

博士論文

マウス膵 β 細胞における M型ピルビン酸キナーゼの機能解析

堀内 雄太

目次

—略語表—	... 5
第1章 序論	
1-1. 膵β細胞とインスリンについて	... 7
1-2. 膵β細胞と糖尿病について	... 9
1-3. 膵β細胞におけるインスリン分泌メカニズム	... 11
1-4. 膵β細胞の細胞死	... 13
1-5. L-システインによる膵β細胞のインスリン分泌制御	... 15
1-6. 細胞内におけるピルビン酸キナーゼの役割	... 17
1-7. 研究目的	... 19
第2章 試薬と研究手法	
2-1. 用いた試薬と抗体、siRNA	... 22
2-2. バッファー組成	... 23
2-3. 細胞培養とマウス膵島単離	... 24
2-4. siRNAによるRNA干渉実験	... 25
2-5. インスリン分泌量測定	... 26
2-6. BCA法によるタンパク質量測定	... 27
2-7. 細胞内の総インスリン量測定	... 27
2-8. ウェスタンブロッティング法によるタンパク質発現量測定	... 28
2-9. 細胞内のカルシウムイオン濃度測定	... 29
2-10. ATP量測定	... 30
2-11. 酸素消費量測定	... 30
2-12. メタボローム解析	... 31
2-13. 細胞内の硫化水素量測定	... 32
2-14. 生細胞中のピルビン酸キナーゼ活性測定	... 32
2-15. 抗体特異性の確認	... 33
2-16. 免疫除去	... 33

2-17. 定量的 RT-PCR 法による細胞内 mRNA 量測定	... 34
2-18. <i>in vitro</i> 系でのピルビン酸キナーゼによるピルビン酸産生量測定	... 35
2-19. L-システインの PKM2 に対する半数阻害濃度 (IC ₅₀) 測定と、 PKM2 の最大反応速度 (V _{max})、ミカエリス定数 (K _m) の計算	... 36
2-20. Native SDS-PAGE 法を用いたウェスタンブロッティング	... 37
2-21. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出	... 37
2-22. Annexin V 法を用いたアポトーシス細胞の検出	... 38
2-23. 間接蛍光抗体法	... 39
2-24. コメットアッセイ	... 39
2-25. 共免疫沈降法	... 40
2-26. 免疫沈降法による A-Raf タンパク質複合体の回収	... 41
2-27. <i>in vitro</i> 系での A-Raf 複合体による GST-MEK1 リン酸化アッセイ	... 41
2-28. Phos-tag SDS-PAGE	... 42
2-29. 統計解析	... 43

第 3 章 結果

3-1. L-システインは MIN6 細胞の二相性インスリン分泌を抑制する	... 45
3-2. L-システインは MIN6 細胞内のピルビン酸キナーゼ活性を可逆的に抑制する	... 49
3-3. L-システインはインスリン分泌制御に関与する PKM2 を特異的に抑制する	... 53
3-4. PKM1 は膵 β 細胞において小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する	... 58
3-5. PKM1 は A-Raf と結合し、MEK、ERK のリン酸化を制御する	... 61
3-6. PKM1 は ERK のリン酸化を介して caspase-9、caspase-3 の活性を制御する	... 63

第4章 考察	
4-1. PKM2によるインスリン分泌制御とL-システインによる可逆的な抑制について	... 68
4-2. PKM1によるA-Raf/MEK/ERK経路の活性化とcaspase-9/caspase-3経路の抑制、 小胞体ストレス誘導性アポトーシスの抑制について	... 71
4-3. M型ピルビン酸キナーゼと糖尿病の関係について	... 74
—謝辞—	... 78
第5章 参考文献	... 79
第6章 図表	... 95

略語表

ADP : adenosine diphosphate

AGEs : advanced glycation end products

ATP : adenosine triphosphate

BSA : bovine serum albumin

CBS : cystathionine- β -synthase

CE-TOFMS : capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry

CSE : cystathionine- γ -lyase

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FITC : fluorescein isothiocyanate

GFR : glomerular filtration rate

GSIS : glucose-stimulated insulin secretion

HRP : horseradish peroxidase

K_{ATP} channels : ATP-sensitive K⁺ channels

NAD : nicotinamide adenine dinucleotide

PBS : phosphate-buffered saline

PEP : phosphoenolpyruvate

PI : propidium iodide

RIPA buffer : radio-immunoprecipitation assay buffer

RNAi : ribonucleic acid interference

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA : small interfering ribonucleic acid

T1D : type 1 diabetes mellitus

T2D : type 2 diabetes mellitus

TBS : Tris-buffered saline

TCA cycle : tricarboxylic acid cycle

TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UPR : unfolded protein response

VDCCs : voltage-dependent calcium channels

第 1 章 序論

1-1. 膵β細胞とインスリンについて

ヒトを始めとする多くの脊椎動物はグルコース（ブドウ糖）を主なエネルギー源とするため、ホルモンによる調節などを通じて血液中のグルコース濃度（血糖値）を適切な範囲内に保っているが、その中でも中心的な役割を果たすのが膵臓のβ細胞（膵β細胞）から分泌されるインスリンである。血糖値を制御するホルモンは多く知られているものの、血糖値を低下させる役割をもつホルモンはただ一種類、インスリンのみであることから、インスリンは特に重要なホルモンとして考えられている（Henquin, 2000; Lang, 1999; Leibiger *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009）。

グルコースは通常、細胞に取り込まれた後に代謝され、解糖系やクエン酸回路（TCA (tricarboxylic acid) 回路）、酸化リン酸化といった過程を経てATP産生に用いられる。このことから、血糖値の高い状態（高血糖）は豊富なエネルギーを有する状況として良いことのように考えられるが、慢性的な高血糖は生体に対し悪影響を及ぼすことが知られている。その原因としては、高いグルコース濃度が細胞へのストレスとなる「糖毒性 (glucotoxicity)」や、グルコースの反応性の高さから生じる「糖化反応 (glycation)」と呼ばれる現象が挙げられる。タンパク質にグルコースが付加される反応として、酵素を介して特定の残基にグルコースが付加されるグリコシル化反応 (glycosylation) がよく知られているが、糖化反応は、グルコースがタンパク質の不特定の部位と反応して不可逆的なグルコース付加が生じる、酵素に制御されていない反応である（Rabbani & Thornalley, 2012）。糖化反応が亢進したタンパク質は終末糖化産物 (advanced glycation end products, AGEs) と呼ばれるようになり、AGEs の増加は糖尿病の悪化や腎障害、心血管障害、アルツハイマー病などに関連することも報告されていることから、血糖値を適切な範囲に保つことが生体にとって非常に重要な意味をもつと言える（Fu *et al.*, 2013; Prentki & Nolan, 2006; Rabbani & Thornalley, 2012）。

血糖値が上昇すると、それを感知した膵 β 細胞がインスリンの分泌を行う。膵臓全体としては内分泌器官、外分泌器官双方の役割をもつが、内分泌器官としての体積は膵臓全体の1-2%程度であると考えられており、膵島（ランゲルハンス島）と呼ばれる細胞塊にホルモン分泌を行う細胞が集まっている（Hou *et al.*, 2009; Leibiger *et al.*, 2008）。膵島にはグルカゴンを産生する α 細胞、ソマトスタチンを産生する δ 細胞やグレリンを産生する ϵ 細胞、膵ポリペプチドを分泌するPP細胞、そしてインスリンを分泌する β 細胞が集まっているが、最も多く存在するのは膵 β 細胞であり、膵島のうち60-80%程度を占めるとされている（Henquin & Meissner, 1984; Ionescu-tirgoviste *et al.*, 2015）。

膵 β 細胞が分泌するペプチドホルモン、インスリンは51個のアミノ酸からなる5.8 kDaほどのタンパク質である。mRNAからの翻訳時には110アミノ酸からなるプレプロインスリンと呼ばれる状態であるが、そこからシグナルペプチドが除かれてプロインスリンとなる。更にC-ペプチドと呼ばれるペプチドが切り離されて、2本のポリペプチド鎖（A鎖、B鎖）が3ヶ所のジスルフィド結合で繋がった構造のインスリンとなり、分泌顆粒内に凝縮された後に分泌刺激によって細胞外へと分泌される（Fu *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2009）。

分泌されたインスリンは血液を通じて全身の臓器へ行き渡り、受容体を介してインスリンシグナルと呼ばれる一連のシグナル応答を引き起こす。このシグナルにより、各臓器は血糖値を下げるような働きを示す。たとえば筋肉や脂肪細胞のグルコース取り込みを増加させ、筋肉や肝臓においてはグリコーゲンの形で、肝臓や脂肪細胞では脂質の形で貯蔵を進める（Guo, 2014）。また、血糖値を上昇させるホルモンであるグルカゴンを分泌する膵臓 α 細胞に対しては、グルカゴンの分泌を抑制させる働きをもつ（Bansal & Wang, 2008）。インスリン、あるいはインスリンに似た構造のタンパク質自体は多くの生物種において確認されており、大腸菌（*Escherichia Coli*）やテトラヒメナ（*Tetrahymena*）などの単細胞生物でも、インスリンを介したシグナル伝達経路が存在する。しかし、その分泌に特化した細胞が存在

するのは一部の魚類を含めた脊椎動物のみであり、種々の臓器の働きを緻密に制御する役目を有していることが示唆される (Arntfield & Kooy, 2011)。

1-2. 膵β細胞と糖尿病について

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) は、「インスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群」として定義される病気であり、高血糖となる成因は多岐に渡る。糖尿病は大別すると 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1D)、2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2D)、特定の原因によるその他の型の糖尿病 (インスリン遺伝子の異常や若年性糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young, MODY) などの遺伝子に関する異常、他の病気に付随して生じる糖尿病状態など)、妊娠性糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) にわかれている (清野 他, 2010)。

T1D は自己免疫疾患による病気で、インスリンを産生する膵β細胞が失われることによって発症する。遺伝的な要因やウイルス感染などが原因とされており、インスリン注射による対症療法が現在の主な治療法となる。T2D 発症の要因は多岐に渡るが、主な原因としては、インスリンへの感受性が下がるインスリン抵抗性の発症や、インスリンの産生不足を含めた膵β細胞の機能不全などが考えられている。糖尿病の患者数は年々増えており、2017 年現在では全世界に 4 億人超の患者がいると推計されている。更に、2040 年には約 1.5 倍の 6 億人超に増加すると見込まれている。糖尿病患者のうち 90%程度が T2D であるという推計も踏まえると、T2D の発症を抑える、あるいは効果的な治療を行うことは、社会的にも重要な側面をもつ (International Diabetes Federation, 2017)。

T2D が生活習慣病と呼ばれるように、生活習慣の悪化や肥満、そしてそれに伴うインスリ

ン抵抗性の増加は、T2D 発症の初期によく見られる。これらが T2D 発症の大きなリスクファクターとなることは勿論だが、インスリン抵抗性の発現がそのまま T2D の発症につながるわけではない。特に近年は、T2D の発症過程において膵β細胞の果たす役割、すなわち膵β細胞の代謝異常や細胞死といった機能低下、機能不全が生体に与える影響が大きな注目を集めている。T2D の患者において膵β細胞量の減少や個々の膵β細胞の機能低下が報告されていることから、こうした過程が膵β細胞の機能不全につながり、最終的に T2D の発症を導くと考えられている (Kahn *et al.*, 2014; Meier & Bonadonna, 2013; Wajchenberg, 2007; Weir & Bonner-Weir, 2013)。

膵β細胞の機能低下については、未だ詳細な機構は不明であるものの、インスリン分泌量の低下を引き金として膵β細胞に要求されるインスリン分泌量が増え、膵β細胞への負担が増加する、そしてそれが膵β細胞の機能低下や細胞死につながり、更にインスリン分泌量が減少する、というネガティブなサイクルが存在すると考えられている (Meier & Bonadonna, 2013)。実際、インスリン抵抗性の状態を含む T2D の初期段階においては、既存のβ細胞の機能の増幅やβ細胞の数の増加を通して血糖を正常な値に戻すことが可能であることが知られている (Kahn, 1994)。しかし、その「代償期」が長く続くことは少なく、徐々にインスリン感受性の低下に対応できるだけの十分量のインスリンを分泌できなくなり、β細胞が機能不全へと陥ってインスリン分泌不全が生じることもわかっている (Fu *et al.*, 2013)。また、糖尿病を発症している患者においては膵β細胞のアポトーシスが盛んになっており、膵β細胞の数の減少に由来すると考えられる膵島全体の体積減少も多く見受けられる (Butler *et al.*, 2003)。それゆえ、膵β細胞のインスリン分泌制御機構や細胞死のメカニズムを知ることは、膵β細胞が機能不全に至る道筋の解明や T2D の発症機構の理解につながるとともに、効果的な治療法の探索においても大きく役立つと考えられる。

1-3. 膵β細胞におけるインスリン分泌メカニズム

インスリンが血糖値を低下させることは先に述べた (1-1.) が、そのため、インスリンの分泌機構に異常が生じると血糖の制御がうまくいかなくなる。インスリン分泌量が少なくなれば高血糖症 (hyperglycaemia) に、多くなれば低血糖症 (hypoglycaemia) に陥るため、その分泌においては精密な制御がなされている (Henquin, 2009)。

インスリンは合成された後にインスリン分泌顆粒となって膵β細胞内に蓄積されており、膵β細胞が血中のグルコース濃度上昇を感知するとそれに応じてインスリンが分泌される (Schmitz *et al.*, 2008)。グルコースを刺激として生じるインスリン分泌はグルコース刺激誘導性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) と呼ばれ、グルコースの取り込みからインスリン分泌までの大まかな流れは図 A に示した通りである (Henquin, 2009; Fig.1 を基に作成、一部改変)。GSIS においては惹起経路と代謝性増幅経路の二種の経路が知られており、これらが組み合わさることでインスリン分泌が構成されている。

惹起経路 (triggering pathway) においては、グルコースの取り込みの後、解糖系、TCA 回路、電子伝達系での代謝を通じて細胞内で産生される ATP が重要な役割を果たす。グルコース刺激後の ATP 濃度上昇に反応して細胞膜上の ATP 感受性カリウムチャネル (ATP-sensitive K⁺ channels, K_{ATP} チャンネル) が閉口し、脱分極が生じることで、同じく細胞膜上に存在する電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent calcium channels, VDCCs) の開口が引き起こされる。VDCCs の開口は細胞内へのカルシウムイオン流入を促進し、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇する。このカルシウムイオン濃度の上昇がインスリン分泌顆粒の細胞膜への融合を引き起こし、結果的に顆粒内のインスリンが細胞外へと分泌される (Ashcroft *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 2013; Henquin, 2000; Lang, 1999; Seino *et al.*,

2000)。

代謝性増幅経路 (metabolic amplifying pathway) においては、グルコースを含む様々な代謝産物が鍵となって細胞内のキナーゼ等が活性化され、インスリン分泌が増強されることがわかっている。以前は ATP 非依存性経路と呼ばれていたが、こちらの経路が働くためには惹起経路におけるカルシウムイオン濃度の上昇が必要であり、惹起経路を阻害するとほとんどの場合においてこちらの経路も阻害されるということがわかってからは、代謝性増幅経路の名称が多く使われるようになってきている (Henquin, 2009)。

グルコース刺激後すぐに起こる惹起経路と、その後しばらくしてから起こる代謝性増幅経路が組み合わさることで、図 B のようにインスリン分泌に二相性が生じることが知られている (Rorsman & Renström, 2003; Fig.2A、5A を基に作成、一部改変)。グルコース刺激後速やかに起こる第一相は刺激後 5 分以内に分泌量のピークが存在し、10 分程度で収まる。それに引き続くようにして第二相の分泌が生じ、第二相の分泌はグルコース刺激後から 30 分以上に渡って続く (Fehse *et al.*, 2005)。この二相性のインスリン分泌においては、分泌に関わるインスリン顆粒の種類が異なることが示唆されている (Bratanova-Tochkova *et al.*, 2002; Rorsman & Renström, 2003)。第一相においては、細胞膜の近辺に存在し、インスリン分泌顆粒全体の 1-5%程度を占めると言われる RRP (readily releasable pool) と呼ばれるインスリン分泌顆粒プール由来のインスリンが主に分泌されていると考えられている (Fu *et al.*, 2013; Seino *et al.*, 2011)。それに対して、残りの 95%以上を占めるのが細胞膜直下の F-アクチンのネットワークよりも離れたところにある RP (reserve pool) に存在するインスリン分泌顆粒である。ここに貯蔵されている顆粒が分泌されるためには、アクチン細胞骨格が再構成を起し、微小管などを介して顆粒が膜近傍へと輸送される必要がある。なお、RP 由来の顆粒が分泌されるのは特に第二相においてであるとされており、その際にはグルコースの代謝産物が F-アクチンの再構成などに関与する (Wang & Thurmond, 2009) が、詳細につい

てはまだ不明な点も残る。

インスリン分泌の二相性は生体における血糖の制御においても重要な役割をもつと考えられるが、二相性インスリン分泌の異常、特に第一相の減少が T2D 患者において確認されており (Bacha *et al.*, 2010; Del Prato & Tiengo, 2001)、インスリン分泌が二相性を失うことが T2D の発症と関与する可能性も考えられる。このことから、分泌されるインスリンの総量だけでなく、膵β細胞において二相性のインスリン分泌が維持されているかどうかを確かめることが膵β細胞の機能評価において重要になると考えられる。

1-4. 膵β細胞の細胞死

T2D における膵β細胞の減少は、膵β細胞の複製能の低下ではなく、アポトーシスの増加によるものであることが示唆されている (Butler *et al.*, 2003; Montane *et al.*, 2014)。このアポトーシスの主な原因として考えられているのが、生体内において膵β細胞の受けている様々な毒性の刺激 (糖毒性や脂肪毒性、アミロイドの沈着など) と、それによって細胞内で増加する酸化ストレスや小胞体ストレスなどである (Montane *et al.*, 2014; Wali *et al.*, 2013)。

膵β細胞はグルコースや栄養素を取り込み、代謝することでインスリンの分泌を行っているが、細胞内のグルコース量の増加やカルシウムイオン濃度の増加は活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の産生や蓄積につながり、酸化ストレスとなる (Drews *et al.*, 2010)。また、フォールディングのうまくいかなかった異常タンパク質 (misfolded proteins) の蓄積は小胞体ストレスとなり、細胞への負担となる (Hetz, 2012; Scheuner & Kaufman, 2008)。通常はこれらのストレスに対処する機構が働いて膵β細胞の機能は正常に保たれているが、

許容量を超えるストレスとなった場合には、膵β細胞はアポトーシスを起こす。中でも小胞体ストレスは、膵β細胞におけるアポトーシスの大きな原因の一つである (Back & Kaufman, 2012; Eizirik *et al.*, 2008; Wali *et al.*, 2013)。

そもそもアポトーシスは、プログラム細胞死とも呼ばれ、ネクローシスなどの細胞死と区別される (Elmore, 2007)。ネクローシスにおいてはミトコンドリアの膨潤、細胞の肥大などを経て、最終的には細胞膜が破裂して細胞融解が起こるため、細胞の内容物が放出されて炎症が起こるのに対し、アポトーシスは細胞膜が維持されたまま核と細胞質が凝縮していき、アポトーシス小体と呼ばれる小さな塊となった後、マクロファージなどの貪食作用によって取り除かれ、炎症などは生じない (Elmore, 2007)。アポトーシスは、外因性、及び内因性の刺激によって引き起こされる一連のタンパク質のシグナル伝達経路により構成され、前者の場合は、tumor necrosis factor (TNF) や Fas リガンドなどの細胞外シグナルを細胞表面の受容体が受け取ることで、後者の場合は、DNA の損傷や小胞体ストレスの増加などによってアポトーシスが始まることが知られている (Elmore, 2007; Parrish *et al.*, 2013)。どちらの経路においても、カスパーゼと呼ばれるタンパク質ファミリーが重要な役割を持ち、外因性の経路においては caspase-8 が、内因性の経路においては caspase-9 が活性化された後、どちらも最終的には caspase-3 を活性化し、細胞死へとつながる。caspase-8、caspase-9、caspase-3 はいずれも細胞内では不活性化状態で存在し、切断によって活性化される (切断前の状態を procaspase と呼ぶ) (Parrish *et al.*, 2013)。

小胞体ストレスへの対処として、細胞には小胞体ストレス応答 (unfolded protein response, UPR) という機構が存在している (Fonseca *et al.*, 2011; Papa, 2012)。UPR においては、一般的には protein kinase R-like ER kinase (PERK) と inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α)、そして ATF6 の三種の「センサー」が小胞体ストレスを感知し、その軽減に関与している。これら 3 種のタンパク質は全て小胞体膜に存在する膜タンパク質であるが、その

性質はそれぞれ異なる。PERK と IRE1 α は小胞体ストレスシグナルを受け取ると小胞体膜上で集まり、自己リン酸化によって活性化し、PERK は eIF2 α 、IRE1 α は XBP1 という下流のタンパク質へとシグナルを伝達する (Hetz, 2012)。ATF6 はゴルジ体へと輸送された後に切断され、切断された ATF6 が核内へ輸送されてシグナルを伝達する (Hetz, 2012)。これらのシグナルは基本的に、小胞体の負担を軽減する方向へと細胞内の分子を動かす。すなわち、タンパク質のフォールディングに関わるシャペロンの量を増やしてフォールディング能力を向上させる、mRNA からタンパク質への翻訳を一時的に抑制する、小胞体内の異常タンパク質を除去する、などであるが、UPR で対処しきれないほどの小胞体ストレスが生じた場合には、アポトーシスにつながる (Fonseca *et al.*, 2011; Papa, 2012; 原 & 浦野, 2014)。こうした小胞体ストレスの増加やそれに伴うアポトーシスは膵 β 細胞の機能不全につながり、T2D の発症を導くことが示唆されている (Oyadomari *et al.*, 2002; Papa, 2012; Scheuner & Kaufman, 2008)。

酸化ストレスや小胞体ストレスといったストレスに誘導されるアポトーシスのメカニズムを解明することで、T2D においてアポトーシスによる膵 β 細胞の減少を防ぐきっかけとなるとともに、それらの分子が T2D の治療の標的となることも期待される (Montane *et al.*, 2014)。

1-5. L-システインによる膵 β 細胞のインスリン分泌制御

L-システインはヒトにおける準必須アミノ酸であるが、美白効果や二日酔いの改善といった目的のためのサプリメントとしても知られており、多く服用されている。その一方で、膵 β 細胞への影響や糖尿病態への関与などは、議論の余地が残されていた。

近年、特に血中の L-システイン濃度増加が糖尿病の発症や重症化に関与している可能性に

についての報告がなされており、その関連性が注目されている。たとえば肥満のアフリカ系アメリカ人女性を対象とした研究において、インスリン抵抗性の増加とともに血中 L-システイン濃度が増加することが報告されている (Fiehn *et al.*, 2010)。また、糖尿病の発症と密接に関連する体脂肪率の増加が血中の総システイン濃度 (遊離型、ジスルフィド結合型、アルブミン結合型 L-システインを含む) と強い関係性をもつこと、及びボディマス指数 (body mass index, BMI) が血中の遊離 L-システイン濃度と強い関係性をもつことが明らかにされている (Elshorbagy *et al.*, 2012)。更に、T2D 患者の腎臓の糸球体濾過率 (glomerular filtration rate, GFR) の悪化に相関する形で L-システイン、及びその前駆体であるシスタチオニンの血中濃度が増加するとの報告 (Herrmann *et al.*, 2005) や、T2D 発症リスク上昇の原因の一種として考えられている閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea syndrome) (Botros *et al.*, 2009) において、血中の L-システイン濃度の上昇がその重症化における潜在的なバイオマーカーであるという報告もある (Cintra *et al.*, 2011)。

また、L-システインと膵β細胞のインスリン分泌不全との関係についての報告も存在する。特に重要な先行研究として金子らの報告があるが、マウスの膵島、及び膵臓β細胞由来の細胞株である MIN6 細胞において、L-システインを添加することで ATP 量、インスリン分泌量が減少することが示されている (Kaneko *et al.*, 2006)。また、L-システインは細胞内でシスタチオニン-β-シンターゼ (cystathionine-β-synthase, CBS) やシスタチオニン-γ-リアーゼ (cystathionine-γ-lyase, CSE) の働きによって代謝され、硫化水素 (H₂S) を産生することが知られている (Yu *et al.*, 2014) が、硫化水素が K_{ATP} チャネルや VDCCs の機能攪乱を介してインスリン分泌不全を誘起するという報告もされている (Ali *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2005)。

しかしその一方で、L-システインが糖尿病態の改善に寄与するという可能性を示す報告も存在する。例えば、個体レベルにおいて、肥満由来糖尿病モデル動物である Zucker ラット

のインスリン抵抗性などの病態が L-システインの経口投与により改善するという報告がある (Jain *et al.*, 2009)。細胞レベルでも、マウスの膵島において L-システインを添加することでインスリン分泌量が増加することが報告されている (Kaneko *et al.*, 2009)。

これらの報告において、L-システインの添加濃度や処理時間は研究によって差があり、中には高濃度 (>10 mM) の L-システインを短時間 (1 時間ほど) 添加した際の細胞への影響を確かめたものも存在する。しかし、特に T2D などの長期の生活習慣が反映される疾患においては、血中 L-システイン濃度の「短時間での急激な上昇」よりも、「長時間に渡る緩やかな上昇」が重要となることが推測される。そのため、高濃度かつ短時間の L-システイン添加が細胞に与える影響だけでなく、低濃度かつ長時間の L-システイン添加が細胞に対してどのような影響を及ぼすかを明らかにすることも必要であると考えられる。L-システインが生体内で働くメカニズムやインスリン分泌に対する効果、また、その影響がどのようにして T2D などの疾患に結びつくのかについては、今後の研究で明らかにされるべき点であると言える。

1-6. 細胞内においてピルビン酸キナーゼが果たす役割

ピルビン酸キナーゼは、ホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) と ADP からピルビン酸と ATP を産生する酵素で、解糖系において必要不可欠な酵素である (Valentini *et al.*, 2000)。ピルビン酸キナーゼによる ATP 産生はミトコンドリアにおける好気呼吸とは異なり、酸素の供給を必要としないことから、低酸素下における細胞の生存を可能にするという点でも重要な酵素である (Mazurek, 2011)。

ピルビン酸キナーゼには 4 種のアイソフォームがあり、それぞれ発現している組織や働き、制御機構に違いがある。L 型 (PKL)、R 型 (PKR) の 2 種は PKL 遺伝子にコードされてい

るアイソフォームで、PKL は糖新生を行う肝臓や腎臓、腸において、PKR は赤血球において発現している。M 型の PKM1 と PKM2 は PKM 遺伝子にコードされているスプライシングバリエーションで、どちらも 531 残基のアミノ酸からなる。PKM 遺伝子の 9 番目のエキソンが選択された場合には PKM1、10 番目のエキソンが選択された場合には PKM2 となり、その配列の違いは僅か 23 残基である (Clower *et al.*, 2010; David *et al.*, 2010; Noguchi *et al.*, 1986)。PKM1 は脳や筋肉、PKM2 は膵臓を含めた様々な成熟組織や未発達の組織、またはガン細胞において発現しており、細胞がガン化すると元の組織で発現しているアイソフォーム (たとえば肝臓ならば PKL、脳ならば PKM1) が消えて PKM2 が発現することがわかっている (Clower *et al.*, 2010; Macdonald & Chang, 1985; Mazurek, 2011)。

また、PKM2 はピルビン酸キナーゼとしての機能以外の働きにも注目が集まっている。特に、ガン細胞においてワールブルク効果 (好氣的な条件下であっても、乳酸の産生を行う嫌気呼吸が亢進する現象) を進める働きは大きな研究対象となっており、ガン細胞の急速な成長に必要な因子として考えられている (Christofk *et al.*, 2008; Hitosugi *et al.*, 2009)。更に、ガン細胞において PKM2 が核に移行することでワールブルク効果に関連する遺伝子の転写を制御しているという報告 (Yang *et al.*, 2012) や、PKM2 の核移行が細胞の増加を制御しているという報告 (Hoshino *et al.*, 2007; Steták *et al.*, 2007) もされている。また、未だ議論の余地はある (Hosios *et al.*, 2015) もの、PKM2 がタンパク質にリン酸を付加するプロテインキナーゼとしての役割をもっているという報告も存在する (Gao *et al.*, 2012)。

加えて、PKM1 と PKM2 が様々な細胞種において細胞死を活性化、または抑制する機能をもつことも報告されている。細胞死を活性化する例としては、HCT116 細胞において PKM1 の過剰発現がアポトーシスを亢進させること、及び miR-124 誘導性アポトーシスを増強させることが報告されている (Sun *et al.*, 2014)。また、Cos-7 細胞において、PKM2 が核内へ移行することでアポトーシスが活性化されることも報告されている (Steták *et al.*, 2007)。

加えて、shRNA による PKM1、PKM2 の発現抑制を行った際にラットのグリオーマスフェロイドの自発性細胞死が抑制されることを示した研究もあり、特に PKM2 の発現抑制時には、Dichloroacetate + Etoposide 誘導性の細胞死、2-deoxyglucose 誘導性の細胞死も抑制されると報告されている (Morfouace *et al.*, 2014)。

反対に細胞死を抑制する例としては、PKM1 の過剰発現によって、HeLa 細胞における Vitamin K₃ 誘導性、あるいは Vitamin K₅ 誘導性の細胞死が減少することが報告されている (Chen *et al.*, 2012)。更に、siRNA を用いた PKM1 の発現抑制によって DLD-1 細胞と WiDr 細胞の内在性のアポトーシス経路が活性化されることも示唆されている (Taniguchi *et al.*, 2015)。また、siRNA を用いた PKM2 の発現抑制により、HCT116 細胞、HepG2 細胞、SKOV3 細胞、更には NCI-60 に含まれる 10 種のヒト由来ガン細胞においてアポトーシスが増加することも報告されている (Goldberg & Sharp, 2012)。しかしその一方で、例えば MEF 細胞においては PKM2 を欠損させても細胞死が増加しないことも報告されており (Lunt *et al.*, 2015)、PKM1 と PKM2 のタンパク質量の変化が細胞死に与える影響は、細胞種や細胞死の誘導条件によって異なると考えられる。

このように、PKM1 や PKM2 がもつ機能はピルビン酸キナーゼとしての役割も含めて多岐に渡っており、今後の研究によって更に詳しい機能、及び制御メカニズムが明らかにされていくことが期待される。

1-7. 研究目的

本研究においては、膵β細胞のインスリン分泌や細胞死に関わる機構について、培養細胞を用いたタンパク質レベルでの解析を行い、細胞機能の制御メカニズムを解明することを目

的とした。特に、L-システインに関する研究を進める中で膵β細胞機能の制御因子の候補として挙げられたM型ピルビン酸キナーゼに着目し、各アイソフォームがどのような働きをもつのか、どのような仕組みで膵β細胞の機能を制御しているのかを明らかにすることを目指した。

本研究を通じて、膵β細胞の機能制御におけるM型ピルビン酸キナーゼの役割についての理解が進むとともに、T2Dを含む疾患の予防やその治療法の開発に少なからず寄与することが期待される。

第2章 試薬と研究手法

2-1. 用いた試薬と抗体、siRNA

用いた試薬について、特に記載のないものについては和光純薬工業（大阪府）より購入した。ピルビン酸メチル（methyl pyruvate）、ツニカマイシン（tunicamycin）、タプシガルギン（thapsigargin）は Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany) より購入した。DASA-10 (PKM2 Activator II, DASA) は Calbiochem (Merck) より購入した。Complete Protease Inhibitor Cocktail と PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail は Roche Diagnostics (Basel, Switzerland) より購入した。

抗体について、insulin (#8138)、caspase-3 (#9665)、caspase-9 (#9504)、cleaved caspase-9 (Asp353) (#9509)、p44/42 MAPK (Erk1/2) (#4695)、phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#4370)、phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (#9154)、PERK (#3192)、phospho-PERK (Thr980) (#3179)、IRE1 α (#3294)、GST (#2624)、A-Raf (#4432)、normal rabbit IgG (#2729) に対する抗体、及び Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (#7074) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。

phospho-IRE1 alpha (Ser724) (PA1-16927)、actin (A5060)、PKLR (AV41699)、 β -tubulin (T8328) に対する抗体は Sigma-Aldrich より購入した。

PKM1 (15821-1-AP)、PKM2 (15822-1-AP) に対する抗体は Proteintech (Manchester, UK) より購入した。

caspase-9 (phospho T125) (ab195847)、MEK1+MEK2 (ab178876) に対する抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。

HRP-conjugated anti-mouse IgG light chain-specific antibody (AP200P) は Millipore (Merck) より購入した。

Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody (A-11034) は Life Technologies

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) より購入した。

HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (W402) は Promega (Madison, WI, USA) より購入した。

マウス PKM1 と PKM2 に対する siRNA は、Sigma-Aldrich の Rosetta siRNA Design Algorithm による設計を行い、Sigma-Aldrich から購入した。siRNA の配列は以下の通り。

PKM1 siRNA, 5'-GUGCGAGCCUCCAGUCACUdTdT-3'

PKM2 siRNA, 5'-GGCAGAGGCUGCCAUCUACdTdT-3'

なお siRNA を用いた実験では、ネガティブコントロールとして、Ambion (Thermo Fisher Scientific) から購入した negative control siRNA (AM4635) を使用した。

2-2. バッファー組成

本研究において用いたバッファーの組成は以下の通り。

control KREBS (pH 7.4) (KRBB) : 140 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM

MgSO₄, 1.5 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES

低グルコース溶液 (3G-KRBB) : 3 mM D(+)-Glucose in KRBB

高グルコース溶液 (12G- or 25G-KRBB) : 12 mM or 25 mM D(+)-Glucose in KRBB

High-K solution (pH 7.4) : 93.6 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.5 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgSO₄,

1.5 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 3 mM D(+)-Glucose

PBS (pH 7.4) : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 16 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄

RIPA buffer : 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% (wt/vol)

sodium deoxycholate, 0.1% (wt/vol) SDS

2x Laemmli Sample buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (wt/vol) SDS, 20% (vol/vol)

Glycerol

SDS-PAGE running buffer : 250 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% (wt/vol) SDS

Semi-dry blotting buffer : 39 mM glycine, 48.5 mM Tris-base, 20% (vol/vol) methanol,
0.0376% (wt/vol) SDS

TBS : 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM KCl

TBST : 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.05% (vol/vol) Tween-20

2-3. 細胞培養とマウス臍島単離

MIN6 細胞は、大阪大学の宮崎純一教授よりご提供いただいたものを使用した。MIN6 細胞の培養においては、菅原らの先行研究 (Sugawara *et al.*, 2014) を参考にし、D-MEM High Glucose (和光純薬工業、044-29765) に 10% (vol/vol) の FCS (Gibco, Thermo Fisher Scientific) と 1% (vol/vol) のペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、72 μ M の β -メルカプトエタノールを加えたものを培地として用いた。MIN6 細胞は二日に一度、培地の交換を行った。継代においては、細胞剥離液として 0.125% Trypsin と 50 mM EDTA を含む PBS を用い、3-4 日を目安に継代を行った。

Beta-TC-6 細胞は、ATCC (Manassas, VA, USA) より購入した細胞株 (CRL-11506) を用いた。Beta-TC-6 細胞の継代においては、DMEM (日水製薬、東京都) に 1.4 g/l の炭酸水素ナトリウムを溶かし、15%の FBS (Corning, Tewksbury, MA, USA) を加えた培地を使用して培養を行った。継代においては、0.25% Trypsin と 50 mM EDTA を含む PBS を用い、

3-5 日を目安に継代を行った。

マウスの臍島は、8 週齢の C57BL/6J マウス（日本クレア（東京都）より購入）から、高本らの方法（Takamoto *et al.*, 2014）と同様に collagenase digestion method によって採集したものを使用した。また、マウスの取り扱いにあたっては、東京大学の動物実験実施マニュアルに則った方法で実験を行った。大きさを考慮した上で臍島を選別し、グループ間で細胞の総量になるべく差が出ないように、大小合わせて 20 個の臍島を 1 つの実験グループとして実験に用いた。臍島採取後から 24 時間、11 mM のグルコースを含む RPMI 1640 培地（日水製薬）に 10% (vol/vol) の FCS (Gibco) と 1% (vol/vol) のペニシリン/ストレプトマイシンを加えた培地で前培養を行った。

なお本研究では、細胞の培養及び実験操作後のインキュベーターについて、特に断りのない限りは 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で行った。

2-4. siRNA による RNA 干渉実験

MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞における RNA 干渉実験では、reverse transfection 法を用いた siRNA のトランスフェクションを行った。継代時と同様にトリプシン溶液で細胞をディッシュから剥がし、抗生物質を含まない培地で懸濁した後に遠心して上清を取り除き、抗生物質を含まない培地を用いて再懸濁した。細胞懸濁液をディッシュに撒くとともに、Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) を用い、試薬のマニュアルに従って 35 mm ディッシュ 1 枚あたり 100 pmol の siRNA をトランスフェクションした。

なお、siRNA をトランスフェクションしたサンプルについては、培養時、実験時ともに抗生物質を含まない培地を使用した。

2-5. インスリン分泌量測定

MIN6 細胞における非灌流系でのインスリン分泌測定においては菅原らの先行研究 (Sugawara *et al.*, 2014) を参考にし、基本的には培地を用いた 24 時間の前培養、低グルコース溶液 (3G-KRBB) を用いた 1 時間の低グルコース処理 (前処理)、高グルコース溶液 (25G-KRBB) を用いた 30 分間の高グルコース刺激 (インスリン分泌誘導) を一連の流れとして、37°C の 5% CO₂ 条件下で実験を行った (図 C (i))。なお、加えた溶液は全て 37°C に温めた後に使用した。また、前培養を始める前には必ず培地の交換を行った。各操作の間にはグルコースを含まない KREBS 溶液 (KRBB) で 2 回ディッシュを洗浄し、溶液を持ち越さないようにした。

30 分間のインスリン分泌誘導の後、上清を回収し、4°C、20,400 × *g* で 1 分間遠心を行って細胞残滓を沈殿させ、Human Insulin Immunoassay kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて、AlphaLISA 法によりプロトコル通りに上清中のインスリン量を測定した。測定には PerkinElmer の EnSpire Alpha を使用した。測定したインスリン量は、2-6.の方法に従って測定したタンパク質量に基づいて補正を行った。

なお、siRNA をトランスフェクションした細胞の前培養においては、トランスフェクション後 24 時間が経過した時点で、ディッシュから培地を一部取って試薬等を指定の最終濃度となるよう添加し、ディッシュに戻して 24 時間の前培養を行った。

MIN6 細胞及びマウス膵島を用いた灌流系のインスリン分泌測定においてはまず、非灌流系と同様に 24 時間の前培養を行い、低グルコース処理を 30 分間行った。その後、Vacu-Cell Incubation Chamber (C&L Instrumental, Hershey, PA, USA) を細胞培養ディッシュに取り

り付け、ポンプを用いて 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ (MIN6 細胞) または 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ (マウス睪島) の流速で低グルコース溶液を流して 30 分間灌流培養を行った。その後、流す溶液を高グルコース溶液 (12G-KRBB) に変え、同様の条件で更に 30 分間灌流培養を行った (図 C (ii))。灌流培養中も細胞を 37°C の CO_2 インキュベーター内に置くとともに、流す溶液も 37°C に温めてから使用した。高グルコース溶液に変えた直後の溶液が流路から出てくる時間を「高グルコース刺激後 0 分」とし、その前の 10 分間 (低グルコース処理時) とその後の 30 分間 (高グルコース刺激後 0-30 分) について、1 分ごとに溶液を分取した。各経過時間における溶液中のインスリン分泌量は非灌流系と同様に測定し、測定値をインスリン分泌量とした。

2-6. BCA 法によるタンパク質量測定

実験に用いた細胞の総タンパク質量の確認においてはまず、細胞を氷冷 PBS で洗浄した後に RIPA buffer を加えて細胞を溶解させ、溶液を回収した。回収した溶液について、BCA Protein Assay Reagent kit (Thermo Fisher Scientific) をプロトコル通りに使い、562 nm における吸光度を Benchmark Plus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) によって測定した後にタンパク質濃度を計算した。

2-7. 細胞内の総インスリン量測定

MIN6 細胞内の総インスリン量を計測においては、細胞を氷冷 PBS で洗浄後、Complete Protease Inhibitor Cocktail を含む 0.1% Triton X-100 溶液を細胞に加え、4°C に 10 分間お

いた。その後細胞溶液を回収し、1 mL シリンジ（テルモ、東京都）を使い 27 ゲージの注射針（テルモ）を 15 回通した後、4°C で更に 30 分間おいた。その後、4°C、 $20,400 \times g$ で 1 分間遠心を行って細胞残滓を沈殿させ、2-5.と同様に溶液中のインスリン量を測定した。測定した値は、2-6.の方法で計測したタンパク質量を用いて補正を行った。

