

## [別紙 2]

### 審査の結果の要旨

氏名 岡崎 由希子

AMP-activated protein kinase (AMP キナーゼ : AMPK)はその活性が上昇することにより、骨格筋や肝臓での脂肪酸酸化を促進し、また肝臓での糖新生抑制、骨格筋における糖取り込みの促進などの作用を持つことから、2型糖尿病治療薬の新たな分子標的として最近注目されてきている。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。本研究は膵β細胞由来細胞株のINS-1D細胞に、AMPKα1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ものであり、下記の結果を得ている。

#### 1. 不活性型AMPKの作製

AMPKα1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 (AMPKα1-DN) はdominant negative効果をもつことが報告されている。この変異体にc-mycのタグをつけアデノウイルスベクターを用いてINS-1D細胞に24時間感染させた。コントロールとしてはLacZを組み込んだアデノウイルスを24時間感染させた細胞を用いた。感染後の細胞蛋白をウェスタンブロットティングすると、抗c-myc抗体によるブロットティングではAMPKα1-DN感染細胞のみにc-mycのバンドを認め、AMPKα1-DNが細胞内で発現していることが確認された。またAMPKの活性化の指標としてAMPKのリン酸化を検討したところ、AMPKα1-DN感染細胞にてAMPKのリン酸化の低下を認めた。これらの結果から、AMPKα1-DNを感染させたINS-1D細胞ではAMPKが不活性化していることが確認された。この細胞を用いて以下の実験を行った。

#### 2. 不活性型AMPKのグルコース応答性インスリン分泌への影響

インスリン分泌刺激試験においては、0.1 mM グルコースの下においてはAMPKα1-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、AMPKα1-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。グルコース酸化の検討では30 mM グルコースの下ではAMPKα1-DN感染細胞のグルコース酸化量はコントロールと比べ79%に減少していた。ATP/ADPは30 mM グルコースの下ではAMPKα1-DN感染細胞はコントロールと比べ78%に減少していた。細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度はAMPKα1-DN感染細胞ではLacZ感染細胞と比べ30 mM グルコースの刺激による上昇が抑制されている結果となった。細胞内のインスリン含量、インスリン mRNA量はAMPKα1-DN感染細胞とコントロールで有意差は認めず、不活性型AMPKはインスリンの生合成に影響を及ぼしていないと考えた。AMPKの不活性化によりグルコース応答性インスリン分泌の低下を認めたが、こ

これはグルコース酸化の低下により ATP/ADP が低下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。

### 3. 不活性型 AMPK の脂質代謝への影響

ウエスタンブロッティングで ACC のリン酸化レベルを検討した結果、不活性型 AMPK 感染細胞では ACC はリン酸化レベルが低下しており、すなわち ACC の活性は増加していると考えられた。パルミチン酸酸化についての検討では、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。細胞内中性脂肪含量についての検討では、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞では LacZ 感染細胞と比べ 46% 増加していた。AMPK の不活性化により、ACC の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 が抑制されたことで、脂肪酸  $\beta$  酸化の低下し、細胞内中性脂肪含量が増加したと考えられた。

### 4. 不活性型 AMPK の脱分極刺激及び SU 薬によるインスリン分泌への影響

脱分極刺激によるインスリン分泌試験では、50 mM KCl 下では AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞では LacZ 感染細胞に比べ 70% にインスリン分泌量は低下していた。SU 薬によるインスリン分泌試験では 5  $\mu$  M グリベンクラミド下にて、AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞では LacZ 感染細胞に比べ 84% にインスリン分泌量は低下していた。細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 50 mM KCl、5  $\mu$  M グリベンクラミドのいずれの刺激に対しても AMPK  $\alpha$  1-DN 感染細胞と LacZ 感染細胞で有意差は認めなかった。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。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た。そして SNAP-25 の蛋白量の低下がこの原因の一つの可能性と考えられる。

インスリン分泌能の低下の原因の一つとして脂肪毒性という概念があるが、本研究では AMPK の活性を低下させることにより脂肪酸酸化が低下し細胞内中性脂肪含量が増加しており、この中性脂肪の蓄積が、グルコース酸化の低下、開口放出機構の障害、の原因である可能性が考えられる。また開口放出機構の障害はグルコース刺激時のインスリン分泌の抑制の一因ともなっていると考えられる。

以上、本論文は膵  $\beta$  細胞由来細胞株である INS-1D 細胞において、AMPK の活性を低下させることでインスリン分泌が低下する機序を示しており、膵  $\beta$  細胞と AMPK との関連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。