The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Stable overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit attenuates glucose sensitivity of insulin secretion from a mouse pancreatic beta cell line.
Author(s)	飯塚, 勝美
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41797
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【68】

氏　　名	飯　塚　勝　美（いいづかかつみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15273　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Stable overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit attenuates glucose sensitivity of insulin secretion from a mouse pancreatic beta cell line. （グルコース－6－リン酸脱リン酸化酵素の安定的な過剰発現は，マウス膵β細胞株MIN6グルコース応答性インスリン分泌を減弱させる）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松澤　佑次 （副査） 教　授　宮崎　純一　　教　授　荻原　俊男

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

グルコース－6－リン酸脱リン酸化酵素（G－6－Pase）は、グルコース－6－リン酸をグルコースに変換する酵素であり、主として肝臓において糖新生および糖放出を司る酵素である。本酵素は膵β細胞ではグルコースセンサーであるグルコキナーゼ（GK）の逆反応として働き、細胞内のグルコース利用能およびATP合成能を調節することが考えられる。しかしながらインスリン分泌におけるG－6－Paseの代謝学的な関与は不詳であった。近年複数の肥満糖尿病モデル動物において、糖尿病の進展に従って膵β細胞のG－6－Pase活性が増加することが報告され、膵β細胞でのG－6－Paseの生理的意義が注目されている。そこで本研究では、G－6－Pase活性を安定的に過剰発現する膵β細胞株（MIN 6 G－6－Pase）を樹立し、G－6－Pase活性の変化が糖代謝およびインスリン分泌に与える影響がどのようなものであるかについて分析した。

【方法ならびに成績】

安定的G－6－Pase過剰発現細胞の樹立

当研究室でクローニングしたrat G－6－Pase cDNAをpCXN 2ベクターに組み込み、発現プラスミドpCXN－G－6－Paseを作製した。同プラスミドをマウス膵β細胞株MIN 6にtransfectionし、抗生剤G418により選択後、約30の安定株を樹立した。これらのクローンに対し、RT－PCRにてベクター由来のG－6－PasemRNAの発現を確認し、酵素活性を測定した。野生型に比し3、7、24倍のG－6－Pase活性を有するクローン（G1、G4、G8）を選別して以下の検討を行った。

G－6－Paseのグルコース応答性インスリン分泌に与える影響

インスリンは、ラットインスリンを標準物質としたEIA法を用いて測定した。25mMグルコースに対するインスリン分泌は、G－6－Pase活性の増加とともに段階的に抑制された。特に、24倍の活性をもつG8で、グルコース応答性インスリン分泌は完全に抑制された。

G－6－Paseの細胞内ATP含量および糖利用能に与える影響

細胞内ATP含量はluciferin-luciferase法により定量した。グルコース利用能は、3－［^{3}H］－glucoseを含む培養液で2時間培養後、培養上清中の％^3H_2Oの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、グルコース利用能とした。5.5および25mMグルコースにおけるATP含量および糖利用能はG－6－Pase活性の増加に伴い低下

し、インスリン分泌抑制の程度と相関した。糖利用能、ATP含量はG 1では正常群とほぼ変わらず、G 4で正常の80%と60%、G 8で40%と30%に各々低下した。以上より、G－6－Pase活性の増加に従って、膵β細胞内の解糖系のflux及びATP合成が低下することが示された。

細胞内カルシウム濃度変化

25mMグルコースおよび30mM KClに対する細胞内カルシウム濃度変化はfura－2 AMを含む培養液で30分間培養後、Argus50／CAを用いて340nmおよび380nmにより励起された蛍光量の比を経時的に測定することで分析した。KClに対する細胞内Ca濃度の上昇反応は、正常MIN 6およびG 8で差を認めなかったが、25mMグルコースに対する細胞内Ca濃度の上昇はG 8において消失した。

グルコース、ピルビン酸、およびフルクトースに対する細胞内NAD（P）H濃度変化とインスリン分泌

25mMグルコース、20mMピルビン酸、及び20mMフルクトースに対する細胞内NAD（P）H濃度変化を共焦点顕微鏡を用いて360nMの励起蛍光で経時的に測定した。G 8では、細胞内NAD（P）H濃度の上昇はグルコースに対して消失したが、ピルビン酸やフルクトースに対する反応は野生型との差を認めなかった。以上から、G 8におけるインスリン分泌反応の低下は、GK／G－6－Pase stepでの代謝変化により生じる事が示された。

【総括】

膵β細胞のG－6－Pase活性を上昇させると、その増加に従って段階的にインスリン分泌が抑制された。今回検討した種々の代謝学的分析結果を総合すると、G－6－Pase活性の変化が、GK／G－6－Pase stepでの相対的な酵素活性の比を変化させ、ネットでの糖利用能とATP合成の変化を介してグルコース応答性インスリン分泌の抑制に関与することが明らかになった。以上より、膵β細胞のG－6－Pase活性増加は、糖尿病で認められるグルコース応答性インスリン分泌の低下を引き起こす要因の一つと考えられた。

論文審査の結果の要旨

グルコース－6－リン酸脱リン酸化酵素は肝での糖放出及び糖新生において重要な役割を果たすことが知られていたが、膵β細胞での役割についてはこれまで不明であった。そこで本論文では膵β細胞におけるG－6－Pase活性とインスリン分泌及び糖代謝との関連について検討した。

グルコース応答性インスリン分泌能の保持されているマウス膵β細胞株MIN 6にRat G－6－Pase cDNAを安定的に過剰発現させ、各々コントロールに比し約3、7、24倍のG－6－Pase活性を有する3クローンを用いて、以下の解析を行った。G－6－Pase活性増加に伴い、グルコース応答性インスリン分泌、糖利用能、ATP含量、細胞内カルシウム濃度上昇も低下した。この現象はG－6－Pase活性の増加によるATP合成能の低下によるものと思われた。また、Glucokinase／G－6－Paseステップを介さないで代謝されるfructoseおよびpyruvateによるインスリン分泌およびATP濃度変化を反映する細胞内NAD（P）H濃度変化はコントロールに比しG－6－Pase過剰発現細胞では不変であったことから、G－6－Pase過剰発現細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌の低下はG－6－Pase活性の増加により生ずることが証明された。

本論文は、膵β細胞におけるG－6－Pase活性の増加が代謝的な視点からグルコース応答性インスリン分泌の低下を介して糖尿病の進展因子となりうることを明らかにした点で学位の授与に値すると考えられた。