2-8. ウェスタンブロッティング法によるタンパク質発現量測定

細胞内のタンパク質発現量の確認においては、以下のようにウェスタンブロッティング法を行った。まず、細胞を氷冷 PBS で洗浄した後、RIPA buffer または 2x Laemmli Sample buffer を加えて細胞溶出液（ライセート）を得た。細胞溶出液は 27 ゲージの注射針を 10 回通して粘性を減らし、100°C のヒートブロックに 5 分おいた後に冷却したものをウェスタンブロッティング用のサンプルとした。なお、RIPA buffer を用いてサンプルを調製した際には、更に等量の 2x Laemmli Sample buffer を加えることでウェスタンブロッティング用のサンプルとした。各サンプルは、2-6.の方法に沿ってタンパク質量を測定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) では、各泳動サンプルのタンパク質量、溶液量が一致するように希釈した後、Dual Color Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad) と共に 5–20% の濃度勾配付きアクリルアミドゲル (SuperSep Ace、和光純薬工業) にサンプルをアプライし、室温、定電流の条件下で、SDS-PAGE running buffer を用いて泳動を行った。ゲルを Semi-dry blotting buffer で洗浄した後、室温、定電圧の条件下で polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) にタンパク質を転写した。

TBS を用いてメンブレンを洗浄した後、室温で、5% のスキムミルク（雪印メグミルク、東京都）または 3% のウシ血清アルブミン (BSA、Equitech-Bio, Kerrville, TX, USA) を含む

溶液（どちらも wt/vol in TBST）を用いてブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体を含むブロッキング溶液または Can Get Signal 溶液（東洋紡、大阪府）にメンブレンを浸し、4°Cで終夜おいた。メンブレンを TBST で洗浄後、HRP 結合型二次抗体を含むブロッキング溶液または Can Get Signal 溶液にメンブレンを浸し、室温においた。

再度メンブレンを洗浄後、PerkinElmer の Western Lightning Plus-ECL 溶液を加え、ImageQuant LAS 4000 mini system（GE Healthcare, Little Chalfont, UK）または Amersham Imager 600 (GE Healthcare) を用いてシグナル強度の測定を行った。その上で、Multi Gauge（富士フイルム、東京都）または Amersham Imager 600 の定量ソフトを用いて目的バンドのシグナル強度を計量した後、内部標準となるタンパク質のバンドのシグナル強度との比に基づいてタンパク質量を算出した。

2-9. 細胞内のカルシウムイオン濃度測定

カルシウムイオン濃度測定においては、glass-based dish（IWAKI、AGC テクノグラス、静岡県）に播種した MIN6 細胞を用いた。2-5.と同様に 24 時間の前培養を行った後、KRBB で洗浄を行い、2 μ M の Fluo 4-AM（Dojindo、同仁化学研究所、熊本県）を添加した低グルコース溶液を加え 30 分間培養を行った。その後、KRBB を用いて細胞を洗浄し、新たに低グルコース溶液を加えて更に 30 分間培養した。続いてディッシュを共焦点レーザー顕微鏡（LSM710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）のステージ上に乗せ、特定細胞の画像を 10 秒毎に取得した。撮影開始から 5 分後、撮影を続けながら低グルコース溶液を静かに除いて高グルコース溶液を加えた。10 秒毎の撮影を合計 100 回繰り返して画像の取得を行った後、取得した画像において細胞領域の蛍光強度を算出し、その変化を各細胞におけるカルシウム

イオン濃度の変化とした。L-システインを加えたサンプルについては、前培養時、低グルコース処理時 (Fluo 4-AM 添加時を含む)、高グルコース処理時のいずれにおいても L-システインを 2 mM 加えた溶液を用いた。なお、Fluo 4-AM は 488 nm の波長のレーザーで励起を行い、516 nm における蛍光強度を測定した。

2-10. ATP 量測定

MIN6 細胞の培地を捨てた後、KRBB または PBS で細胞を洗浄し、Passive Lysis Buffer (Promega) を加えて細胞を溶出させた。なお、グルコース刺激後の経時的な ATP 量測定にあたっては、2-5.と同様の前培養と低グルコース処理を行った後、高グルコース溶液を加える直前 (0 分後)、加えてから 5 分後と 30 分後の MIN6 細胞についてサンプルを調製した。細胞溶出液を液体窒素で凍結させてから 35°C で解凍する手順を二度行った後、溶出液を 4°C、 $20,400 \times g$ で 1 分間遠心し、上清中の ATP 量について、ATP Determination Kit (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) をプロトコル通りに用いて定量した。Benchmark Plus で 560 nm における吸光度を定量した後、2-6.の方法で計測したタンパク質量を用いて補正を行った。

2-11. 酸素消費量測定

2-5.と同様の前培養、低グルコース処理を行った MIN6 細胞について、KRBB で細胞を洗浄した後に 0.125% のトリプシン溶液を加えて静置し、培地を加えて懸濁してから細胞溶液を

回収した。溶液を 4°C、400 × *g* で 1 分遠心した後、上清を除き、低グルコース溶液を加えて細胞を再懸濁した。この再懸濁後の細胞溶液を Clark 型電極 (Oxygraph; Hansatech Instruments, Norfolk, UK) の測定槽に移した後、MIN6 細胞の酸素消費量の計測を開始した。2-3 分ほどで酸素濃度が安定し始めてからの酸素消費量を低グルコース条件下での酸素消費量 [Ox 3G] として、5 分間測定した。その後、細胞溶液中の最終グルコース濃度が 25 mM になるよう調製した高濃度のグルコースを含む KRBB をチャンバーに加え、高グルコース刺激後の酸素消費量 [Ox 25G] として 10 分間測定を行った。また、細胞を含まない KRBB 中の酸素量についても測定を行い、[Ox bg] とした。測定後、細胞溶液を回収して 4°C、400 × *g* で 5 分遠心し、上清を除いた後に RIPA bufer で溶解し、2-6.と同様の方法でタンパク質量を計測した。

低グルコース条件下と比べた際の高グルコース条件下における酸素消費量を求めるため、タンパク質量による補正を行った上で、以下の計算式によって酸素消費量 (高グルコース/低グルコース) を計算した。

$$\{ [(Ox\ 25G) - (Ox\ bg)] / 10 \} / \{ [(Ox\ 3G) - (Ox\ bg)] / 5 \}$$

なお、L-システインを添加する条件においては、前培養、前処理、及び細胞懸濁時の培地、酸素消費量測定時の低グルコース溶液、高グルコース溶液において 2 mM の L-システインを添加して実験を行った。また、[Ox bg] の測定時においても、2 mM の L-システインを含む KRBB を用いて測定を行った。

2-12. メタボローム解析

MIN6 細胞の培地を、L-システインを含まない (0 mM) もの、1 または 2 mM 含むものに

交換して 24 時間培養した後、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ（山形県）のプロトコル通りにサンプルを調製した。調製したサンプルをヒューマン・メタボローム・テクノロジーズに送付し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析法（capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry, CE-TOFMS）によって細胞内代謝産物の網羅的解析（メタボローム解析）を行った。

2-13. 細胞内硫化水素量測定

細胞内の硫化水素量の測定には、methylene blue colorimetric 法を用いた。0、1、2 mM の L-システインを培地に添加して 24 時間の培養を行った MIN6 細胞を氷冷 PBS で洗浄し、370 μL の 10 mM NaOH を加えて細胞を溶解させ細胞溶液を回収した。溶液は 18 ゲージの注射針（テルモ）を 15 回通した後、30 μL の 50% (wt/vol) トリクロロ酢酸を加えて 20,400 $\times g$ で 30 分遠心し、そこから 150 μL の上清を回収した。上清に 25 μL の 30 mM FeCl_3 溶液 (in 1.2 M HCl) と 25 μL の 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate 溶液 (in 7.2 M HCl) を加えた後、混和した溶液を 96 well プレートに移して 20 分間おいた。その後、670 nm における吸光度を Benchmark Plus によって測定し、各サンプルの硫化水素量を計算した。

2-14. 生細胞中のピルビン酸キナーゼ活性測定

Pyruvate Kinase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Milpitas, CA,

USA) のプロトコルに従ってサンプルを調製した後、570 nm における吸光度を Benchmark Plus で測定し、生細胞中のピルビン酸キナーゼ活性を測定した。なお、細胞溶液中のタンパク質量を予め 2-6.と同様の方法で測定し、各サンプルにおける総タンパク質量が揃うよう希釈を行った。

2-15. 抗体特異性の確認

購入した抗 PKM1 抗体、抗 PKM2 抗体、抗 PKLR 抗体について、それぞれの標的タンパク質のリコンビナントタンパク質を用いて、抗原の認識が特異的かどうかを確認した。リコンビナントタンパク質はそれぞれ、Sigma-Aldrich のヒト PKM1、Abcam のマウス PKM2、Abnova (Taipei, Taiwan) のヒト PKLR を用いた。各リコンビナントタンパク質 100 ng を 20 μ L のサンプルバッファー (2.5 mM Tris-HCl バッファー (pH 6.8)、5% (wt/vol) スクロース、5% (vol/vol) β -メルカプトエタノール、2% (wt/vol) SDS、0.005% (vol/vol) ブロモフェノールブルー) に溶解し、100°Cに 5 分間おいてウェスタンブロッティング用のサンプルを作製した。このサンプルを用いて 2-8.と同様の方法によりウェスタンブロッティングを行い、各タンパク質を標的とした抗体の特異性を確認した。

2-16. 免疫除去

抗 PKM1 抗体と抗 PKM2 抗体を用いて、MIN6 細胞のライセートから M 型ピルビン酸キナーゼタンパク質を除く免疫除去を行った。MIN6 細胞の培地を除き、PBS で洗浄した後、

氷冷 RIPA バッファー (25 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.6)、150 mM NaCl、1% (vol/vol) Triton X-100、1% (wt/vol) sodium deoxycholate、0.1% (wt/vol) SDS、Complete Protease Inhibitor Cocktail、PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail) を加えて 4°C で 10 分間おいた。細胞溶液を回収し、27 ゲージの注射針を 15 回通した後、4°C で 30 分間静置した。その後 4°C、16,000 × *g* で 30 分間遠心を行い、上清を回収し、2-6.と同様の方法で上清中のタンパク質量を測定した後、上清中のタンパク質量が 0.5 mg/ml になるよう RIPA バッファーで希釈した。10 µg の抗 PKM2 抗体、または抗 normal rabbit IgG 抗体を 100 µL の上清に加え、4°C で 2 時間回転混和した。その後 Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を加え、4°C で 1 時間回転混和した後、4°C、20,400 × *g* で 1 分間遠心を行い、上清を回収した。この上清に対し、10 µg の抗 PKM1 抗体、または抗 normal rabbit IgG 抗体を加え、上述と同様の作業を行い、PKM1 と PKM2 が除かれたライセート及びコントロールとして上清を得た。

2-17. 定量的 RT-PCR 法による細胞内 mRNA 量測定

MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞からの RNA 抽出は、PBS で細胞を洗浄した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) をプロトコル通りに用いて行った。RNase Free Water で total RNA を溶出した後、NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定した。その後、100 ng の RNA を取り、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡、福井県) を用い、プロトコルに従って相補的 DNA (cDNA) の合成を行った。合成した cDNA とプライマー、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) を用いて、プロトコルに従って定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を行った。測定装置には

StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。その際用いたプライマーの配列は以下の通り。なお、Pkm1 と Pkm2 の検出を目的としたプライマーの設計においては、石原らの先行研究 (Ishihara *et al.*, 2014) を参照した。また、18S ribosomal RNA (Rn18S) を内部標準として用いた。プライマーは、Sigma-Aldrich より購入した。

Pkm1 forward, 5'-GTCTGGAGAAACAGCCAAGG-3'

Pkm1 reverse, 5'-TCTTCAAACAGCAGACGGTG-3'

Pkm2 forward, 5'-GTCTGGAGAAACAGCCAAGG-3'

Pkm2 reverse, 5'-CGGAGTTCCTCGAATAGCTG-3'

Rn18S forward, 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'

Rn18S reverse, 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

2-18. *in vitro* 系でのピルビン酸キナーゼによるピルビン酸産生量測定

Pyruvate Kinase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit を用いて、リコンビナントタンパク質のピルビン酸産生能を検証した。リコンビナント PKM1、PKM2 は 2-15. と同様のものを用いた。

PKM1 については、1 ng の PKM1 と 0、1、10 μ M の濃度の L-システインを含む反応溶液を作製し、キットの使用法に従って反応を進めた。反応開始から 0、5、10、15、30、60、90 分後の吸光度 (570 nm) を測定し、測定された吸光度から、PKM1 によって生成されたピルビン酸量を計算した。

PKM2 については、10 ng の PKM2 と 0、1、10、100、1,000 μ M の濃度の L-システイン

を含む反応溶液を作製し、PKM1と同様に実験を行い、測定された吸光度から、PKM2によって生成されたピルビン酸量を定量した。

また、DASA-10を用いた実験においては、10 ngのPKM2と1 mMのL-システイン、及び0、0.1、1、10、100 μ MのDASA-10を含む反応溶液を作製し、上述と同様にPKM2によって生成されたピルビン酸量を定量した。

2-19. L-システインのPKM2に対する半数阻害濃度 (IC_{50}) 測定と、PKM2の最大反応速度 (V_{max})、ミカエリス定数 (K_m) の計算

リコンビナントPKM2タンパク質を用いて、L-システインのPKM2に対する半数阻害濃度 (IC_{50}) を測定した。10 ngのPKM2と0、1、10、50、100、1,000、10,000 μ MのL-システインを含む反応溶液を作製した後、20分間インキュベートし、2-18.と同様にピルビン酸キナーゼ活性を測定した。測定値をもとに、GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて IC_{50} の計算を行った。

その後、Chanetonらの方法 (Chaneton *et al.*, 2012) をもとにして、L-システイン存在下、非存在下におけるPKM2の反応の最大速度 (V_{max}) と、ミカエリス定数 (K_m) を求めることとした。ピルビン酸キナーゼは「ホスホエノールピルビン酸 + ADP \rightarrow ピルビン酸 + ATP」の反応に関与するため、PKM2のピルビン酸キナーゼ活性はATPの産生量から求めることができる。

そこで、リコンビナントPKM2を、0、0.25、1、5、10 mMのホスホエノールピルビン酸とともに反応液 (50 mM Tris、100 mM KCl、10 mM $MgCl_2$ 、200 mM ADP、3% (vol/vol) DMSO) に加え、0 または 59 μ MのL-システインとともに20分間おいた後、ATP

Determination Kit をプロトコル通りに用いて、産生された ATP 量を定量した。なおこの時、コントロールとして PKM2 を含まない反応液における ATP 産生量も測定し、値の補正を行った。得られた値から、ミカエリス-メンテンプロット、及びラインウィーバー-バークプロットを描画し、 V_{\max} と K_m の値を計算した。

2-20. Native SDS-PAGE 法を用いたウェスタンブロッティング

PKM2 の四量体検出のため、Nowakowski らの Native SDS-PAGE 法 (Nowakowski *et al.*, 2014) をもとにしたウェスタンブロッティングを行った。電気泳動時に用いるバッファの SDS 濃度を半分 (0.05% (wt/vol)) にした点、4°C で泳動を行った点、及び、タンパク質の転写を 4°C の条件下でウェットタイプの転写槽を用いて行った点を除き、2-8. のウェスタンブロッティングの方法と同様に実験を行った。

2-21. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出

MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞において、*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics) を用いて terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によってアポトーシス細胞を検出した。細胞はカバーガラス (松浪硝子工業、大阪府) の上に播種したものを用い、細胞の固定や膜透過、FITC 標識 dUTP による染色をキットの指示に従って行った後、PBS で希釈した Hoechst 33342 (Dojindo) を加え、遮光して室温で 10 分おいて DNA の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl

Zeiss、または Nikon A1（ニコン、東京都）を用いてサンプルを観察した。

Hoechst 33342 によって染色された核をもつ細胞について、それぞれ FITC の蛍光が見られるかどうかを判別し、蛍光が見られたサンプルを「アポトーシス細胞」として数えた。

Hoechst 33342 で判別できる細胞 500 個を数え、そのうちの FITC で染色された細胞の割合をアポトーシス細胞の割合として表した。

2-22. Annexin V 法を用いたアポトーシス細胞の検出

MIN6 細胞において、ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Clontech、タカラバイオ、滋賀県) を用いて、fluorescence-activated cell sorting (FACS) によるアポトーシス細胞の検出を行った。MIN6 細胞を PBS で洗浄した後、トリプシン溶液を加え、細胞溶液を回収した。4°C、 $2,000 \times g$ で 2 分間遠心した後、上清を除き、PBS を加えて再度洗浄を行った。細胞濃度を計測した後に 4°C、 $2,000 \times g$ で再度 2 分間遠心して上清を除き、全てのサンプルが同一の細胞濃度となるよう量を調節しつつ、キットに付属のバッファーで細胞を懸濁した。その後はキットの指示に従って Annexin V-FITC と propidium iodide (PI) を細胞溶液に加え、サンプルを調製した後、Guava easyCyte Flow Cytometers (Millipore) を用いて Annexin V-FITC の蛍光と PI の蛍光を測定した。どの実験においても、デブリと思われる集団を除いた適切な大きさの細胞集団をゲーティングし、ゲート内の 10,000 細胞について蛍光情報を取得した。その上で、Annexin V-FITC と PI を含まないサンプル (コントロール) から自家蛍光の範囲を確認し、Annexin V-FITC 及び PI に由来する蛍光強度の閾値を設定した。この閾値を超えたものをそれぞれ Annexin V⁺、PI⁺とし、細胞を 4 種の集団 (生細胞 (Annexin V⁻/PI⁻)、死細胞 (Annexin V⁻/PI⁺)、早期アポトーシス細胞 (Annexin V⁺/PI⁻)、終期アポトーシス細胞

胞 (Annexin V⁺/PI⁺) にわけ、そのうちの Annexin V⁺となった細胞をアポトーシス細胞として扱った。

2-23. 間接蛍光抗体法

カバーガラスの上に播種した MIN6 細胞を PBS で洗浄した後、3% (wt/vol) のパラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS を加えて室温で 30 分間静置して細胞を固定した。PBS で洗浄し、0.2% (vol/vol) の Triton X-100 を含む PBS を加え、室温で 20 分間静置して細胞膜の透過処理を行った。PBS で洗浄した後、3% (wt/vol) の BSA を含む PBS を加え、室温で 30 分間静置してブロッキング処理を行った。その後、一次抗体をブロッキング溶液で希釈したものを加えて室温で 2 時間おいた後、PBS で洗浄し、二次抗体と Hoechst 33342 をブロッキング溶液で希釈したものを加えて、遮光した状態で 1 時間室温においた。細胞を PBS で洗浄した後、スライドガラス (松浪硝子工業) の上に置き、パラフィンで封をし、観察用サンプルとした。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1) を用いて観察した。

2-24. コメットアッセイ

OxiSelect Comet Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いてコメットアッセイを行い、DNA へのダメージの有無を確かめた。MIN6 細胞を PBS で洗浄してトリプシン溶液を加え、細胞溶液を回収した後、細胞濃度を計測した上で適切な細胞数となるよう溶液の量を調節し、4°C、20,400 × *g* で 1 分間遠心した。上清を除き、付属のアガロースゲルで

細胞を懸濁した後、キットのプロトコルに従って実験を行った。サンプルを作製し終えた後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510) を用いて細胞の写真を取得した。各サンプルについて無作為に細胞 100 個の写真を撮った後、CASPLab software (casplab.com) (Końca *et al.*, 2003) を用いて画像の解析を行い、tail DNA %を計算した。なお、ネガティブコントロールには培地の交換のみを行い 24 時間培養した MIN6 細胞を、実験のポジティブコントロールには 20 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシンを培地に加えて 24 時間培養した MIN6 細胞を用いた。

2-25. 共免疫沈降法

中津らの方法 (Nakatsu *et al.*, 2014) をもとに、4°Cの条件下で抗 A-Raf 抗体を用いた共免疫沈降を行った。MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞を氷冷 PBS で洗浄した後、氷冷 RIPA バッファー (20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% (vol/vol) Triton X-100、1 mM EDTA、1 mM EGTA、Complete Protease Inhibitor Cocktail、PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail) を加えて細胞溶液を回収した。細胞溶液は 27 ゲージの注射針を 15 回通した後、30 分間回転混和し、14,000 $\times g$ で 10 分間遠心した。上清を回収し、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を加えて 30 分間回転混和した後、20,400 $\times g$ で 5 秒間遠心した。上清を回収し、抗 A-Raf 抗体または抗 normal rabbit IgG 抗体を加えて 12 時間回転混和した後、更に Protein G Sepharose 4 Fast Flow を加えて 1 時間回転混和した。20,400 $\times g$ で 5 秒間遠心した後に沈殿物を回収し、RIPA バッファーで洗浄してから 2x Laemmli Sample buffer で再懸濁した。サンプルは 100°Cに 5 分間おいた後、2-8.と同様の方法で SDS-PAGE 及びタンパク質の転写を行った。その後、メンブレンを 10 mg/ml の acetylated BSA (ニッポンジーン、東京都) と 1% (vol/vol) の Blocking Reagent (ニッポンジーン) を含む TBST-Mg

(0.05% (vol/vol) の Tween-20 と 5 mM の MgCl_2 を含む TBS) でブロッキングした。メンブレンは同様のバッファーで希釈した一次抗体液に 1 時間浸した後、ImmunoAptamer, Rabbit IgG (ニッポンジーン) を加えた同様のバッファー中に 15 分間おき、Streptavidin-HRP Conjugate (GE Healthcare) を含む TBST-Mg で 30 分間おいた後に 2-8. と同様の方法でシグナルの検出を行った。

2-26. 免疫沈降法による A-Raf タンパク質複合体の回収

2-25. とほぼ同様の方法を用いて、4°C の条件下で A-Raf タンパク質複合体を得た。MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞を氷冷 PBS で洗浄した後、氷冷 RIPA バッファー (20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0)、0.25% (vol/vol) NP-40、100 mM NaCl、1 mM EDTA、Complete Protease Inhibitor Cocktail、PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail) を加えて細胞溶液を回収した。細胞溶液は 27 ゲージの注射針を 15 回通した後、30 分間回転混和し、 $20,400 \times g$ で 10 分間遠心した。上清を回収し、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を加えて 30 分間回転混和した後、 $20,400 \times g$ で 1 分間遠心した。上清を回収し、抗 A-Raf 抗体を加えて 3 時間回転混和した後、更に Protein G Sepharose 4 Fast Flow を加えて 1 時間回転混和した。 $20,400 \times g$ で 1 分間遠心した後に沈殿物を回収し、RIPA バッファーで洗浄した後、A-Raf タンパク質複合体サンプルとして 2-27. の *in vitro* 系アッセイに用いた。

2-27. *in vitro* 系での A-Raf 複合体による GST-MEK1 リン酸化アッセイ

中津らの方法 (Nakatsu *et al.*, 2014) をもとに、A-Raf 複合体を用いて *in vitro* 系における GST-MEK1 リン酸化アッセイを行った。2-26. で得られた A-Raf 複合体をキナーゼリアクションバッファー (20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4)、20 mM NaCl、1 mM DTT、10 mM MnCl₂、10 mM MgCl₂、Complete Protease Inhibitor Cocktail、PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail) で洗浄した後、同様のバッファーで再懸濁した。その後、500 ng の recombinant human unactive GST-MEK1 (M02-14BG; SignalChem, Richmond, BC, Canada) と 20 μM の ATP を加え、30°C で 30 分間おいた。サンプルは 2x Laemmli Sample buffer で再懸濁し、100°C に 5 分間おいた後、2-8. と同様の方法によりウェスタンブロッティングを行った。なお、GST-MEK1 の検出においては、HRP-conjugated anti-mouse IgG light chain-specific antibody を用いた。

2-28. Phos-tag SDS-PAGE

Phos-tag SDS-PAGE を行い、タンパク質のリン酸化状態を詳しく確かめた。サンプルの調製等は 2-8. と同様の方法で行い、SDS-PAGE の際にはアクリルアミド 12.5% の Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE ゲル (和光純薬工業) を用いた。SDS-PAGE を終えた後、ゲルを 10 mM の EDTA を含む Semi-dry blotting buffer で 3 回洗浄し、EDTA を含まない Semi-dry blotting buffer で 1 回洗浄してから、2-8. と同様に PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。その後も 2-8. と同様の方法で実験を進め、非リン酸化抗体を用いてタンパク質の検出を行った。なおこの時、Phos-tag 用ゲルの SDS-PAGE と同時に通常のゲルを用いた SDS-PAGE も行い、通常のウェスタンブロッティング法による検出をすることで、タンパク質の泳動状況や検出量に異常が見られないかどうかを確認した ('conventional')。

2-29. 統計解析

図 1、3-6、8、11、14、16-18、21B-D、26、27、45B、46、61B、61C、68B、68C、71B、71C においては、Dunnet の検定法を用いてデータ群間の有意性を検証した。

図 9、30、51、52、53B、53C、58B、58C、59B、59C、64B、64C、65B、65C、66B、66C、67B、67C、69B、69C、70B、70C においては、Fisher の F 検定法を用いてデータ群間の等分散性の確認を行い、Student の t 検定法または Welch の t 検定法でデータ群間の有意性を検証した。

図 12、13、28 においては、Bartlett の検定法を用いてデータ群間の分散の均一性の確認を行い、Tukey-Kramer または Steel-Dwass の検定法でデータ群間の有意性を検証した。

図 25B、29、36、37 においては、Bonferroni 補正を行い、Fisher の F 検定法を用いてデータ群間の等分散性の確認を行い、Student の t 検定法でデータ群間の有意性を検証した。

結果を示したそれぞれのグラフにおいて、データは平均値±標準誤差の形で表し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ を基準として統計的に有意な差を示した。

第 3 章 結果

3-1. L-システインは MIN6 細胞の二相性インスリン分泌を抑制する

本研究においては、L-システインが膵β細胞に及ぼす影響をより生体内の環境に近い状態で確かめるため、まず細胞レベルにおける至適な L-システイン添加濃度の検討を行った。

金子らの先行研究 (Kaneko *et al.*, 2006) においては、MIN6 細胞に対する 1 時間の L-システイン曝露について、約 3 mM の L-システイン濃度でインスリン分泌量がほぼ半減し、10 mM の濃度でインスリン分泌量が 90%以上減少するという結果が報告されている。また同研究では、マウス膵島に対して 1 時間の L-システイン曝露を行った際、1 mM の濃度でインスリン分泌量がほぼ半減し、10 mM の濃度においては MIN6 細胞と同様に 90%近くインスリン分泌量が減少することも示されている。

生体内における L-システインの存在量としては、血中濃度を計測した先行研究が複数存在する。例えば Cintra らの報告 (Cintra *et al.*, 2014) において、L-システインの血中濃度は健常者で 440 μM ほど、深刻な閉塞性睡眠時無呼吸症候群の患者において 500 μM を超えるとされている。また、Herrmann らの報告 (Herrmann *et al.*, 2005) では、腎臓透析を行っている患者について、糸球体濾過率 (GFR) の低下に応じて血中 L-システイン濃度に変動があるとされており、軽度のステージ 2 で 335 μM、より重度のステージ 5 で 448 μM という中間値の報告がなされている。このように、血中 L-システイン濃度は先行研究によって多少値に幅があるものの、300-500 μM の範囲に収まることが予想される。この濃度を培養細胞、特に膵β細胞における実験に適用する際、ヒトとマウスの血糖値の差やインスリン分泌刺激時のグルコース濃度を参考にして、更なる濃度の検討を行った。

マウスの血糖値については、空腹時の血糖値が 11 mM を超えると糖尿病と判断されることが多いと報告されているが (八木橋 他, 2010)、インスリン分泌刺激に用いられるグルコース濃度はマウスの膵島で 10 mM 程度、マウス培養膵β細胞では 20 mM 程度である (Kaneko

et al., 2006)。それに対してヒトの血糖値は、健常者の空腹時で概ね 100 mg/dL 以下であることが知られている（清野 他, 2010）が、これはおおよそ 5.6 mM に相当する。このことから、単純な比較が正確であるとは言えないものの、マウス培養細胞においては、マウス膵島の 2 倍、ヒト血中の 3-4 倍程度の濃度のグルコース、あるいは L-システインを与えることで、生体内の環境に近い状態を作り出せるのではないかと考えられる。すなわち、培養細胞において L-システインを 1-2 mM 程度で添加すれば、血中で L-システイン濃度が上昇した状態を模倣できると考えられる。そこでまずは、1 mM、及び 2 mM での L-システインの効果を確かめることとした。

本研究の培養細胞におけるインスリン分泌実験系では、菅原らの先行研究（Sugawara *et al.*, 2014）と同様に、培地を用いた前培養の後、細胞を低グルコース溶液（3 mM グルコース、3G-KRBB）におく前処理を 1 時間行い、その後に高グルコース溶液（25 mM グルコース、25G-KRBB）で 30 分間のインスリン分泌誘導を行うこととした（図 C (i)）。そこでまず、前培養の 24 時間と、前処理の 1 時間、インスリン分泌誘導の 30 分間のあいだ、用いる溶液に 1 mM 及び 2 mM の L-システインを加えることでインスリン分泌に変化があるかを確認した。その結果、1 mM、2 mM の L-システイン添加によってグルコース刺激誘導性のインスリン分泌（GSIS）が抑制され、L-システイン非添加のサンプルと比べて 25%程度までインスリン分泌量が低下することがわかった（図 1）。一方で、高グルコース溶液によるインスリン分泌誘導時の 30 分間のみ L-システインを添加したサンプルにおいてはインスリン分泌抑制が見られなかった（図 1、‘transient’）ことから、低濃度の L-システインを長時間添加し続けることで細胞内において何らかの変化が生じていることが示唆された。

続いて、L-システインによる GSIS 抑制がどのようなメカニズムなのかを探る手がかりを得るべく、細胞レベルでの灌流系培養システムを構築し、経時的なインスリン分泌量の測定を試みた（図 C (ii)）。第一章（1-3.）で述べたように、インスリン分泌においては二相性が

存在し、第一相と第二相の制御メカニズムは一部が異なる。それゆえ、L-システインが二相性のインスリン分泌にどのように影響を与えているのかを確かめることが、L-システインの作用機序を知る有用な手段となると期待された。

始めに、L-システインを添加しない細胞において経時的なインスリン分泌量を計測したところ、高グルコース刺激によって速やかに分泌が起こる第一相と、その後しばらくして分泌が始まる第二相の、二相性のインスリン分泌が確認できた (図 2A)。このことから、当実験系において細胞レベルでの二相性インスリン分泌を再現することができたと考えられる。そこで、1 または 2 mM の L-システインを添加した際にインスリン分泌がどのように変化するかを確認したところ、驚くべきことに、1 mM と 2 mM とともに第一相と第二相双方のインスリン分泌が殆ど抑制されていることが明らかになった (図 2B、2C)。

この結果を受けてまず、L-システインがインスリンのタンパク質量そのものを減少させている可能性について検証を行った。L-システインを 24 時間添加した後、MIN6 細胞内におけるインスリンの総量を確認したところ、L-システイン非添加 (0 mM)、添加 (1 mM、2 mM) のサンプルにおいて有意な差は認められなかった (図 3)。また、インスリンとプロインスリンを認識する抗体を用い、ウェスタンブロッティング法によるタンパク質量の確認も行ったが、こちらも L-システイン添加による有意な差は認められなかった (図 4) ため、L-システインは細胞内のインスリン量に影響を与えているのではないと判断した。

続いて、インスリン分泌量が減少するメカニズムとして、インスリンを細胞外へ分泌する機構がうまく作用していない可能性が考えられた。すなわち、L-システインがインスリン分泌顆粒の輸送や膜融合等を阻害するためにインスリンが分泌されない、という可能性である。この可能性について検証するため、前培養時から長時間の L-システイン添加を行った細胞に対し、高グルコース刺激の代わりに細胞膜の脱分極を引き起こす高濃度のカリウムイオン (K^+) を含む溶液を用いた刺激を加えてインスリン分泌誘導を行った。その結果、L-システイン存

在下であってもカリウムイオン依存的なインスリン分泌が生じることがわかった (図 5)。このことを更に確認するため、カルシウムチャネル阻害剤であるマイトトキシシンを用いた実験を行った。マイトトキシシンは有毒渦鞭毛藻由来の毒素であり、カルシウムチャネルを開口させる働きをもつ (Meucci *et al.*, 1992; Soergel *et al.*, 1990; Soergel *et al.*, 1992) ため、高濃度のカリウムイオンと同様の効果が得られることが期待された。実際、高グルコース溶液の代わりとして 10 ng/ml のマイトトキシシンを含む低グルコース溶液を用いてインスリン分泌誘導を行ったところ、L-システインの有無によらずインスリン分泌量の増加が確認できた (図 6)。すなわち、インスリン分泌顆粒を細胞外に分泌する過程に対しては L-システインの影響がないことが示唆された。

そこで、高グルコース刺激後の細胞内へのカルシウムイオン (Ca^{2+}) の流入量について確認するため、細胞内のカルシウムイオンを可視化することができる Fluo 4-AM を用いて MIN6 細胞内のカルシウムイオン濃度変化を確かめた。その結果、L-システイン非添加の細胞においては高グルコース刺激後速やかにカルシウムイオン濃度が上昇しているのに対し、2 mM の L-システインを添加した細胞では、カルシウムイオン濃度の上昇が見られないことがわかった (図 7)。つまり、L-システインがカルシウムイオンの流入を抑制していることが明らかになった。

これらの結果を踏まえて、L-システインがカルシウムイオン流入を抑制するメカニズムとして、MIN6細胞において ATP 産生量を減少させている可能性について検証することとした。第一章 (1-3.) で述べた通り、膵 β 細胞のインスリン分泌においては、グルコースが代謝された結果として生じる ATP 量の増加が K_{ATP} チャネルの閉口、そして VDCCs の開口において重要な因子となることが知られている。実際、ラット膵島を用いた先行研究においては、高グルコース刺激後 5 分で ATP 濃度が一過的に 1.2 倍まで上昇し、その後 30 分で元の濃度に戻ることが示されている (Fransson *et al.*, 2006)。そこで、高グルコース刺激後に生じる

一時的な ATP 産生量の上昇が L-システインによって攪乱されているかどうかを確かめた。その結果、L-システイン非添加の細胞においては高グルコース刺激から 5 分後に細胞内の ATP 量が 2 倍程度となり、30 分後でも 1.7 倍程度は存在するのに対し、L-システインを長時間添加することにより、高グルコース刺激から 5 分後、及び 30 分後であっても ATP 量の増加が見られないことが明らかになった (図 8)。なお、図には示していないが、グルコース非刺激時の ATP 濃度 (0 分) は L-システイン添加の有無によらず殆ど変化がなかった。このことから、L-システインによる GSIS 抑制は、この一時的な ATP 産生量の増加が抑制されているために生じたものであると考えられた。また、好氣的条件下での ATP 産生には酸素が用いられることから、高グルコース刺激時の細胞内における酸素消費量の測定も試みたところ、L-システイン添加時には、非添加時と比べて高グルコース刺激時の酸素消費量が 50%程度となっていることが明らかになった (図 9)。これらの結果から、L-システインがグルコースの取り込みから ATP を産生するまでの経路において何かしらの影響を与えている可能性が強く示唆された。

3-2. L-システインは MIN6 細胞内のピルビン酸キナーゼ活性を可逆的に抑制する

膵β細胞からのインスリン分泌に細胞内の代謝が大きく関与していることは既に述べたが、それゆえ、L-システインによるインスリン分泌抑制においても、特に ATP 産生経路における代謝産物の量的変化が関与していることが考えられた。この仮説を検証するため、1 mM または 2 mM の L-システインを 24 時間添加した細胞と非添加の細胞とについて、細胞内代謝産物の網羅的解析 (メタボローム解析) を行い、どのような変化が見られるのかを確認することとした。

図 10 は、ATP 産生経路における主要な代謝産物のメタボローム解析結果であるが、L-システインを添加した細胞における大きな変化として、解糖系の最終産物であるピルビン酸量が著しく減少（1 mM の L-システイン添加で 46%、2 mM では 24%まで減少）していることが明らかになった。その影響と考えられるが、ピルビン酸の下流となる TCA 回路の代謝産物についても 30%前後の減少が見られた。また、インスリン分泌の第一相の正の制御因子となる NAD⁺や NADH (Jitrapakdee *et al.*, 2010)、第二相の正の制御因子となるマロニル CoA (Straub & Sharp, 2002) についても減少が見られた。しかし一方で、解糖系でピルビン酸の上流であるホスホエノールピルビン酸 (PEP) を含め、グルコースからピルビン酸に至るまでの解糖系の代謝産物については殆ど変化が見られなかった。また、最終的な産物である ATP 量についても、L-システイン添加の影響をあまり受けていないようであった。ピルビン酸が減少している一方で ATP 量に変化していないというのは少し意外な結果であったが、ピルビン酸の産生が完全に止まったわけではなく、一定量の代謝が行われていた結果だと考えられる。実際この結果は、前項の ATP 量測定実験 (図 8) におけるグルコース刺激前 (0 分) の ATP 量の解釈と矛盾しない。なお、L-システイン添加によって細胞内の L-システイン量が大きく増加していた (非添加の細胞と比べ、1 mM 添加で 4.8 倍、2 mM 添加で 7.6 倍) ため、細胞内で硫化水素 (H₂S) が産生されている可能性が考えられたものの、本実験系においては細胞内硫化水素量の増加は確認されなかった (図 11)。これらのことから、ピルビン酸の産生量減少は定常的な ATP 産生には影響を与えないものの、インスリン分泌のために必要となるグルコース刺激後の速やかな ATP 産生に対しては供給が追い付かず、結果的にインスリン分泌が抑制されているという可能性が考えられた。

この仮説を検証するため、細胞膜透過性で TCA 回路の基質となって ATP 産生につながる事が知られているピルビン酸メチル (methyl pyruvate) を細胞に添加してインスリン分泌量を確認することとした。その結果、非灌流系の実験において、L-システイン存在下であっ

でもピルビン酸メチルを添加することでインスリン分泌量が回復することが確認できた（図 12）。なおこの時、高濃度のグルコースに加えてピルビン酸メチルを添加したことで細胞に悪影響が出ている可能性が考えられたため、低グルコース溶液にピルビン酸メチルを添加する実験も行った。インスリン分泌刺激を行う際の溶液として、ピルビン酸メチルを 0 または 2 mM 含む低グルコース溶液及び高グルコース溶液を用いたところ、低グルコース溶液+ピルビン酸メチル、高グルコース溶液のみ、高グルコース溶液+ピルビン酸メチル、の三種のサンプルでは、いずれも同程度のインスリン分泌量となることが確認できた（図 13）。すなわち、ピルビン酸メチルによる刺激は、高グルコースによる刺激と同程度であるとともに、グルコース代謝経路の活性化に関与していることが考えられた。この結果をもとに、L-システインを添加した細胞に対して低グルコース溶液+ピルビン酸メチルの条件でインスリン分泌誘導を行ったところ、インスリン分泌の抑制は生じなかった（図 14）。このことから、L-システインがピルビン酸の産生抑制を通じてインスリン分泌を抑制していること、そしてピルビン酸メチルの添加によってピルビン酸よりも下流の代謝が活性化されてインスリン分泌が回復することが示唆された。

なお、Lembert らの先行研究において、マウスの膵島に対し 5 mM のピルビン酸メチルを添加することで、細胞の脱分極が促され、それがきっかけとなって ATP 産生非依存的にインスリン分泌が起こるという報告があった（Lembert *et al.*, 2001）ことから、今回の実験系においても、ピルビン酸メチルが細胞の脱分極を通してインスリン分泌を誘導している可能性が考えられた。そこで、この可能性を否定するため、L-システイン添加を行った細胞に対してピルビン酸メチルを添加し、灌流系において経時的なインスリン分泌量を計測することとした。高濃度のカリウムイオンなどを用いた細胞の脱分極に由来するインスリン分泌においては、二相性のインスリン分泌が起こらずに第一相の分泌のみが観察されることが知られている（Rorsman & Renström, 2003）ことから、二相性のインスリン分泌を確認することが

できれば、ピルビン酸メチルが代謝経路の活性化を行っていることを示せると言える。その結果、図 15 に示すように、L-システインとともにピルビン酸メチルを添加することで、L-システイン非添加の細胞（‘control’）と同様の二相性のインスリン分泌を確認することができた（図 15C）。また、その際のインスリン分泌量は L-システイン非添加のサンプルと同程度まで回復することも確かめられた。これらの結果は、本実験系においてピルビン酸メチルが TCA 回路の基質となって ATP 産生に寄与したこと、及び、L-システインが TCA 回路に流入する基質を減少させたことでインスリン分泌が抑制されていることを示唆している。この結果を、L-システイン添加時に PEP の量が殆ど変わらないのに対してピルビン酸の量が大きく減少していたメタボローム解析結果（図 10）と合わせて考えると、L-システインがピルビン酸の産生を抑制している可能性が非常に高いと推測された。解糖系におけるピルビン酸産生において主要な役割を果たすのは、PEP と ADP からピルビン酸と ATP を産生するピルビン酸キナーゼである（Mazurek, 2011）ことから、L-システインがピルビン酸キナーゼの働きに影響を与えている可能性について検証することとした。

そこでまず、細胞内のピルビン酸キナーゼ活性を計測することとした。その結果、前培養、前処理、グルコース刺激の間 L-システインを添加し続けた細胞においては、1 mM で 75%程度、2 mM では 50%程度までピルビン酸キナーゼ活性が有意に低下していることが確認できた（図 16）。またこの時、前培養時に 24 時間 L-システインを添加した後、前処理とグルコース刺激の間に L-システインを除くことでピルビン酸キナーゼの活性が回復することも確かめられた（図 16、‘remove’）ことから、L-システインによる阻害効果が可逆的なものである可能性が示唆された。そこで、高グルコース刺激後の一時的な ATP 産生量増加、及び GSIS についても、前処理時とグルコース刺激時に L-システインを除去することで回復が見られるかを確認した。結果としては、1 mM、2 mM のいずれの L-システイン前培養サンプルにおいても、短時間の L-システイン除去によって高グルコース刺激時の ATP 産生量、及びインスリン

分泌量が L-システイン非添加のサンプルと同等まで回復することが確かめられた (図 17、18、‘remove’)。また、灌流系を用いたインスリン分泌についても同様の検証を行ったところ、確かに二相性のインスリン分泌が回復していることが確認できた (図 19)。更に、L-システインによる可逆的なインスリン分泌の抑制が膵 β 細胞に普遍的なものであるかどうかを確認するため、マウスの膵島を用いて、MIN6 細胞と同様に灌流系におけるインスリン分泌量の測定を行った。その結果、マウス膵島においても二相性の GSIS が確認できたとともに、L-システイン添加によって二相性の GSIS が第一相、第二相ともに抑制されること、及び、短時間の L-システイン除去でその抑制が回復することも確認できた (図 20)。

これらの結果から、L-システインは膵 β 細胞においてピルビン酸キナーゼの活性を可逆的に抑制することで GSIS を抑制しているということが示唆された。

3-3. L-システインはインスリン分泌制御に関与する PKM2 を特異的に抑制する

L-システインがピルビン酸キナーゼ活性に与える影響としてまず考えられたのが、単純なタンパク質量の増減を介した制御であった。そこで、L-システイン添加、あるいは添加後に短時間 L-システインを除去することでピルビン酸キナーゼのタンパク質量が変化するかどうかを確かめることとした。第一章 (1-6.) で述べたように、ピルビン酸キナーゼには 4 種のアイソフォームが存在しているが、先行研究において、膵 β 細胞における主要なピルビン酸キナーゼのアイソフォームは M 型であることが報告されている (Martens *et al.*, 2010)。そこで本研究においては主に、そのスプライシングバリエーションである M1 型 (PKM1)、M2 型 (PKM2) に着目して実験を行うこととした。

始めに、PKM1 と PKM2 について、それぞれを特異的に認識する抗 PKM1 抗体と抗 PKM2 抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法により各タンパク質の存在量を確認した。また

この時、膵β細胞では殆ど発現していないと考えられる L 型、R 型のピルビン酸キナーゼについても、両方を認識する抗体、抗 PKLR 抗体を用いてタンパク質量の確認を行った。その結果、いずれのタンパク質においても、L-システイン添加によるタンパク質量の有意な変化は確認されなかった (図 21)。

ここで予想外だったのが、膵β細胞においても L 型及び R 型のピルビン酸キナーゼがある程度存在するらしいということであった。ウェスタンブロッティング法においてはサンプルの検出条件に差があるために、単純に PKM1 や PKM2 のタンパク質量との比較はできないが、一定量の PKL、PKR が存在することが示唆されたと言える。そこでこの可能性を検証するため、抗体の特異性を確認することとした。PKM1、PKM2、PKLR のリコンビナントタンパク質を用いて、抗 PKM1 抗体、抗 PKM2 抗体、抗 PKLR 抗体がそれぞれを特異的に認識するかどうかを確かめたところ、抗 PKM1 抗体と抗 PKM2 抗体がそれぞれ PKM1、PKM2 のみを特異的に認識したのに対し、抗 PKLR 抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、PKM1 や PKM2 も認識されることが明らかになった (図 22)。すなわち、抗 PKLR 抗体がピルビン酸キナーゼの全アイソフォームを認識している可能性が示唆された。なおこの時、入手が容易であったことから、PKM1 と PKLR のリコンビナントタンパク質については、ヒト遺伝子由来のものを用いた。ヒトとマウスの PKM1 はアミノ酸レベルで 97%以上の相同性となっている (図 23) ことから、実験結果への影響は僅かであると考えられた。続いて、免疫除去法を用いて M 型ピルビン酸キナーゼを除くことでウェスタンブロッティングの結果にどのような変化が見られるかを確認することとした。MIN6 細胞のライセートに抗 PKM1 抗体と抗 PKM2 抗体を加え、インキュベートした後に遠心して上清を得ることで、PKM1、PKM2 タンパク質を除いたライセートを得た (免疫除去)。このサンプルを用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、抗 PKM1 抗体や抗 PKM2 抗体を用いた際にバンドが検出されなかっただけでなく、抗 PKLR 抗体を用いた際にもバンドが検出されなかった

(図 24、‘M’)。これらの結果から、先述のウェスタンブロッティング (図 21) で検出された“PKLR”が主に PKM1 と PKM2 であったことが確認できたとともに、膵β細胞内に PKL、PKR が殆ど存在しないことが示唆された。

次に、PKM1 及び PKM2 について、siRNA を用いた RNA 干渉によってタンパク質の発現を抑制し、インスリン分泌にどのような影響が出るのかを確かめることとした。まず初めに、PKM1 及び PKM2 を標的とした siRNA がそれぞれのタンパク質に特異的に作用するかどうかをウェスタンブロッティング法により検証したところ、PKM1 標的 siRNA は PKM1 特異的に、PKM2 標的 siRNA は PKM2 特異的にタンパク質の発現を 50%以上抑制し、異なるアイソフォームに対しては有意な差を与えないことが確認できた (図 25)。更に、定量的 RT-PCR 法を用いて各 mRNA 量についても確認を行ったところ、各 siRNA は標的 mRNA 特異的に作用し、10%程度の量まで標的 mRNA 量を減少させることが確かめられた (図 26)。続いて、タンパク質発現抑制時の GSIS について確かめたところ、PKM1 の発現を抑制した細胞においては、インスリン分泌量に有意な差は認められなかった (図 27)。その一方で、PKM2 の発現抑制を行った細胞においては、インスリン分泌量が 50%程度まで有意に減少することがわかった (図 28)。そこで PKM2 発現抑制細胞について更に検証を重ねたところ、PKM2 の発現抑制と L-システイン添加の効果が同程度であること、及び、PKM2 発現抑制細胞に L-システインを添加してもインスリン分泌抑制効果はそれぞれの単独処理と同程度であることが明らかになった (図 28)。また、PKM2 の発現を抑制した状態であっても、ピルビン酸メチルを添加することによってインスリン分泌抑制が回復することも確かめられた (図 29)。更には、PKM2 の発現を抑制することで、高グルコース刺激後の一時的な ATP 産生量増加が抑制されることも明らかになった (図 30)。これらの結果は、総じて L-システイン添加時の結果とよく似た傾向であった。L-システインは PKM2 のタンパク質量に影響を与えないという結果 (図 21C) を考慮すると、L-システインによる ATP 産生抑制やインスリン分泌抑制は、

PKM2 の活性制御を介している可能性が考えられた。

そこで、この L-システインの阻害効果が PKM2 に特異的なものであるのか、また、タンパク質に対して直接的なものなのか間接的なものなのかを確かめるため、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* での実験系において L-システインが PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性を抑制するかどうかの検証を行った。その結果、L-システインは 10 μM 以上で濃度依存的に PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性を抑制した (図 31) 一方で、PKM1 に対しては 10 μM においても効果が見られなかった (図 32) ことから、L-システインが直接的に、かつ特異的に PKM2 の活性を抑制している可能性が示唆された。なおここで、L-システインの PKM2 に対する半数阻害濃度 (IC_{50}) を求めたところ、59 μM であることが確認できた (図 33)。また、この結果をもとにミカエリス-メンテンプロット (図 34) とラインウィーバー-バークプロット (図 35) を作成した結果、最大速度 (V_{max}) とミカエリス定数 (K_m) は、L-システイン非存在下で 180 pmol/min、3.9 mM であったのに対し、L-システインを添加することでそれぞれ 84 pmol/min、4.5 mM となることがわかった。 K_m に対する影響が僅かであるのに対し、 V_{max} への影響が大きかったことから、PKM2 に対する L-システインの効果は、非競合阻害であることが示唆された。この結果は、L-システインが直接 PKM2 の活性阻害を行うという仮説を支持するものであると考えられる。

L-システインによるインスリン分泌抑制が PKM2 の活性制御を介したものであることを更に裏付けるため、PKM2 の特異的な活性化剤である DASA-10 (Boxer *et al.*, 2010) を用いた実験を行うこととした。その結果、前処理時とインスリン分泌刺激時に L-システインとともに DASA-10 を添加することで、グルコース刺激後の一時的な ATP 産生量の増加 (図 36)、GSIS (図 37) について、どちらも L-システインによる抑制からの回復が確認できた。また、灌流系において DASA-10 を添加する実験により、MIN6 細胞における二相性 GSIS の回復が確認できた (図 38) だけでなく、マウスの膵島においても同様の DASA-10 の効果を確認

することができた (図 39)。この DASA-10 による PKM2 の活性化は、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* における実験系でも確認することができた (図 40) ため、PKM2 の不活性化、及び活性化が膵β細胞の GSIS に大きな影響を与えているということが改めて示唆された。

更に、L-システインによる PKM2 不活性化のメカニズムを明らかにするため、細胞内における PKM2 の状態を確認することとした。PKM2 は四量体の時に高いピルビン酸キナーゼ活性を有し、二量体、あるいは単量体になることでそのピルビン酸キナーゼ活性が大きく失われることが知られている (Anastasiou *et al.*, 2012; Mazurek, 2011) ことから、細胞内における四量体の存在比を確かめることで活性化の程度がわかると考えられた。そこで、Native SDS-PAGE 法 (Nowakowski *et al.*, 2014) を用いて、PKM2 の四量体、二量体、単量体の存在量が L-システイン処理によって変化しているのかどうか検証を行った。Native SDS-PAGE 法では、タンパク質の多量体の状態を維持したまま電気泳動を行うことで、移動度の違いから多量体と単量体とを分離することができる (多量体は移動度が小さくなる) とともに、多量体の有無や存在量を確認することが可能となる (Nowakowski *et al.*, 2014)。その結果、MIN6 細胞から得られた細胞ライセートにおいて、何も添加していないサンプルや L-システインと DASA-10 を同時に添加したサンプルでは四量体と考えられるバンドが確認できるものの、L-システインを添加したサンプルでは当該バンドが消失していることが確認できた (図 41、'MIN6')。リコンビナントタンパク質を用いたサンプル (図 41、'*in vitro*') においてもほぼ同様の結果が得られた一方で、PKM1 について確認してみると、L-システイン添加時であっても四量体のバンドが消失することはなかった (図 42)。これらの結果から、L-システインによる PKM2 の活性抑制メカニズムとして、L-システインが PKM2 の四量体を減少させるという機構が示唆された。

ここまでの結果から、(1) L-システインは膵β細胞において、ピルビン酸産生抑制を通し

て二相性 GSIS を可逆的に抑制している、(2) L-システインは PKM1 ではなく PKM2 に作用し、PKM2 の四量体を減少させることでその活性を抑制している、(3) 膵β細胞のインスリン分泌機構において、PKM2 の存在量、特に四量体の量が大きな役割をもつ、といった結論を導くことができた (図 43)。

3-4. PKM1 は小胞体ストレス誘導性アポトーシスを阻害する

PKM2 が膵β細胞のインスリン分泌制御に大きく関与していることが確認できたが、このことから、膵β細胞におけるピルビン酸キナーゼの機能異常が、T2D のような疾患と結びつくことが考えられた。実際、いくつかの先行研究を基にすると、ピルビン酸キナーゼの存在が T2D に関与している可能性を示唆することができる。例えば、RNA ヘリカーゼである DEAD-box helicase 6 (DDX6) は PKM1 と PKM2 のタンパク質量を正に制御する可能性が示されている (Taniguchi *et al.*, 2015) が、T2D の患者の膵β細胞では、非糖尿病患者の膵β細胞と比較して、DDX6 の発現量が中央値比較で 20%以上低下することが示唆されている (Marselli *et al.*, 2010)。他にも、PKM1 と PKM2 の mRNA 転写の正の制御因子として働くという報告がある転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (Panasyuk *et al.*, 2012) について、PPAR γ の活性化がヒト膵島細胞においてパルミチン酸ナトリウム誘導性のアポトーシス抑制につながるということが明らかにされている (Vandewalle *et al.*, 2008)。

そこで、PKM1 や PKM2 の存在量あるいは存在比が、インスリン分泌以外にも膵β細胞の機能に影響を与えていると考え、その可能性を検証することとした。特に、第一章 (1-6.) でも述べたように、PKM1 と PKM2 は近年、種々の細胞の細胞死制御に関与していることが

報告されている。しかし、PKM1 や PKM2 が膵β細胞のアポトーシスにどのような影響を及ぼすかは明らかにされていなかったことから、本研究では、膵β細胞の細胞死の主要な原因の一つであるとされている小胞体ストレス (Back & Kaufman, 2012; Eizirik *et al.*, 2008; Wali *et al.*, 2013) に注目し、PKM1 と PKM2 のタンパク質量減少が膵β細胞の細胞死、特に小胞体ストレス誘導性アポトーシスに影響を与えるかどうかを確かめた。

まず、MIN6 細胞に PKM1、PKM2 の siRNA をトランスフェクションした 48 時間後から、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (tunicamycin)、またはタプシガルギン (thapsigargin) を培地に加え、0、6、12、24 時間後におけるアポトーシス細胞数を計測した。TUNEL 法を用いてアポトーシス細胞を染色し、TUNEL 陽性細胞の割合を計算したところ、PKM2 の発現を抑制した細胞においてはコントロールの細胞と殆ど同様の傾向を示したのに対し、PKM1 の発現を抑制した細胞では、小胞体ストレス誘導後 6 時間の時点からアポトーシス細胞数が大きく増加し始めることがわかった (図 44)。特に小胞体ストレス誘導後 24 時間の時点では、PKM1 の発現抑制により、コントロールと比べて 3 倍近い細胞がアポトーシスを起こしていた。この PKM1 発現抑制による効果が膵β細胞において一般的なものであるかどうかを確かめるため、同じマウス膵β細胞由来の培養細胞株、Beta-TC-6 細胞 (Poitout *et al.*, 1995) を用いて同様の実験を行うこととした。まず MIN6 細胞と同様の条件下で PKM1、及び PKM2 の発現抑制を行うことができるかどうかを確認したところ、タンパク質量の減少 (図 45)、mRNA 量の減少 (図 46) がともに標的特異的であることが確かめられた。その上で、Beta-TC-6 細胞においても siRNA のトランスフェクション後 48 時間から小胞体ストレスを誘導し、24 時間後にアポトーシス細胞数を計測したところ、MIN6 細胞と同様に PKM1 の発現抑制時にアポトーシス細胞数が増加することが確認できた (図 47)。

これらの細胞死がアポトーシスであることを裏付けるため、小胞体ストレスを誘導した MIN6 細胞において Annexin V 法を用いたアポトーシス細胞の検出を行った。FACS を用い

た解析の結果、PKM1 の発現を抑制すると、アポトーシス細胞特異的に結合する Annexin V に対して陽性を示す細胞が増加するという結果が得られた (図 48)。またこの時、細胞膜不透過性の色素で死細胞のマーカーとなる propidium iodide (PI) が陽性かつ Annexin V が陰性 (Annexin V/PI⁻) の細胞の割合については殆ど変化が見られなかった (図 48) ことから、PKM1 の発現抑制がネクロシスなどのアポトーシス以外の細胞死に影響を与えている可能性は低いと判断した。これらの結果から、PKM1 の発現を抑制することで小胞体ストレス誘導性アポトーシスが亢進するということが確かめられたとともに、PKM1 が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに対し潜在的な抑制効果をもつという可能性が示唆された。

なおこの時、PKM1 の発現抑制そのものが細胞にダメージを与えている可能性が考えられたため、その検証を行った。まず、PKM1 の発現抑制が DNA 傷害の原因となっている可能性について検証したが、PKM1 の核への局在が少ないこと (図 49)、及び、コメットアッセイ時に損傷 DNA 量に殆ど差が見られなかったこと (図 50) から、PKM1 の発現抑制は細胞における DNA 傷害に影響を与えていないことが考えられた。また、ピルビン酸の産生量低下による細胞へのストレス増加という可能性も考えられたが、PKM1 の発現抑制時には細胞内ピルビン酸量 (図 51)、細胞内 ATP 量 (図 52) とともに大きな変化は見られなかったことから、小胞体ストレス誘導性アポトーシスの増加との関連性は少ないと考えられた。実際、これらの結果は先のグルコース誘導性インスリン分泌を確かめた結果と矛盾しない。

更に、PKM1 の発現抑制が小胞体ストレス応答 (UPR) に関与している可能性についても検証を行った。UPR の主要な経路のうち、リン酸化による制御が介在する PERK と IRE1 α (Scheuner & Kaufman, 2008) のリン酸化状態について、PKM1 の発現抑制が影響を与えるかどうかを確認した (図 53A)。その結果、小胞体ストレス非誘導時のリン酸化 PERK、リン酸化 IRE1 α の量に変化が見られないこと (図 53B)、及び、PERK、IRE1 α の総タンパク質量に変化が見られないことが確かめられた (図 53C)。更に、ツニカマイシンを用いて小

胞体ストレスを誘導し、6、12、24 時間後におけるリン酸化 PERK、リン酸化 IRE1 α の量の経時的変化も確かめたが、コントロールの細胞とほぼ同様の変化をすることがわかった (図 54)。すなわち、PKM1 の発現抑制は、小胞体ストレスを軽減するための UPR 機構に影響を与えていないということが示唆された。

3-5. PKM1 は A-Raf と結合し、MEK、ERK のリン酸化を制御する

PKM1 が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関与する機構として次に考えられたのが、他のタンパク質との相互作用によるものである。先行研究において、PKM2 を含め M 型のピルビン酸キナーゼと結合、相互作用すると報告されているタンパク質は複数存在するが、その中でも本研究においては、アポトーシスに関連するタンパク質として報告のある A-Raf タンパク質に着目した (Ahn *et al.*, 2015; Mazurek *et al.*, 2007; Villani *et al.*, 2014; Yuryev & Wennogle, 2003)。A-Raf タンパク質は、Raf ファミリーと呼ばれるキナーゼの一種で、膵 β 細胞においても発現していることが知られている (Alejandro & Johnson, 2008)。A-Raf タンパク質と膵 β 細胞のアポトーシスのつながりとしては、膵 β 細胞に対して毒性をもつストレプトゾトシン (STZ) 処理を行った糖尿病マウスについて、膵臓で A-Raf の発現量が低下している可能性が示唆されている (Villani *et al.*, 2014)。STZ 処理は小胞体ストレスを誘導し、アポトーシスを引き起こすことも報告されており (Ahn *et al.*, 2015)、A-Raf の機能が低下することで小胞体ストレス誘導性アポトーシスが亢進する可能性が考えられる。

そこでまず、PKM1 が A-Raf と結合するかどうかを確かめることとした。MIN6 細胞から得られた細胞ライセートについて抗 A-Raf 抗体を用いた共免疫沈降を行い、PKM1 及び PKM2 が検出できるかどうかを検証したところ、驚くべきことに、PKM2 は検出されず、

PKM1 のみが検出できた (図 55A)。また、Beta-TC-6 細胞のライセートを用いた実験においても同様の結果が得られたことから (図 55B)、マウス膵β細胞において PKM1 と A-Raf が結合していることが確かめられたと言える。続いて、A-Raf の機能に PKM1 が関与しているかどうかを確かめるため、コントロール細胞、及び PKM1 の発現を抑制した細胞についてライセートを作製し、抗 A-Raf 抗体による免疫沈降を行って A-Raf タンパク質複合体を得た後、*in vitro* 系で A-Raf タンパク質複合体と GST 結合型 MEK1 (GST-MEK1) を混和し、反応させ、GST-MEK1 のリン酸化状態に差が出るかどうかを比べることとした。MEK1 は A-Raf の下流に存在するキナーゼで、A-Raf によってリン酸化 (活性化) されることがわかっている (Wu *et al.*, 1996) ことから、PKM1 の発現を抑制した細胞において A-Raf の機能が低下していた場合、コントロールと比べて GST-MEK1 のリン酸化量が少なくなると考えられる。実験の結果、MIN6 細胞 (図 56A)、Beta-TC-6 細胞 (図 56B) とともに、PKM1 の発現を抑制した細胞から得られたライセート ('PKM1 KD') において、PKM1 が減少するとともに、リン酸化された GST-MEK1 タンパク質の検出量も低下していた ('GST-MEK1 (phosphorylated)'). なおこの実験において、GST-MEK1 タンパク質は入手が容易であったヒト遺伝子由来のものを用いたが、マウスとヒトの MEK1 はアミノ酸レベルにおいて約 99% の相同性をもつ (図 57) ことから、結果への影響は僅かであると考えられた。すなわち、マウス膵β細胞の PKM1 が、ヒト MEK1 と極めて近い配列をもつマウス MEK1 のリン酸化に関与することが推測された。そしてこれらの結果から、マウス膵β細胞において PKM1 が A-Raf と結合すること、及び、PKM1 が A-Raf の機能、特に MEK1 のリン酸化 (活性化) に何らかの影響を与えている可能性があるかと判断した。

そこで、A-Raf の下流である MEK、更にその下流である ERK タンパク質について、PKM1 がリン酸化状態に影響を与えているかどうかを確かめることとした。コントロール細胞と PKM1 の発現を抑制した細胞から得られたライセートについてウェスタンブロッティングを

行った結果、MIN6 細胞において、PKM1 の発現を抑制した場合にリン酸化 MEK、リン酸化 ERK の量が大きく減少することがわかった (図 58)。この時、PKM2 の発現を抑制した細胞についても MEK と ERK のリン酸化状態について検証を行ったが、PKM2 の発現抑制がリン酸化 MEK、リン酸化 ERK の量に変化を及ぼさないことが確かめられた (図 59)。また、PKM1 発現抑制による MEK、ERK のリン酸化について更に確かめるため、SDS-PAGE によってリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離することができる Phos-tag SDS-PAGE 法 (Kinoshita *et al.*, 2004) を用いて MEK と ERK の検出を行った。Phos-tag SDS-PAGE 法では、非リン酸化タンパク質と比べてリン酸化タンパク質の移動度が小さくなるため、リン酸化タンパク質を異なるバンドとして検出することができる (Kinoshita *et al.*, 2004)。その結果、図 60 に示すように、PKM1 の発現を抑制したサンプルにおいては、移動度の小さい (リン酸化された) MEK、及び ERK のバンドのシグナルが減少していることが確認できた。なお、同様の条件で同時に行った通常の SDS-PAGE 法の結果 ('conventional') から、サンプルのタンパク質量に差がないことも確かめられた。これらの結果は Beta-TC-6 細胞においても同様に確認できた (通常の SDS-PAGE (図 61)、Phos-tag SDS-PAGE (図 62)) ことから、膵β細胞において PKM1 の発現を抑制すると MEK、ERK のリン酸化が抑制されるということがわかった。

3-6. PKM1 は ERK のリン酸化を介して caspase-9、caspase-3 の活性を制御する

続いて、PKM1 の発現抑制時の MEK、ERK のリン酸化の抑制がアポトーシスへとつながるメカニズムの解明を試みた。そこで着目したのが、caspase-9 の 125 番目のスレオニン残基 (Thr125) のリン酸化である。caspase-9 は細胞へのストレスなどによる内因性アポトー

シスにおいてイニシエーターカスパーゼとして働く (Wali *et al.*, 2013) が、その制御機構の一つに、ERK が caspase-9 の Thr125 をリン酸化することで caspase-9 の活性化を抑制するという機構が存在する (Allan *et al.*, 2003)。ヒトの Thr125 は、マウスにおいては Thr163 として保存されている可能性が高いことから (図 63)、まずはマウスにおいても caspase-9 (Thr125) の機能が保存されているかを確認することとした。

そこでまずは、MIN6 細胞に MEK の阻害剤である U0126 を添加し、caspase-9 (Thr125) のリン酸化状態に変化が出るかを確認した。その結果、リン酸化 ERK の減少 (図 64) とともに、caspase-9 の Thr125 におけるリン酸化も有意に減少していることが明らかになった (図 65) ことから、マウス膵β細胞においても、ERK が caspase-9 (Thr125) のリン酸化に関与している可能性が示唆された。

続いて、PKM1 の発現を抑制した際に caspase-9 (Thr125) のリン酸化状態に変化が出るかどうかを確認したところ、図 66 に示すように、PKM1 の発現抑制によってリン酸化 caspase-9 (Thr125) の量が有意に減少していることが確認できた。なおこの時、PKM2 の発現抑制を行ってもリン酸化 caspase-9 (Thr125) の量には変化が見られなかった (図 67)。更に、Beta-TC-6 細胞においても同様に、PKM2 の発現抑制時にはリン酸化 caspase-9 (Thr125) 量に有意な差が見られないのに対し、PKM1 の発現を抑制した際にはリン酸化 caspase-9 (Thr125) が有意に減少していることが確かめられた (図 68)。これらの結果をまとめると、マウス膵β細胞においても ERK が caspase-9 (Thr125) のリン酸化を制御する機構が存在し、PKM1 の発現を抑制した際には、リン酸化 ERK の減少に伴って caspase-9 (Thr125) のリン酸化量も減少する、というメカニズムが示唆されたと言える。

リン酸化 caspase-9 (Thr125) の減少により caspase-9 が活性化されやすくなり、最終的にはアポトーシスの亢進につながると考えられる。そこで、小胞体ストレス誘導後に実際に caspase-9 の活性化状態が変化しているかを確認することとした。なお、caspase-9 は切断さ

れることで活性化される (Parrish *et al.*, 2013) ことから、切断型 caspase-9 の量を caspase-9 の活性化の指標として用いることとした。その結果、24 時間の小胞体ストレス誘導により、PKM1 発現抑制細胞では切断型 (活性型) caspase-9 の量が増加 (ツニカマイシン処理では 1.9 倍、タプシガルギン処理では 2.5 倍) していることがわかった (図 69A、69B)。そこで更に、caspase-9 によって切断されて活性化する、内因性アポトーシスの最終実行因子である caspase-3 (Li *et al.*, 1997; Wali *et al.*, 2013) の状態についても検証を行った。結果としては、caspase-9 と同様に、PKM1 の発現を抑制することで小胞体ストレス誘導後に切断型 (活性型) caspase-3 が増加する (ツニカマイシン処理で 6.5 倍、タプシガルギン処理で 4.5 倍) ということが確かめられた (図 69A、69C)。その一方で、PKM2 の発現抑制を行っても、小胞体ストレス誘導後における切断型 (活性型) の caspase-9、caspase-3 の量はコントロールと殆ど変化がなく、有意な差は得られなかった (図 70)。また、これらの結果は、Beta-TC-6 細胞においても同様に確かめることができた (図 71)。

PKM1 と小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関するここまでの結果から、(1) PKM1 は A-Raf と結合し、MEK 及び ERK のリン酸化に寄与している、(2) PKM1 の発現抑制時にリン酸化 ERK、リン酸化 caspase-9 (Thr125) が減少し、小胞体ストレス誘導時には caspase-9、caspase-3 の活性化が起こりやすくなる、(3) 膵β細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシス機構において、PKM1 はアポトーシスを抑制する働きをもつ、といった結論を導くことができた (図 72)。

本研究を通して、マウス膵β細胞における PKM2 の機能 (図 43) と PKM1 の機能 (図 72) について、それぞれ新たな役割を明らかにすることができた。これらの結果を更にまとめると、M 型ピルビン酸キナーゼの PKM1 と PKM2 が、それぞれアポトーシスの抑制とインスリン分泌の制御という、膵β細胞の正常な働きに必須となる重要な機能に関わるという結論

を導くことができる (図 73)。

第 4 章 考察

4-1. PKM2によるインスリン分泌制御とL-システインによる可逆的な抑制について

本研究においてはまず、L-システインがPKM2の四量体を減少させることでピルビン酸キナーゼ活性を抑制し、高グルコース刺激後の一時的なATP量増加の抑制を介してインスリン分泌を阻害するということが明らかにすることができた。

特にピルビン酸キナーゼの働きに着目したことから、GSISにおいて細胞内のピルビン酸量が非常に重要となるということが改めて確かめられたが、L-システインによるピルビン酸産生抑制とGSIS抑制には、未解明の点も残っていると考えられる。例えばL-システインは、シスタチオニン- γ -リアーゼ(CSE)の働きによってピルビン酸と硫化水素を産生することが知られており(Julian *et al.*, 2002; Yilmaz *et al.*, 2003)、マウス臍島を18時間高グルコース条件下におくことでCSEの発現量が増加するという報告も存在する(Kaneko *et al.*, 2009)。このことから、今回の実験系においてもCSEの働きによってL-システインからピルビン酸が産生された可能性は否定できない。しかし、メタボローム解析の結果から、少なくとも本研究の実験系においては、CSEによるピルビン酸の産生能よりも、PKM2の活性阻害によるピルビン酸の産生抑制の方が大きな影響を与えたということが考えられる。

PKM2のピルビン酸キナーゼ活性制御という点では、L-システインの添加によって活性型の四量体が減少するという発見はとても興味深い。L-システインとピルビン酸キナーゼの活性に関する先行研究は複数存在するが、具体的な阻害メカニズムまで明らかにした文献は確認できなかった。L-システインによるピルビン酸キナーゼ活性の抑制は、1973年にラットの腎臓と肝臓で報告されている(Carbonell *et al.*, 1973)が、その活性抑制についてはL型のピルビン酸キナーゼについてのみ確認されており、M型についての大きな変化は確認されていなかった。その後、ラットの大脳皮質においてM1型の(Rech *et al.*, 2008)、マウスの腫瘍細胞(Kędryna *et al.*, 1983)やヒトの乳がん細胞においてM2型の(Yilmaz *et al.*, 2003)

活性抑制が確認されており、L-システインを含め数種類のアミノ酸や脂肪酸などにより M2 型の活性が抑制されることがわかっている (Mazurek, 2011)。本研究において、L-システインによる PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性抑制メカニズムは明らかになったものの、PKM1 の活性抑制については確認できなかった。しかし、異なる細胞種、あるいは異なる L-システイン濃度では PKM1 に影響を及ぼすという可能性も考えられる。

ここで問題となるのが、なぜ L-システインが PKM1 に影響を与えず、PKM2 特異的に働くのかである。この点については、PKM1 と PKM2 の大きな違いの一つである、活性制御メカニズムの違いという面から議論することで一つの可能性が挙げられる。PKM1 は代謝産物等によるアロステリックな制御を受けず、四量体として常に高いピルビン酸キナーゼ活性をもつとされている。一方で、PKM2 も四量体で高いピルビン酸キナーゼ活性をもつものの、その活性はフルクトース 1, 6-ビスリン酸や L-セリンなどの代謝産物によって正に制御されており、二量体や単量体の状態になった場合にはピルビン酸キナーゼ活性が低下する (Mazurek, 2011)。PKM2 はこうした制御によって四量体と単量体の間で平衡状態にあるとされており、そのメカニズムとしては、フルクトース 1, 6-ビスリン酸や L-セリン、あるいは人工的な PKM2 の活性化剤が PKM2 タンパク質の“ポケット”に入り込むことで四量体化を促進、安定させるという機構が考えられている (Anastasiou *et al.*, 2012; Chaneton *et al.*, 2012)。L-システインは L-セリンと非常に似た構造をもつことから、一つの仮説として、L-システインが L-セリンの代わりに PKM2 の“ポケット”に入り込むことで L-セリンによる活性化を阻害し、結果的に PKM2 の四量体が減少しているという可能性が考えられる。本研究における結果だけでは、L-システインがどのように PKM2 の四量体を解離させているのかは判別できないが、その活性阻害が直接的かつ可逆的であり、L-システインを除いた場合や PKM2 の活性化剤を加えた際に PKM2 の活性が戻るという点から考えると、上記のような活性制御メカニズムの存在が示唆できるのではないだろうか。

また、本研究においては、細胞レベルでの灌流系を用いた実験から、L-システインが GSIS の第一相と第二相をともに抑制することを明らかにした。第一相への影響としてまず考えられたのは L-システインを介した硫化水素の産生による K_{ATP} チャンネルや VDCCs の攪乱 (Ali *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2005) であったが、ピルビン酸メチルや DASA-10 を用いた際に GSIS の回復が見られたことから、本実験系においてその可能性は低いと言えた。実際、細胞内の硫化水素量についても検証を行ったが、硫化水素量の増加は確認できなかった。L-システインの添加時に硫化水素の産生量が増加するかどうかについては議論の余地が残るが、L-システインを添加する濃度や時間、及び用いる実験系などの条件によって異なる可能性がある。本研究においても、低グルコース処理と高グルコース刺激時の 1 時間半のあいだ L-システインを溶液から抜くことで抑制効果が解消されることが確かめられたが、これは、MIN6 細胞内において L-システイン濃度が速やかに変化することを示唆しているとともに、細胞内における L-システインの挙動については慎重な検証が必要であるとも言える。

また、本研究においては、1 mM、または 2 mM という濃度で L-システインを添加したが、これは血中濃度よりも高い濃度であると考えられる。ヒトにおける血中 L-システイン濃度について、報告によって幅があることは先に述べた (1-5.) が、実際に膵 β 細胞がどの程度の濃度の L-システインに曝されているのかは明らかにされていない。この点は先行研究においても議論されているが、インスリン分泌の実験系において生理的な物質の影響を調べる場合に生体における濃度の数倍程度の濃度で実験を行うことから、数 mM レベルの L-システイン濃度であれば、有効濃度と生体の濃度が大きくかけ離れていることはないと言われている (仁木 & 金子, 2006)。L-システインによる GSIS 阻害が生体でも起こりうるのか、また、生体において膵 β 細胞がどの程度の量の L-システイン曝露を受けているのかは、今後明らかにされるべき課題であると考えられる。しかし、培養細胞である MIN6 細胞においてだけでなく、マウスの膵島を用いた実験においても L-システインの PKM2 抑制効果が確かめられた

ことから、本研究で明らかにされたこのメカニズムが生体の環境を再現している可能性は高いのではないかと考えられる。

特に、L-システインの効果が可逆的であるというのは、生体にとって非常に大きな意味をもつと言える。血中の L-システイン濃度増加に伴いインスリン分泌が抑制され、血中 L-システイン濃度の低下によってインスリン分泌量が増加するという仕組みが存在するのであれば、L-システインが血糖値の恒常性維持に関与している可能性も考えられる。更に、L-システインの増加が疾患としての側面をもつだけでなく、インスリンの過分泌などを防止する血中インスリン濃度の調節因子として、疾患を抑えるための役割を担うということも考えられる。例えば T2D の初期においては、インスリン抵抗性の増加に伴ってインスリン分泌量が増加することが知られているが、それは同時に膵β細胞へのストレス増加にもつながる (Leibiger *et al.*, 2008; Meier & Bonadonna, 2013; Wajchenberg, 2007)。そのため、T2D における血中 L-システイン濃度増加が、インスリンの過分泌による「代償」を抑えるためのメカニズムである可能性も十分に考えられる。本研究で明らかになった L-システインによる PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性抑制及び GSIS 抑制が、細胞や生体にとってどのような意義をもつのかは、今後の研究によって更に詳しく解明されることと期待される。

4-2. PKM1 による A-Raf/MEK/ERK 経路の活性化と caspase-9/caspase-3 経路の抑制、小胞体ストレス誘導性アポトーシスの抑制について

本研究では更に、膵β細胞において、PKM1 が A-Raf との結合を介して MEK/ERK 経路の活性化を行い、caspase-9/caspase-3 経路を抑制することで、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを抑制していることを示した。

本研究で明らかになった PKM1 との相互作用による A-Raf 経路の活性化機構としては、いくつかの可能性が考えられる。例えば、PKM1 が A-Raf の特定残基のリン酸化を直接的に促進することで活性化に寄与している可能性を挙げることができる。A-Raf の活性化に関与するリン酸化部位として 301 残基目と 302 残基目のチロシン (Marais *et al.*, 1997)、299 残基目のセリン (Baljuls *et al.*, 2007) などが知られており、これらの残基はマウスでも保存されていることから、PKM1 が直接的、あるいは間接的にこれらのリン酸化に関与している可能性が考えられる。また、PKM1 が A-Raf の活性化因子と相互作用し、A-Raf を活性化する足場のような役割を果たすことも考えられる。GTP 結合型のタンパク質である Rac1 は M 型のピルビン酸キナーゼと相互作用することが示唆されている (Wan *et al.*, 2015) が、Rac1 は、Raf ファミリータンパク質が MEK/ERK 経路を活性化する際にそれらのタンパク質の足場として働く IQ motif-containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1) (Hart *et al.*, 1996) と結合することが報告されている (Abel *et al.*, 2015) ことから、PKM1 が Rac1 や IQGAP1 をリクルートすることで A-Raf の機能を助けている可能性も考えられる。更には、PKM1 が A-Raf の抑制効果をもつタンパク質に作用し、結果的に A-Raf の活性化につながっているということも考えることができる。A-Raf における抑制的なリン酸化部位として 214 番目のセリン残基が知られており、このリン酸化に伴って、A-Raf を不活化する 14-3-3 タンパク質が結合するようになる (Matallanas *et al.*, 2011)。仮に PKM1 がこの 14-3-3 タンパク質の結合を阻害するような形で A-Raf と結合しているのであれば、それは A-Raf の活性を維持することにつながると言える。また、PKM1 はタンパク質脱リン酸化酵素である EPM2A と相互作用するという報告 (Viana *et al.*, 2015) があることから、PKM1 が EPM2A の機能を阻害することで A-Raf のリン酸化状態を維持している、といった可能性も考えることができる。哺乳類においては、Raf タンパク質ファミリーとして A-Raf、B-Raf、c-Raf (Raf-1) の三種が存在するが、A-Raf がもつキナーゼ活性は、その中でも最も低いと言われている (Desideri

et al., 2015)。それゆえ、膵β細胞がどのように A-Raf の活性を維持しているのか、PKM1 との関連も含めて、今後更なる研究が必要であると言える。

また、B-Raf や c-Raf と異なり、A-Raf は MEK のリン酸化以外の機能についての報告が少なく、どのような役割を果たしているのか完全には解明されていない (Desideri *et al.*, 2015; Matallanas *et al.*, 2011)。しかし近年、アポトーシスに関連した機能が注目されている。具体的には、A-Raf がアポトーシス促進タンパク質である mammalian sterile 20-like kinase (MST2) と結合することで、MEK/ERK 経路とは独立に、MST2 を介したアポトーシスを阻害するという報告がされている (Rauch *et al.*, 2010; Rauch *et al.*, 2016)。膵β細胞においても同様の経路が存在する可能性は否定できないが、本研究では MEK/ERK 経路の活性化が A-Raf を介したアポトーシス抑制において非常に重要であることを示した点で、A-Raf の新たな可能性を提示できたと言える。

PKM1 が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関与する機構として他に考えられたのが、MEK/ERK 以外の、アポトーシスを制御するキナーゼのリン酸化への関与である。内因性アポトーシス経路においては、ERK を介した経路だけでなく、Akt を介したアポトーシス抑制経路もよく知られている (Elmore, 2007; Guo, 2014)。Akt はリン酸化により活性化されると、アポトーシス促進タンパク質である Bad をリン酸化して不活化し、アポトーシスを抑制する (Guo, 2014)。実際、PKM1 の発現を抑制した際に Akt のリン酸化状態を確認したところ、リン酸化 Akt 量が減少している傾向を確認することができた (データ未掲載)。また、その際のリン酸化 Bad タンパク質量についても確認したが、総 Bad タンパク質量、リン酸化 Bad タンパク質量の双方が減少している傾向が確認された (データ未掲載)。PKM1 が Bad タンパク質の転写や翻訳、あるいは分解に関与しているという可能性も否定できないと考えられる。

本研究においては、caspase-9 の Thr125 残基のリン酸化を介した caspase-9/caspase-3 経

路の制御機構について確かめたが、他にも多くの caspase-9 活性制御機構が存在している。特にミトコンドリアから放出される cytochrome c が caspase-9/caspase-3 経路の活性化を介してアポトーシスを促進する経路 (Li *et al.*, 1997) がよく知られているが、caspase-4 (Jiang *et al.*, 2007) や caspase-12 (Morishima *et al.*, 2002) といった他のカスパーゼファミリーによる制御を受けることも知られている。caspase-4 は小胞体ストレス誘導時に U0126 処理による MEK/ERK 経路の不活性化によって活性化 (切断) が促進され、続く caspase-9 と caspase-3 の活性化に関与することが報告されており (Jiang *et al.*, 2007)、小胞体ストレス誘導時に caspase-9 を活性化する caspase-12 は、cytochrome c 非依存的に働くということが報告されている (Morishima *et al.*, 2002)。PKM1 が本研究において示された A-Raf/MEK/ERK と caspase-9/caspase-3 の経路以外に影響を与えているのかは、今後更に研究を行って明らかにする必要があると考えられる。

4-3. M 型ピルビン酸キナーゼと糖尿病の関係について

本研究を通じて、膵β細胞において PKM2 と PKM1 が果たす役割を明らかにすることができた。その機能は、それぞれグルコース刺激誘導性インスリン分泌の制御と、小胞体ストレス誘導性アポトーシスの抑制という、どちらも膵β細胞にとって非常に重要となる働きであった。それゆえ、これらの M 型ピルビン酸キナーゼの機能やタンパク質量に異常が生じた場合は、膵β細胞が機能不全に陥るだけでなく、T2D を含めた糖尿病態の発症にもつながると考えられる。直接の関わりを示すためには更なる研究が必要であるものの、本研究といくつかの先行研究から、その可能性について考察を加えることができる。

PKM1 と PKM2 の発現が選択的スプライシングによって制御されていることは先に述べ

たが、その制御を行う因子として hnRNPA1、hnRNPA2、PTB1 という 3 種のタンパク質が知られており、いずれも PKM1 の発現を抑制し、PKM2 の発現を促進する機能をもっている (Clower *et al.*, 2010; David *et al.*, 2010)。このうち、PTB1 (polypyrimidine tract-binding protein 1) については、T2D の患者と健常者の間で膵島細胞における核内存在量に差がある可能性が報告されている (Ehehalt *et al.*, 2010)。同研究では、非グルコース刺激時を元にしたグルコース刺激時の核内 PTB1 量の比が、健常者の膵島での指標と比べて T2D 患者では中央値比較で 50%以上上昇しているとされている (Ehehalt *et al.*, 2010)。この結果を基にすると、T2D 患者の膵島においては PKM1 の発現量が減少し、PKM2 の発現量が増加しているという可能性が示唆できる。これは、インスリン分泌量増加への要請に応える形で PKM2 の発現が亢進する一方で、PKM1 が減少することでアポトーシスが増加する、という病態を示しているとも考えられる。

また、ピルビン酸キナーゼと同様に解糖系に関わる酵素であるグルコキナーゼについて、その活性化が膵β細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制するという報告がある (Shirakawa *et al.*, 2013)。この先行研究では、小胞体ストレス由来の糖尿病モデルマウスである Akita マウスに対してグルコキナーゼ活性化剤を投与した際に膵β細胞のアポトーシスについて改善が見られたことが報告されており、ATP 産生の増加がその一因であると考えられている (Shirakawa *et al.*, 2013)。このことから、ピルビン酸キナーゼも同様の効果を有している可能性が考えられる。ただし、本研究における結果からは、膵β細胞における定常的なピルビン酸の産生について、PKM1 と PKM2 がどのように寄与しているかを単純に考察することはできないと考えられる。本研究では、PKM1 及び PKM2 の発現を抑制した際に他のアイソフォームの発現に有意な増加は見られなかったものの、例えば PKM1 の発現を抑制した際のピルビン酸の産生量について、PKM2 が不足分を補っている可能性は十分に考えられる。PKM2 は四量体と単量体の平衡状態にあることから、PKM1 が不足してピルビン酸

の供給の必要が生じた際に、PKM2の四量体量が増加することで、タンパク質量を変えないままピルビン酸キナーゼ活性を高めているという可能性も十分考えられる。実際、PKM2の発現を抑制したガン細胞においてPKM1の発現量が増加するという報告もされており (Israelsen *et al.*, 2013)、PKM1とPKM2が相互に影響を与えている可能性は否定できない。また、PKM1とPKM2の関係という点では、近年、細胞のガン化やオートファジー、アポトーシスなどにおいてPKM2とPKM1の比が重要となるという報告も出てきている (Shinohara *et al.*, 2015; Taniguchi *et al.*, 2015)。本研究で明らかとなったGSIS制御機構やアポトーシス抑制機構は、他のアイソフォームによらない、アイソフォーム特異的なものであることが明確に示されているが、その他の機能については、アイソフォーム間の「量比」に注目した研究の重要性も示唆されていると言える。

更に、結果の章(3-4.)においても述べたように、PKM1とPKM2のmRNA転写、あるいはタンパク質量を正に制御する因子であるPPAR γ やDDX6なども、T2DにおけるM型ピルビン酸キナーゼの機能を推測する上で重要であると考えられる。本研究でも示唆されたが、膵 β 細胞においてはPKLやPKRといったピルビン酸キナーゼが殆ど存在しないと考えられるため、PKM1、PKM2双方のタンパク質量が減少することは、細胞の生存にとって極めて深刻なダメージになると言える。実際に病態の組織や細胞においてM型ピルビン酸キナーゼがどの程度発現しているのかを知ることで、病態進行度を含めた病態への理解が深まるとともに、治療の標的としても考えられるようになることが期待される。

最後に、本研究における結果を改めてまとめると、膵 β 細胞においてM型ピルビン酸キナーゼのPKM1とPKM2が果たす役割とその重要性を明らかにすることができた。また、それぞれの機能の具体的な制御メカニズムを突き止めることができた。更に、インスリン分泌量の減少や膵 β 細胞死の増加を伴うT2Dの治療標的候補として、PKM2やPKM1の活性状

態、存在量が有用となる可能性を提示することができた。これらの成果は、膵β細胞機能の制御機構の新たな側面を明らかにしたとともに、T2Dなどの疾患メカニズムの更なる理解や、疾患の予防、その治療法の開発などに寄与することができると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、学部時代より長年に渡り丁寧にご指導いただきました村田昌之教授に深く御礼申し上げます。

実験指導を含めて論文作成において的確な助言をいただきました、東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学センター、加納研究室の加納ふみ准教授に深く御礼申し上げます。

実験計画の立案やデータの解析を始めとし、論文作成にあたり大いに手助けしていただいた、加納研究室の中津大貴助教にも深く御礼申し上げます。

インスリン分泌実験において的確な助言をいただくとともに、マウス豚島を用いた実験において多大なご協力を賜りました、東京大学医学部附属病院、糖尿病・代謝内科の門脇孝教授、窪田直人准教授、高本偉碩特任講師に、深く御礼申し上げます。

実験の補佐をしていただいた、自然科学研究機構 生理学研究所、生体機能調節領域 細胞構造研究部門、古瀬研究室の菅原太一特任助教に深く御礼申し上げます。

実験の補佐をしていただいた野口誉之助教を筆頭に、様々な形で研究に協力して下さった村田研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。

私の研究を支えてくれた家族、特に T1D を患いながらも日々の生活を支え続けてくれた妻に、心より感謝します。

第5章 参考文献

- Abel, A. M., Schuldt, K. M., Rajasekaran, K., Hwang, D., Riese, M. J., Rao, S., ... Malarkannan, S. (2015). IQGAP1: Insights into the function of a molecular puppeteer. *Molecular Immunology*, 65(2), 336–349. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.012>
- Ahn, C., An, B.-S., & Jeung, E.-B. (2015). Streptozotocin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis via disruption of calcium homeostasis in mouse pancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 302–308. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.017>
- Alejandro, E. U., & Johnson, J. D. (2008). Inhibition of Raf-1 Alters Multiple Downstream Pathways to Induce Pancreatic β -Cell Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4), 2407–2417. <http://doi.org/10.1074/jbc.M703612200>
- Ali, M. Y., Whiteman, M., Low, C. M., & Moore, P. K. (2007). Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a K_{ATP} channel-dependent pathway. *Journal of Endocrinology*, 195, 105–112. <http://doi.org/10.1677/JOE-07-0184>
- Allan, L. A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., & Clarke, P. R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biology*, 5(7), 647–654. <http://doi.org/10.1038/ncb1005>
- Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W. J., Jiang, J., Boxer, M. B., Hong, B. S., ... Vander Heiden, M. G. (2012). Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 839–847. <http://doi.org/10.1038/nchembio.1060>
- Arntfield, M. E., & van der Kooy, D. (2011). β -Cell evolution: How the pancreas borrowed from the brain. *Bioessays*, 33(8), 582–587. <http://doi.org/10.1002/bies.201100015>
- Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ämmälä, C., Bokvist, K., & Rorsman, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells. *J Cell Biochem*, 55S, 54–65. <http://doi.org/10.1002/jcb.240550007>
- Bacha, F., Lee, S., Gungor, N., & Arslanian, S. A. (2010). From pre-diabetes to type 2 diabetes in obese youth: pathophysiological characteristics along the spectrum of glucose dysregulation. *Diabetes Care*, 33(10), 2225–2231. <http://doi.org/10.2337/dc10-0004>
- Back, S. H., & Kaufman, R. J. (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 767–793. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-095555>

- Baljuls, A., Mueller, T., Drexler, H. C. A., Hekman, M., & Rapp, U. R. (2007). Unique N-region determines low basal activity and limited inducibility of A-RAF kinase: The role of N-region in the evolutionary divergence of RAF kinase function in vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26575–26590. <http://doi.org/10.1074/jbc.M702429200>
- Bansal, P., & Wang, Q. (2008). Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(4), E751–E761. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.90295.2008>
- Botros, N., Concato, J., Mohsenin, V., Selim, B., Doctor, K., & Yaggi, H. K. (2009). Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes. *The American Journal of Medicine*, 122(12), 1122–1127. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.04.026>
- Boxer, M. B., Jiang, J., Vander Heiden, M. G., Shen, M., Skoumbourdis, A. P., Southall, N., ... Thomas, C. J. (2010). Evaluation of substituted *N,N'*-diarylsulfonamides as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(3), 1048–1055. <http://doi.org/10.1021/jm901577g>
- Bratanova-Tochkova, T. K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y.-J., Mulvaney-Musa, J., ... Sharp, G. W. G. (2002). Triggering and augmentation mechanism, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*, 51(suppl 1), S83–S90. <http://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S83>
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(1), 102–110. <http://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102>
- Carbonell, J., Felú, J. E., Marco, R., & Sols, A. (1973). Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues. *European Journal of Biochemistry*, 37(1), 148–156.
- Chaneton, B., Hillmann, P., Zheng, L., Martin, A. C. L., Maddocks, O. D. K., Chokkathukalam, A., ... Gottlieb, E. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*, 491(7424), 458–462. <http://doi.org/10.1038/nature11540>
- Chen, J., Jiang, Z., Wang, B., Wang, Y., & Hu, X. (2012). Vitamin K₃ and K₅ are inhibitors of tumor pyruvate kinase M2. *Cancer Letters*, 316(2), 204–210. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.039>

- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., ... Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, *452*(7184), 230–233.
<http://doi.org/10.1038/nature06734>
- Cintra, F., Tufik, S., D'Almeida, V., Calegare, B. F. A., de Paola, A., Oliveira, W., ... Poyares, D. (2011). Cysteine: a potential biomarker for obstructive sleep apnea. *Chest*, *139*(2), 246–252.
<http://doi.org/10.1378/chest.10-0667>
- Clower, C. V., Chatterjee, D., Wang, Z., Cantley, L. C., Vander Heiden, M. G., & Krainer, A. R. (2010). The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 1894–1899. <http://doi.org/10.1073/pnas.0914845107>
- David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., & Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, *463*(7279), 364–368.
<http://doi.org/10.1038/nature08697>
- Del Prato, S., & Tiengo, A. (2001). The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, *17*(3), 164–74. <http://doi.org/10.1002/dmrr.198>
- Desideri, E., Cavallo, A. L., & Baccarini, M. (2015). Alike but different: RAF paralogs and their signaling outputs. *Cell*, *161*(5), 967–970. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.045>
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., & Düfer, M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *460*(4), 703–718.
<http://doi.org/10.1007/s00424-010-0862-9>
- Eehalt, F., Knoch, K.-P., Erdmann, K., Krautz, C., Jäger, M., Steffen, A., ... Solimena, M. (2010). Impaired insulin turnover in islets from type 2 diabetic patients. *Islets*, *2*(1), 30–36.
<http://doi.org/10.4161/isl.2.1.10098>
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, *29*(1), 42–61. <http://doi.org/10.1210/er.2007-0015>

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Elshorbagy, A. K., Kozich, V., Smith, A. D., & Refsum, H. (2012). Cysteine and obesity: consistency of the evidence across epidemiologic, animal and cellular studies. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(1), 49–57. <http://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834d199f>
- Fehse, F., Trautmann, M., Holst, J. J., Halseth, A. E., Nanayakkara, N., Nielsen, L. L., ... Nauck, M. A. (2005). Exenatide augments first- and second-phase insulin secretion in response to intravenous glucose in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(11), 5991–5997. <http://doi.org/10.1210/jc.2005-1093>
- Fiehn, O., Timothy Garvey, W., Newman, J. W., Lok, K. H., Hoppel, C. L., & Adams, S. H. (2010). Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS ONE*, 5(12), e15234. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015234>
- Fonseca, S. G., Gromada, J., & Urano, F. (2011). Endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell death. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(7), 266–74. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2011.02.008>
- Fransson, U., Rosengren, A. H., Schuit, F. C., Renström, E., & Mulder, H. (2006). Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 49(7), 1578–1586. <http://doi.org/10.1007/s00125-006-0263-y>
- Fu, Z., Gilbert, E. R., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53. <http://doi.org/10.2174/157339913804143225>
- Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X., & Liu, Z.-R. (2012). Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Molecular Cell*, 45(5), 598–609. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.001>
- Goldberg, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 217–224. <http://doi.org/10.1084/jem.20111487>

- Guo, S. (2014). Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: Insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T1–T23.
<http://doi.org/10.1530/JOE-13-0327>
- Hart, M. J., Callow, M. G., Souza, B., & Polakis, P. (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *The EMBO Journal*, 15(12), 2997–3005.
- Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49(11), 1751–1760. <http://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1751>
- Henquin, J. C. (2009). Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*, 52(5), 739–751. <http://doi.org/10.1007/s00125-009-1314-y>
- Henquin, J. C., & Meissner, H. P. (1984). Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia*, 40(10), 1043–1052.
<http://doi.org/10.1007/BF01971450>
- Herrmann, W., Schorr, H., Obeid, R., Makowski, J., Fowler, B., & Kuhlmann, M. K. (2005). Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes. *Clinical Chemistry*, 51(5), 891–897. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2004.044453>
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 89–102. <http://doi.org/10.1038/nrm3270>
- Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M. G., Chung, T.-W., Elf, S., Lythgoe, K., ... Chen, J. (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Science Signaling*, 2(97), ra73. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2000431>
- Hoshino, A., Hirst, J. A., & Fujii, H. (2007). Regulation of cell proliferation by interleukin-3-induced nuclear translocation of pyruvate kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17706–17711. <http://doi.org/10.1074/jbc.M700094200>
- Hosios, A. M., Fiske, B. P., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G. (2015). Lack of evidence for PKM2 protein kinase activity. *Molecular Cell*, 59(5), 850–857.
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.013>

- Hou, J. C., Min, L., & Pessin, J. E. (2009). Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. *Vitam Horm*, 80, 473–506. [http://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00616-X](http://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00616-X).Insulin
- International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas Eighth edition*.
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P. A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., & Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific Reports*, 5, 14634. <http://doi.org/10.1038/srep14634>
- Ishihara, K., Kanai, S., Sago, H., Yamakawa, K., & Akiba, S. (2014). Comparative proteomic profiling reveals aberrant cell proliferation in the brain of embryonic Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome. *Neuroscience*, 281, 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.039>
- Israelsen, W. J., Dayton, T. L., Davidson, S. M., Fiske, B. P., Hosios, A. M., Bellinger, G., ... Vander Heiden, M. G. (2013). PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell*, 155(2), 397–409. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.025>
- Jain, S. K., Velusamy, T., Croad, J. L., Rains, J. L., & Bull, R. (2009). L-Cysteine supplementation lowers blood glucose, glycated hemoglobin, CRP, MCP-1, and oxidative stress and inhibits NF-κB activation in the livers of Zucker diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(12), 1633–1638. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.014>
- Jiang, C. C., Chen, L. H., Gillespie, S., Wang, Y. F., Kiejda, K. A, Zhang, X. D., & Hersey, P. (2007). Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Research*, 67(20), 9750–9761. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2047>
- Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J. C., & MacDonald, M. J. (2010). Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia*, 53(6), 1019–1032. <http://doi.org/10.1007/s00125-010-1685-0>
- Julian, D., Statile, J. L., Wohlgemuth, S. E., & Arp, A. J. (2002). Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(1), 105–115. [http://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00122-8](http://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00122-8)

- Kahn, C. R. (1994). Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43(8), 1066–1085. <http://doi.org/10.2337/diab.43.8.1066>
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, 383(9922), 1068–1083. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
- Kaneko, Y., Kimura, T., Taniguchi, S., Souma, M., Kojima, Y., Kimura, Y., ... Niki, I. (2009). Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Letters*, 583(2), 377–382. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.026>
- Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., & Niki, I. (2006). L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*, 55(5), 1391–1397. <http://doi.org/10.2337/db05-1082>
- Kędryna, T., Gumińska, M., & Marchut, E. (1983). The inhibitory effect of L-cysteine and its derivatives on glycolysis in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 763(1), 64–71. [http://doi.org/10.1016/0167-4889\(83\)90026-5](http://doi.org/10.1016/0167-4889(83)90026-5)
- Kinoshita, E., Takahashi, M., Takeda, H., Shiro, M., & Koike, T. (2004). Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc (II) complex. *Dalton Transactions*, 8, 1189–1193. <http://doi.org/10.1039/b400269e>
- Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., ... Wojcik, A. (2003). A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research*, 534(1-2), 15–20. [http://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00251-6](http://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00251-6)
- Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Biochemistry*, 259(1-2), 3–17. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00043.x>
- Leibiger, I. B., Leibiger, B., & Berggren, P.-O. (2008). Insulin signaling in the pancreatic β -cell. *Annual Review of Nutrition*, 28, 233–251. <http://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155530>

- Lembert, N., Joos, H. C., Idahl, L.-Å., Ammon, H. P. T., & Wahl, M. A. (2001). Methyl pyruvate initiates membrane depolarization and insulin release by metabolic factors other than ATP. *Biochemical Journal*, 354(Pt 2), 345–350. <http://doi.org/10.1042/bj3540345>
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479–489. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Liu, Y., Mziaut, H., Ivanova, A., & Solimena, M. (2009). β -Cells at the crossroads: choosing between insulin granule production and proliferation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11(SUPPL. 4), 54–64. <http://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01107.x>
- Lunt, S. Y., Muralidhar, V., Hosios, A. M., Israelsen, W. J., Gui, D. Y., Newhouse, L., ... Vander Heiden, M. G. (2015). Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation. *Molecular Cell*, 57(1), 95–107. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.027>
- Macdonald, M. J., & Chang, C.-M. (1985). Pancreatic islets contain the M₂ isoenzyme of pyruvate kinase. Its phosphorylation has no effect on enzyme activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 68(2), 115–120.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., & Marshall, C. J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4378–4383. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4378>
- Marselli, L., Thorne, J., Dahiya, S., Sgroi, D. C., Sharma, A., Bonner-Weir, S., ... Weir, G. C. (2010). Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS ONE*, 5(7), e11499. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011499>
- Martens, G. A., Jiang, L., Verhaeghen, K., Connolly, J. B., Geromanos, S. G., Stangé, G., ... Gorus, F. K. (2010). Protein markers for insulin-producing beta cells with higher glucose sensitivity. *PLoS ONE*, 5(12), e14214. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014214>
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., & Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes & Cancer*, 2(3), 232–260. <http://doi.org/10.1177/1947601911407323>

- Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 969–980.
<http://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.005>
- Mazurek, S., Drexler, H. C. A., Troppmair, J., Eigenbrodt, E., & Rapp, U. R. (2007). Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible glycolytic stop or go mechanism. *Anticancer Research*, 27(6 B), 3963–3971.
- Meier, J. J., & Bonadonna, R. C. (2013). Role of reduced β -cell mass versus impaired β -cell function in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 36(SUPPL.2), S113–S119.
<http://doi.org/10.2337/dcS13-2008>
- Meucci, O., Grimaldi, M., Scorziello, A., Govoni, S., Bergamaschi, S., Yasumoto, T., & Schettini, G. (1992). Maitotoxin-induced intracellular calcium rise in PC12 cells: involvement of dihydropyridine-sensitive and omega-conotoxin-sensitive calcium channels and phosphoinositide breakdown. *J Neurochem*, 59(2), 679–688. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09422.x>
- Montane, J., Cadavez, L., & Novials, A. (2014). Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 25–34. <http://doi.org/10.2147/DMSO.S37649>
- Morfouace, M., Lalier, L., Oliver, L., Cheray, M., Pecqueur, C., Cartron, P.-F., & Vallette, F. M. (2014). Control of glioma cell death and differentiation by PKM2-Oct4 interaction. *Cell Death & Disease*, 5, e1036. <http://doi.org/10.1038/cddis.2013.561>
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., & Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34287–34294.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M204973200>
- Nakatsu, D., Kano, F., Taguchi, Y., Sugawara, T., Nishizono, T., Nishikawa, K., ... Murata, M. (2014). JNK1/2-dependent phosphorylation of angulin-1/LSR is required for the exclusive localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts in Eph4 epithelial sheet. *Genes to Cells*, 19(7), 565–581. <http://doi.org/10.1111/gtc.12158>

- Noguchi, T., Inoue, H., & Tanaka, T. (1986). The M₁- and M₂-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 261(29), 13807–13812.
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078. <http://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
- Oyadomari, S., Araki, E., & Mori, M. (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic β -cells. *Apoptosis*, 7(4), 335–345. <http://doi.org/10.1023/A:1016175429877>
- Panasyuk, G., Espeillac, C., Chauvin, C., Pradelli, L. A., Horie, Y., Suzuki, A., ... Pende, M. (2012). PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nature Communications*, 3, 672. <http://doi.org/10.1038/ncomms1667>
- Papa, F. R. (2012). Endoplasmic reticulum stress, pancreatic β -cell degeneration, and diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(9), a007666. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a007666>
- Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6), a008672. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008672>
- Poitout, V., Stout, L. E., Armstrong, M. B., Walseth, T. F., Sorenson, R. L., & Robertson, R. P. (1995). Morphological and functional characterization of β TC-6 cells—an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice. *Diabetes*, 44(3), 306–313. <http://doi.org/10.2337/diab.44.3.306>
- Potter, K. J., Westwell-Roper, C. Y., Klimek-Abercrombie, A. M., Warnock, G. L., & Verchere, C. B. (2014). Death and dysfunction of transplanted β -cells: Lessons learned from type 2 diabetes? *Diabetes*, 63(1), 12–19. <http://doi.org/10.2337/db12-0364>
- Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Islet β cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1802–1812. <http://doi.org/10.1172/JCI29103>
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2012). Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids*, 42(4), 1087–1096. <http://doi.org/10.1007/s00726-010-0782-1>
- Rauch, J., O'Neill, E., Mack, B., Matthias, C., Munz, M., Kolch, W., & Gires, O. (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by

- regulating A-Raf transcription. *Cancer Research*, 70(4), 1679–1688.
<http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2740>
- Rauch, J., Vandamme, D., Mack, B., McCann, B., Volinsky, N., Blanco, A., ... Kolch, W. (2016). Differential localization of A-Raf regulates MST2-mediated apoptosis during epithelial differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 23(8), 1283–1295.
<http://doi.org/10.1038/cdd.2016.2>
- Rech, V. C., Feksa, L. R., Fleck, R. M. M., Athaydes, G. A., Dornelles, P. K. B., Rodrigues-Junior, V., & Wannmacher, C. M. D. (2008). Cysteamine prevents inhibition of thiol-containing enzymes caused by cystine or cystine dimethylester loading in rat brain cortex. *Metabolic Brain Disease*, 23(2), 133–145. <http://doi.org/10.1007/s11011-008-9081-x>
- Rorsman, P., & Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46(8), 1029–1045. <http://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>
- Scheuner, D., & Kaufman, R. J. (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with β -cell failure and diabetes. *Endocrine Reviews*, 29(3), 317–333.
<http://doi.org/10.1210/er.2007-0039>
- Schmitz, O., Rungby, J., Edge, L., & Juhl, C. B. (2008). On high-frequency insulin oscillations. *Ageing Research Reviews*, 7(4), 301–305. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2008.04.002>
- Seino, S., Iwanaga, T., Nagashima, K., & Miki, T. (2000). Diverse roles of K_{ATP} channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes*, 49(3), 311–318.
<http://doi.org/10.2337/diabetes.49.3.311>
- Seino, S., Shibasaki, T., & Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clinical Investigation*, 121(6), 2118–2125.
<http://doi.org/10.1172/JCI45680>
- Shinohara, H., Taniguchi, K., Kumazaki, M., Yamada, N., Ito, Y., Otsuki, Y., ... Akao, Y. (2015). Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. *Cancer Letters*, 360(1), 28–38. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.039>

- Shirakawa, J., Togashi, Y., Sakamoto, E., Kaji, M., Tajima, K., Orime, K., ... Terauchi, Y. (2013). Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *Diabetes*, 62(10), 3448–3458. <http://doi.org/10.2337/db13-0052>
- Soergel, D. G., Gusovsky, F., Yasumoto, T., & Daly, J. W. (1990). Stimulatory effects of maitotoxin on insulin release in insulinoma HIT cells: role of calcium uptake and phosphoinositide breakdown. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 255(3), 1360–1365.
- Soergel, D. G., Yasumoto, T., Daly, J. W., & Gusovsky, F. (1992). Maitotoxin effects are blocked by SK&F 96365, an inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Molecular Pharmacology*, 41(3), 487–493.
- Steták, A., Veress, R., Ovádi, J., Csermely, P., Kéri, G., & Ullrich, A. (2007). Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Research*, 67(4), 1602–1608. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2870>
- Straub, S. G., & Sharp, G. W. G. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 18(6), 451–463. <http://doi.org/10.1002/dmrr.329>
- Sugawara, T., Kano, F., & Murata, M. (2014). Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. *Scientific Reports*, 4, 6952. <http://doi.org/10.1038/srep06952>
- Sun, Y., Zhao, X., Luo, M., Zhou, Y., Ren, W., Wu, K., ... Hu, Y. (2014). The pro-apoptotic role of the regulatory feedback loop between miR-124 and PKM1/HNF4 α in colorectal cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4318–4332. <http://doi.org/10.3390/ijms15034318>
- Takamoto, I., Kubota, N., Nakaya, K., Kumagai, K., Hashimoto, S., Kubota, T., ... Kadowaki, T. (2014). TCF7L2 in mouse pancreatic beta cells plays a crucial role in glucose homeostasis by regulating beta cell mass. *Diabetologia*, 57(3), 542–553. <http://doi.org/10.1007/s00125-013-3131-6>
- Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L., & Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca²⁺ channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 56(3), 533–541. <http://doi.org/10.1007/s00125-012-2806-8>

- Taniguchi, K., Sugito, N., Kumazaki, M., Shinohara, H., Yamada, N., Matsushashi, N., ... Akao, Y. (2015). Positive feedback of DDX6/c-Myc/PTB1 regulated by miR-124 contributes to maintenance of the Warburg effect in colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1971–1980. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.022>
- Valentini, G., Chiarelli, L., Fortin, R., Speranza, M. L., Galizzi, A., & Mattevi, A. (2000). The allosteric regulation of pyruvate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18145–18152. <http://doi.org/10.1074/jbc.M001870200>
- Vandewalle, B., Moerman, E., Lefebvre, B., Defrance, F., Gmyr, V., Lukowiak, B., ... Pattou, F. (2008). PPAR γ -dependent and -independent effects of Rosiglitazone on lipotoxic human pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(4), 1096–1101. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.088>
- Viana, R., Lujan, P., & Sanz, P. (2015). The laforin/malin E3-ubiquitin ligase complex ubiquitinates pyruvate kinase M1/M2. *BMC Biochemistry*, 16, 24. <http://doi.org/10.1186/s12858-015-0053-6>
- Villani, V., Milanese, A., Sedrakyan, S., Da Sacco, S., Angelow, S., Conconi, M. T., ... Perin, L. (2014). Amniotic fluid stem cells prevent β -cell injury. *Cytotherapy*, 16(1), 41–55. <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.08.010>
- Wajchenberg, B. L. (2007). β -Cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocrine Reviews*, 28(2), 187–218. <http://doi.org/10.1210/10.1210/er.2006-0038>
- Wali, J. A., Masters, S. L., & Thomas, H. E. (2013). Linking metabolic abnormalities to apoptotic pathways in Beta cells in type 2 diabetes. *Cells*, 2(2), 266–283. <http://doi.org/10.3390/cells2020266>
- Wan, C., Borgeson, B., Phanse, S., Tu, F., Drew, K., Clark, G., ... Emili, A. (2015). Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes. *Nature*, 525(7569), 339–344. <http://doi.org/10.1038/nature14877>
- Wang, Z., & Thurmond, D. C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of Cell Science*, 122(7), 893–903. <http://doi.org/10.1242/jcs.034355>

- Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2013). Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), 92–105.
<http://doi.org/10.1111/nyas.12031>
- Wu, X., Noh, S. J., Zhou, G., Dixon, J. E., & Guan, K.-L. (1996). Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(6), 3265–3271. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.6.3265>
- Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., & Wang, R. (2005). Activation of K_{ATP} channels by H_2S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of Physiology*, 569(Pt 2), 519–531. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097642>
- Yang, W., Zheng, Y., Xia, Y., Ji, H., Chen, X., Guo, F., ... Lu, Z. (2012). ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nature Cell Biology*, 14(12), 1295–1304. <http://doi.org/10.1038/ncb2629>
- Yilmaz, S., Ozan, S., & Ozercan, I. H. (2003). Comparison of pyruvate kinase variants from breast tumor and normal breast. *Archives of Medical Research*, 34(4), 315–324.
[http://doi.org/10.1016/S0188-4409\(03\)00054-7](http://doi.org/10.1016/S0188-4409(03)00054-7)
- Yu, X.-H., Cui, L.-B., Wu, K., Zheng, X.-L., Cayabyab, F. S., Chen, Z.-W., & Tang, C.-K. (2014). Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clinica Chimica Acta*, 437, 78–87.
<http://doi.org/10.1016/j.cca.2014.07.012>
- Yuryev, A., & Wennogle, L. P. (2003). Novel Raf kinase protein-protein interactions found by an exhaustive yeast two-hybrid analysis. *Genomics*, 81(2), 112–125.
[http://doi.org/10.1016/S0888-7543\(02\)00008-3](http://doi.org/10.1016/S0888-7543(02)00008-3)
- 原崇, & 浦野文彦. (2014). 小胞体ストレスと β 細胞死 β 細胞死の抑制を目指した創薬アプローチ. *日薬理誌*, 144, 53–58.
- 仁木一郎, & 金子雪子. (2006). L-システイン代謝と硫化水素 (H_2S) : インスリン分泌を抑制するシグナリング. *日薬理誌*, 128, 214–218.
- 清野裕, 南條輝志男, 田嶋尚子, 門脇孝, 柏木厚典, 荒木栄一, ... 植木浩二郎. (2010). 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病*, 53(6), 450–467.

八木橋操六, 寺内康夫, 森豊, 池上博司, & 佐藤譲. (2010). 実験動物における糖尿病の診断基準について. 糖尿病, 53(5), 379–384.

第 6 章 図表

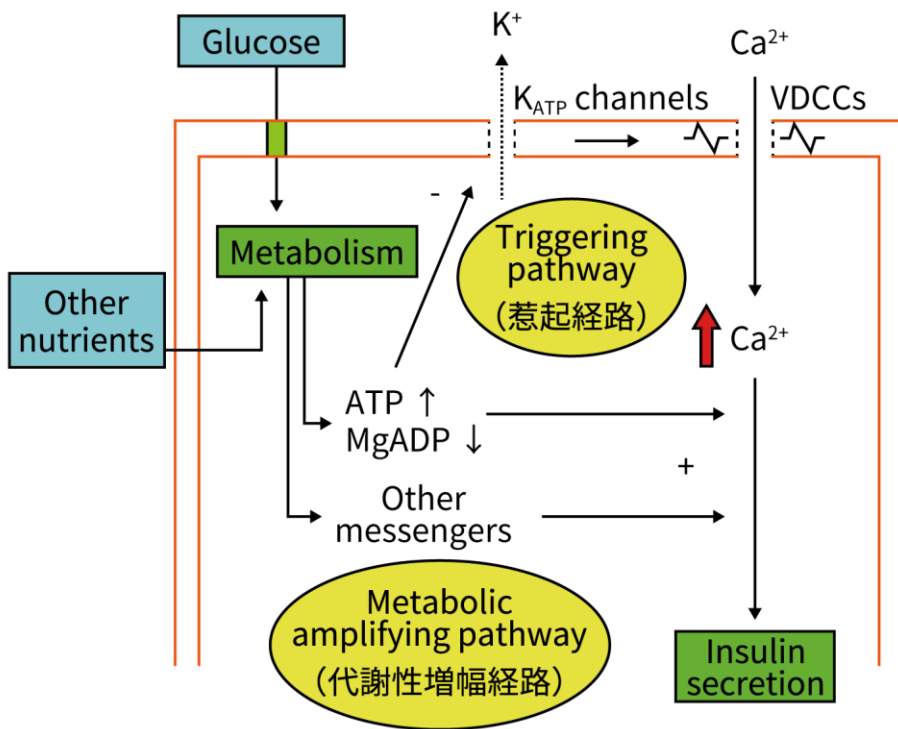
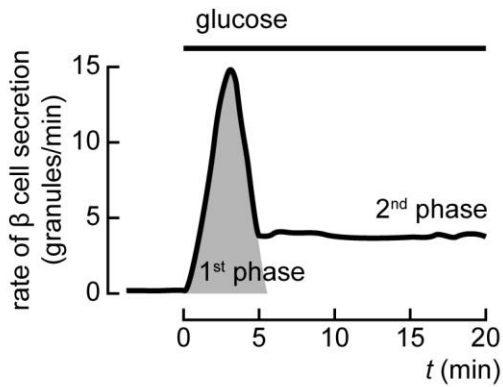


図 A グルコース刺激誘導性インスリン分泌の概略図

(Henquin, 2009; Fig.1 を基に作成、一部改変)

細胞に取り込まれたグルコースは代謝され、ATP やその他の代謝産物が産生される。ATP の産生量が増加することで、細胞内の ATP/ADP 比が上昇して K_{ATP} チャンネルが閉口する。この K_{ATP} チャンネルの閉口により生じる脱分極が原因となって VDCCs が開口し、カルシウムイオンが流入して細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇、インスリンの分泌が生じる (Triggering pathway, 惹起経路)。また、代謝により生じた産物は惹起経路によるインスリン分泌を増幅する (Metabolic amplifying pathway, 代謝性増幅経路)。

(i)



(ii)

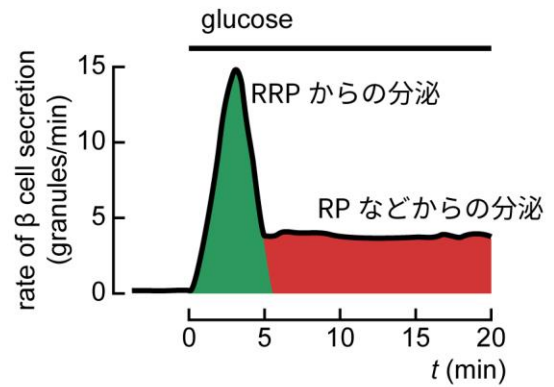


図 B グルコース刺激誘導性インスリン分泌の二相性

(Rorsman and Renström, 2003; Fig.2A 及び Fig.5A を基に作成、一部改変)

(i) GSIS においては、グルコース刺激から 5 分以内に生じる第一相の分泌と、その後に長く続く緩やかな第二相の分泌が観察できる。

(ii) 第一相において分泌されるインスリン顆粒は RRP (readily releasable pool) に由来するものと考えられており、この分泌が終わると、細胞膜から離れた位置にあったインスリン分泌顆粒が細胞膜の近くへと移動して分泌される。第二相の分泌においては、RP (reserve pool) などに由来する顆粒が分泌されていると考えられている。

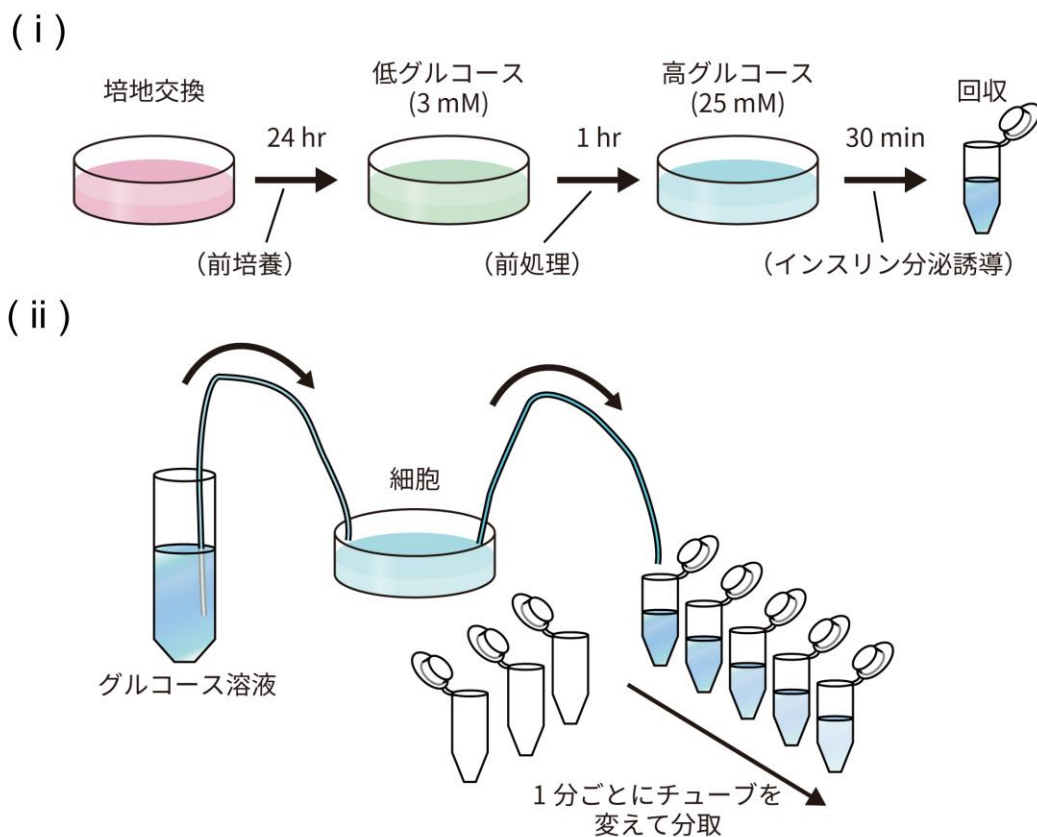


図 C 本研究におけるインスリン分泌実験の基本プロトコル

(i) 非灌流系におけるインスリン分泌実験の概要。培地中で 24 時間の前培養を行った後、低グルコース溶液 (3G-KRBB) 中で 1 時間の前処理を行い、更に高グルコース溶液 (25G-KRBB) 中で 30 分間のインスリン分泌誘導を行った。ただし、用いる溶液等の条件は実験により異なる。

(ii) 灌流系におけるインスリン分泌実験の概略。非灌流系と同様に 24 時間の前培養、30 分間の前処理を行った後、灌流系に細胞を移した。灌流系では、ポンプを用いて細胞に溶液を供給し続けるとともに、ディッシュから溶液を回収し続けた。30 分間低グルコース溶液 (3G-KRBB) を流して灌流培養を行った後、溶液を高グルコース溶液 (12G-KRBB) に変え、更に 30 分間灌流培養を行った。溶液を 1 分ごとに別のチューブに分取することで、経時的なサンプルを得た。

