があることが明確に示された。

NADH シャトル機構が停止した状態では、グルコース刺激後の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の初期低下は認められず、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase による細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みが充分起きていないことが示唆された。また、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の第 1 相のピーク形成も消失していた。これは、KATP チャネルの閉鎖とそれに引き続く細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  流入の活性化が充分ではないことを示している。これらはいずれも ATP 要求性の反応であり、ミトコンドリアでの ATP 産生の減少を反映するものである。電気生理学的手法を用いた単一膵β細胞における検討では、この際、細胞膜電位を規定している KATP チャネルの閉鎖はほとんど観察されなかった。細胞膜の脱分極と活動電位の発生も、長時間観察下での少数例を除いては認められなかった。これらの結果から、インスリン分泌廃絶の ATP 産生過程以遠の主因は細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  流入障害にもとめられた。また、KATP チャネル非依存性経路によるインスリン分泌も正常の約 40% に低下しており、 $\text{Ca}^{2+}$  流入以遠の開口分泌にいたる経路も NADH シャトル機構を介したエネルギー産生に強く依存していることが示された。

以上の実験結果から、グルコース応答性インスリン分泌においてピルビン酸が唯一の解糖系由来のミトコンドリアへの代謝シグナルであるとする従来のモデル (図 A) には改訂が必要であり、その意義がこれまで不明であった NADH シャトル機構が分泌に必須の役割を果たしていることが示された。今後は、NADH シャトル機構を介する細胞質 NADH の電子のミトコンドリアへの伝達を、ピルビン酸のミトコンドリアへの伝達と並ぶ、主要な解糖系由来代謝シグナルとして位置付けなければならない。この新規なグルコース代謝モデルは以下のようにまとめられる (図 B)。好氣的解糖により細胞質内で産生された NADH の電子は二つの独立したシャトルからなる NADH シャトル機構によりミトコンドリア電子伝達系に伝達され、それ自体がミトコンドリアで産生される ATP の約 50% に寄与している。そればかりではなく、ミトコンドリア内膜電位の形成に伴うミトコンドリアへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の活性化が  $\text{Ca}^{2+}$  依存性酵素群を賦活化させ、ピルビン酸の TCA 回路での酸化を亢進させることにより分泌に十分な ATP 産生を保証している。一方、NADH シャトル機構が停止すると、細胞質 NADH の電子に由来する ATP 産生が廃絶するばかりでなく、正常状態ではミトコンドリアで産生される ATP の約 50% をになうピルビン酸の TCA 回路での酸化が、ミトコンドリアへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入障害などにより半減する結果、ミトコンドリア全体としての ATP 産生は正常の約 25% にまで大幅に減少する。これ

に伴い、細胞内 ATP の二大標的のうち、KATP チャンネル閉鎖-電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル開口-細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇のカスケードはほぼ完全に抑制され、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇以降のインスリン開口放出に至るカスケードも強く抑制される結果、インスリン分泌は廃絶する (図 C)。

日本人 2 型糖尿病においては、病初期からのグルコース特異的なインスリン分泌応答不全がその特徴である。解糖系における NADH 産生からミトコンドリア電子伝達系への電子の供給までを含む NADH シャトル機構の経路上に位置するあらゆる異常はグルコース特異的なインスリン分泌不全を惹起しうると考えられ、今後、2 型糖尿病の重要な成因候補として検討を進めてゆく必要がある。

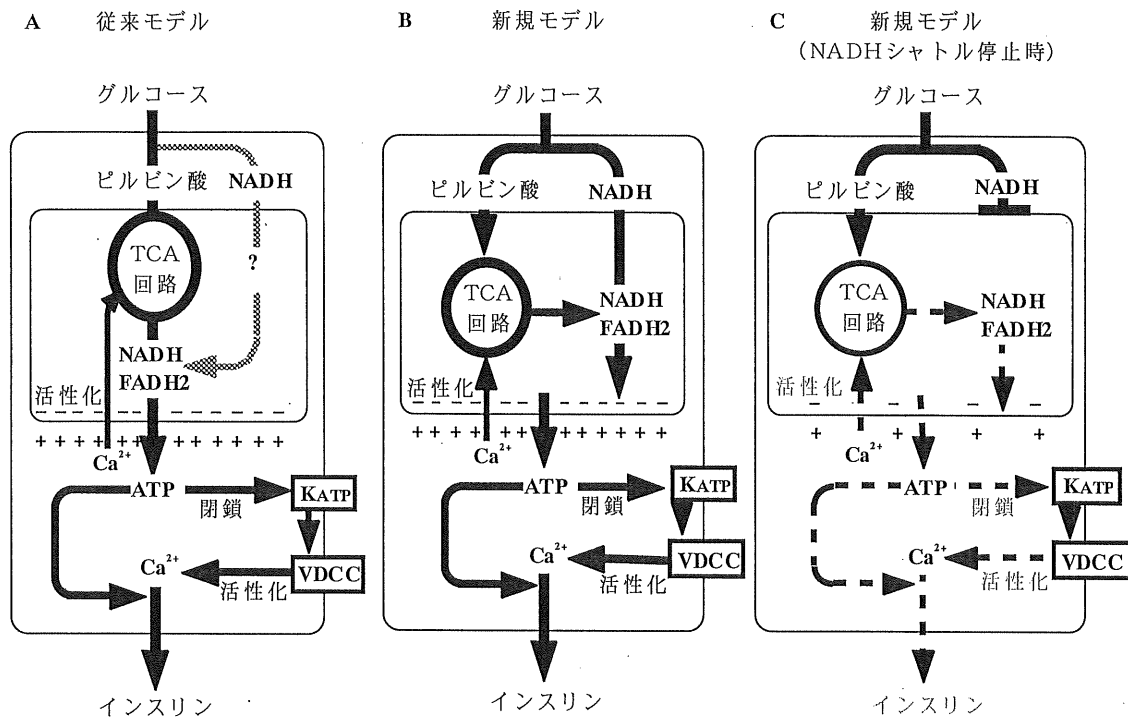


図 グルコース応答性インスリン分泌におけるグルコース代謝モデル

従来 (A) は、ピルビン酸のみが解糖系代謝とミトコンドリア代謝を連結する代謝シグナルと考えられてきた。新規モデル (B) では、ピルビン酸と並んで解糖系由来の NADH が、NADH シャトル機構を介してミトコンドリア代謝を活性化し、分泌に充分な ATP 産生に必須のシグナルを形成している。NADH シャトル機構停止状態 (C) では、NADH シャトル機構に由来する ATP 産生が廃絶するばかりではなく、ミトコンドリアへの  $Ca^{2+}$  流入障害などにより TCA 回路でのグルコース酸化も半減するため、ミトコンドリア全体としての ATP 産生は正常の約 25%に低下し、もはやインスリン分泌を惹起しうる閾値に達し得ない。K<sub>ATP</sub>: K<sub>ATP</sub> チャンネル、VDCC: 電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル。