

# 論文要旨

## Cyclic AMP/cAMP-GEF pathway amplifies insulin exocytosis induced by $\text{Ca}^{2+}$ and ATP in rat islet $\beta$ cells

(Cyclic AMP/cAMP-GEF 経路は rat islet  $\beta$  cell において  $\text{Ca}^{2+}$  と ATP により引き起こされるインスリン開口放出を増強する。)

橋口 裕

[背景] GIP (gastric inhibitory polypeptide) や GLP-1 (glucagon-like peptide-1) などのインクレチンホルモンは膵  $\beta$  細胞の細胞膜に存在する G 蛋白共役受容体に作用し、細胞内 cyclic AMP (cAMP) 濃度を上昇させインスリン分泌を増強している。cAMP は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を上昇させ、グルコースによる  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillation の頻度を増加させることが報告されている。cAMP はインスリンの開口放出機構においてもインスリン分泌を促進すると考えられている。ところが、cAMP によるインスリンの開口放出促進作用に高濃度の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が必要であるかの一致した意見はない。cAMP の effector として protein kinase A (PKA) と cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors (cAMP-GEF) が候補に挙がっているが、インスリン開口放出機構における cAMP-GEF と PKA の役割を検討した報告はない。

[目的] 本研究では  $\text{Ca}^{2+}$  と ATP に依存したインスリン開口放出機構における cAMP の作用、ならびにその下流における PKA、cAMP-GEF の役割について検討した。

[方法] A: Isolation and permeabilization 10~14 週令の雄ウイスターラットに腹腔内麻酔を行い、ラ氏島をコラゲナーゼ法にて単離し実験に供した。ラ氏島を  $\alpha$ -toxin で  $37^\circ\text{C} \cdot 20$  分間処理し、eosin G dye の細胞内への取り込みで permeabilization を確認した (Fig. 1a)。B: Islet perfusion and insulin measurement permeabilize されたラ氏島を  $37^\circ\text{C}$  の条件下で 1ml/min の速度で灌流した。灌流液は pH 7.0; HEPES, 11 mmol/l; potassium glutamate, 135 mmol/l; NaCl, 5 mmol/l;  $\text{MgSO}_4$ , 3 mmol/l; EGTA, 11 mmol/l を用い、 $\text{CaCl}_2$  と  $\text{Na}_2\text{ATP}$  の濃度はそれぞれ調節した。

[結果] A: 灌流液の ATP 濃度を 3 mmol/l に固定し、 $\text{Ca}^{2+}$  を変化させて 10  $\mu\text{mol/l}$  の cAMP によるインスリン分泌量を測定した。cAMP 作用前では、 $\text{Ca}^{2+}$  は濃度依存性にインスリン分泌を増強した (Fig. 2a, b)。cAMP によるインスリン分泌増強作用は低い  $\text{Ca}^{2+}$  においても認められた ( $P < 0.05$ , paired *t*-test, Fig. 2c)。cAMP のインスリン分泌増強作用を増加率で表すと、その値はいずれの  $\text{Ca}^{2+}$  においても同等であると考えられた ( $P = 0.23$ , ANOVA)。B: 次に cAMP-GEF を特異的に刺激するアナログである 8-pCPT-2' -O-Me-cAMP と、PKA を特異的に刺激する 6-Bnz-cAMP を使用した。100  $\mu\text{mol/l}$  の 8-pCPT-2' -O-Me-cAMP はインスリン分泌を増強し ( $P = 0.002$ , paired *t*-test)、その増加率は  $1.25 \pm 0.05$  倍 (Fig. 3a)であった。100  $\mu\text{mol/l}$  の 6-Bnz-cAMP はインスリン分泌作用を示さなかった ( $P = 0.66$ , paired *t*-test) (Fig. 3b)。500  $\mu\text{mol/l}$  の

6-Bnz-cAMP 作用下ではインスリン分泌は漸減し、wash out 後に反跳現象が認められた (Fig. 3c)。PKA 阻害薬である *N*-[2-(*p*-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89) 10  $\mu\text{mol/l}$  の存在下における  $\text{Ca}^{2+}$  によるインスリン分泌量は約 30% 低下した ( $P=0.003$ , unpaired *t*-test; Fig. 3d)。しかし、10  $\mu\text{mol/l}$  の cAMP によるインスリン分泌増加率は  $1.29 \pm 0.04$  倍 ( $P=0.007$ , paired *t*-test) であり H-89 の影響をうけなかった。C: 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP 100  $\mu\text{mol/l}$  は ATP 非存在下では有意なインスリン分泌作用を示さなかった (Fig. 4a)。一方、同アナログの存在下で 3 mmol/l ATP を作用させるとインスリン分泌は漸増した (Fig. 4b)。同様の現象は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に無関係であった (Fig. 4c)。

【考察】 cAMP によるインスリン分泌増加作用は、作用前に対する増加率として表すと低～高濃度のいずれの  $\text{Ca}^{2+}$  においても一定であった。cAMP によるインスリン分泌刺激に高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  が必要かという問題に関しては、現在までに一致した意見がなかった。過去の実験データは static incubation によるものが多く、低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度での少量のインスリン分泌増加分を正確に測定できなかったことが原因と考えられた。cAMP によるインスリン分泌増強作用にどの分子が関与しているかは定かではない。Kashima らは Epac2/cAMP-GEF II と PKA の両者が同等に関与していると報告している。Eliasson らは両分子共にインスリン分泌を増強するが、そのキネティクスにおいて異なると報告している。一方、我々は PKA 阻害薬である H-89 と KT5720 が cAMP によるインスリン分泌を抑制しないことを以前に報告した。本研究において、H-89 は  $\text{Ca}^{2+}$  のみによるインスリン分泌を若干減弱させたが、cAMP による増加率には影響を与えなかった。さらに、PKA 刺激薬である 6-Bnz-cAMP にはインスリン分泌増強作用はなく、cAMP-GEF 刺激薬である 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP によりインスリン分泌は増強された。以上より、cAMP によるインスリン分泌増強作用は、主に cAMP-GEF により引き起こされていると考えられる。この結果は、cAMP の cAMP-GEF に対する affinity constant は PKA の 10 倍以上であり、インクレチン作用時の膵  $\beta$  細胞内 cAMP 濃度の大きな変化は cAMP-GEF の活性化に反映されるという報告と矛盾しない。また、高濃度 (500  $\mu\text{mol/l}$ ) の 6-Bnz-cAMP はインスリン分泌を抑制した。この現象は、インスリン分泌の調節には細胞内分子のリン酸化のみならず、脱リン酸化も重要な働きを持つという過去の報告に一致している。ATP は分泌顆粒の priming に影響を及ぼし、 $\text{Ca}^{2+}$  は priming された分泌顆粒の fusion 過程を制御していると考えられている。本研究において cAMP のインスリン分泌増強作用には ATP が必要あることが示された。従って、cAMP-GEF はインスリン顆粒の priming 以前に作用して、開口放出を促進すると考えられた。

【総括】 cAMP のインスリン分泌増強効果は、作用前に対する増加率で表すと、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に関係なく一定である。cAMP のインスリン分泌増強作用における下流の分子として、cAMP-GEF が有力であると考えられた。cAMP から cAMP-GEF に至る経路はインスリン分泌過程における readily releasable pool に分泌顆粒を補充することで、インスリン開口放出を増強すると考えられた。

## 論文審査の要旨

報告番号	医研第618号	氏名 橋口 裕	
審査委員	主査	反町 勝	
	副査	上村 裕一	佐伯 武頼

### Cyclic AMP/cAMP-GEF pathway amplifies insulin exocytosis induced by $Ca^{2+}$ and ATP in rat islet $\beta$ cells

(Cyclic AMP/cAMP-GEF 経路は rat islet  $\beta$  cell において  $Ca^{2+}$  と ATP により引き起こされるインスリン開口放出を増強する)

cAMP (adenosine-3',5'-cyclic monophosphate) はインスリンの開口放出を促進すると考えられている。ところが、cAMP のこの作用に高濃度の細胞内  $Ca^{2+}$  が必要か否かについては一致した意見がない。さらに cAMP の effector として、protein kinase A (PKA) と cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors (cAMP-GEF) が候補に挙がっているが、インスリン開口放出機構における PKA と cAMP-GEF の役割を検討した報告はない。本研究では  $Ca^{2+}$  と ATP に依存したインスリン開口放出機構における cAMP の作用、ならびにその下流における PKA、cAMP-GEF の役割について検討している。

$\alpha$ -toxin にて細胞膜に pore を形成し、透過性を亢進させた豚ラ氏島を 3mM ATP を含むリンゲル液で灌流し、種々の  $Ca^{2+}$  濃度下において 10  $\mu$ M cAMP によるインスリン分泌量を測定している。 $Ca^{2+}$  は濃度依存性にインスリン分泌を増強したが、cAMP の添加によりさらに分泌量は増加した。cAMP による分泌増加率は、いずれの  $Ca^{2+}$  においても同等(約 1.3 倍)であった。

cAMP-GEF を特異的に刺激する cAMP アナログである 100  $\mu$ M 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyl cAMP) によるインスリン分泌増加率は  $1.25 \pm 0.05$  倍であり、ATP の存在を必要とした。他方、PKA を特異的に刺激する 100  $\mu$ M 6-Bnz-cAMP ( $N^6$ -Benzoyl cAMP) はインスリン分泌作用を示さず、500  $\mu$ M の 6-Bnz-cAMP ではインスリン分泌は減少し wash out 後に反跳現象が認められた。

PKA 阻害薬である H-89 (N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) 存在下での 10  $\mu$ M cAMP によるインスリン分泌増加率は  $1.29 \pm 0.04$  倍であり H-89 の影響をうけなかった。

本研究により、cAMP によるインスリン分泌増加率は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に関係なく一定であること、cAMP の下流の調節機構として cAMP-GEF が有力であることが示された。cAMP-GEF はインスリン分泌過程における readily releasable pool (即時放出可能プール) に分泌顆粒を補充することにより、インスリン開口放出を増強する機序が示唆された。

本研究は、GIP (gastric inhibitory polypeptide) や GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) などの腸管ペプチド (インクレチン) によるインスリン分泌作用の解明に大きく貢献するものと考えられ、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 <b>618</b> 号	氏名 橋口 裕
審査委員	主査	反町 勝
	副査	上村 裕一      佐伯 武頼

主査および副査の3名は、平成18年1月25日、学位請求者 橋口 裕 に対して論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には以下のような質疑応答がされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

【質問1】perifusionの実験ではカラムにどのような工夫をしてインスリン測定を行ったか？

【回答】カラム内にビーズを敷き豚ラ氏島をその上に乗せた状態で灌流液を流した。  
ビーズ間のスペースは豚β細胞が流失しない程度である。

【質問2】Static incubationとはどのようなものか？

【回答】ウェル内に一定の溶液を入れ、豚ラ氏島を入れた状態で一定時間のインスリン分泌を測定する手法である。経時的測定でないためウェル内の豚ラ氏島のサイズの不均一性などの影響で低濃度ではインスリンの測定値にばらつきが出るのが問題点と考えられる。

【質問3】primingとは具体的にはどのような現象のことか？

【回答】vesicleが細胞内より細胞膜に translocationし、t-SNAREとv-SNAREが結合した状態のことである。細胞内Ca濃度上昇が加わると、vesicleは細胞膜に fusionし分泌が起こる。

【質問4】priming以前にcAMP-GEF(Epac)の作用があるということだが、どのような報告があるか？

【回答】Rorsmanらは capacitance measurementを用いた実験でcAMPは readily releasable poolをcAMP-GEF(Epac)依存性に増加させると報告している。

【質問5】Fig 2Cのデータの解釈によってはCa濃度が上昇することによりインスリン分泌が上昇しているようにみえるが、細胞内のCa濃度は変化していないのか？

【回答】測定はしていないが、変化していないと考えられる。

【質問6】cAMP-GEF(Epac)が開口放出レベルでインスリン分泌を亢進していることは理解できるが、どのような機序によるのか？

【回答】1. グルコース代謝によりATP/ADP比が上昇すると、cAMP-GEFII(Epac2)はSUR1に固定され、exocytosisに必要な構成要素であるKATP channel, VDCC, Rim2, Piccoloを集結させる。  
2. cAMPの上昇はSUR1からcAMP-GEFII(Epac2)を切り離し、Rim2-PiccoloもしくはPiccolo-Piccoloの2量重合を促進する。Rim2-Piccoloはvesicle上に存在するRab3に結合しインスリン分泌を促進するという報告がある。

【質問7】α-toxinで処理した細胞のグルコースセンサーは機能しているのか？

【回答】機能していると考えている。

【質問8】3mM ATPを使用することで細胞膜の脱分極は起きていると考えられるのか？

【回答】ATPによるK<sub>ATP</sub> channelの活性化は起こるが、細胞膜にporeが形成されており、K<sup>+</sup>はこのporeを通過して細胞内外に自由に移動できるので、脱分極は起らないと考えられる。

【質問9】freeのATP濃度はどの程度であると考えられるか？

【回答】非刺激時の細胞内free ATP濃度は～1mMと報告されている。高濃度のグルコース刺激により数倍に上昇すると考えられる。

【質問10】Fig 3Cのデータでインスリン分泌が抑制されているのはなぜ？

【回答】Satoらはオカダ酸を使用し脱リン酸化を抑制した状態、すなわちリン酸化の過剰状態では、インスリン分泌は抑制されると報告している。高濃度の6-Bnz-cAMPによりPKAによるインスリン開口放出に関与する蛋白のリン酸化の亢進した状態が引き起こされ、インスリン分泌抑制が起こったと考えられる。

