



Title	Glucose enhances collectrin protein expression in insulin-producing MIN6 $\beta$ cells
Author(s)	最所, 賢二
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54096">https://hdl.handle.net/11094/54096</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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

氏名	さい しょう けん じ 最 所 賢 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 23633 号
学位授与年月日	平成22年3月23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臨床医学専攻
学位論文名	Glucose enhances collectrin protein expression in insulin-producing MIN6 $\beta$ cells (インスリン産生するMIN6 $\beta$ 細胞でグルコースはコレクトリン蛋白の発現を高める)
論文審査委員	(主査) 教 授 下村伊一郎 (副査) 教 授 金倉 譲 教 授 宮崎 純一

## 論文内容の要旨

### 〔 目 的 〕

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) は単一遺伝子異常による糖尿病であり、現在までに6種類の原因遺伝子が同定されている。その内MODY3は、HNF-1 $\alpha$ の異常による糖尿病でインスリン分泌不全をきたす。最近、HNF-1 $\alpha$ の膵 $\beta$ 細胞における新たな標的遺伝子としてコレクトリンが同定され、インスリン分泌に関与していることが判明している。一方、グルコースはインスリン分泌のシグナル経路に関わる様々な遺伝子の発現を修飾することが知られているが、グルコースによるコレクトリンの発現修飾については不明である。マウス膵 $\beta$ 細胞株であるMIN6細胞を用いてグルコースによるコレクトリンの発現修飾を検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

MIN6細胞を6wellに5x10<sup>5</sup>/well、25mMグルコース下で48h培養後、5.5 mMグルコースでさらに16h培養。その後、2.8,5.5,11,25 mMのグルコース濃度で24h培養し、ウエスタンブロッティング法でコレクトリン蛋白の発現を評価したところ、グルコース濃度依存性にコレクトリン蛋白の発現が上昇した。また、単離膵島 (C57BL/6マウス) を用いた検討でも、同様の結果が認められた。一方、グルコース濃度によるコレクトリンmRNAの発現量の違いをReal-time PCRで検討したが、mRNAレベルの変化は認められなかった。また、翻訳阻害剤 (cycloheximide) を添加し、コレクトリン蛋白の発現量の推移を3hまで検討したが、グルコース濃度5.5 mM と25 mMとの間で蛋白量の減少率に差は認めず、グルコース濃度によるコレクトリン蛋白の安定性に差はないと考えられた。

$\beta$ 細胞にグルコースが取り込まれると、グルコースは解糖系に入り代謝されピルビン酸となり、ミトコンドリアのTCA回路に入ってATPが産生され、さらにATP/ADP比が上昇することでATP感受性K<sup>+</sup>channelが閉じて細胞膜が脱分極し、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルが活性化されて、インスリン開口放出が起こる。この $\beta$ 細胞におけるグルコース代謝・シグナル経路において、どのステップ(糖取り込み・解糖系・TCA回路・ATP依存性K<sup>+</sup>channel・Ca<sup>2+</sup>流入)の分子が、グルコースによるコレクトリン蛋白発現上昇に関与しているかを検討するため、MIN6細胞に、2-deoxyglucose (2-DG、 $\beta$ 細胞に取り込まれるが代謝はされないグルコース)、マンノース ( $\beta$ 細胞内で代謝されてフルクトース6リン酸として解糖系に入る)、ピルビン酸、ロイシン/グルタミン ( $\alpha$ ケトグルタル酸としてTCA回路に入る)、SU剤 (ATP依存性K<sup>+</sup>channelを閉じる)、Ca<sup>2+</sup>遮断薬 (Ca<sup>2+</sup>流入を抑制する) を添加し、コレクトリン蛋白の発現上昇が認められるかどうかを検討した。その結果、2-DGの添加ではコレクトリン蛋白の発現上昇は認めず、マンノース、ピルビン酸の添加

ではコレクトリン蛋白の発現は上昇した。また、ロイシン/グルタミンの添加では、ATPの上昇は確認されたにもかかわらず、コレクトリン蛋白の発現上昇は認めず、さらにSU剤でもコレクトリン蛋白の発現は上昇せず、Ca<sup>2+</sup>遮断薬の添加でもコレクトリン蛋白の発現上昇は抑制されなかった。

#### 〔 総 括 〕

コレクトリンはMODY3の原因遺伝子であるHNF-1 $\alpha$ の膵 $\beta$ 細胞における標的遺伝子であり、インスリン分泌との関与が報告されているが、これまでにコレクトリンの発現修飾について報告したものはない。本研究ではMIN6細胞及びマウスの単離膵島において、グルコース濃度依存性にコレクトリン蛋白の発現上昇が認められることを明らかにした。コレクトリンmRNAやコレクトリン蛋白の安定性には変化を認めず、グルコースによるコレクトリン蛋白の発現上昇は翻訳レベルの発現調節であると考えられた。さらに、グルコースによるコレクトリン発現上昇に、 $\beta$ 細胞におけるグルコース代謝・シグナル経路のいずれの分子が関与しているかについて検討したところ、ピルビン酸以降のミトコンドリアTCAサイクル中間代謝物が、グルコースによるコレクトリン蛋白の発現制御に関与していることが示された。

### 論文審査の結果の要旨

コレクトリンは膵 $\beta$ 細胞においてHNF1 $\alpha$ の標的遺伝子であり、インスリン分泌に関わる分子であるが、その発現調節機構は不明である。本研究では膵 $\beta$ 細胞株であるMIN6細胞及びマウスの単離膵島において、グルコース濃度依存性にコレクトリン蛋白の発現上昇が認められることを明らかにした。コレクトリンmRNAやコレクトリン蛋白の安定性には変化を認めず、グルコースによるコレクトリン蛋白の発現上昇は翻訳レベルの発現調節であると考えられた。さらに、グルコースによるコレクトリン発現上昇に、 $\beta$ 細胞におけるグルコース代謝・シグナル経路のいずれの分子が関与しているかについて検討したところ、ピルビン酸以降のミトコンドリアTCAサイクル中間代謝物が、グルコースによるコレクトリン蛋白の発現制御に関与していることが示唆された。グルコースによるコレクトリン発現調節機構の解明は糖尿病治療につながる可能性があり学位に値すると考える。