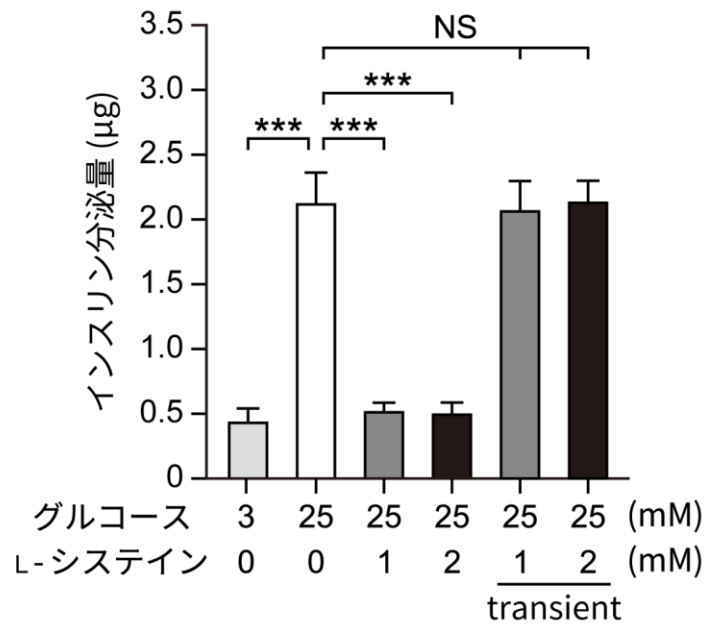


図1 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞におけるGSISを抑制する

MIN6細胞について、培地中で24時間の前培養、3G-KRBB中で1時間の前処理を行った後、30分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時のグルコース濃度は図中の‘グルコース’に示す通りで、3G-KRBBまたは25G-KRBBを用いた。

また、L-システインを添加したサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、図中の‘L-システイン’に記載されている濃度のL-システインを溶液に加えた。

ただし‘transient’のサンプルについては、前培養と前処理の間はL-システインを含まない溶液で培養を行い、インスリン分泌誘導時のみ記載の濃度のL-システインを含む溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。NS $P > 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

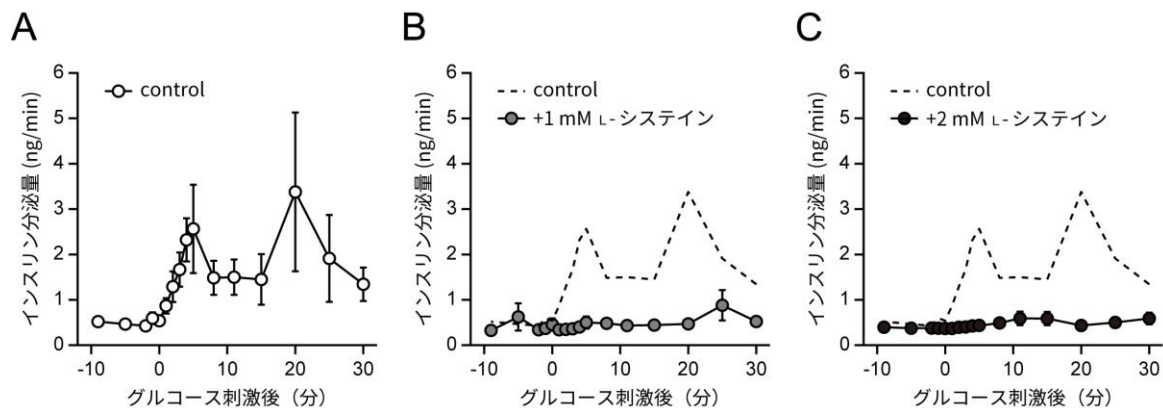


図2 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞における二相性のGSISを抑制する

MIN6細胞について、培地中で24時間の前培養、3G-KRBB中で30分間の前処理を行った後、灌流培養系において更に3G-KRBBを用いた30分間の前処理と、12G-KRBBを用いた30分間のインスリン分泌誘導を行った。溶液が12G-KRBBに変わった時間を0分とし、インスリン分泌量の経時変化をグラフに表した。

(A) L-システインを含まない状態におけるインスリン分泌量（‘control’）。

(B) 1 mMのL-システインを前培養時から加え続けた際の実験結果（‘+1 mM L-システイン’）。点線で示した‘control’は(A)の結果と同一。

(C) 2 mMのL-システインを前培養時から加え続けた際の実験結果（‘+2 mM L-システイン’）。点線で示した‘control’は(A)の結果と同一。

結果は平均値±標準誤差で表した（ $n = 6$ each）。

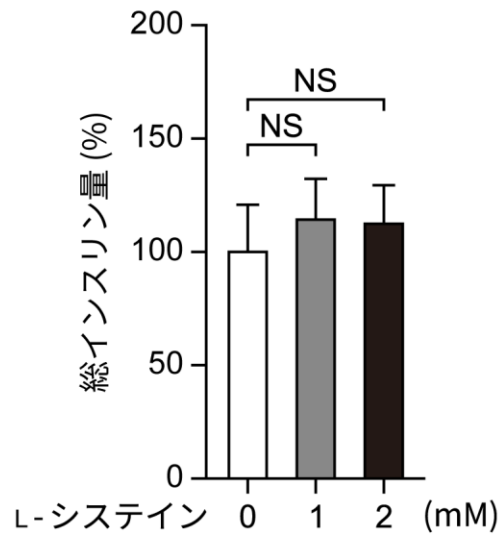
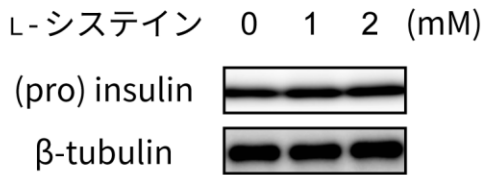


図3 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞内の総インスリン量に影響を与えない

MIN6細胞について、L-システインを0、1、2 mM含む培地中で24時間の前培養を行った後に細胞内の総インスリン量を測定した。

測定された総インスリン量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、L-システインを含まない(0 mM)サンプルの平均値を100%とした際の割合で表した ($n = 5$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

A



B

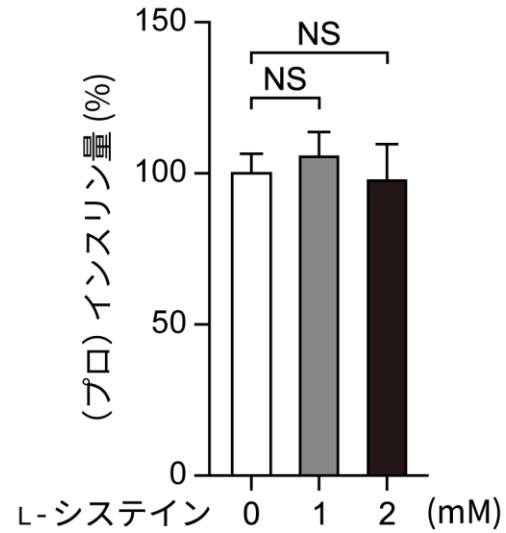


図4 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞内の(プロ)インスリン量に影響を与えない

(A) MIN6細胞について、L-システインを0、1、2 mM含む培地中で24時間の前培養を行った後に、インスリンとプロインスリンをどちらも認識する抗体（‘(pro) insulin’）を用いてウェスタンブロッティングを行い、細胞内の(プロ)インスリンの存在量を比較した。なお、 β -tubulinを内部標準として用いた。

(B) 測定された(プロ)インスリン量は、各サンプルの β -tubulin量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、L-システインを含まない(0 mM)サンプルの平均値を100%とした際の割合で表した ($n = 5$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

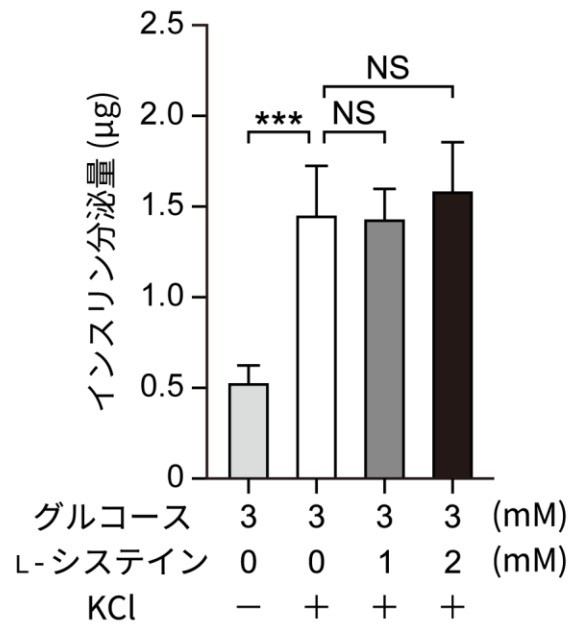


図 5 長時間の L-システイン添加は MIN6 細胞におけるカリウムイオン誘導性インスリン分泌に影響を与えない

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB または高濃度のカリウムイオンを含む溶液 (High-K solution、'KCl') を用いた。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。NS $P > 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

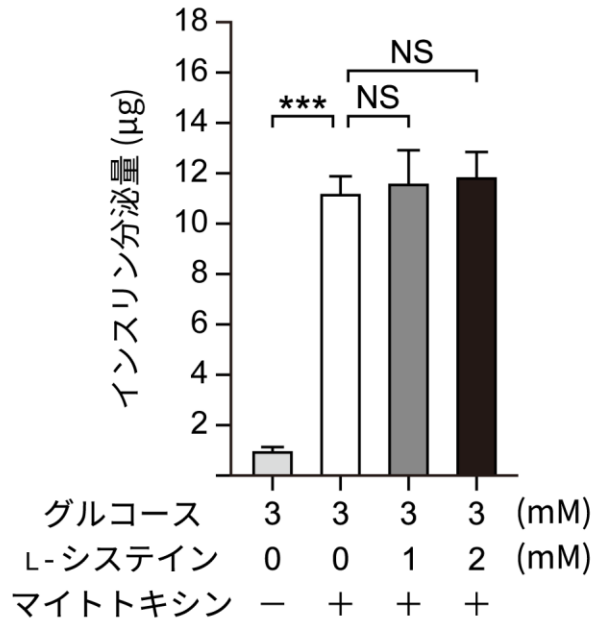


図 6 長時間の L-システイン添加は MIN6 細胞におけるマイトトキシシン誘導性インスリン分泌に影響を与えない

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB または 3G-KRBB に 10 ng/ml のマイトトキシシンを加えた溶液を用いた。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。NS $P > 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

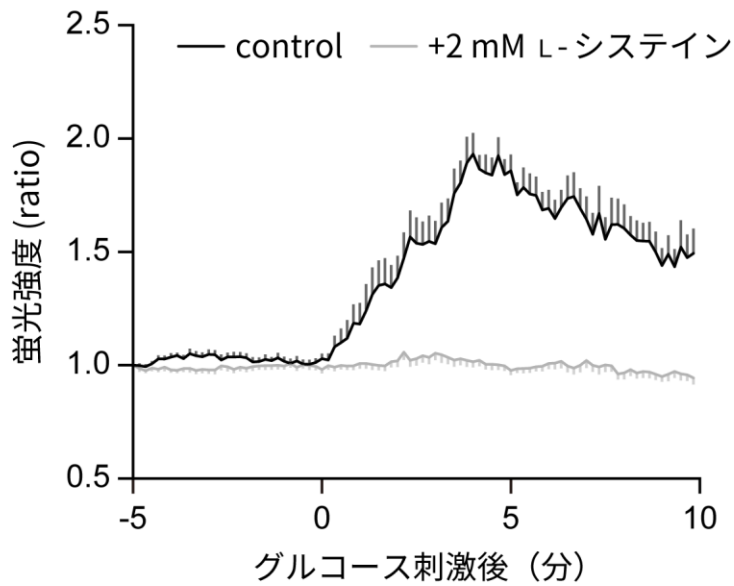


図7 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞における細胞内へのカルシウムイオン流入を抑制する

MIN6細胞について、培地中で24時間の前培養、3G-KRBB中で1時間の前処理を行った後、25G-KRBBを用いてインスリン分泌誘導を行った。なお、前処理の間にカルシウムイオンを認識するFluo 4-AMを加えた。細胞を顕微鏡のステージに乗せ、10秒ごとに細胞の画像を取得しつつ、その状態のまま溶液を25G-KRBBに変えることで高グルコース刺激時の細胞内カルシウムイオン量の変化を測定した。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、2 mMのL-システインを加えた溶液を用いた。

なお蛍光強度は一細胞ごとに測定し、得られた蛍光強度を細胞の面積で割った値を用いた。25G-KRBBを加えた時間を0分とし、グルコース刺激の5分前(-5分)における各細胞の蛍光強度を1として、各経過時間における平均値±標準誤差をグラフに表した($n=15-23$)。

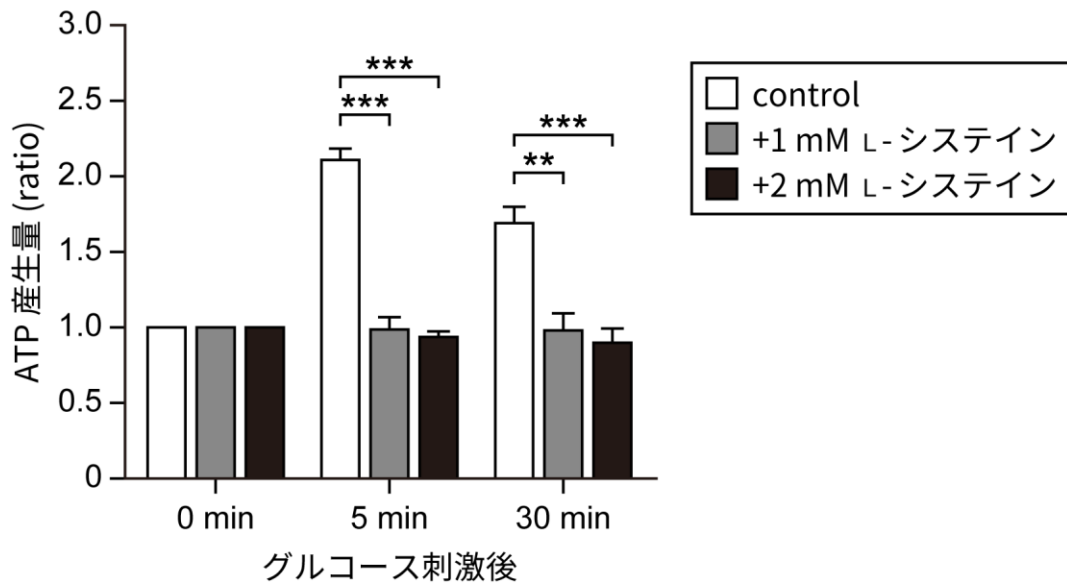


図8 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞におけるグルコース刺激時の一時的なATP産生量増加を抑制する

MIN6細胞について、培地中で24時間の前培養、3G-KRBB中で1時間の前処理を行った後、25G-KRBBを用いてインスリン分泌誘導を行った。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、1または2 mMのL-システインを加えた溶液を用いた。

インスリン分泌誘導前(0分)、誘導後5分、30分において細胞を回収し、細胞中のATP量を測定した。測定されたATP産生量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、各サンプルの0分における平均値を1とした時の比で表した($n = 6$ each)。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

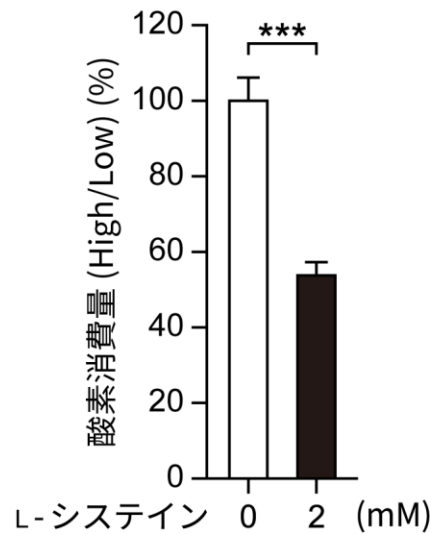


図 9 長時間の L-システイン添加は MIN6 細胞におけるグルコース刺激時の酸素消費量を低下させる

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、細胞をチャンバーに移し、酸素消費量を測定した。測定を続けながら、最終濃度が 25 mM となるように高濃度のグルコースを含む KRBB を加えてインスリン分泌誘導を行った。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。

25G-KRBB となった間の酸素消費量の平均を、3G-KRBB でおいた間の酸素消費量の平均と比べ、その増加の度合いを確かめた。測定された酸素消費量は、計算の前に各サンプルのタンパク質量で補正を行った。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、L-システインを含まない (0 mM) サンプルにおける酸素消費量比の平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 6$ each)。*** $P < 0.001$ 。

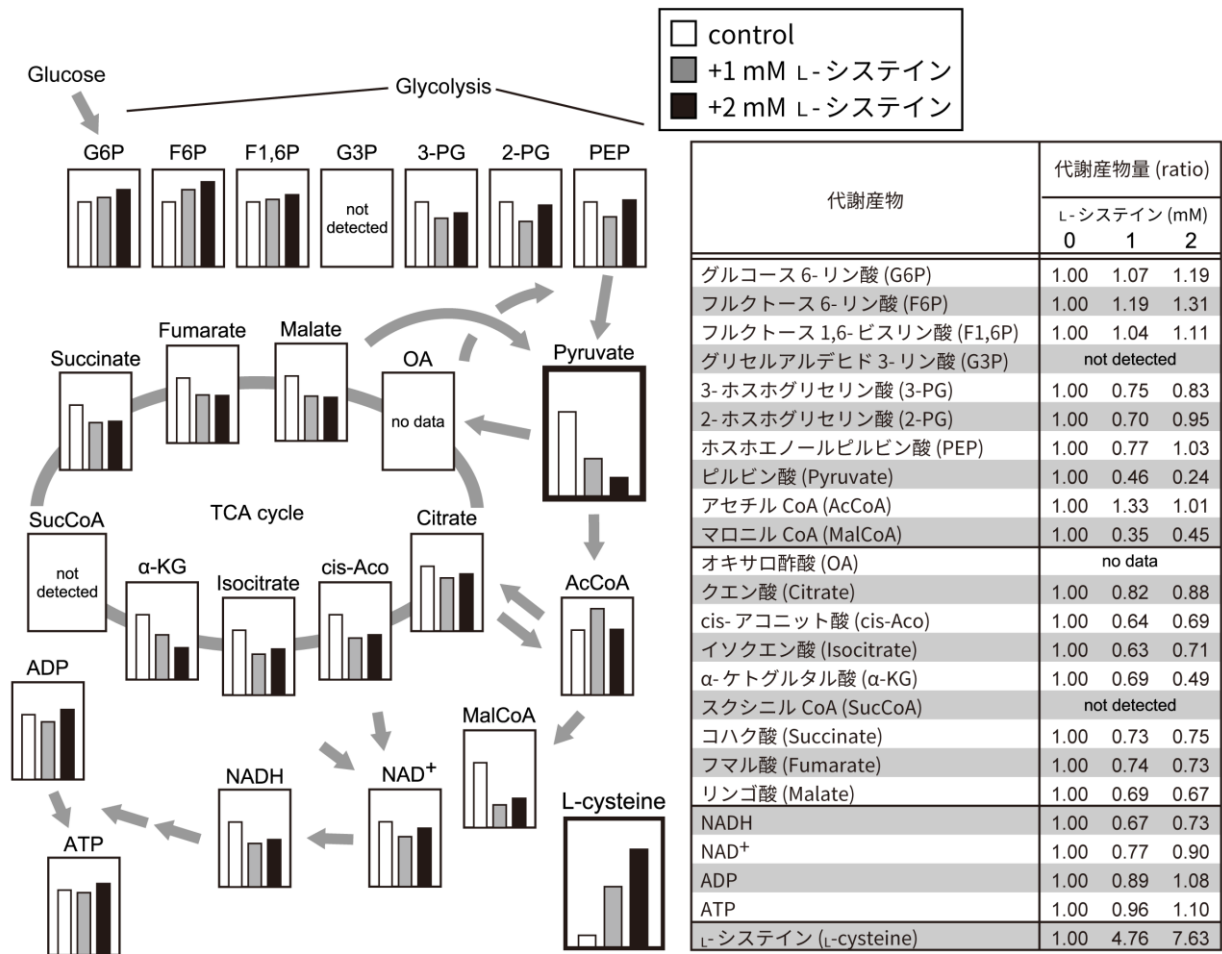


図 10 MIN6 細胞において長時間 L-システインを添加した際のメタボローム解析結果

MIN6 細胞について、L-システインを 0、1、2 mM 含む培地中で 24 時間の前培養を行った後に、細胞内の代謝産物の網羅的解析（メタボローム解析）を行った。解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズにおいて行った。

結果はサンプルごとの平均値で、L-システインを含まないサンプル（‘control’）における各代謝産物量の平均値を 1 とした際の比で表した（ $n = 3$ each）。

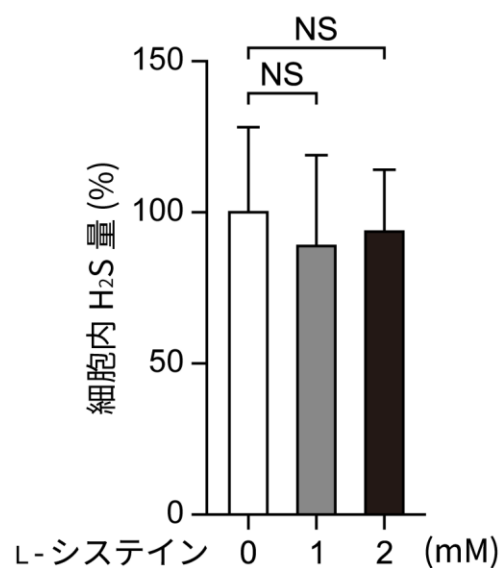


図 11 長時間の L-システイン添加は MIN6 細胞内の硫化水素量に影響を与えない

MIN6 細胞について、L-システインを 0、1、2 mM 含む培地中で 24 時間の前培養を行った後に細胞内の硫化水素 (H₂S) 量を測定した。

測定された硫化水素量は各サンプルの細胞数で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、L-システインを含まない (0 mM) サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 5$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

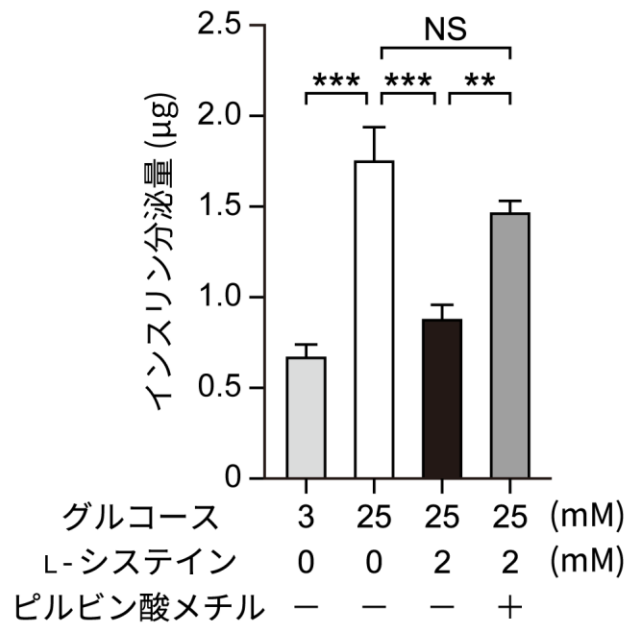


図 12 長時間の L-システイン添加による MIN6 細胞の GSIS 抑制はピルビン酸メチル添加によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB、25G-KRBB、または 25G-KRBB に 2 mM のピルビン酸メチルを添加した溶液を用いた。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。NS $P > 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

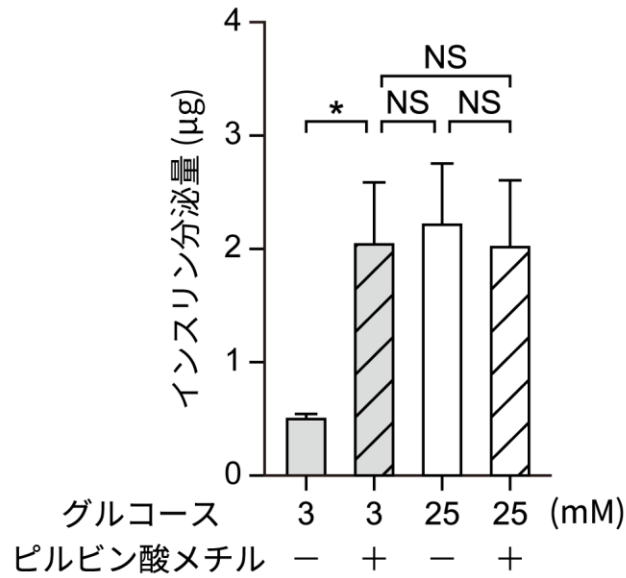


図 13 ピルビン酸メチルは MIN6 細胞のインスリン分泌において高濃度のグルコースと同程度の効果を有する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB、3G-KRBB に 2 mM のピルビン酸メチルを添加した溶液、25G-KRBB、または 25G-KRBB に 2 mM のピルビン酸メチルを添加した溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{*} $P < 0.05$ 。

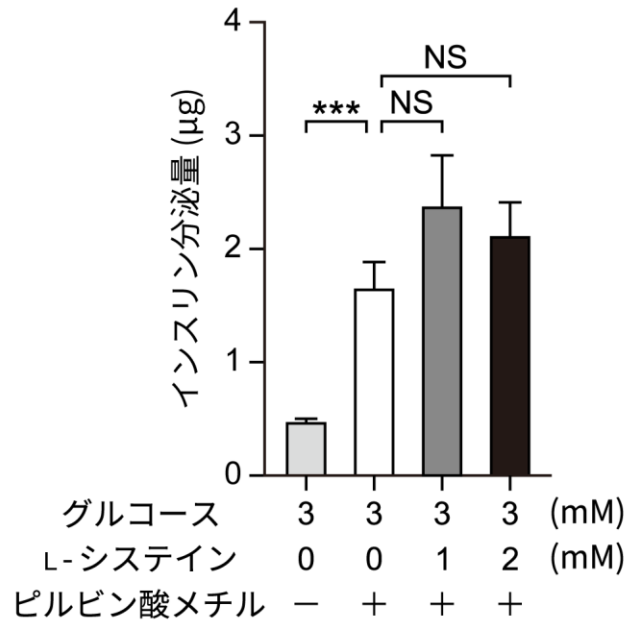


図14 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞におけるピルビン酸メチル誘導性インスリン分泌に影響を与えない

MIN6細胞について、培地中で24時間の前培養、3G-KRBB中で1時間の前処理を行った後、30分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB、または3G-KRBBに2 mMのピルビン酸メチルを添加した溶液を用いた。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、1または2 mMのL-システインを加えた溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。NS $P > 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

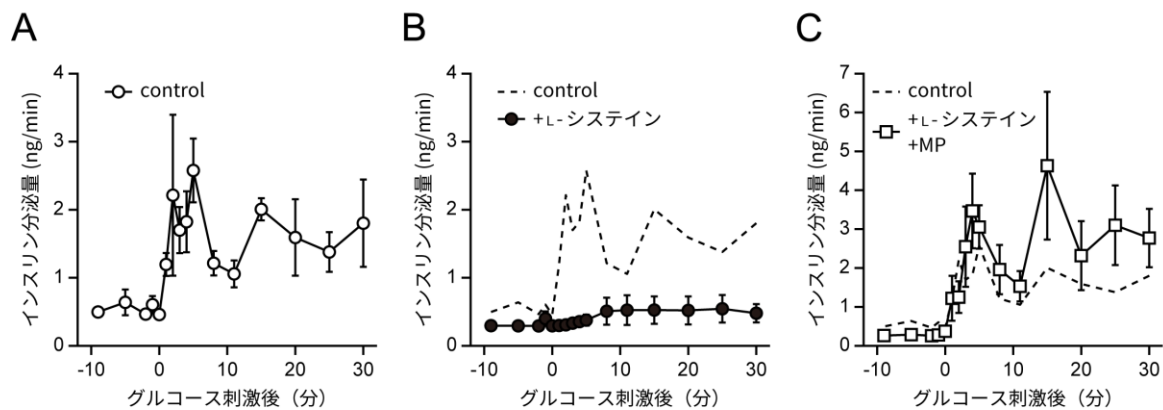


図 15 長時間の L-システイン添加による MIN6 細胞の二相性 GSIS 抑制はピルビン酸メチル添加によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 30 分間の前処理を行った後、灌流培養系において更に 3G-KRBB を用いた 30 分間の前処理と、12G-KRBB を用いた 30 分間のインスリン分泌誘導を行った。溶液が 12G-KRBB に変わった時間を 0 分とし、インスリン分泌量の経時変化をグラフに表した。

(A) L-システインを含まない状態におけるインスリン分泌量（‘control’）。

(B) 2 mM の L-システインを前培養時から加え続けた際の実験結果（‘+L-システイン’）。点線で示した ‘control’ は (A) の結果と同一。

(C) 2 mM の L-システインを前培養時から加え続け、更に、インスリン分泌誘導時に 1.5 mM のピルビン酸メチルを加えた際の実験結果（‘+L-システイン+MP’）。点線で示した ‘control’ は (A) の結果と同一。

結果は平均値±標準誤差で表した ($n = 5-6$)。

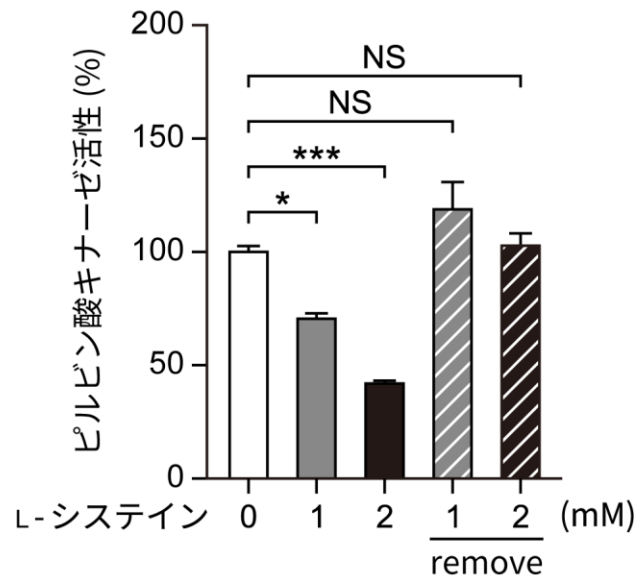


図 16 長時間のL-システイン添加はMIN6細胞のピルビン酸キナーゼ活性を可逆的に抑制する

MIN6細胞について、培地中で24時間の前培養、3G-KRBB中で1時間の前処理を行った後、25G-KRBBを用いて30分間のインスリン分泌誘導を行った。その後、細胞を回収し、ピルビン酸キナーゼ活性の測定を行った。

また、L-システインを添加したサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、図中の‘L-システイン’に記載されている濃度のL-システインを溶液に加えた。

ただし‘remove’のサンプルについては、前培養の間はL-システインを含む溶液で培養を行い、前処理時とインスリン分泌誘導時はL-システインを含まない溶液を用いた。

なお、予め各サンプルのタンパク質量を測定し、タンパク質量が揃うように希釈した上でピルビン酸キナーゼ活性の測定を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、L-システインを含まない(0 mM)サンプルの平均値を100%とした際の割合で表した($n = 3$ each)。

NS $P > 0.05$ 、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

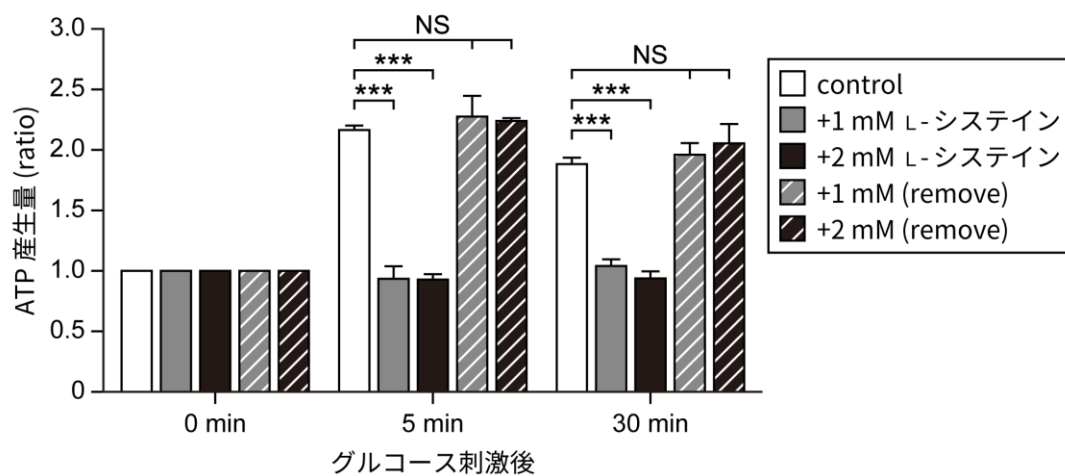


図 17 MIN6 細胞におけるグルコース刺激時の一時的な ATP 産生量増加は長時間の L-システイン添加によって抑制されるが、短時間の L-システイン除去によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、25G-KRBB を用いてインスリン分泌誘導を行った。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。L-システインを除去するサンプルでは、前培養時に 1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用い、前処理時とインスリン分泌誘導時には L-システインを含まない溶液を用いた（‘remove’）。

インスリン分泌誘導前（0 分）、誘導後 5 分、30 分において細胞を回収し、細胞中の ATP 量を測定した。測定された ATP 産生量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、各サンプルの 0 分における平均値を 1 とした時の比で表した（ $n = 6$ each）。^{NS} $P > 0.05$ 、^{***} $P < 0.001$ 。

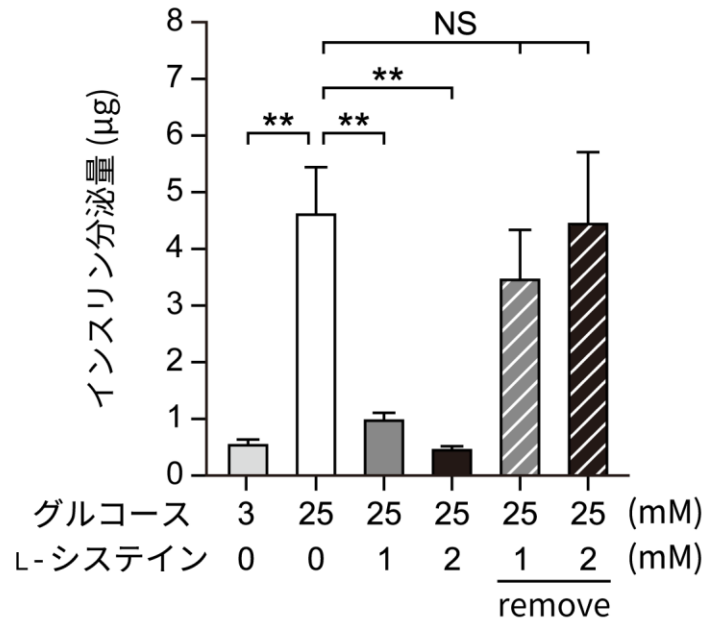


図 18 MIN6 細胞における GSIS は長時間の L-システイン添加によって抑制されるが、短時間の L-システイン除去によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB または 25G-KRBB を用いた。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。L-システインを除去するサンプルでは、前培養時に 1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用い、前処理時とインスリン分泌誘導時には L-システインを含まない溶液を用いた（‘remove’）。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$ 。

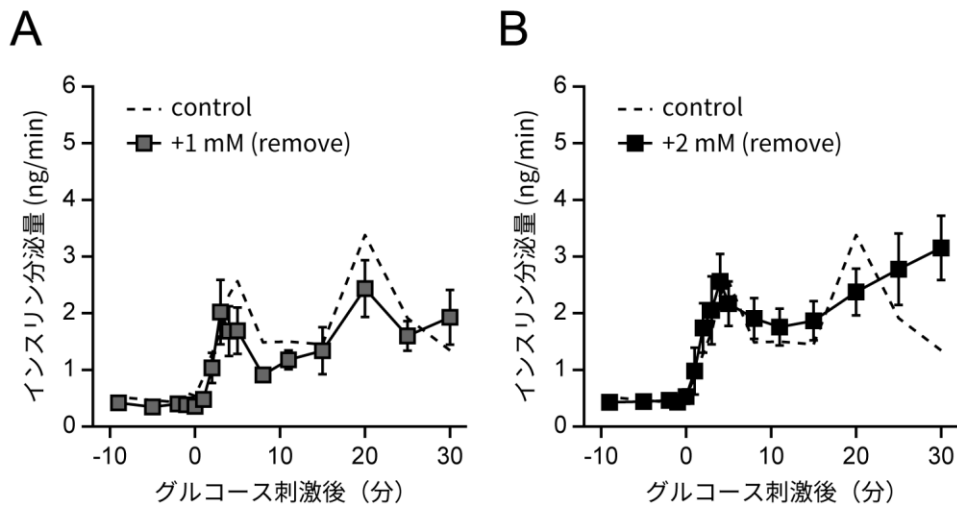


図 19 長時間の L-システイン添加による MIN6 細胞の二相性 GSIS 抑制は、短時間の L-システイン除去によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 30 分間の前処理を行った後、灌流培養系において更に 3G-KRBB を用いた 30 分間の前処理と、12G-KRBB を用いた 30 分間のインスリン分泌誘導を行った。溶液が 12G-KRBB に変わった時間を 0 分とし、インスリン分泌量の経時変化をグラフに表した。

(A) 1 mM の L-システインを前培養時に加えた後、L-システインを含まない溶液で前処理とインスリン分泌誘導を行った際の実験結果。点線で示した 'control' は図 2A の結果と同一。

(B) 2 mM の L-システインを前培養時に加えた後、L-システインを含まない溶液で前処理とインスリン分泌誘導を行った際の実験結果。点線で示した 'control' は図 2A の結果と同一。

結果は平均値±標準誤差で表した ($n = 4-5$)。

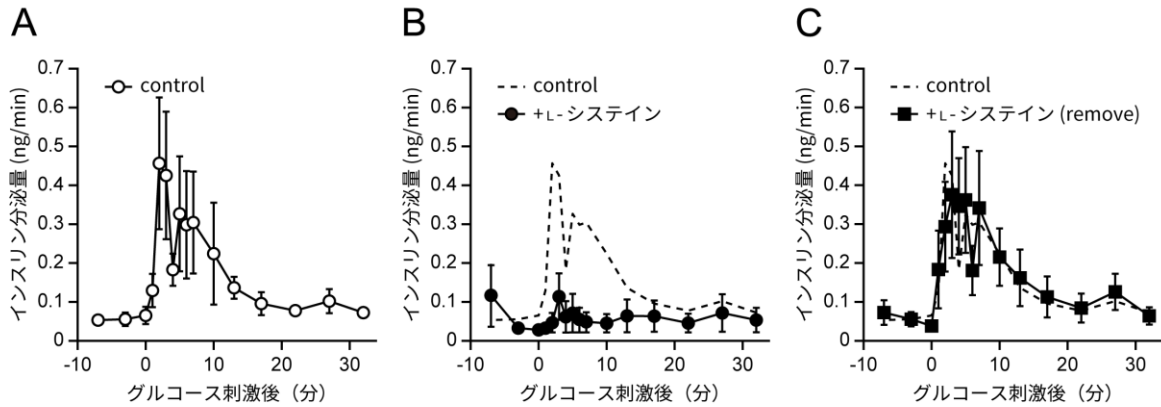


図 20 マウス膵島における二相性 GSIS は長時間の L-システイン添加によって抑制されるが、短時間の L-システイン除去によって回復する

マウス膵島について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 30 分間の前処理を行った後、灌流培養系において更に 3G-KRBB を用いた 30 分間の前処理と、12G-KRBB を用いた 30 分間のインスリン分泌誘導を行った。溶液が 12G-KRBB に変わった時間を 0 分とし、インスリン分泌量の経時変化をグラフに表した。

(A) L-システインを含まない状態におけるインスリン分泌量（‘control’）。

(B) 1 mM の L-システインを前培養時から加え続けた際の実験結果。点線で示した‘control’は (A) の結果と同一。

(C) 1 mM の L-システインを前培養時に加えた後、L-システインを含まない溶液で前処理とインスリン分泌誘導を行った際の実験結果。点線で示した‘control’は (A) の結果と同一。

