

## 論文の内容の要旨

論文題目 インスリン分泌における AMP キナーゼの役割に関する研究

指導教官 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 岡崎 由希子

### <目的>

5'-AMP-activated protein kinase (AMP キナーゼ : AMPK)は AMP 等によって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである。AMPK は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのサブユニットから構成されており AMPK  $\alpha$  サブユニットの 172 番目のアミノ酸であるスレオニン (Thr172) がリン酸化されることで活性化するといわれている。細胞内の AMP レベルが増加すると AMPK は活性化し、ATP を消費するような代謝経路 (たとえば同化作用) は抑制され、一方脂肪酸酸化やグルコースの利用は促進され ATP の合成方向に体内の代謝反応は進み、この結果生体内の代謝は変化し ATP 産生が促される。このような機能を持つ AMPK は細胞内エネルギー代謝の metabolic sensor として機能しているともいわれている。

AMPK は 2 型糖尿病の病態に重要な臓器である肝臓や骨格筋において糖質・脂質代謝を強力に制御していることが知られている。たとえば骨格筋においては、運動などによって ATP/AMP が低下すると AMPK の活性は上昇し、骨格筋内への糖の取り込みを促進させる。またアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)

の活性を低下させることにより脂肪酸酸化を亢進させる。

膵β細胞においては AMPK がインスリンの合成・分泌の調節に関与していると報告されているがまだ十分に解明されていない点も多い。今回私は膵β細胞由来細胞株に、AMPK α1 サブユニットの不活性型変異体 (dominant negative form) を過剰発現させ AMPK の活性を低下させた系において、膵β細胞のインスリン分泌機能に検討を加えた。

### <研究方法>

AMPK α1 サブユニットの157番目のアミノ酸をアスパラギン酸からアラニンに置換した変異体は、dominant negative 効果を発揮することが既に報告されている。ラット由来の膵β細胞株である INS-1D 細胞に、アデノウィルスベクターを用いてこの変異体 AMPK α1-DN (Asp157Ala) を過剰発現させて AMPK α1 の活性が低下した系にて、ACC のリン酸化に対する検討、細胞内脂肪含量、脂肪酸酸化、グルコース酸化、ATP/ADP、細胞質内 Ca<sup>2+</sup>濃度、細胞内インスリン含量、インスリン分泌量の解析を行った。コントロールとしてアデノウィルスベクターにより LacZ を過剰発現させた細胞を用いた。

### <結果と考察>

- ① AMPK α1-DN の過剰発現による AMPK 活性の低下に関しては、抗 AMPK α リン酸化抗体の発現の低下により確認した。また AMPK のリン酸化の基質の一つである ACC のリン酸化レベルの低下も確認した。ACC が AMPK によってリン酸化されると、ACC の活性が低下しマロニル CoA 量が低下し、これによって CPT-1 の抑制が解除されて脂肪酸酸化が亢進する。ACC はリン酸化レベルが低下すると活性は増加するので、AMPK α1-DN の過剰発現により ACC の活性は増加したと考えられる。
- ② 細胞内中性脂肪含量に関する検討では、AMPK α1-DN 感染細胞では LacZ 感染細胞と比べ 46%増加していた。ACC の活性の増加に伴う脂肪酸酸化の低下に加え、ACC 活性化による新規の脂肪合成の増大も関与している可能性があると思われる。
- ③ グルコース酸化に関する検討では、0.1 mM グルコースの下でのグルコース酸

化量は AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞にて LacZ 感染細胞と比べ 73%に減少していた。また、30 mM グルコースの下でも AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞のグルコース酸酸化量はコントロールと比べ 79%に減少していた。

- ④ 脂肪酸酸化に関する検討では、0.1 mM グルコースの下でのパルミチン酸酸化量は AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞では LacZ 感染細胞と比べ 81%に減少していた。また 30 mM グルコースの下でも AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞のパルミチン酸酸化量はコントロールと比べ 75%に減少していた。これは ACC 活性が増加したことによるマロニル CoA の増加に伴い、ミトコンドリア膜上の CPT-1 が抑制されたことが原因と考えられる。
- ⑤ ATP/ADP に関する検討では、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞にて LacZ 感染細胞と比べ低下している結果となった。これはグルコース酸化の低下が一因と考えられる。
- ⑥ 細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に関する検討では、細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は 30 mM グルコース刺激にて AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞にて LacZ 感染細胞と比べ低下している結果となった。AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞では ATP/ADP が低下していたが、このことが  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介する細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇の抑制の一因と考えられる。一方、KCl による脱分極刺激、またインスリン分泌刺激剤であるスルフォニル・ウレア薬の一種である Glibenclamide による刺激においては、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞と LacZ 感染細胞で差は認められなかった。
- ⑦ 開口分泌機構に関する検討では、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞にて SNAP-25 の蛋白量の低下を認めた。
- ⑧ 細胞内のインスリン含量に関する検討では、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞と LacZ 感染細胞とで有意差は認められなかった。また、インスリン mRNA 量をノーザンブロッティングで検討したがこちらでも有意差は認めなかった。
- ⑨ インスリン分泌に関する検討では、0.1 mM グルコースでの刺激においては AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞と LacZ 感染細胞とは差を認めなかった一方、30 mM グルコースで 60 分間刺激した際のインスリン分泌は、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞では LacZ 感染細胞と比較して 78%に減少していた。これは細胞内の ATP/ADP が減少したことによる細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇の抑制が一因であると考えられた。KCl による脱分極刺激、Glibenclamide を投与した際のインスリン分泌に

においても AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞は LacZ 感染細胞と比較してインスリン分泌は各々70%、84%に低下していた。⑥で述べたようにどちらの刺激でも細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞と lacZ 感染細胞で有意差はなかった。すなわち、これらの刺激によるインスリン分泌の低下は細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$ 流入以降のインスリン顆粒の開口放出機構の変化によるものと考えられる。SNAP-25の蛋白量の低下がこの原因の一つの可能性は考えられる。

インスリン分泌能力の低下の原因の一つとして脂肪毒性 (lipotoxicity) という概念がある。脂肪毒性とは、あるいは脂質が膵  $\beta$  細胞に過剰に持続的に存在することでインスリン分泌機構が機能的、アポトーシスなど器質的に障害されることを意味する。本研究では AMPK の活性を低下させることにより、脂肪酸の  $\beta$  酸化が低下し細胞内中性脂肪が増加していた。この中性脂肪の蓄積が、インスリン分泌低下の原因になっていることも考えられる。先に述べた開口放出機構の機能の変化に関しても、AMPK の不活性化による脂肪毒性が関与している可能性が考えられる。

## <まとめ>

膵  $\beta$  細胞の AMPK の活性を低下させた系においてインスリン生合成を減少させることなくインスリン分泌が障害されることが示された。本研究の結果から考えると、AMPK はインスリン分泌を上昇させる作用があると考えられる。AMPK は ACC の活性を低下させることにより脂肪酸  $\beta$  酸化、グルコース酸化を促進させ、これに伴う ATP/ADP の上昇、細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇を介してインスリン分泌を促進させることが予想される。また脂肪毒性が起こりにくい方向に細胞内の環境を導くことによって、脂肪毒性によるインスリン分泌の低下を防ぐ可能性も考えられる。

一方、従来 AMPK がプレプロインスリン遺伝子の発現を抑制しインスリン分泌の抑制に働くという報告があるが、本研究ではインスリン mRNA 量の変化は認められずこの経路を確認できなかった。今後の研究課題としていきたい。