

## 論文内容の要旨

論文題目    ミトコンドリア DNA の転写抑制による代謝の変化と  
                        インスリン分泌機構への影響に関する研究

氏 名      野田光彦

ミトコンドリアはグルコースやその他代謝を介してインスリン分泌作用を発揮する多くの分泌刺激の生化学的反応を中心的に司る細胞内小器官であることから、かねてよりインスリン分泌に関する研究領域において最も興味を惹かれる対象の一つであった。インスリンを分泌させる過程でミトコンドリアが枢要な働きを担うという概念は、ATP感受性 K<sup>+</sup> チャンネル (K<sub>ATP</sub> チャンネル) のクローニングによってより具体的なものとなった。これはすなわち、インスリン分泌に重要と考えられその産生の大半をミトコンドリアに依拠する ATP によって K<sub>ATP</sub> チャンネルが制御されていることが、実際に明確になったからである。インスリン分泌におけるミトコンドリアの重要性は、全糖尿病患者数の約1%を占めると推定されているミトコンドリア DNA の変異によって生ずる糖尿病のある種の型が明らかになったことによって、さらに明確なものとなっている。

私は、DNA や RNA の合成阻害薬であり、染色体外の DNA においてとくに強くこの作用が発揮される—すなわち、動物種由来の真核細胞ではミトコンドリア DNA においてこの作用が強く現れる—ethidium bromide (EtBr) をマウス由来の膵  $\beta$  細胞株である 8HC9 細胞に比較的濃度 (0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で作用させることにより、ミトコンドリア DNA の転写を約 90% 抑制し、その結果グルコース応答性インスリン分泌に抑制をみるという結果を 1998 年に共同研究により得て報告している。同様の結果は他のグループからも報告されているが、これらの変化をきたす全体の機構については不明であり、とくに細胞内代謝の観点からは全く未解明であった。

ミトコンドリア DNA は電子伝達系を構成するの大半の複合体 (複合体 I, III, IV, V) のサブユニット (の一部) と、ミトコンドリア内においてこれらサブユニットの生合成に働く transfer RNA 分子とを特異的にコードしている。本論文では、EtBr によるミトコンドリア DNA の転写抑制が惹起する基質代謝の変化と、これによる刺激-分泌連関への影響を詳細に分析し、このようなミトコンドリア DNA の転写抑制下では乳酸の産生亢進を伴う嫌気性代謝の促進といった代謝の変化が生じることを見いだした。本論文の観察結果は、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌に対してミトコンドリア機能が有する生理的役割に対してのみならず、

ミトコンドリア DNA 異常に由来し、ミトコンドリアの機能低下に起因するミトコンドリア糖尿病をはじめとする諸疾患の発症病理やミトコンドリア糖尿病の臨床に対しても重要な洞察を与えるものである。

### 1) 電子伝達系伝達系の抑制

この研究において私は、マウス由来の膵  $\beta$  細胞株である  $\beta$ H9C9 細胞を EtBr とともに培養することにより、電子伝達系とインスリン分泌の関係を解析し、また、そのときの代謝の変化を詳細に検討した。私たちの従来の検討では、 $\beta$ H9C9 細胞を 0.4  $\mu$ g/ml の EtBr とともに 4～6 日間培養することにより、ミトコンドリア DNA の転写に約 90% の減少が認められた。この減少した転写レベルは、ミトコンドリアの電子伝達系の機能低下をきたし、ミトコンドリアにおける ATP 合成の消失を招来すると推測される。なぜなら、ミトコンドリア DNA は電子伝達系を構成する呼吸鎖複合体 I, III, IV, V (複合体 V : ATP synthase) のサブユニット (の一部) と、ミトコンドリア内においてこれらサブユニットの生合成に働く transfer RNA 分子とをコードしているからである。ここにおいて、ミトコンドリア DNA によってコードされる transfer RNA は、これらミトコンドリア DNA 自身によってコードされる呼吸鎖コンポーネントの生合成にのみ用いられることを指摘しておくことは重要であろう。

事実、私の今回の一連の実験において、グルコース刺激後に対照の  $\beta$ H9C9 細胞では認められた ATP/ADP 比の増加は、EtBr とともに 4～6 日間培養することにより低減した。

### 2) EtBr 処理によるインスリン分泌の変化

したがって私は、電子伝達系の抑制がグルコースからの ATP 産生を低下させ、細胞膜電位の形成を阻害することにより、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を小さくし、最終的にグルコース応答性インスリン分泌を消失させたものと推測した。実際、グルコース応答性インスリン分泌は  $\beta$ H9C9 細胞を EtBr とともに培養することにより急速に失われた。グルコースによる細胞膜の脱分極と  $[Ca^{2+}]_i$  の増加もこの EtBr 処理により抑制されたが、glibenclamide による変化は持続した。