結果は平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。

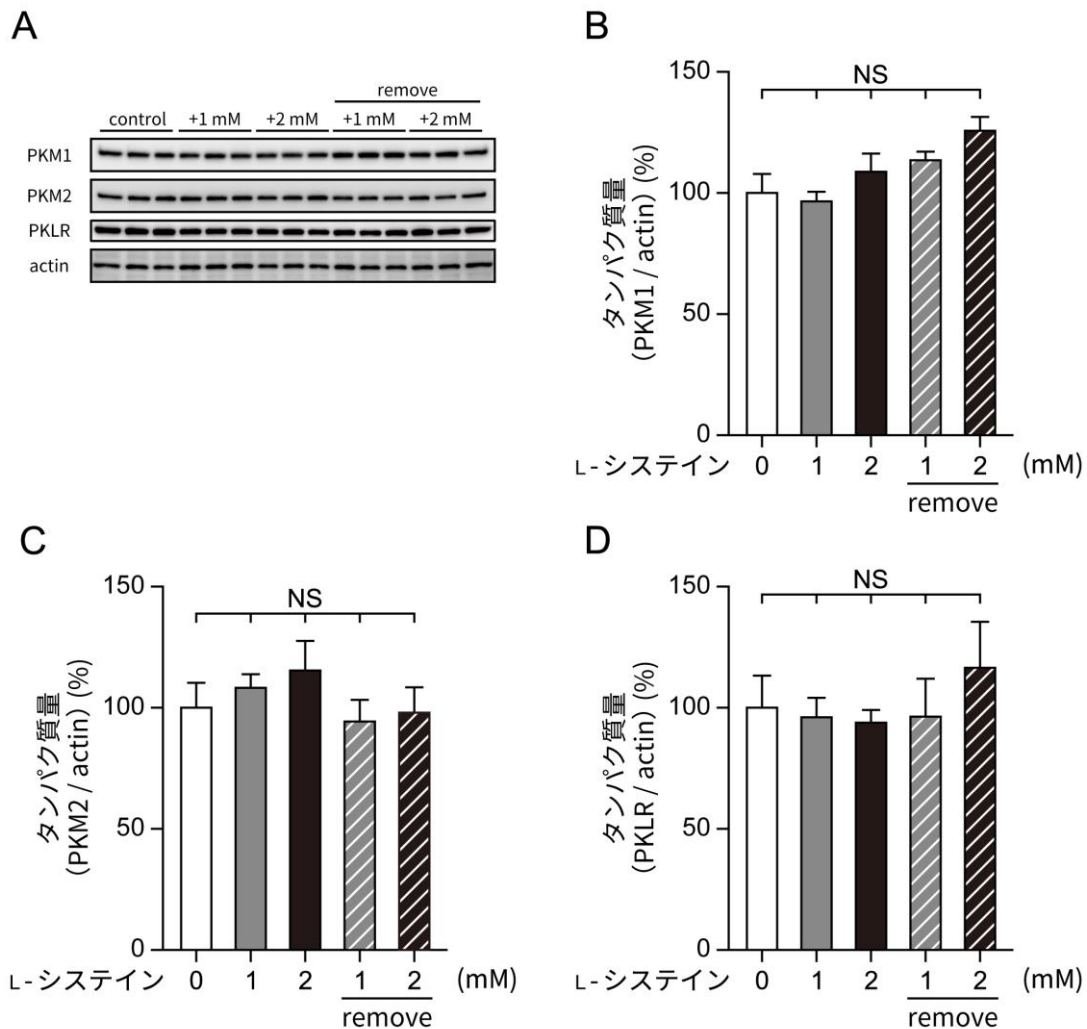


図 21 L-システイン添加は MIN6 細胞内のピルビン酸キナーゼ量に影響を与えない

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理、25G-KRBB 中で 30 分間のインスリン分泌誘導を行った後、細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い (A)、細胞内の PKM1 (B)、PKM2 (C)、PKLR (D) の量を比較した。

L-システインを含むサンプルでは、前培養時、前処理時、インスリン分泌誘導時の間、1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。L-システインを除去するサンプルでは、前培養時に 1 または 2 mM の L-システインを加えた溶液を用い、前処理時とインスリン分泌誘導時には L-システインを含まない溶液を用いた ('remove')。

測定されたピルビン酸キナーゼ量は、各サンプルの actin 量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、L-システインを含まない (0 mM) サンプルの平均値を 100% とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

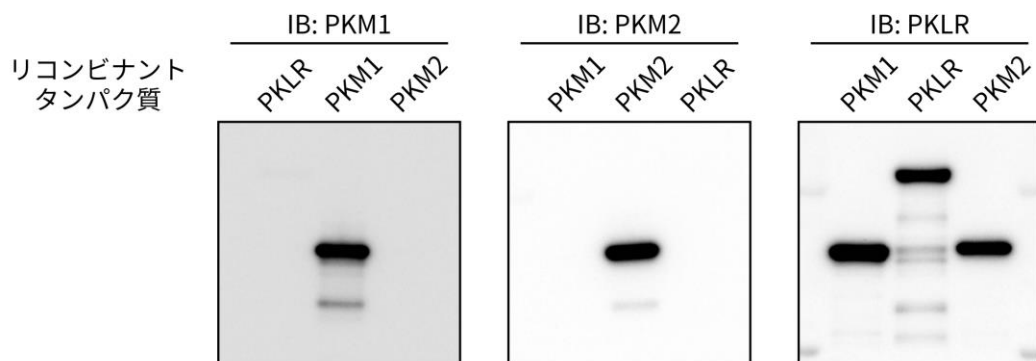


図22 抗PKM1抗体、抗PKM2抗体はそれぞれPKM1とPKM2を特異的に認識し、抗PKLR抗体はPKM1、PKM2、PKLR全てを認識する

リコンビナントPKM1、PKM2、PKLRタンパク質を用いたウェスタンブロッティングを行い、抗PKM1抗体（‘IB: PKM1’）、抗PKM2抗体（‘IB: PKM2’）、抗PKLR抗体（‘IB: PKLR’）が各タンパク質を特異的に認識するかどうかを確かめた。

Human	1	MSKPHSEAGT	AFIQTQQLHA	AMADTFLEHM	CRLDIDS	PPI	TARNTGIICT	IGPASRSVET	60
Mouse	1	MPKPHSEAGT	AFIQTQQLHA	AMADTFLEHM	CRLDIDS	API	TARNTGIICT	IGPASRSVEM	60
Human	61	LKEMIKSGMN	VARLNFSHGT	HEYHAETIKN	VRT	ATESFAS	DPILYRPVAV	ALDTKGPEIR	120
Mouse	61	LKEMIKSGMN	VARLNFSHGT	HEYHAETIKN	VRE	ATESFAS	DPILYRPVAV	ALDTKGPEIR	120
Human	121	TGLIKSGTA	EVELKKGATL	KITLDNAYME	KCDENILWLD	YKNICKVVEV	GSKIYVDDGL	180	
Mouse	121	TGLIKSGTA	EVELKKGATL	KITLDNAYME	KCDENILWLD	YKNICKVVEV	GSKIYVDDGL	180	
Human	181	ISLQVKQKGA	DFLVTEVENG	GSLGSKKGVN	LPGAAVDLPA	VSEKDIQDLK	FGVEQDVMV	240	
Mouse	181	ISLQVKEKGA	DFLVTEVENG	GSLGSKKGVN	LPGAAVDLPA	VSEKDIQDLK	FGVEQDVMV	240	
Human	241	FASFIRKASD	VHEVRKVLGE	KGKNIKIISK	IENHEGVRRF	DEILEASDGI	MVARGDLGIE	300	
Mouse	241	FASFIRKAAD	VHEVRKVLGE	KGKNIKIISK	IENHEGVRRF	DEILEASDGI	MVARGDLGIE	300	
Human	301	IPAENVFLAQ	KMMIGRCNRA	GKPVICATQM	LESMIKKPRP	TRAEKSDVAN	AVLDGADCIM	360	
Mouse	301	IPAENVFLAQ	KMMIGRCNRA	GKPVICATQM	LESMIKKPRP	TRAEKSDVAN	AVLDGADCIM	360	
Human	361	LSGETAKGDY	PLEAVRMQHL	IAREAEAAMF	HRKL	FEELVR	ASSHSTDLME	AMAMGSVEAS	420
Mouse	361	LSGETAKGDY	PLEAVRMQHL	IAREAEAAMF	HRL	FEELVR	ASSHSTDLME	AMAMGSVEAS	420
Human	421	YKCLAAALIV	LTESGRSAHQ	VARYRPRAPI	IAVTRNPQTA	RQAHLYRGIF	PVLCKDPVQE	480	
Mouse	421	YKCLAAALIV	LTESGRSAHQ	VARYRPRAPI	IAVTRNPQTA	RQAHLYRGIF	PVLCKDAVLN	480	
Human	481	AWAEDVDLRV	NFAMN	VGKAR	GFFKKGDVVI	VLGWPRGSG	FTNTMRVVPV	P 531	
Mouse	481	AWAEDVDLRV	NLAM	VGKAR	GFFKKGDVVI	VLGWPRGSG	FTNTMRVVPV	P 531	

図 23 ヒト PKM1 とマウス PKM1 はアミノ酸レベルで 97.74%の相同性をもつ

ヒト PKM1 の配列（上段、P14618-2 KP YM_HUMAN）とマウス PKM1 の配列（下段、P52480-2 KP YM_MOUSE）を UniProt (<http://www.uniprot.org/>) で比較した結果。異なる残基をもつ部分をハイライトで表した。

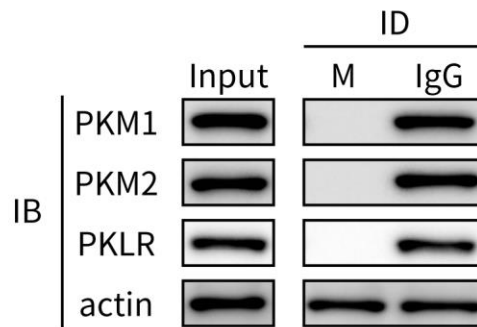


図24 MIN6細胞中の主なピルビン酸キナーゼはM型ピルビン酸キナーゼ(PKM1、PKM2)である

MIN6細胞のライセートについて免疫除去を行い、M型ピルビン酸キナーゼを除いたサンプル(抗PKM1抗体と抗PKM2抗体を使用、‘M’)と、コントロールのサンプル(抗normal rabbit IgG抗体を使用、‘IgG’)を作製した。免疫除去前のサンプル(‘Input’)と免疫除去後のサンプル(‘ID’)について、抗PKM1抗体、抗PKM2抗体、抗PKLR抗体、抗actin抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った(‘IB’)。

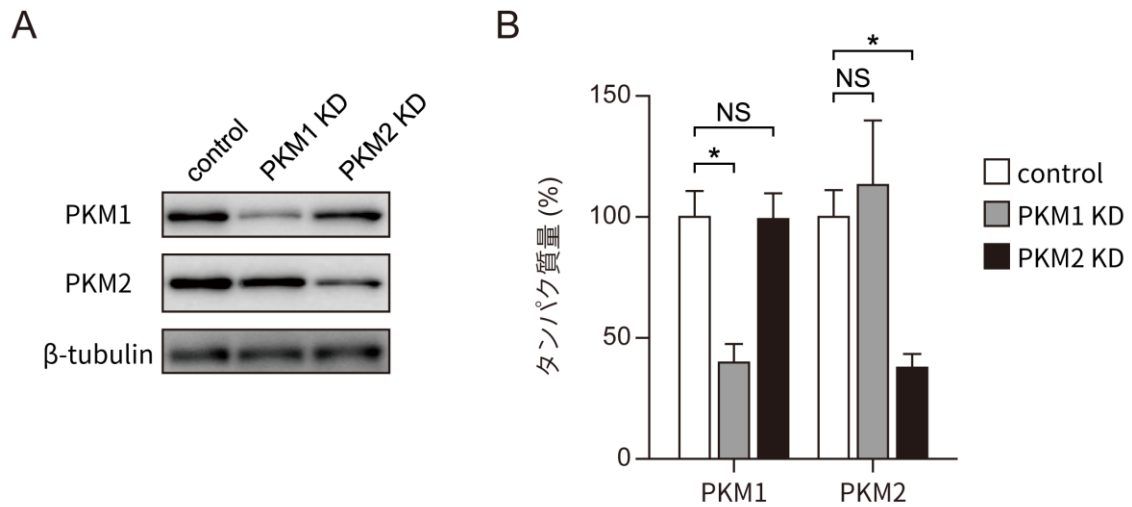


図 25 MIN6 細胞において、PKM1、PKM2 標的 siRNA はそれぞれのタンパク質の発現を特異的に減少させる

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロットティングを行い、細胞内の PKM1、PKM2 タンパク質量を比較した。

(B) 各タンパク質量についての結果。

測定されたタンパク質量は、各サンプルの β -tubulin 量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n=3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{*} $P < 0.05$ 。

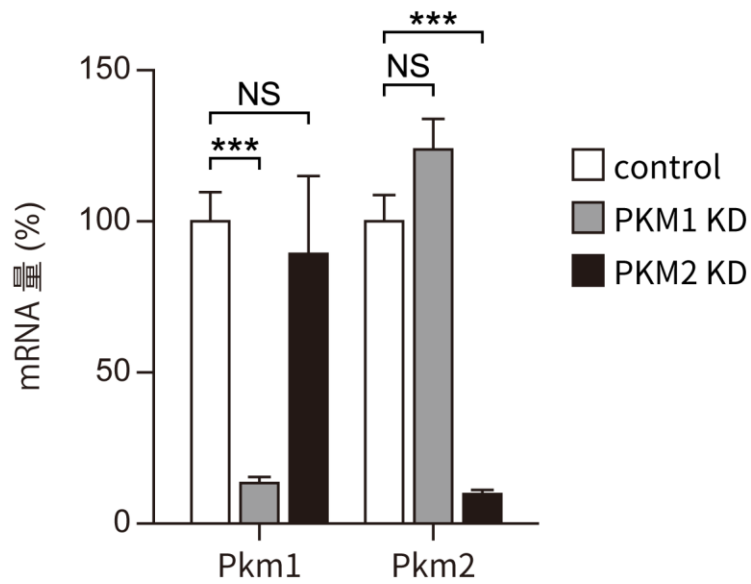


図 26 MIN6 細胞において、PKM1、PKM2 標的 siRNA はそれぞれの mRNA 量の特異的に減少させる

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収して定量的 RT-PCR を行い、細胞内の PKM1、PKM2 の mRNA 量 (それぞれ ‘Pkm1’、‘Pkm2’) を比較した。

測定された mRNA 量は、各サンプルの Rn18S 量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 5$ each)。
 $^{NS}P > 0.05$ 、 $^{***}P < 0.001$ 。

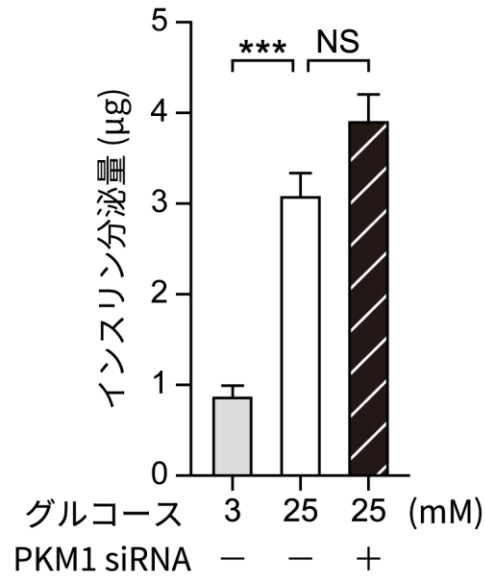


図 27 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞における GSIS に影響を与えない

MIN6 細胞について、negative control 及び PKM1 標的 siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に一度培地を交換して更に 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB または 25G-KRBB を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 4$ each)。NS $P > 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

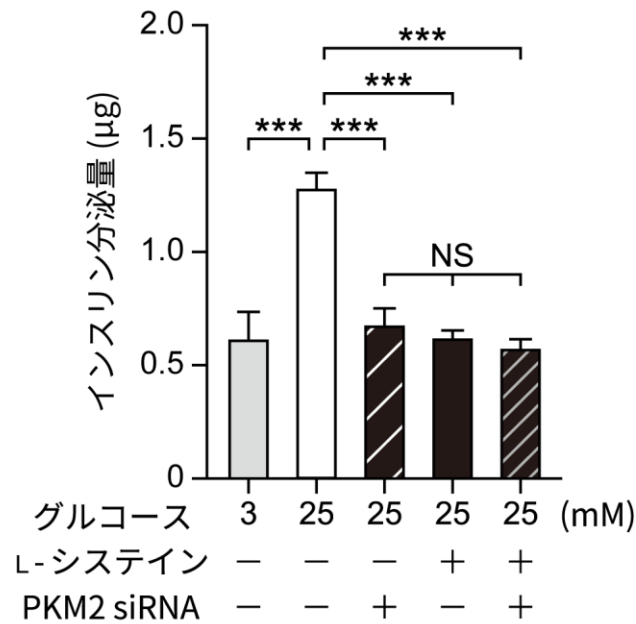


図 28 PKM2 の発現抑制は MIN6 細胞における GSIS を抑制し、その抑制効果は L-システインによる効果と同程度である

MIN6細胞について、negative control 及びPKM2 標的 siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に一度培地を交換して更に 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB または 25G-KRBB を用いた。なお、L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、2 mM の L-システインを添加した溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 5$ each)。NS $P > 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

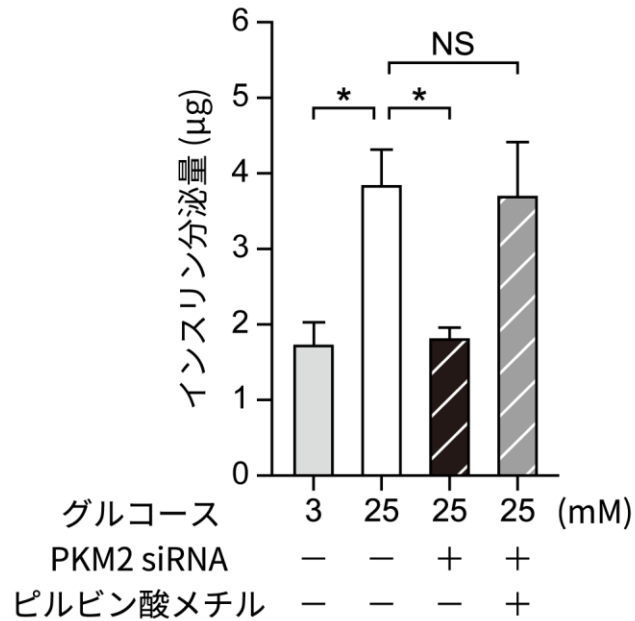


図 29 PKM2 の発現抑制は MIN6 細胞における GSIS を抑制し、その抑制効果はピルビン酸メチルの添加によって回復する

MIN6 細胞について、negative control 及び PKM2 標的 siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に一度培地を交換して更に 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB、25G-KRBB、または 25G-KRBB に 2 mM のピルビン酸メチルを加えた溶液を用いた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 5$ each)。NS $P > 0.05$ 、* $P < 0.05$ 。

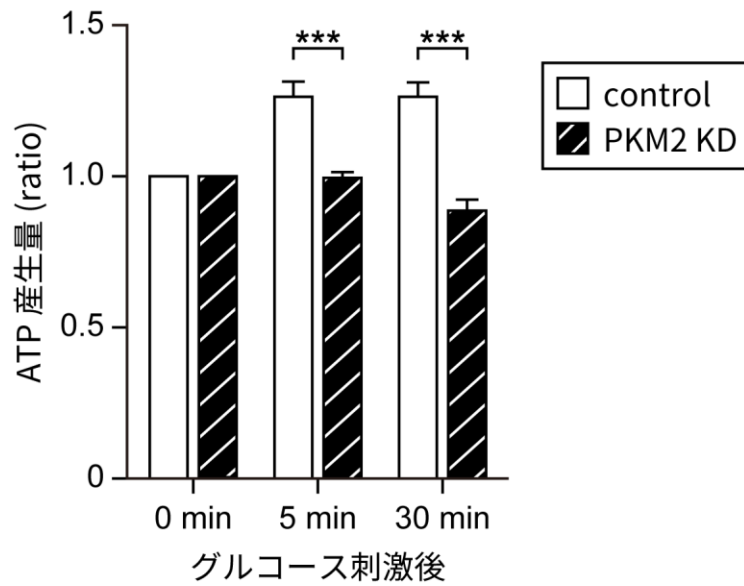


図 30 PKM2 の発現抑制は MIN6 細胞におけるグルコース刺激時の一時的な ATP 産生量増加を抑制する

MIN6 細胞について、negative control (‘control’) 及び PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に一度培地を交換して更に 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、25G-KRBB を用いてインスリン分泌誘導を行った。

インスリン分泌誘導前 (0 分)、誘導後 5 分、30 分において細胞を回収し、細胞中の ATP 量を測定した。測定された ATP 産生量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、各サンプルの 0 分における平均値を 1 とした時の比で表した ($n = 6$ each)。*** $P < 0.001$ 。

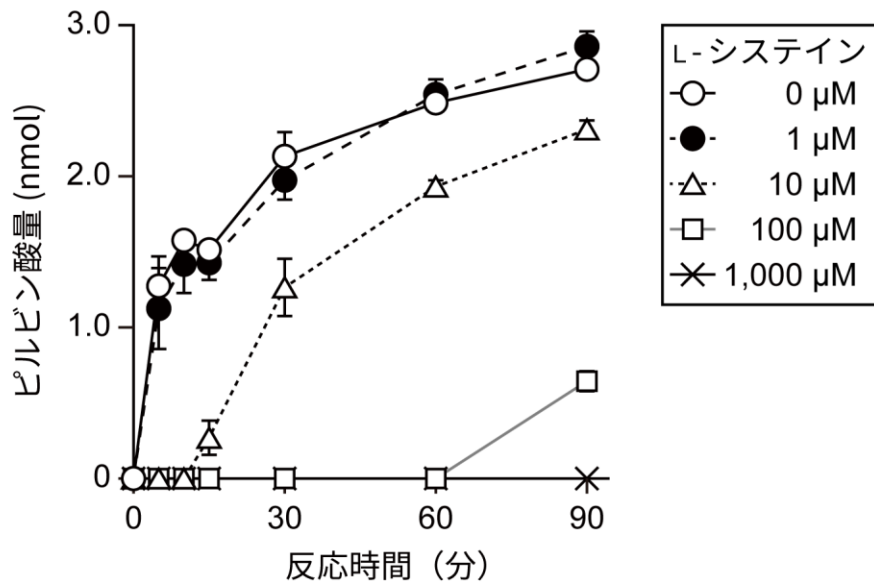


図 31 L-システインは *in vitro* 系において濃度依存的に PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性を抑制する

in vitro 系において、L-システイン存在下での PKM2 によるピルビン酸産生量を測定することでピルビン酸キナーゼ活性を確認した。0、1、10、100、1,000 μM の濃度の L-システインを含む反応溶液を作製し、リコンビナント PKM2 と混和して、0、5、10、15、30、60、90 分後に吸光度を測定することで、各経過時間におけるピルビン酸の産生量を計算した。結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 3$ each)。

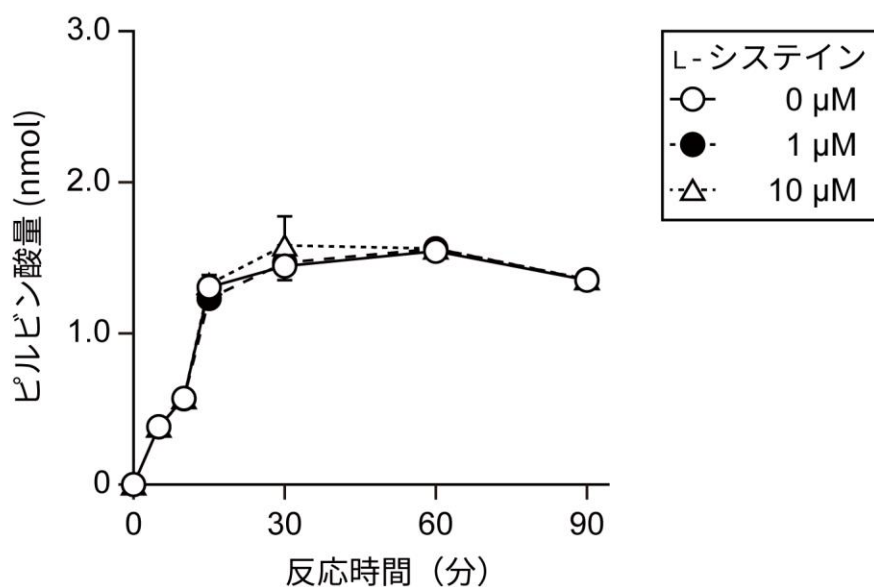


図 32 L-システインは *in vitro* 系において PKM1 のピルビン酸キナーゼ活性に影響を与えない

in vitro 系において、L-システイン存在下での PKM1 によるピルビン酸産生量を測定することでピルビン酸キナーゼ活性を確認した。0、1、10 μM の濃度の L-システインを含む反応溶液を作製し、リコンビナント PKM1 と混和して、0、5、10、15、30、60、90 分後に吸光度を測定することで、各経過時間におけるピルビン酸の産生量を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 3$ each)。

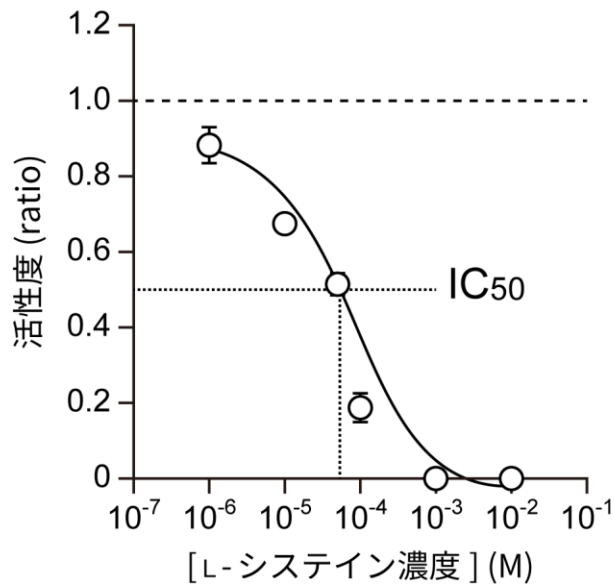


図 33 L-システインによる PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性阻害の半数阻害濃度 (IC₅₀) 測定

in vitro 系において、0、1、10、50、100、1,000、10,000 μM の濃度の L-システインを含む反応溶液を作製し、リコンビナント PKM2 と混和して、20 分後に吸光度を測定することで、各 L-システイン濃度におけるピルビン酸の産生量を測定した。測定値をもとに、GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて IC₅₀ の計算を行った。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 3$ each)。

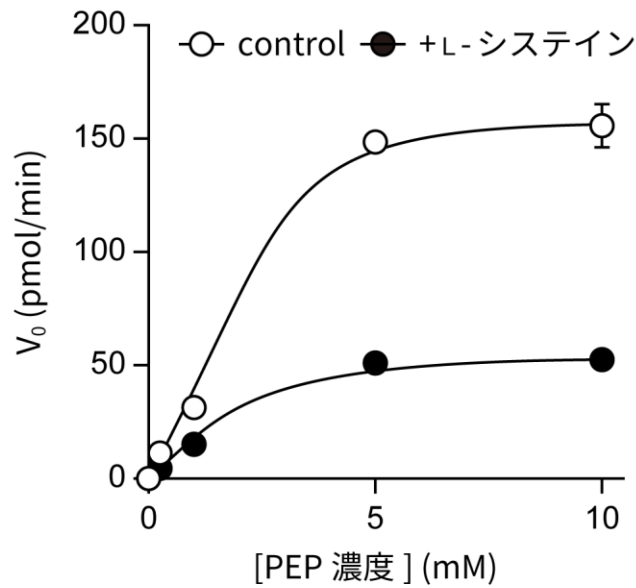


図 34 L-システインが PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性に及ぼす影響 (ミカエリス-メンテンプロット)

リコンビナント PKM2 を、0、0.25、1、5、10 mM のホスホエノールピルビン酸 (PEP)、0 または 59 μM の L-システインを含む反応溶液中で 20 分間おいた後、産生された ATP 量を定量した。PKM2 を含まない反応液における ATP 産生量をもとに値の補正を行った後、得られた値からミカエリス-メンテンプロットを作成した。なお、 V_0 は 1 分あたりの ATP 産生量とした。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 3$ each)。

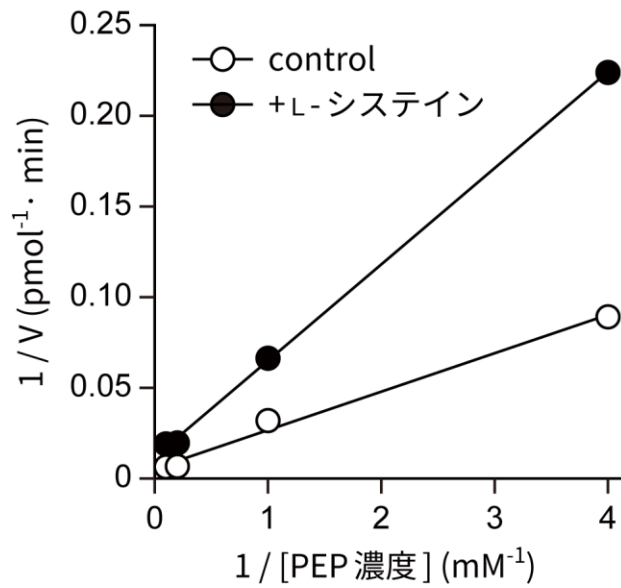


図 35 L-システインが PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性に及ぼす影響 (ラインウィーバー-バークプロット)

リコンビナント PKM2 を、0、0.25、1、5、10 mM のホスホエノールピルビン酸 (PEP)、0 または 59 μ M の L-システインを含む反応溶液中で 20 分間おいた後、産生された ATP 量を定量した。PKM2 を含まない反応液における ATP 産生量をもとに値の補正を行った後、得られた値とミカエリス-メンテンプロットからラインウィーバー-バークプロットを作成した。

結果はサンプルごとの平均値で表した ($n = 3$ each)。

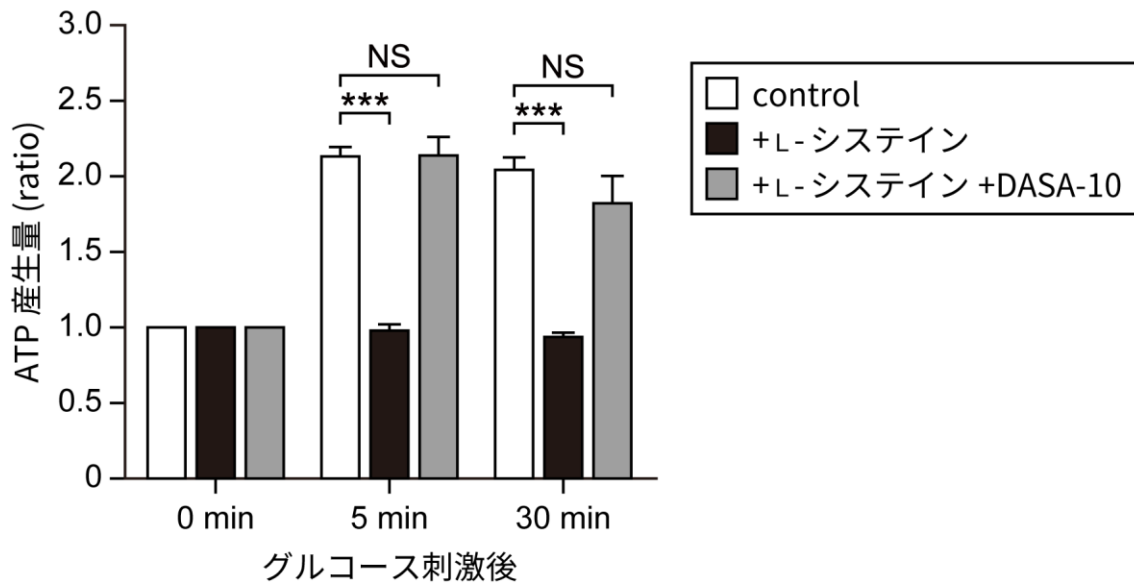


図 36 MIN6 細胞におけるグルコース刺激時の一時的な ATP 産生量増加は長時間の L-システイン添加によって抑制されるが、DASA-10 添加によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、25G-KRBB を用いてインスリン分泌誘導を行った。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。DASA-10 を添加するサンプルでは前処理時とインスリン分泌誘導時に 20 μ M の DASA-10 を加え、それ以外のサンプルでは等量の DMSO を加えた。

インスリン分泌誘導前 (0 分)、誘導後 5 分、30 分において細胞を回収し、細胞中の ATP 量を測定した。測定された ATP 産生量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、各サンプルの 0 分における平均値を 1 とした時の比で表した ($n = 6$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{***} $P < 0.001$ 。

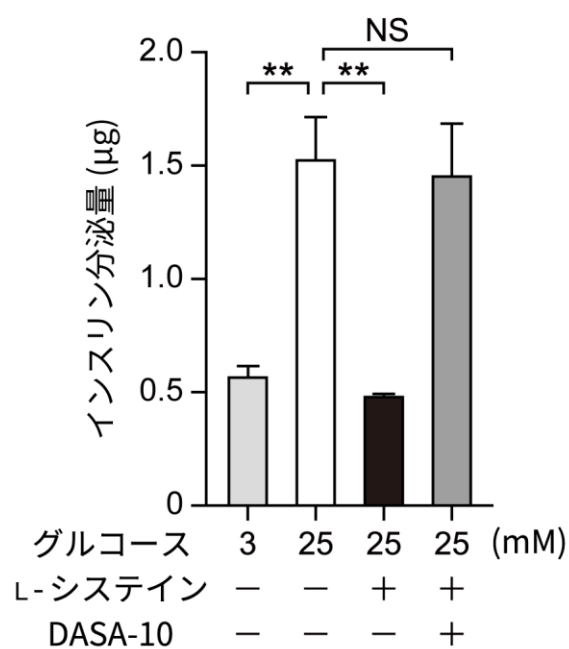


図 37 MIN6 細胞における GSIS は長時間の L-システイン添加によって抑制されるが、短時間の L-システイン除去によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 1 時間の前処理を行った後、30 分間のインスリン分泌誘導を行ってインスリン分泌量を測定した。インスリン分泌誘導時には、3G-KRBB または 25G-KRBB を用いた。L-システインを含むサンプルでは、前培養、前処理、インスリン分泌誘導の間、2 mM の L-システインを加えた溶液を用いた。DASA-10 を含むサンプルでは、前処理時とインスリン分泌誘導時に 20 µM の DASA-10 を加え、それ以外のサンプルでは等量の DMSO を加えた。

測定されたインスリン分泌量は各サンプルのタンパク質量で補正を行い、結果をサンプルごとの平均値±標準誤差で表した ($n = 6$ each)。NS $P > 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

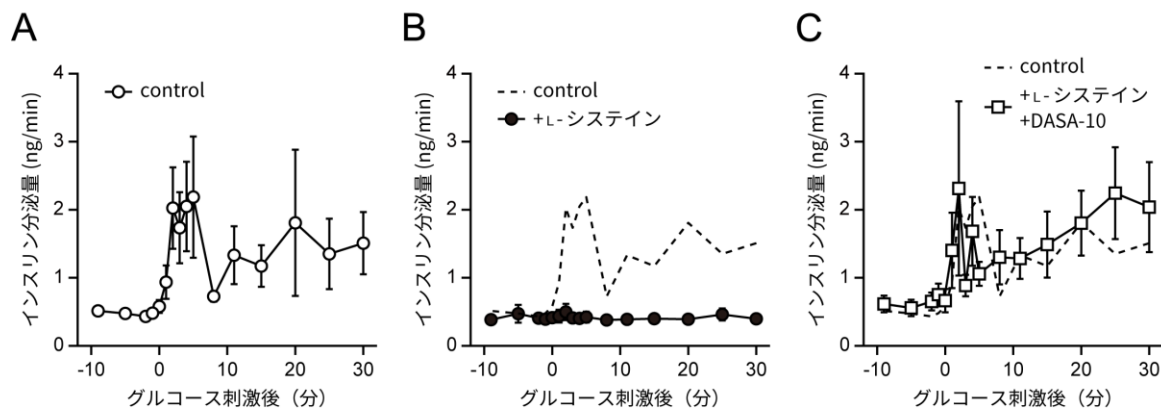


図 38 長時間の L-システイン添加による MIN6 細胞の二相性 GSIS 抑制は、DASA-10 添加によって回復する

MIN6 細胞について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 30 分間の前処理を行った後、灌流培養系において更に 3G-KRBB を用いた 30 分間の前処理と、12G-KRBB を用いた 30 分間のインスリン分泌誘導を行った。DASA-10 を含むサンプルでは、前処理時とインスリン分泌誘導時に 5 μ M の DASA-10 を加え、それ以外のサンプルでは等量の DMSO を加えた。溶液が 12G-KRBB に変わった時間を 0 分とし、インスリン分泌量の経時変化をグラフに表した。

(A) L-システイン、DASA-10 を含まない状態におけるインスリン分泌量（‘control’）。

(B) 2 mM の L-システインを前培養時から加え続けた際の実験結果。点線で示した‘control’は (A) の結果と同一。

(C) 2 mM の L-システインを前培養時から加え続け、更に、前処理時とインスリン分泌誘導時に 5 μ M の DASA-10 を加えた際の実験結果。点線で示した‘control’は (A) の結果と同一。

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 5-6$)。

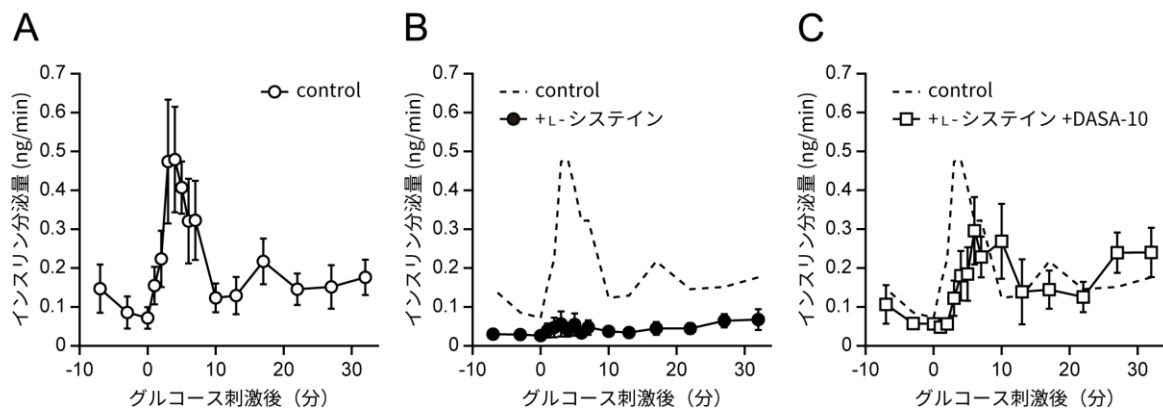


図 39 長時間の L-システイン添加によるマウス膵島の二相性 GSIS 抑制は、DASA-10 添加によって回復する

マウス膵島について、培地中で 24 時間の前培養、3G-KRBB 中で 30 分間の前処理を行った後、灌流培養系において更に 3G-KRBB を用いた 30 分間の前処理と、12G-KRBB を用いた 30 分間のインスリン分泌誘導を行った。DASA-10 を含むサンプルでは、前処理時とインスリン分泌誘導時に 5 μ M の DASA-10 を加え、それ以外のサンプルでは等量の DMSO を加えた。溶液が 12G-KRBB に変わった時間を 0 分とし、インスリン分泌量の経時変化をグラフに表した。

(A) L-システイン、DASA-10 を含まない状態におけるインスリン分泌量（‘control’）。

(B) 1 mM の L-システインを前培養時から加え続けた際の実験結果。点線で示した‘control’は (A) の結果と同一。

(C) 1 mM の L-システインを前培養時から加え続け、更に、前処理時とインスリン分泌誘導時に 5 μ M の DASA-10 を加えた際の実験結果。点線で示した‘control’は (A) の結果と同一。

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 4-6$)。

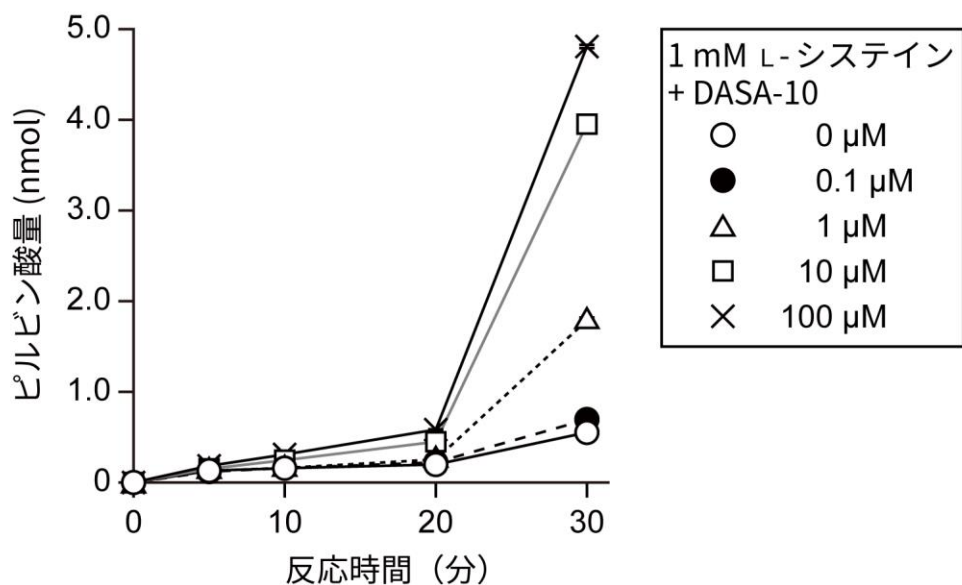


図 40 L-システインによる PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性抑制は、*in vitro* 系において DASA-10 の濃度依存的に回復する