【質問11】Ca oscillationのメカニズムとしてはどのようなものが考えられるか？

【回答】K<sub>ATP</sub> channel, VDCC, cation channel, ERの相互作用によりCa oscillationは形成されていると考えられているが、詳細なメカニズムは不明である。

## 最終試験の結果の要旨

- 【質問 12】Ca store の関与は膵β細胞では大きいのか？  
【回答】細胞内 Ca 濃度は $\sim 1\mu\text{M}$ であるのに対し、小胞体内は数百 $\mu\text{M}$ であることを考えると、Ca store としての小胞体の関与は大きいと考えられる。
- 【質問 13】Ca-induced Ca release (CICR) は膵β細胞では証明されているか？  
【回答】膵β細胞の小胞体にもリアノジン受容体がありCICRに関与するという報告があるが定説とはなっていない。
- 【質問 14】臨床的に cAMP を介した治療薬はどのような効果が期待されるのか？  
【回答】天然の GLP-1 受容体作動性ペプチドである Exendin 4 が臨床応用される予定である。  
cAMP を上昇させて作用が発揮されるのでインクレチンと同様にインスリン分泌促進作用、膵β細胞保護作用、膵外作用などの効果が期待できる。
- 【質問 15】Permeabilization に要する時間はどの程度で、どの程度の pore が形成されているのか？  
【回答】30 分である。 $\alpha$ -toxin は細胞膜上で四量体を形成し、直径 1 $\sim$ 3nm の pore が形成される。  
この pore を通過できる分子の大きさは 2 kDa までで、ほとんどの蛋白はこの pore を通過しないと考えられる。
- 【質問 16】 $\alpha$ -toxin による permeabilization のメリットは何か？  
【回答】上述したように、小分子のみが通過する pore を形成するので、細胞内小器官や蛋白に影響を与えることなく、細胞内のイオン環境を選択的に変えられることである。
- 【質問 17】cAMP は、Ca 濃度を 0 にしてもインスリン分泌は起こるのか？  
【回答】vesicle が細胞膜へ fusion するには Ca が必須なため、Ca 濃度が 0 ではインスリン分泌は起きないと考えられる。しかし、milli Q 水にも微量の Ca は含まれるため EGTA を使用しても Ca を完全に free にできず、10nM が最低レベルの濃度となった。  
実験結果では 10nM でも cAMP を介したインスリン分泌は起こっている。
- 【質問 18】Ca 濃度の設定を  $3\mu\text{M}$  までとした理由は何か？  
【回答】細胞質全体で測定した細胞内 Ca 濃度は 2.8mM glucose では 100nM、8.3mM glucose では 500 $\sim$ 800nM と考えられるが、膜直下の Ca 濃度はグルコース、high K の刺激により 1 $\sim$ 3 $\mu\text{M}$  まで上昇することを考慮して Ca 濃度を設定した。
- 【質問 19】cAMP-GEF(Epac)selective analog の詳細は調べられているのか？  
【回答】Christensen らの詳細な検討により多種の cAMP analog の cAMP-GEF(Epac)、PKA に対する affinity constant が明らかになっている。
- 【質問 20】cAMP-GEF(Epac)は様々な細胞で作用を発揮しているか？  
【回答】cAMP-GEF(Epac)1 の mRNA は甲状腺、腎臓、卵巣、筋肉、心臓に強く発現しており、cAMP-GEF(Epac)2 の mRNA は神経細胞、内分泌組織に発現している。  
それぞれの細胞で作用を発揮していると考えられるが、詳細は今後検討されると思われる。
- 【質問 21】心臓での cAMP-GEF(Epac)作用は研究されているか？  
【回答】心収縮に必要なイオンや分子の調節に必要な心筋細胞間の Gap junction 機能の活性化に cAMP-GEF(Epac)が PKA よりも関連していることが報告されている。
- 【質問 22】cAMP-GEF(Epac)の Kd が PKA より高いことは何か意味があるか？  
【回答】PKA の affinity constant は 0.1 $\sim$ 1 $\mu\text{M}$  であり、cAMP-GEF(Epac)のそれは $\sim$ 10 $\mu\text{M}$  である。  
細胞内 cAMP 濃度は通常数  $\mu\text{M}$  であり、刺激による上昇 (10 $\mu\text{M}$ ) は cAMP-GEF(Epac)を主に刺激すると考えられる。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。