

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 江 藤 一 弘

本研究は膵β細胞からの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を明らかにするため、NADH シャトル機構を構成する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の両方を停止させた系にて、グルコース代謝とインスリン分泌の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. グリセロールリン酸シャトルを構成するミトコンドリア・グリセロール3リン酸脱水素酵素 (mitochondrial glycerol-3 phosphate dehydrogenase) を欠損するノックアウトマウスを発生工学的に作製した。このマウス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を作用させることにより、NADH シャトル機構が停止したモデル膵島を樹立した。

2. グリセロールリン酸シャトルを欠損するマウスは正常耐糖能であり、膵島からのグルコース応答性インスリン分泌にも障害は認められなかった。また、野生型膵島にアミノオキシ酢酸を作用させてリンゴ酸アスパラギン酸シャトルのみを停止させても分泌は障害されず、どちらか片方のシャトル活性のみでグルコース応答性インスリン分泌には十分であることが示された。しかし、両シャトルが停止した条件下ではグルコース応答性インスリン分泌は廃絶した。グリセルアルデヒド刺激に対する分泌も障害されていたが、メチルピルビン酸やグリベンクラミド刺激に対する分泌は保たれていたことから、NADH シャトル機構は解糖系に流入し NADH を産生しうる刺激物質特異的に分泌に必須であることが示された。

3. NADH シャトル機構が停止した条件下でも、従来の見解と異なり、解糖系でのグルコース利用には有意な低下は認められなかった。NADH シャトル機構以外にも解糖系で生じた NADH を再酸化させる機構が存在する可能性が示唆された。一方、ミトコンドリアの TCA 回路におけるグルコース酸化は正常の約 50%に減少し、グルコース刺激後のミトコンドリア NADH 量の増大、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。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。これらのことから、NADH シャトル機構がグルコース刺激後のミトコンドリア代謝活性化に重要な役割を果たすことが示された。

4. 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・マトリックス内

Ca²⁺濃度の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 Ca²⁺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 Ca²⁺流入障害とこれに伴う Ca²⁺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約 50%減少する一因であると示唆された。

5. 野生型膵島に TCA 回路を構成する酵素であるアコニターゼの阻害剤モノフルオロ酢酸を作用させ、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、ミトコンドリア NADH 量の増大、ミトコンドリア内膜電位の形成、ミトコンドリア Ca²⁺濃度の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。このことから、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示された。

6. 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 Ca²⁺濃度の初期低下は認められず、小胞体 Ca²⁺-ATPase による細胞質 Ca²⁺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 Ca²⁺濃度上昇の第 1 相のピーク形成も消失しており、K_{ATP} チャネルの閉鎖とそれに引き続く細胞質への Ca²⁺流入の活性化が充分ではないことが示された。

7. 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、NADH シャトル機構が停止した状態では、細胞膜電位を規定している K_{ATP} 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。また、K_{ATP} 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%に低下していた。これらのことから、K_{ATP} チャネルの閉鎖とそれに続く電位依存性チャネルの活性化からなる K_{ATP} チャネル依存性経路は、NADH シャトル機構を介したエネルギー産生に完全に依存し、Ca²⁺流入以遠から開口分泌にいたる K_{ATP} チャネル非依存性経路もこれに強く依存していることが示された。

以上、本論文は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を明らかにした。また、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、という新規なグルコース代謝モデルを提唱した。本研究はこれまで未知に等しかった、グルコース応答性インスリン分泌における NADH 機構の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。