L-システインによる PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性抑制が DASA-10 の添加によって回復するかを、*in vitro* 系においてピルビン酸産生量を測定することで確認した。0、0.1、1、10、100 μM の濃度の DASA-10 と 1 mM の L-システインを含む反応溶液を作製し、リコンビナント PKM2 と混和して、0、5、10、20、30 分後に吸光度を測定することで、各経過時間におけるピルビン酸の産生量を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 3$ each)。

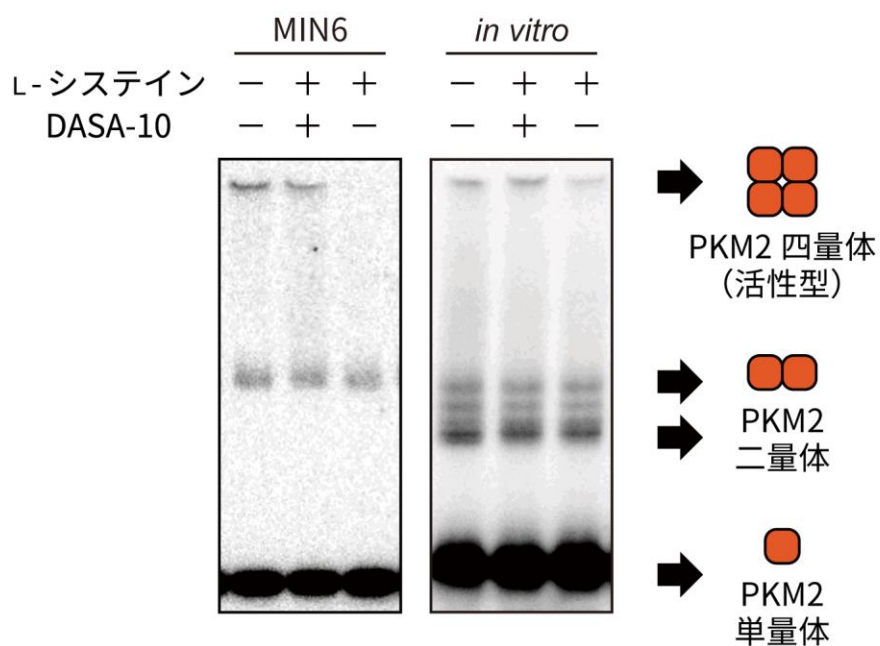


図 41 PKM2 は MIN6 細胞内及び *in vitro* 系において四量体を形成し、L-システインの添加によって四量体が減少するが、DASA-10 を添加することで四量体の量は回復する

MIN6 細胞から得られたライセート（‘MIN6’）、及びリコンビナント PKM2（‘*in vitro*’）を 0 または 1 mM の L-システイン、10 μ M の DASA-10 または等量の DMSO と混和し、37°C に 30 分おいた後、Native SDS-PAGE 法を用いたウェスタンブロッティングを行って PKM2 の検出を行った。

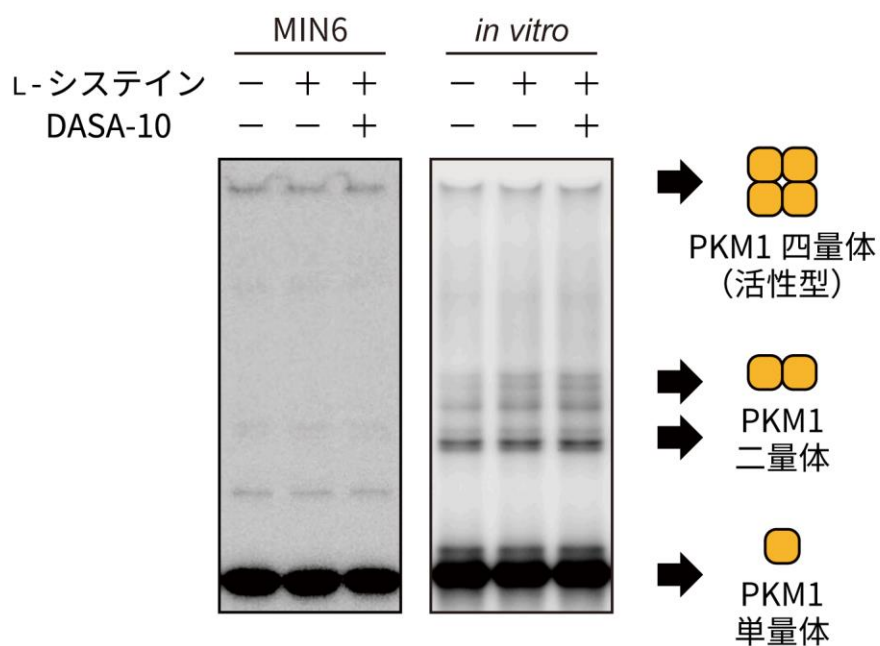


図 42 PKM1 は MIN6 細胞内及び *in vitro* 系において四量体を形成し、L-システインの添加や DASA-10 の添加は四量体の量に影響を与えない

MIN6 細胞から得られたライセート（‘MIN6’）、及びリコンビナント PKM1（‘*in vitro*’）を 0 または 1 mM の L-システイン、10 μ M の DASA-10 または等量の DMSO と混和し、37°C に 30 分おいた後、Native SDS-PAGE 法を用いたウェスタンブロッティングを行って PKM1 の検出を行った。

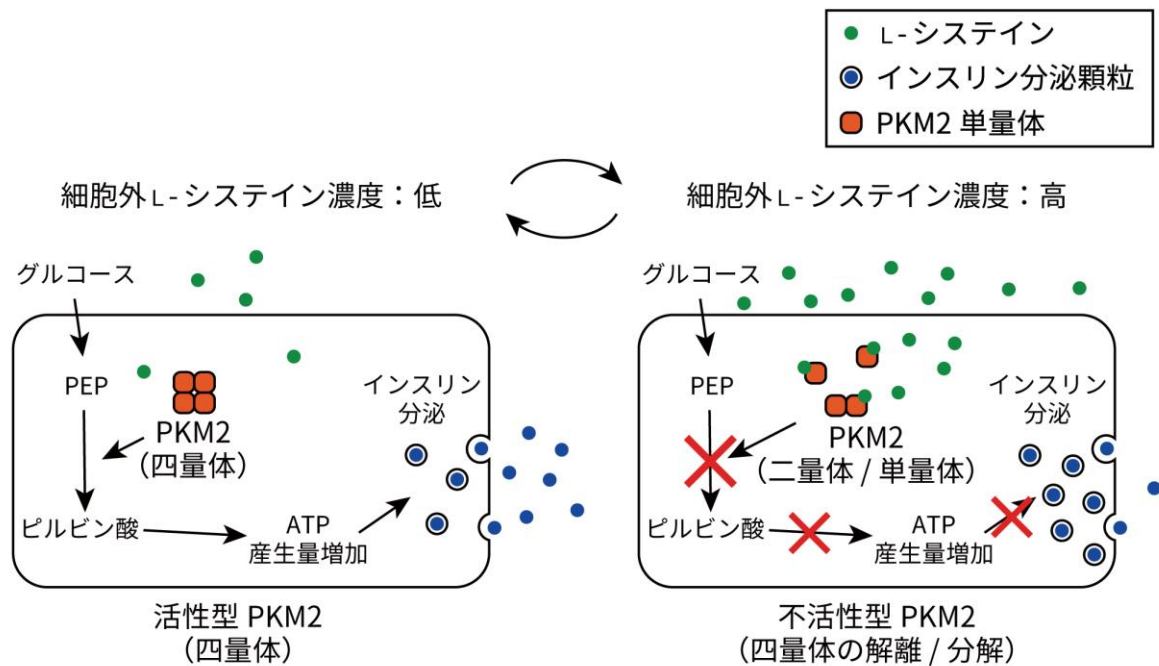


図 43 マウス膵β細胞における PKM2 を介した GSIS と、細胞外 L-システイン濃度の変化による GSIS への可逆的な影響のモデル図

通常、細胞外の L-システイン濃度が低い際には、高グルコース刺激に応じて細胞内に取り込まれたグルコースが PEP へと代謝され、更に四量体（活性型）の PKM2 が PEP からピルビン酸を産生することで ATP 産生量が増加し、インスリン分泌が起こる（左）。

しかし、細胞外の L-システイン濃度が高くなると、細胞内の L-システイン濃度の上昇に伴って PKM2 の四量体が解離、または分解し、四量体の量が減少する。その結果、グルコース刺激時においても PEP からピルビン酸が産生されず、ATP 産生量の増加も起こらなくなり、インスリン分泌が抑制される（右）。

更にこのメカニズムは、細胞外の L-システイン濃度の変化によって PKM2 の四量体の量（活性化 PKM2 量）、及びインスリン分泌量が制御される、可逆的な機構であることが考えられる。

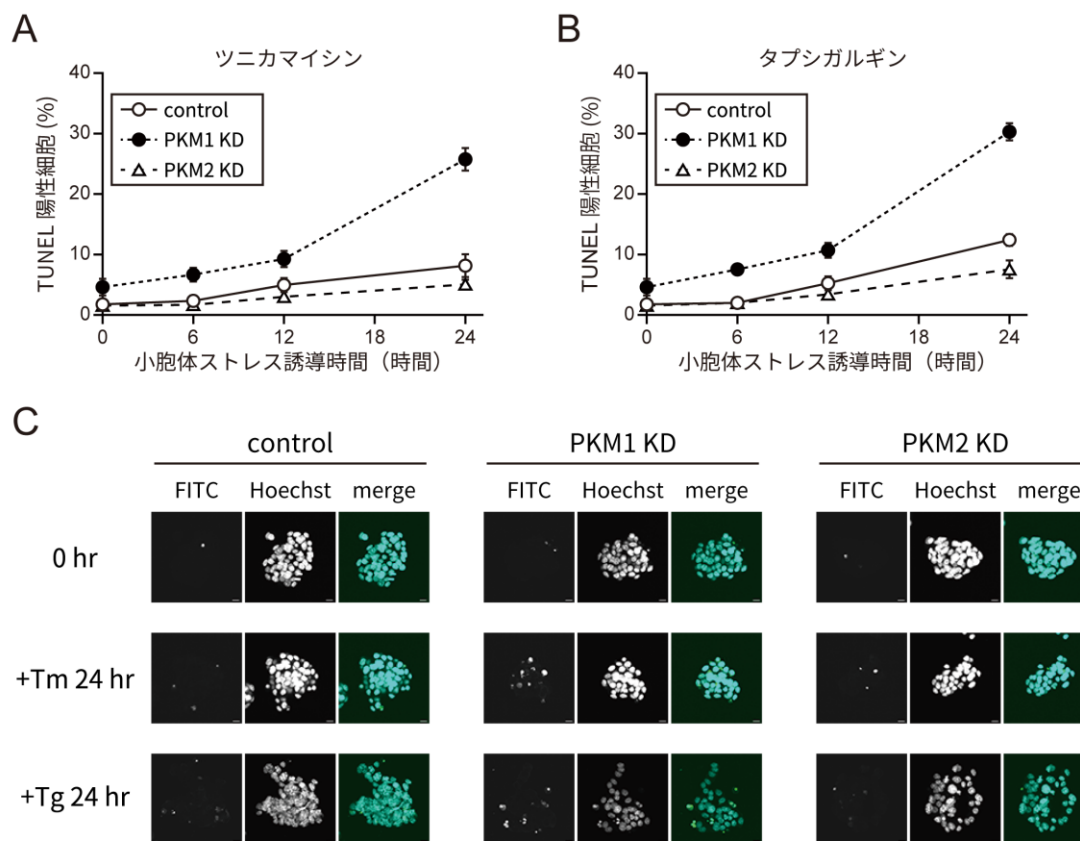


図 44 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞における小胞体ストレス誘導性アポトーシスを亢進させる

MIN6 細胞について、negative control、PKM1 標的、PKM2 標的 siRNA をトランスフェクションした（それぞれ ‘control’、‘PKM1 KD’、‘PKM2 KD’）。48 時間後に、10 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシン (Tm)、または 1 μM のタプシガルギン (Tg) を含む培地に交換し、更に 6、12、24 時間おいた。その後細胞を固定し、TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の染色と、Hoechst 33342 を用いた全細胞の核の染色を行った。Hoechst 33342 の蛍光によって認識できた細胞 500 個のうち、FITC の蛍光が確認できる細胞 (TUNEL 陽性細胞) の数を数えて割合を計算し、アポトーシス細胞の割合とした。

(A) ツニカマイシン添加時のアポトーシス細胞数の割合の経時変化。

(B) タプシガルギン添加時のアポトーシス細胞数の割合の経時変化。小胞体ストレス誘導前のアポトーシス細胞数は (A) と同一。

(C) 小胞体ストレス誘導前 (‘0 hr’)、ツニカマイシン添加後 24 時間 (‘+Tm 24 hr’)、タプシガルギン添加後 24 時間 (‘+Tg 24 hr’) における細胞の写真。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n=3-4$)。写真のスケールバーは 10 μm 。

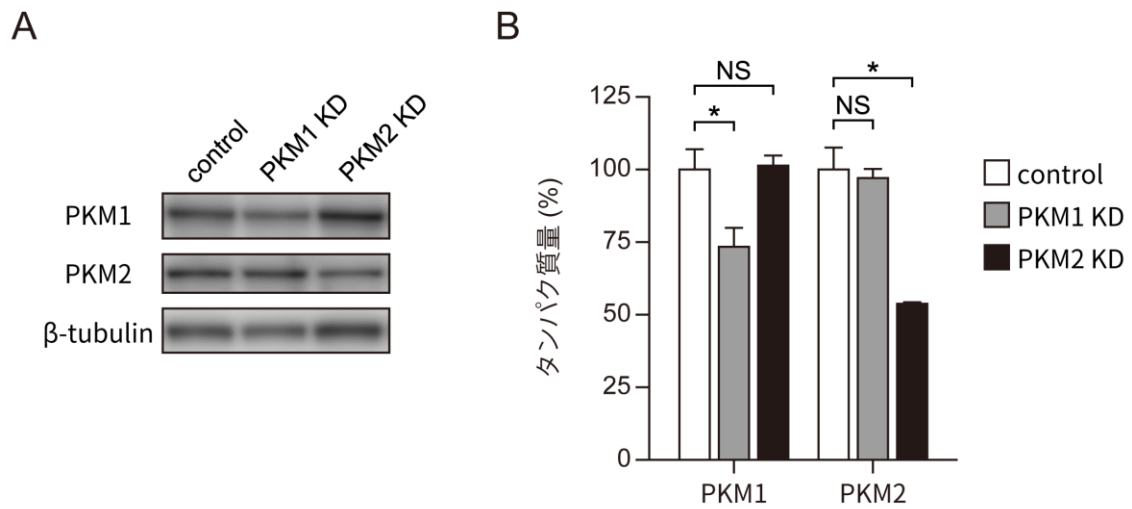


図 45 Beta-TC-6 細胞において、PKM1、PKM2 標的 siRNA はそれぞれのタンパク質の発現を特異的に減少させる

(A) Beta-TC-6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内の PKM1、PKM2 タンパク質量を比較した。

(B) 各タンパク質量についての結果。

測定されたタンパク質量は、各サンプルの β -tubulin 量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n=3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{*} $P < 0.05$ 。

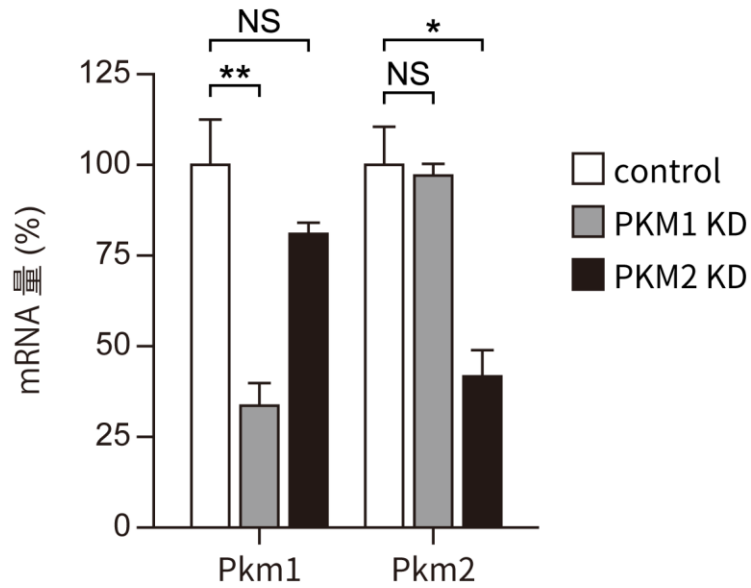


図 46 Beta-TC-6 細胞において、PKM1、PKM2 標的 siRNA はそれぞれの mRNA 量の特異的に減少させる

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収して定量的 RT-PCR を行い、細胞内の PKM1、PKM2 の mRNA 量 (それぞれ ‘Pkm1’、‘Pkm2’) を比較した。

測定された mRNA 量は、各サンプルの Rn18S 量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n=3$ each)。
^{NS} $P>0.05$ 、^{*} $P<0.05$ 、^{**} $P<0.01$ 。

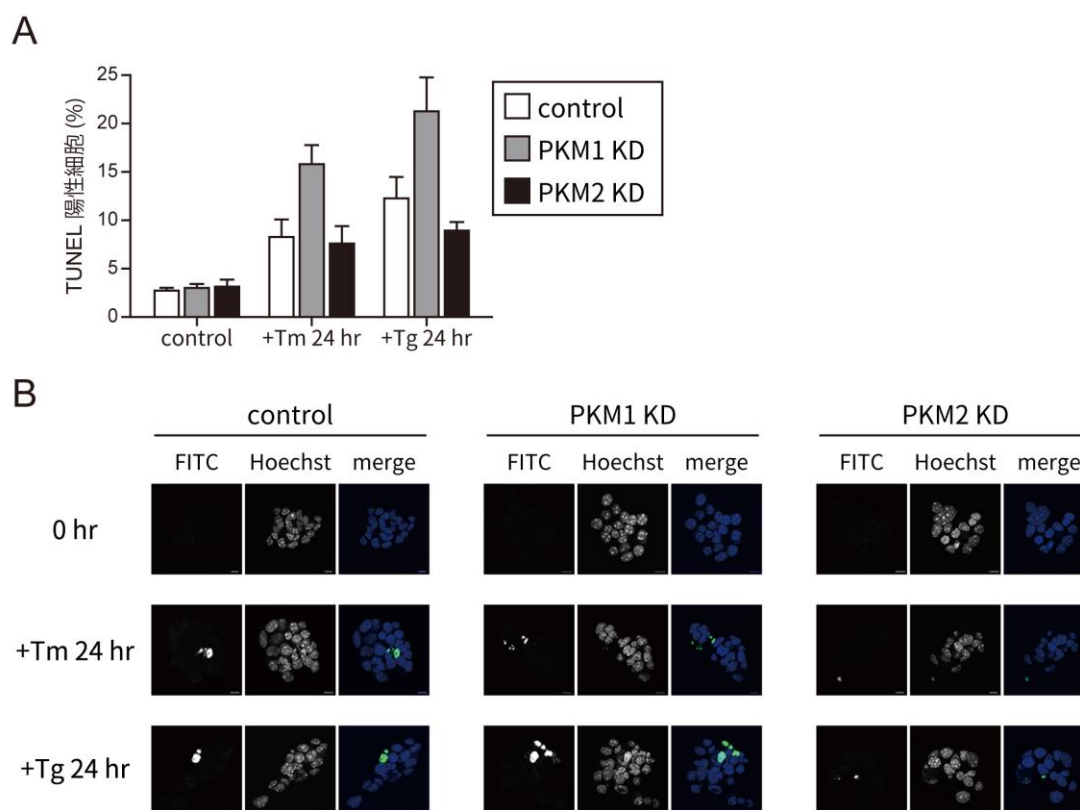


図 47 PKM1 の発現抑制は Beta-TC-6 細胞における小胞体ストレス誘導性アポトーシスを亢進させる

Beta-TC-6 細胞について、negative control、PKM1 標的、PKM2 標的 siRNA をトランスフェクションした (それぞれ ‘control’、‘PKM1 KD’、‘PKM2 KD’)。48 時間後に、10 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシン (Tm)、または 1 μM のタプシガルギン (Tg) を含む培地に交換し、更に 24 時間おいた。その後細胞を固定し、TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の染色と、Hoechst 33342 を用いた全細胞の核の染色を行った。Hoechst 33342 の蛍光によって認識できた細胞 500 個のうち、FITC の蛍光が確認できる細胞 (TUNEL 陽性細胞) の数を数えて割合を計算し、アポトーシス細胞の割合とした。

(A) 小胞体ストレス誘導前 (‘control’)、ツニカマイシン添加後 24 時間 (‘+Tm 24 hr’)、タプシガルギン添加後 24 時間 (‘+Tg 24 hr’) におけるアポトーシス細胞数の割合。

(B) 小胞体ストレス誘導前後の細胞の写真。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n=3$ each)。写真のスケールバーは 10 μm 。

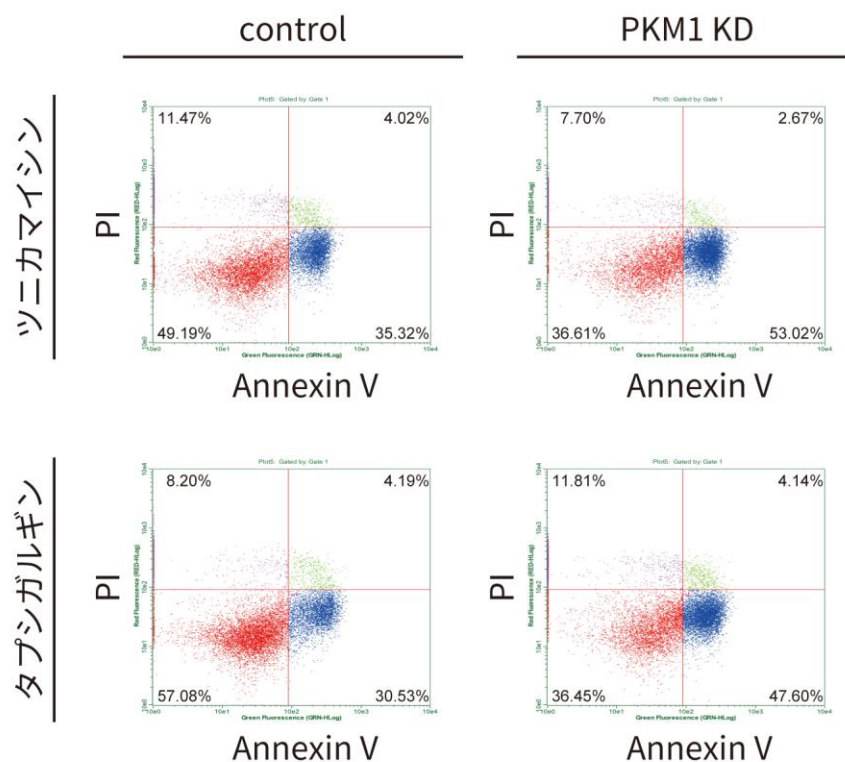


図 48 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞における小胞体ストレス誘導性アポトーシスを亢進させる (Annexin V 法を用いた検証)

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツニカマイシン、または 1 μM のタブシガルギンを含む培地に交換して更に 24 時間おいた。その後細胞を回収し、Annexin V-FITC と propidium iodide (PI) を用いて細胞の染色を行った後、FACS により細胞の蛍光プロパティを確かめた。FACS においてはデブリの集団を除くようにゲーティングを行い、各サンプルそれぞれで 10,000 個の細胞の蛍光プロパティを測定した。

別途用意した非染色細胞サンプルをもとに Annexin V-FITC の蛍光 (‘Annexin V’) と PI の蛍光 (‘PI’) についての閾値を設定し、その閾値を超えたものを Annexin V⁺、及び PI⁺ の細胞とし、細胞を生細胞 (Annexin V⁻/PI⁻)、死細胞 (Annexin V⁻/PI⁺)、早期アポトーシス細胞 (Annexin V⁺/PI⁻)、終期アポトーシス細胞 (Annexin V⁺/PI⁺) の 4 種にわけた。このうち、早期アポトーシス細胞と終期アポトーシス細胞の割合をあわせたものをアポトーシス細胞の割合とした。

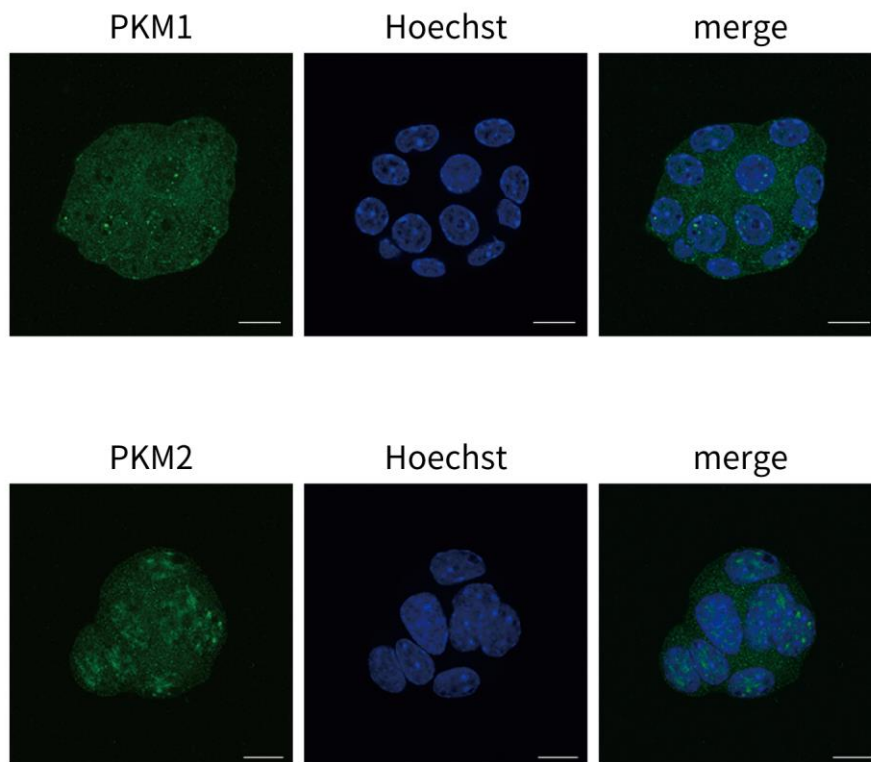


図 49 MIN6 細胞における PKM1 と PKM2 の細胞内局在

MIN6 細胞について、細胞を固定した後、抗 PKM1 抗体（‘PKM1’）または抗 PKM2 抗体（‘PKM2’）を用いて間接蛍光抗体法を行い、更に細胞の核を Hoechst 33342（‘Hoechst’）によって染色した。

写真のスケールバーは 10 μm 。

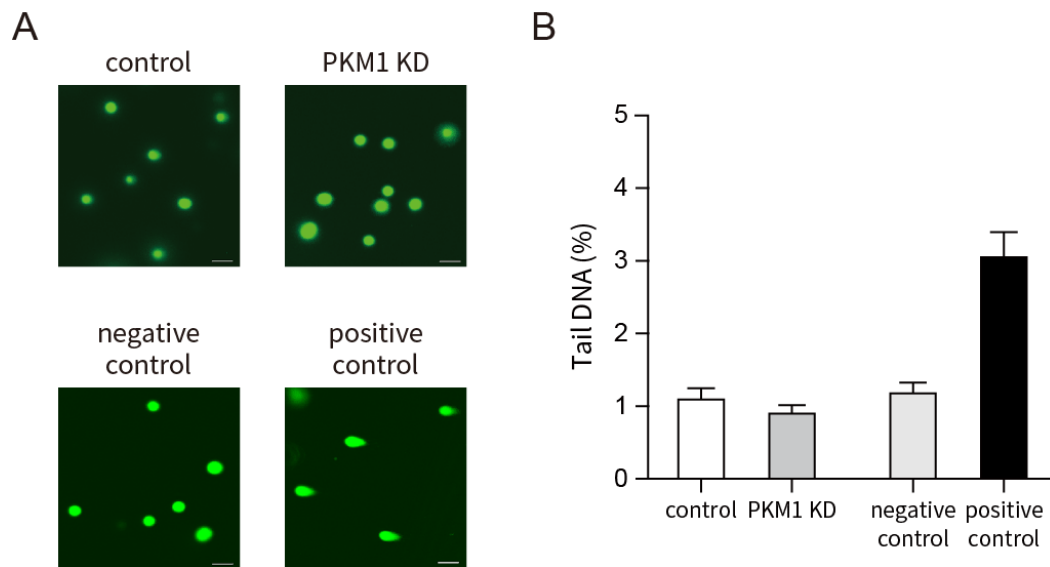


図 50 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞における DNA 傷害の状態に影響を与えない

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してコメットアッセイを行った。各サンプル 100 細胞ずつの写真撮影した後、CASPLab software を用いて細胞の写真を解析し、DNA 傷害の状態を確認した。なお、ネガティブコントロールには培地の交換のみを行い 24 時間培養した MIN6 細胞を、実験のポジティブコントロールには 20 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシンを培地に加えて 24 時間培養した MIN6 細胞を用いた。

(A) control と PKM1 KD、及びネガティブコントロールとポジティブコントロールにおける細胞の写真。写真のスケールバーは 50 μm 。

(B) CASPLab software によって一細胞ずつ計算した Tail DNA (%) について、結果をサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 100$ each)。

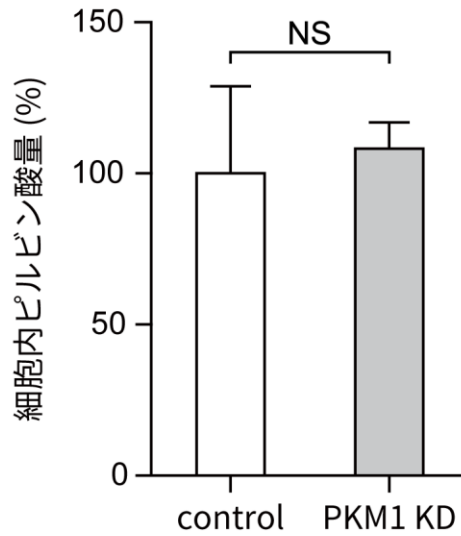


図 51 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞内のピルビン酸量に影響を与えない

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収して細胞内のピルビン酸量を測定した。

測定されたピルビン酸量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control の平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。
^{NS} $P > 0.05$ 。

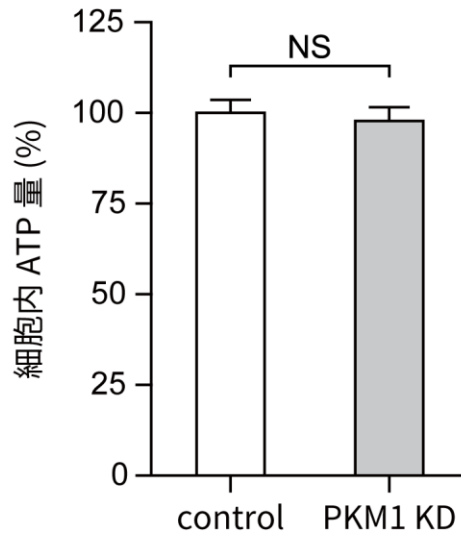


図 52 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞内の ATP 量に影響を与えない

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収して細胞内の ATP 量を測定した。

測定された ATP 量は各サンプルのタンパク質量で補正を行った。結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control の平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

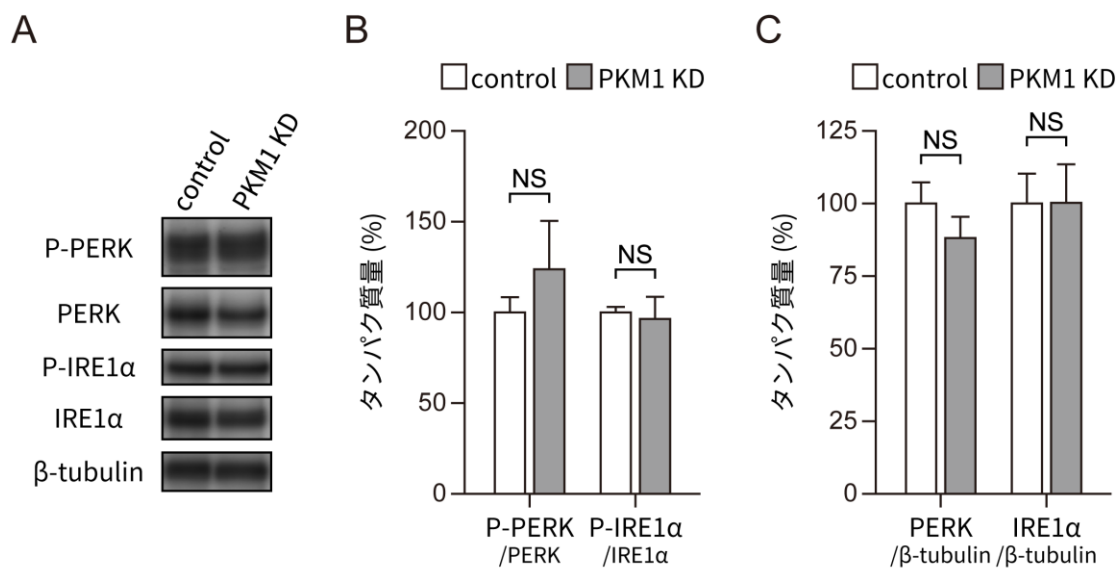


図 53 PKM1 の発現抑制は MIN6 細胞内のリン酸化 PERK、リン酸化 IRE1α 量に影響を与えない

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 PERK (‘P-PERK’)、リン酸化 IRE1α (‘P-IRE1α’)、PERK、IRE1α のタンパク質量を比較した。なお、β-tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 PERK / PERK、及びリン酸化 IRE1α / IRE1α の割合を計算した。

(C) PERK / β-tubulin、及び IRE1α / β-tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

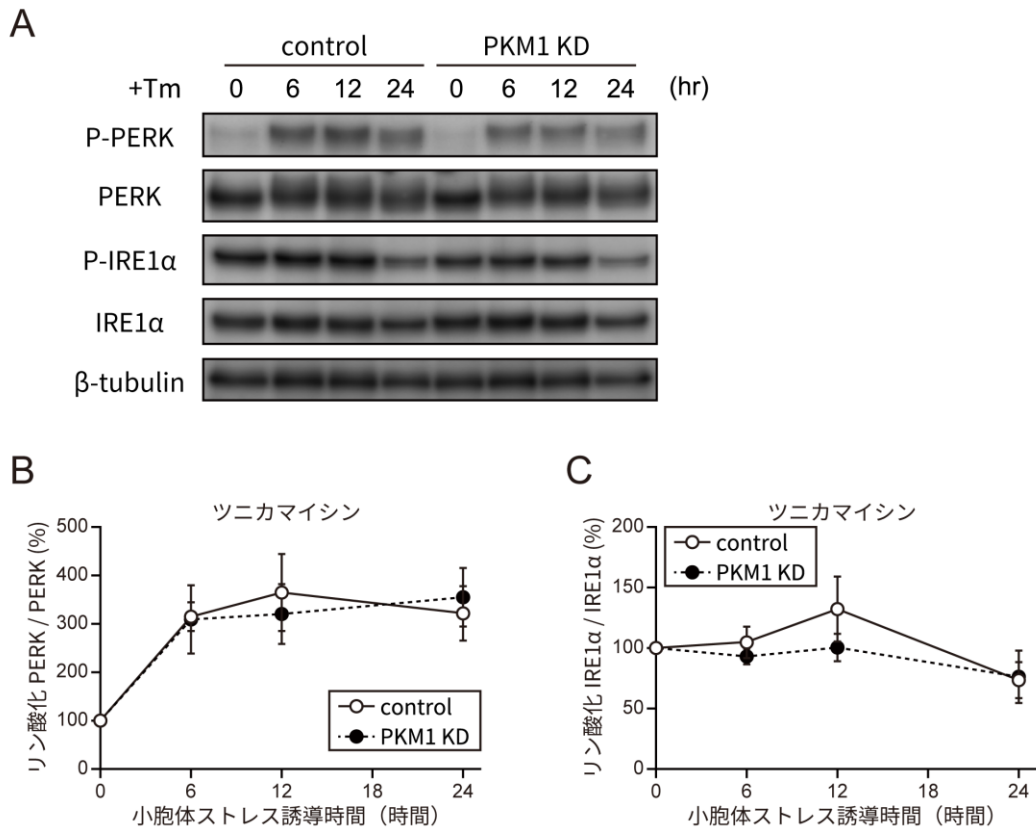


図 54 PKM1 の発現抑制はツニカマイシンによる小胞体ストレス誘導時において、MIN6 細胞内のリン酸化 PERK、リン酸化 IRE1α 量に影響を与えない

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 10 μg/ml のツニカマイシン (Tm) を含む培地に交換し、更に 6、12、24 時間おいた。その後細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 PERK (‘P-PERK’)、リン酸化 IRE1α (‘P-IRE1α’)、PERK、IRE1α のタンパク質量を比較した。なお、β-tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 PERK / PERK の割合の経時的な変化を計算した。

(C) リン酸化 IRE1α / IRE1α の割合の経時的な変化を計算した。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、各サンプルの小胞体ストレス誘導前 (0 hr) における平均値を 100%とした際の割合で表した (n = 3 each)。

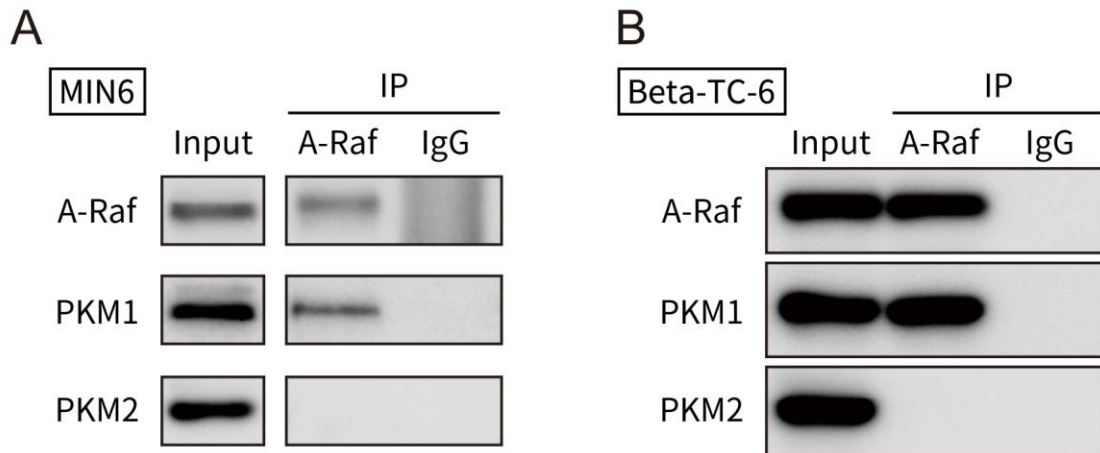


図 55 MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞において、PKM1 は A-Raf と結合している

MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞から得られたライセートについて、抗 A-Raf 抗体（‘A-Raf’）または抗 normal rabbit IgG 抗体（‘IgG’）を用いて、共免疫沈降法によりそれぞれの抗体に結合するタンパク質複合体を得た。共免疫沈降前のサンプル（‘Input’）と共免疫沈降後のサンプル（‘IP’）について、抗 A-Raf 抗体、抗 PKM1 抗体、抗 PKM2 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(A) MIN6 細胞における結果。