インスリン分泌の濃度-分泌相関の検討でも、EtBr 処理によるグルコース応答性インスリン分泌の減少が認められた。これらの結果は、細胞膜脱分極と  $[Ca^{2+}]_i$  増加を介して惹起されるグルコースのインスリン分泌刺激作用にはミトコンドリア代謝が必要であることを示している。興味深いことに、 $\beta$ H9C9 細胞の特徴である 2 相性分泌の第 1 相と持続性の第 2 相は、EtBr 処理によってともに減少していた。観察された EtBr 群における細胞内インスリン含量の対照群との比較のうえでの増加の少なくとも一部は、培養液が高濃度 (25 mM) のグルコースを含むことに鑑みれば、このようなグルコース応答性インスリン分泌の減少によって説明されるであろう。加えて、グルコースによるインスリン合成の転写後調節による産生増加の機序も示唆されよう。

### 3) EtBr 処理 $\beta$ H9C9 細胞のミトコンドリアにおける代謝の変化

EtBr によって惹起されるグルコース代謝の変化に関しては以下のものであった。すなわち、解糖系におけるグルコース代謝量に対応するグルコース利用は、EtBr との 4 日間ないし 6 日間の培養によって、対照細胞に比較してごくわずかに減少したのみであった。これとは対照的に、TCA (tricarboxylic acid) 回路の代謝の流れを示すグルコース酸化は著明に低下し EtBr 処理 6 日ではほぼ消失した。このことは EtBr による処理は電子伝達系を抑制するのみならず TCA 回路を間接的に阻害し、その回転をも弱めていることを示す。では、電子伝達系自身

とは直接にリンクしていない TCA 回路の代謝回転がなぜ低減するのであろうか。

私はこの低減が、電子伝達系の抑制によってもたらされるミトコンドリア内の NADH の蓄積に起因するのではないかと考えた。電子伝達系の最初の段階（複合体 I : NADH 脱水素酵素）で NADH を NAD に変換する電子伝達系を EtBr によって抑制すると、ミトコンドリア内の NADH 濃度は上昇し、上昇した NADH が NADH-NAD 反応に共役した TCA 回路のステップを阻害することにより、逆行性に TCA 回路の代謝回転を減弱せしめ、これによって最終的に TCA 回路における CO<sub>2</sub> の産生も低下させるものと考えられる。この仮説を検証するために、私は、非常に微弱であるために 2 光子励起レーザー顕微鏡によってのみ可能であった 8HC9 細胞の自家蛍光を測定し、細胞内の NADH 濃度を評価したところ、実際にこれが増加していることを確認した。

#### 4) EtBr 処理 8HC9 細胞においてミトコンドリア電子伝達系の抑制によって生ずる細胞質の嫌気性代謝

ミトコンドリアにおいて増加した NADH, および flavin 補酵素の非平衡状態は、逆行性に、インスリン分泌に必須である NADH シャトル機構を機能的に停止させ、その結果、ミトコンドリア内の NADH の増加は細胞質へと伝播するはずである。細胞質におけるこの NADH の増加が、細胞質において NADH から NAD への反応と共役しているピルビン酸から乳酸への反応を促進し、乳酸の産生を促すことが想定される。実際、EtBr 処理 4 日および 6 日において、乳酸の産生は著明に増強し、嫌気性代謝が促進していることを示していた。ミトコンドリア糖尿病患者の血中における乳酸の増加も、患者の筋肉ほかの組織に存在する同様の機構によって説明可能ではないかと考えられる。

#### 5) まとめ

EtBr とともに培養した 8HC9 細胞において、[1]電子伝達系の転写の抑制により NADH 濃度と ATP 産生の低下が認められ、[2]NADH の蓄積により TCA 回路の代謝回転の減弱と CO<sub>2</sub> の産生低下が観察された。一方、[3]乳酸の産生亢進にみられるように、嫌気性代謝が増強していた。

EtBr 処理 8HC9 細胞において、グルコース応答性インスリン分泌が短期間のうちに減少、消失したことから、電子伝達系を構成する呼吸鎖複合体のコンポーネントとこれらコンポーネントの生合成に働く transfer RNA 分子とをコードしているミトコンドリア DNA の転写抑制によって、ATP 生合成と NADH の NAD への変換が低下していることが予想された。しかし、ミトコンドリアのその他の部分は、核 DNA がコードする蛋白によって構成されていることから、保たれていると考えられる。この点でここに呈示した系は、ミトコンドリア DNA の変異によってミトコンドリアの transfer RNA や電子伝達系のコンポーネントが障害されているミトコンドリア糖尿病の睥島のよい病態モデルであると考えられる。

この研究は電子伝達系と TCA 回路の代謝の変化の関係を示したはじめてのものであり、この系は、インスリン分泌におけるミトコンドリア機能の生理的重要性への洞察を与えるのみならず、例えば日本においては数万人が罹患している可能性のあるミトコンドリア糖尿病のよい病態モデルとして機能しうるであろう。