(B) Beta-TC-6 細胞における結果。

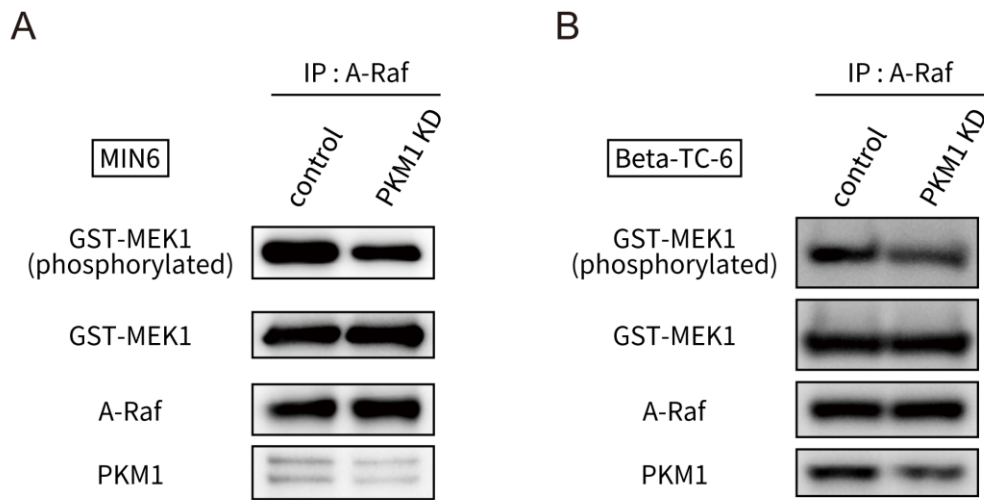


図 56 MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞において、PKM1 の発現抑制時には、A-Raf による GST-MEK1 のリン酸化量が減少する

negative control (‘control’), または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションして 48 時間後の MIN6 細胞及び Beta-TC-6 細胞を回収し、得られたライセートについて、抗 A-Raf 抗体に結合するタンパク質複合体を得た。この A-Raf 複合体とリコンビナント GST-MEK1 タンパク質を混合し、反応させた後、ウェスタンブロッティングを行い、抗リン酸化 MEK 抗体を用いてリン酸化 GST-MEK1 (‘GST-MEK1 (phosphorylated)’) を、抗 GST 抗体を用いて GST-MEK1 を検出した。また、抗 A-Raf 抗体と抗 PKM1 抗体を用いて、各タンパク質量についても確認した。

(A) MIN6 細胞における結果。

(B) Beta-TC-6 細胞における結果。

```

Human 1  MPKKKPTPIQ LNPAPDGS AV NGTSSAETNL EALQKKLEEL ELDEQQRKRL EAFLTQKQKV 60
Mouse 1  MPKKKPTPIQ LNPAPDGS AV NGTSSAETNL EALQKKLEEL ELDEQQRKRL EAFLTQKQKV 60

Human 61  GELKDDDFEK ISELGAGNGG VVFKVSHKPS GLVMARKLIH LEIKPAIRNQ IIRELQVLHE 120
Mouse 61  GELKDDDFEK ISELGAGNGG VVFKVSHKPS GLVMARKLIH LEIKPAIRNQ IIRELQVLHE 120

Human 121 CNSPYIVGFY GAFYSDGEIS ICMEHMDGGS LDQVLK KAGR IPEQILGKVS IAVIKGLTYL 180
Mouse 121 CNSPYIVGFY GAFYSDGEIS ICMEHMDGGS LDQVLK KAGR IPEQILGKVS IAVIKGLTYL 180

Human 181 REKHKIMHRD VKPSNILVNS RGEIKLCDFG VSGQLIDSMA NSFVGTRSYM SPERLQGTHY 240
Mouse 181 REKHKIMHRD VKPSNILVNS RGEIKLCDFG VSGQLIDSMA NSFVGTRSYM SPERLQGTHY 240

Human 241 SVQSDIWSMG LSLVEMAVGR YPIPPDAKE LELMFGCQVE GDA AETPPRP RTPGRPLSSY 300
Mouse 241 SVQSDIWSMG LSLVEMAVGR YPIPPDAKE LELLFGCHVE GDA AETPPRP RTPGRPLSSY 300

Human 301 GMDSRPPMAI FELLDYIVNE PPPKLPSGVF SLEFQDFVNK CLIKNPAERA DLKQLMVHAF 360
Mouse 301 GMDSRPPMAI FELLDYIVNE PPPKLPSGVF SLEFQDFVNK CLIKNPAERA DLKQLMVHAF 360

Human 361 IKRSDAEEVD FAGWLCSTIG LNPSTPTHA AGV 393
Mouse 361 IKRSDAEEVD FAGWLCSTIG LNPSTPTHA ASI 393

```

図 57 ヒト MEK1 とマウス MEK1 はアミノ酸レベルで 98.98%の相同性をもつ

ヒト MEK1 の配列（上段、Q02750 MP2K1_HUMAN）とマウス MEK1 の配列（下段、P31938 MP2K1_MOUSE）を UniProt (<http://www.uniprot.org/>) で比較した結果。異なる残基をもつ部分をハイライトで表した。

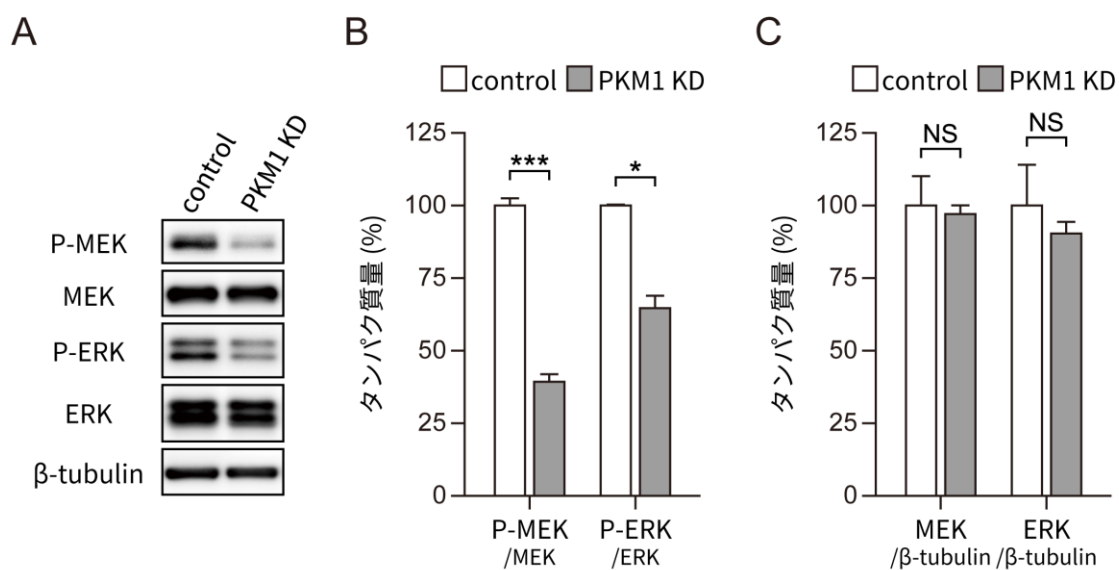


図 58 PKM1 の発現抑制により MIN6 細胞内のリン酸化 MEK、リン酸化 ERK 量が減少する

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 MEK (‘P-MEK’)、リン酸化 ERK (‘P-ERK’)、MEK、ERK のタンパク質量を比較した。なお、β-tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 MEK / MEK、及びリン酸化 ERK / ERK の割合を計算した。

(C) MEK / β-tubulin、及び ERK / β-tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。NS $P > 0.05$ 、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

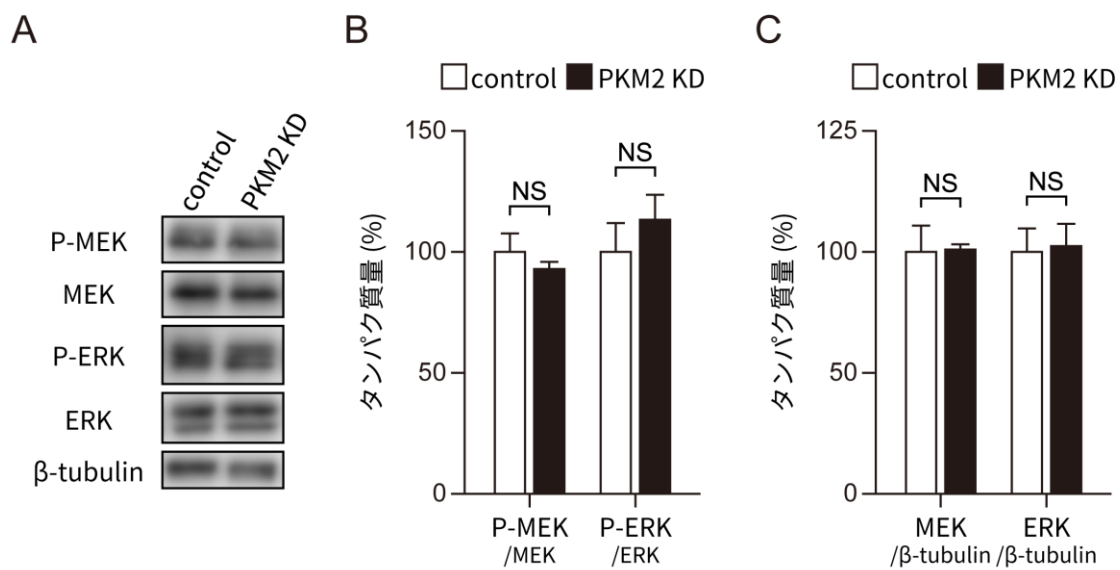


図 59 PKM2 の発現抑制は MIN6 細胞内のリン酸化 MEK、リン酸化 ERK 量に影響を与えない

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 MEK (‘P-MEK’)、リン酸化 ERK (‘P-ERK’)、MEK、ERK のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 MEK / MEK、及びリン酸化 ERK / ERK の割合を計算した。

(C) MEK / β -tubulin、及び ERK / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

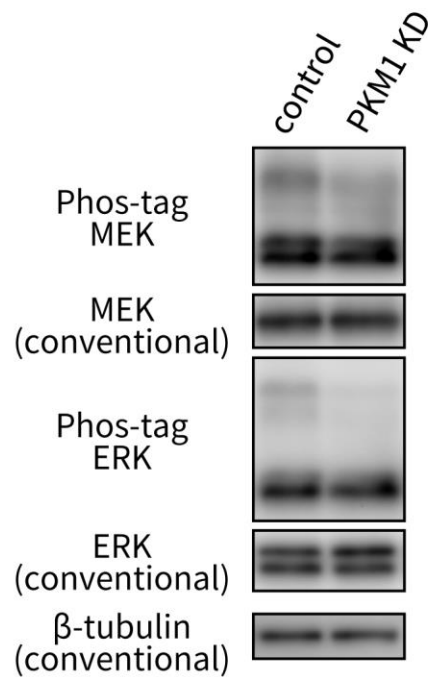


図 60 PKM1 の発現抑制により MIN6 細胞内のリン酸化 MEK、リン酸化 ERK 量が減少する (Phos-tag SDS-PAGE による検証)

MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収して、Phos-tag SDS-PAGE を用いたウェスタンブロッティング (‘Phos-tag’) を行い、抗 MEK 抗体、抗 ERK 抗体を用いて検出を行った。

なお、通常の SDS-PAGE を用いたウェスタンブロッティング (‘conventional’) も同時に行い、MEK、ERK、及び β-tubulin の量に大きな変化がないことを確認した。

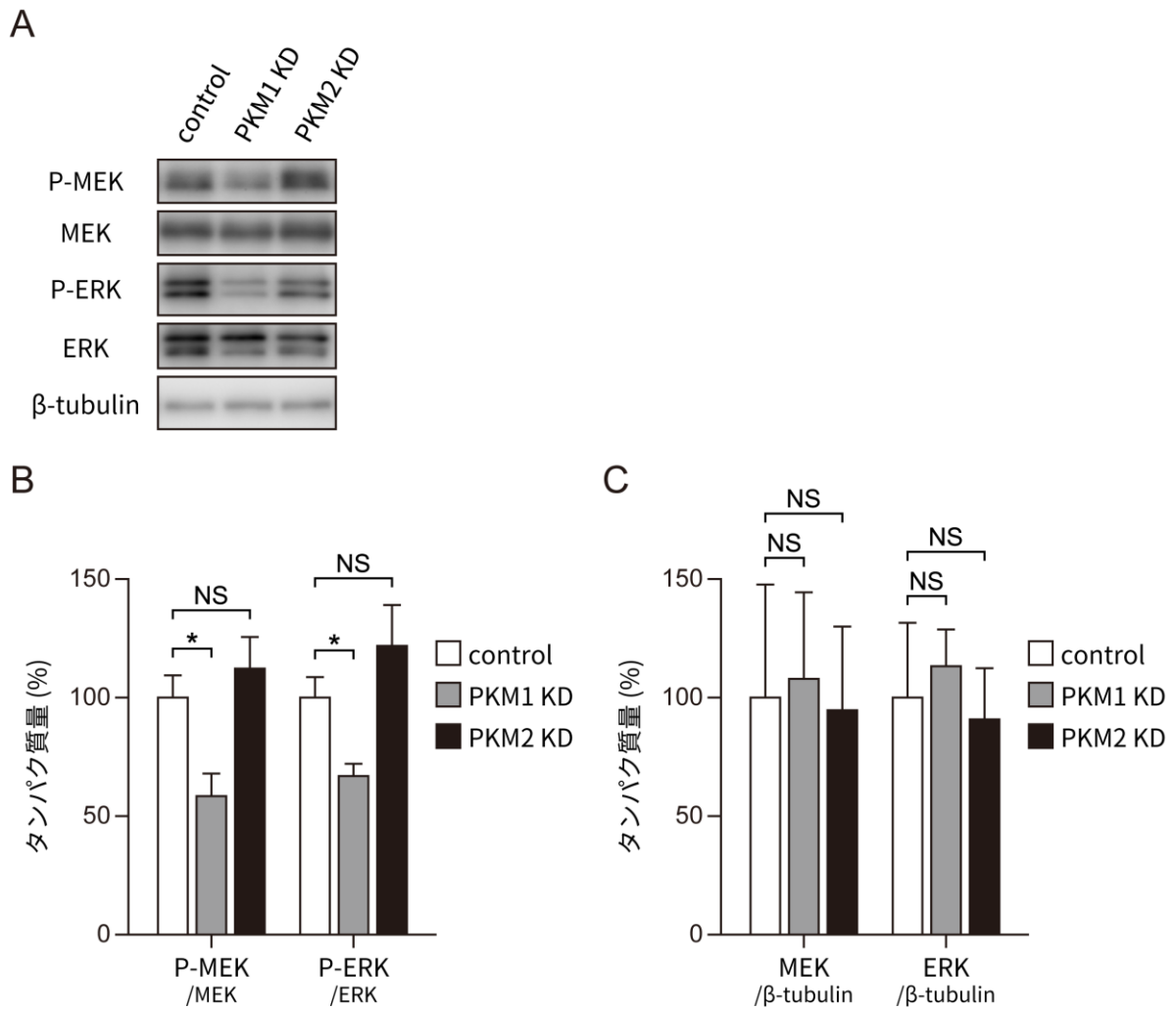


図 61 PKM1 の発現抑制により Beta-TC-6 細胞内のリン酸化 MEK、リン酸化 ERK 量が減少するが、PKM2 の発現抑制は影響を与えない

(A) Beta-TC-6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、または PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 MEK (‘P-MEK’)、リン酸化 ERK (‘P-ERK’)、MEK、ERK のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 MEK / MEK、及びリン酸化 ERK / ERK の割合を計算した。

(C) MEK / β -tubulin、及び ERK / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値±標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{*} $P < 0.05$ 。

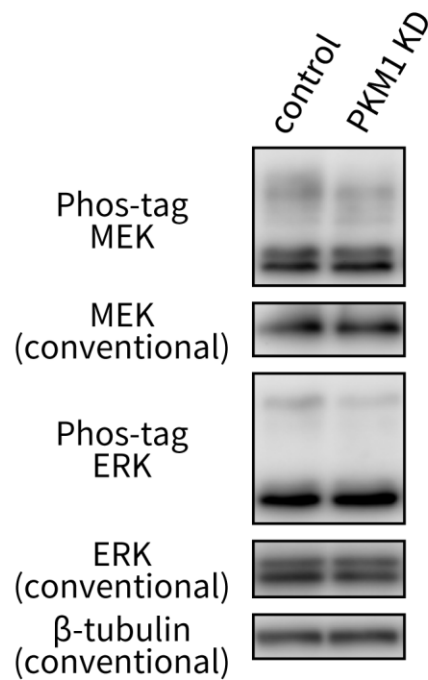


図 62 PKM1 の発現抑制により Beta-TC-6 細胞内のリン酸化 MEK、リン酸化 ERK 量が減少する (Phos-tag SDS-PAGE による検証)

Beta-TC-6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収して、Phos-tag SDS-PAGE を用いたウェスタンブロッティング (‘Phos-tag’) を行い、抗 MEK 抗体、抗 ERK 抗体を用いて検出を行った。

なお、通常の SDS-PAGE を用いたウェスタンブロッティング (‘conventional’) も同時に行い、MEK、ERK、及び β -tubulin の量に大きな変化がないことを確認した。

Human 1	MDEADRRLLR RCRLRLVEEL QVDQLWDALL SRELF ^Q RP ^H MI EDIQ ^R RAGSGS RRDQARQL ^I I	60
Mouse 1	MDEAD ^R QLLR RCRVRLVSEL QVAELWDALL SRELF ^T R ^D MI EDIQ ^Q AGSGS RRDQARQL ^V T	60
Human 61	DLETRGSQAL PLFISCLEDT GQDMLASFLR TNRQA ^A AKLS- -----	99
Mouse 61	DLETRGRQAL PLFISCLEDT GQGTLASL ^L LQ SGRQA ^A KQDP EAVKPLDHLV PVVLGPMGLT	120
Human 100	----- --KPTLENLT PVVLRP----- -EIRKPEVLR PET ^P RPVDIG SGGFGDVGAL	142
Mouse 121	AK ^E QRVVKLD PSQPAVGNLT PVVLR ^G PEELW PARLKPEVLR PET ^P RPVDIG SGG ^A H ^D V ^C VP	180
Human 143	ESLRGNADLA YILSM ^E PCGH CLII ^N NV ^N FC RESGLRTRTG SNIDCEKLRR RFSS ^L HFMVE	202
Mouse 181	GKIRGHADMA YTLDS ^D PCGH CLII ^N NV ^N FC PSSGLGTRTG SNLDRDKLEH RFRWLRFMVE	240
Human 203	VKGD ^L TAKKM VLALLELAQQ DHGALDCCVV VILSHGCQAS HLQFPGAVYG TDGCPVSVEK	262
Mouse 241	VK ^N DLTAKKM VTALMEMAHR NHRALDC ^F VV VILSHGCQAS HLQFPGAVYG TDGCS ^V SIEK	300
Human 263	IVNIFNGT ^S C PSLGGKPKLF FIQACGG ^E QK DHGFEV ^A STS PEDES ^P GS ^N P EPDATPFQEG	322
Mouse 301	IVNIFNG ^S SGC PSLGGKPKLF FIQACGG ^E QK DHGFEV ^A CTS SQGRTLD ^S DS EPDAV ^P YQEG	360
Human 323	LRTFDQLDAI SSLPTPSDIF VSYSTFPGFV SWRDPKSGSW YVETLDDIFE QWAHSEDLQS	393
Mouse 361	PRPLDQLDAV SSLPTPSDIL VSYSTFPGFV SWRDKKSGSW YIETLDGILE QWARS ^E DLQS	420
Human 383	LLLRVANAVS VKGIYKMPG CFNFLRKKLF FKTS	416
Mouse 421	LLLRVANAVS AKGTYKQIPG CFNFLRKKLF FKTS	454

図 63 ヒト caspase-9 の Thr125 残基とマウス caspase-9 の Thr163 残基における相同性

ヒト caspase-9 の配列（上段、P55211 CASP9_HUMAN）とマウス caspase-9 の配列（下段、Q8C3Q9 CASP9_MOUSE）を UniProt (<http://www.uniprot.org/>) で比較した結果。これらはアミノ酸レベルで 71.59%の相同性をもつ。異なる残基をもつ部分を青のハイライトで、ヒトの Thr125 残基とマウスの Thr163 残基を黄のハイライトで表した。

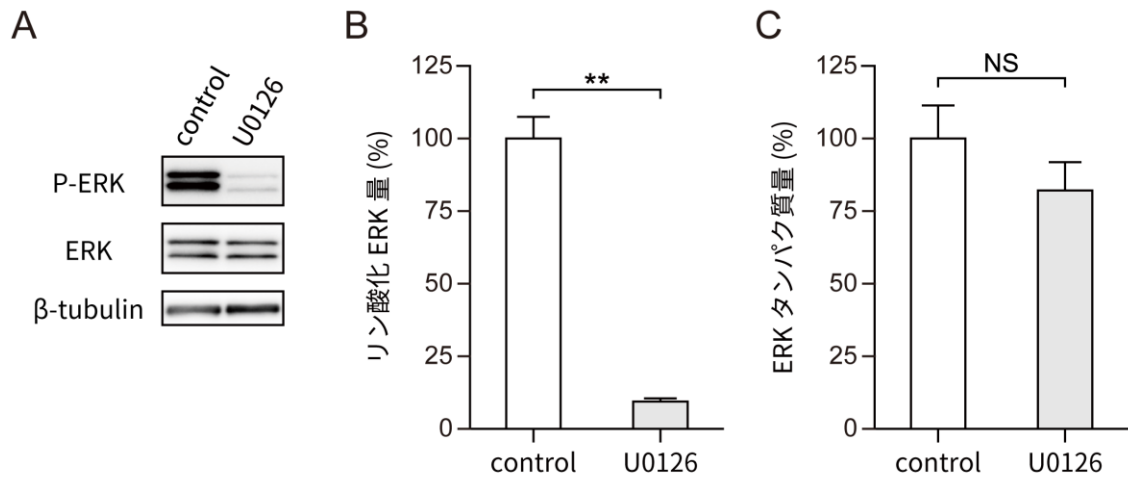


図 64 U0126 添加により MIN6 細胞内のリン酸化 ERK 量が減少する

(A) MIN6 細胞について、40 μ M の U0126 (‘U0126’) または等量の DMSO (‘control’) を加え、2 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 ERK (‘P-ERK’)、ERK のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 ERK / ERK の割合を計算した。

(C) ERK / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$ 。

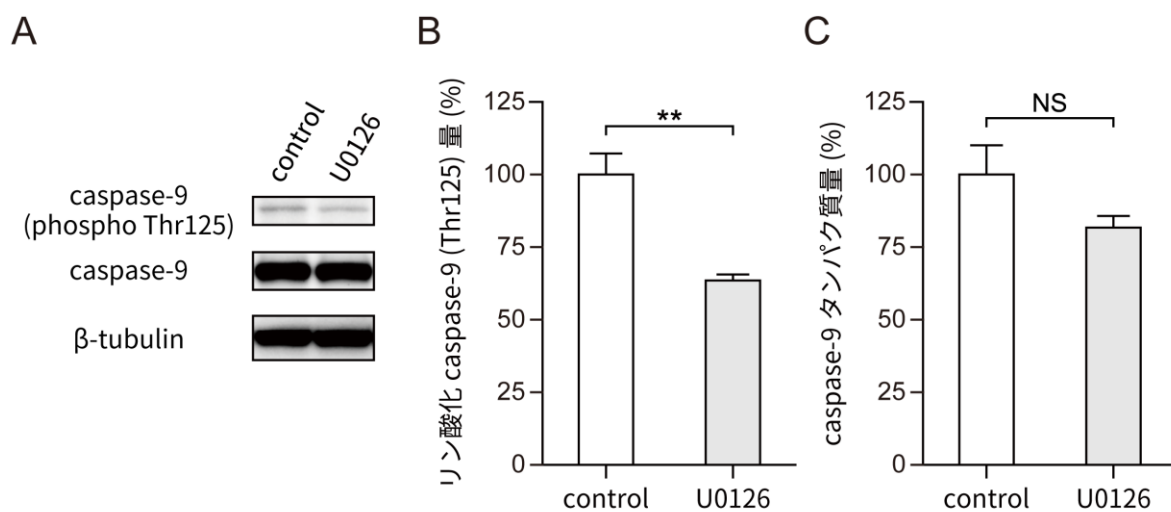


図 65 U0126 添加により MIN6 細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) 量が減少する

(A) MIN6 細胞について、40 μ M の U0126 (‘U0126’) または等量の DMSO (‘control’) を加え、2 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) (‘caspase-9 (phospho Thr125)’)、caspase-9 のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 caspase-9 (Thr125) / caspase-9 の割合を計算した。

(C) caspase-9 / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$ 。

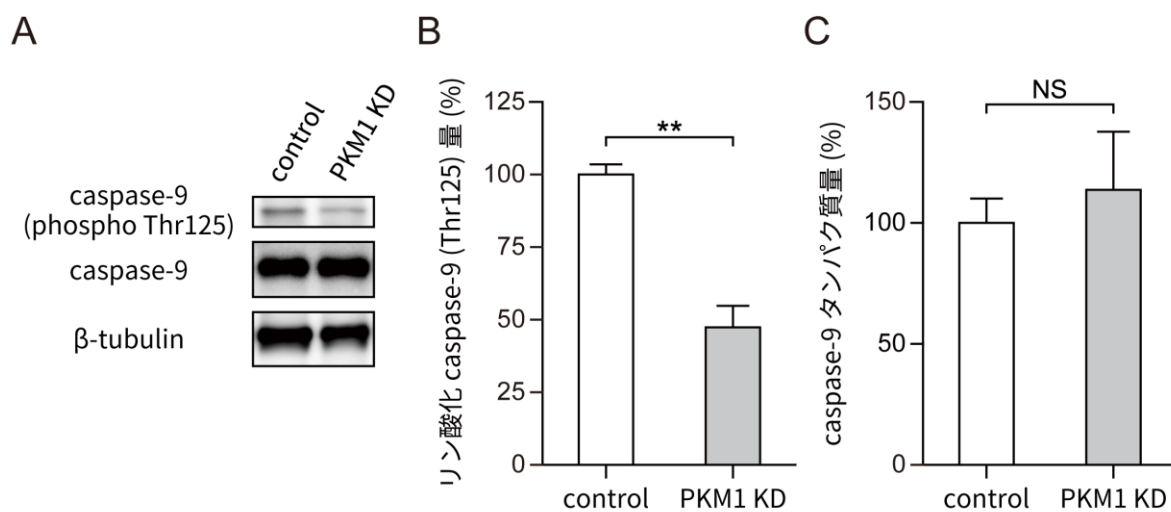


図 66 PKM1 の発現抑制により MIN6 細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) 量が減少する

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) (‘caspase-9 (phospho Thr125)’)、caspase-9 のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 caspase-9 (Thr125) / caspase-9 の割合を計算した。

(C) caspase-9 / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の比で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$ 。

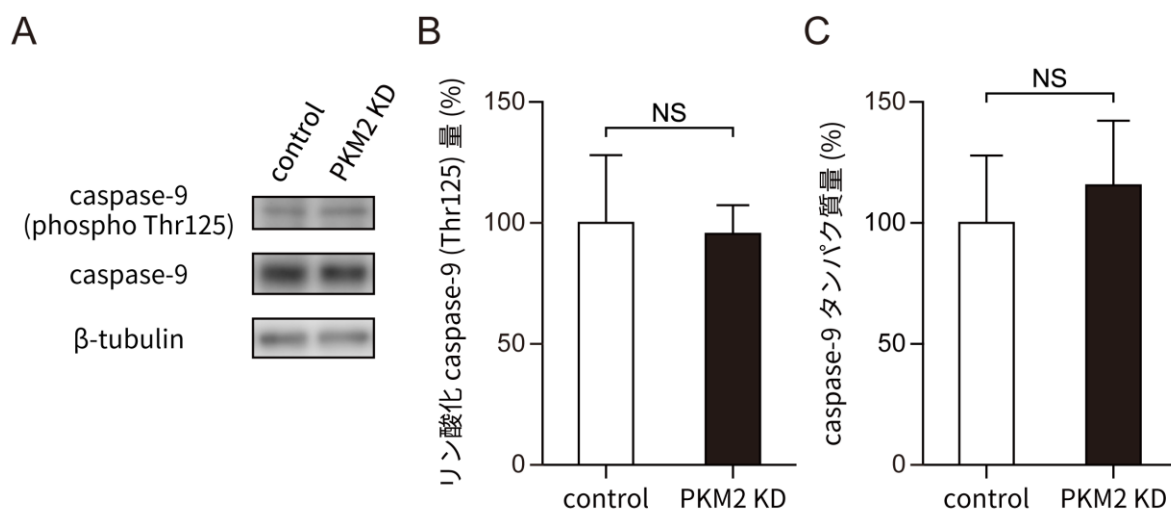


図 67 PKM2 の発現抑制は MIN6 細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) 量に影響を与えない

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) (‘caspase-9 (phospho Thr125)’)、caspase-9 のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 caspase-9 (Thr125) / caspase-9 の割合を計算した。

(C) caspase-9 / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

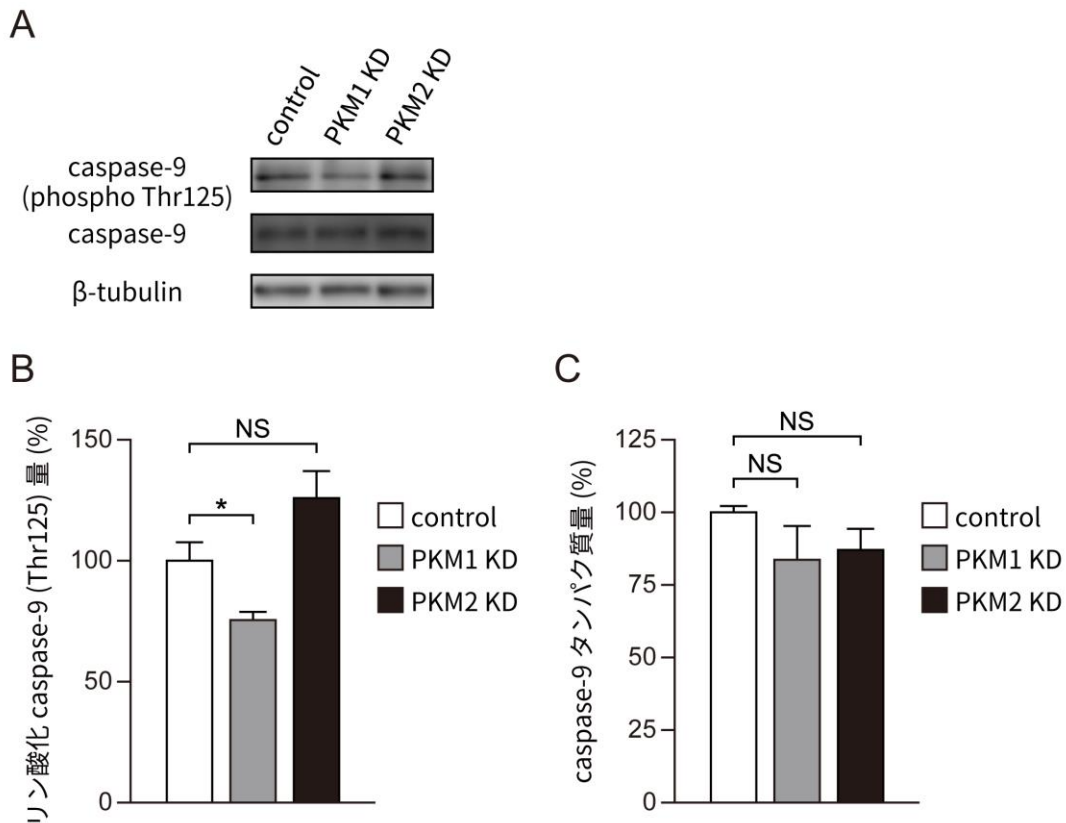


図 68 PKM1 の発現抑制により Beta-TC-6 細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) 量が減少するが、PKM2 の発現抑制は影響を与えない

(A) Beta-TC-6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、または PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内のリン酸化 caspase-9 (Thr125) (‘caspase-9 (phospho Thr125)’)、caspase-9 のタンパク質量を比較した。なお、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) リン酸化 caspase-9 (Thr125) / caspase-9 の割合を計算した。

(C) caspase-9 / β -tubulin の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、* $P < 0.05$ 。

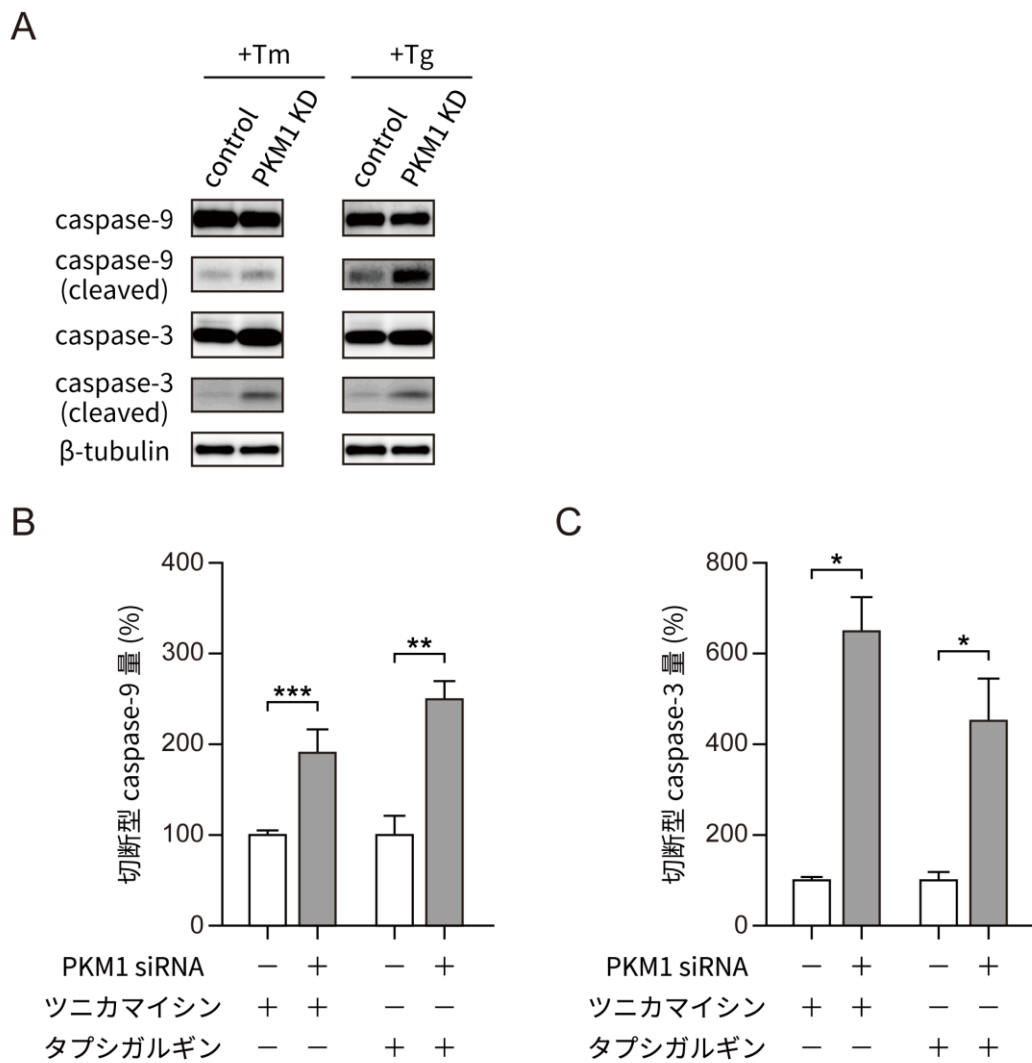


図 69 PKM1 の発現抑制により小胞体ストレス誘導時における MIN6 細胞内の切断型 caspase-9、切断型 caspase-3 量が増加する

(前ページ)

図 69 PKM1 の発現抑制により小胞体ストレス誘導時における MIN6 細胞内の切断型 caspase-9、切断型 caspase-3 量が増加する

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM1 標的 (‘PKM1 KD’) siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 10 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシン (‘Tm’)、または 1 μM のタプシガルギン (‘Tg’) を含む培地に交換し、更に 24 時間おいた。その後細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内の caspase-9、切断型 caspase-9 (‘caspase-9 (cleaved)’)、caspase-3、切断型 caspase-3 (‘caspase-3 (cleaved)’) のタンパク質量を比較した。なお、切断型 caspase-9 は抗 cleaved caspase-9 抗体を用いて検出し、切断型 caspase-3 は抗 caspase-3 抗体を用いて検出した。また、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) 各条件における切断型 caspase-9 / caspase-9 の割合を計算した。

(C) 各条件における切断型 caspase-3 / caspase-3 の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

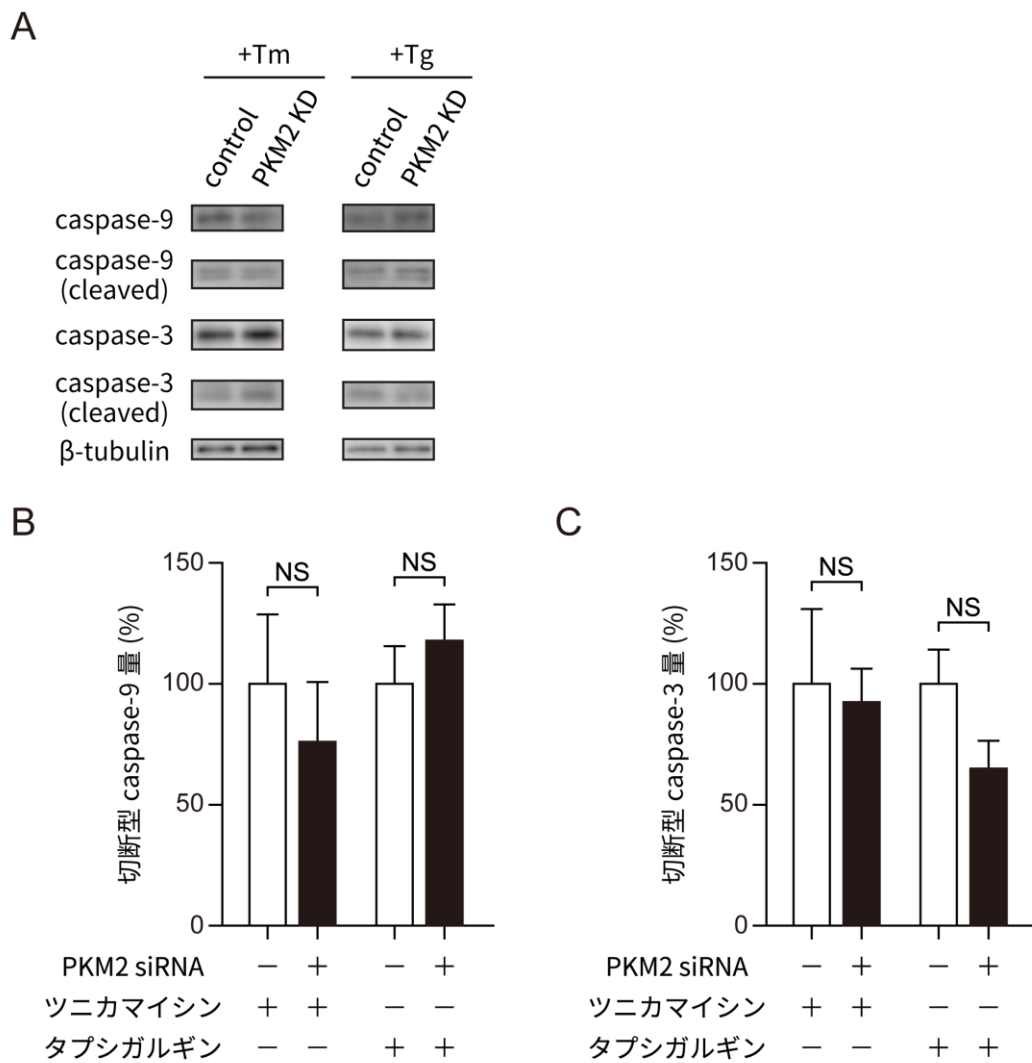


図 70 PKM2 の発現抑制は小胞体ストレス誘導時における MIN6 細胞内の切断型 caspase-9、切断型 caspase-3 量に影響を与えない

(前ページ)

図 70 PKM2 の発現抑制は小胞体ストレス誘導時における MIN6 細胞内の切断型 caspase-9、切断型 caspase-3 量に影響を与えない

(A) MIN6 細胞について、negative control (‘control’)、または PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 10 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシン (‘Tm’)、または 1 μM のタプシガルギン (‘Tg’) を含む培地に交換し、更に 24 時間おいた。その後細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内の caspase-9、切断型 caspase-9 (‘caspase-9 (cleaved)’)、caspase-3、切断型 caspase-3 (‘caspase-3 (cleaved)’) のタンパク質量を比較した。なお、切断型 caspase-9 は抗 cleaved caspase-9 抗体を用いて検出し、切断型 caspase-3 は抗 caspase-3 抗体を用いて検出した。また、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) 各条件における切断型 caspase-9 / caspase-9 の割合を計算した。

(C) 各条件における切断型 caspase-3 / caspase-3 の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 。

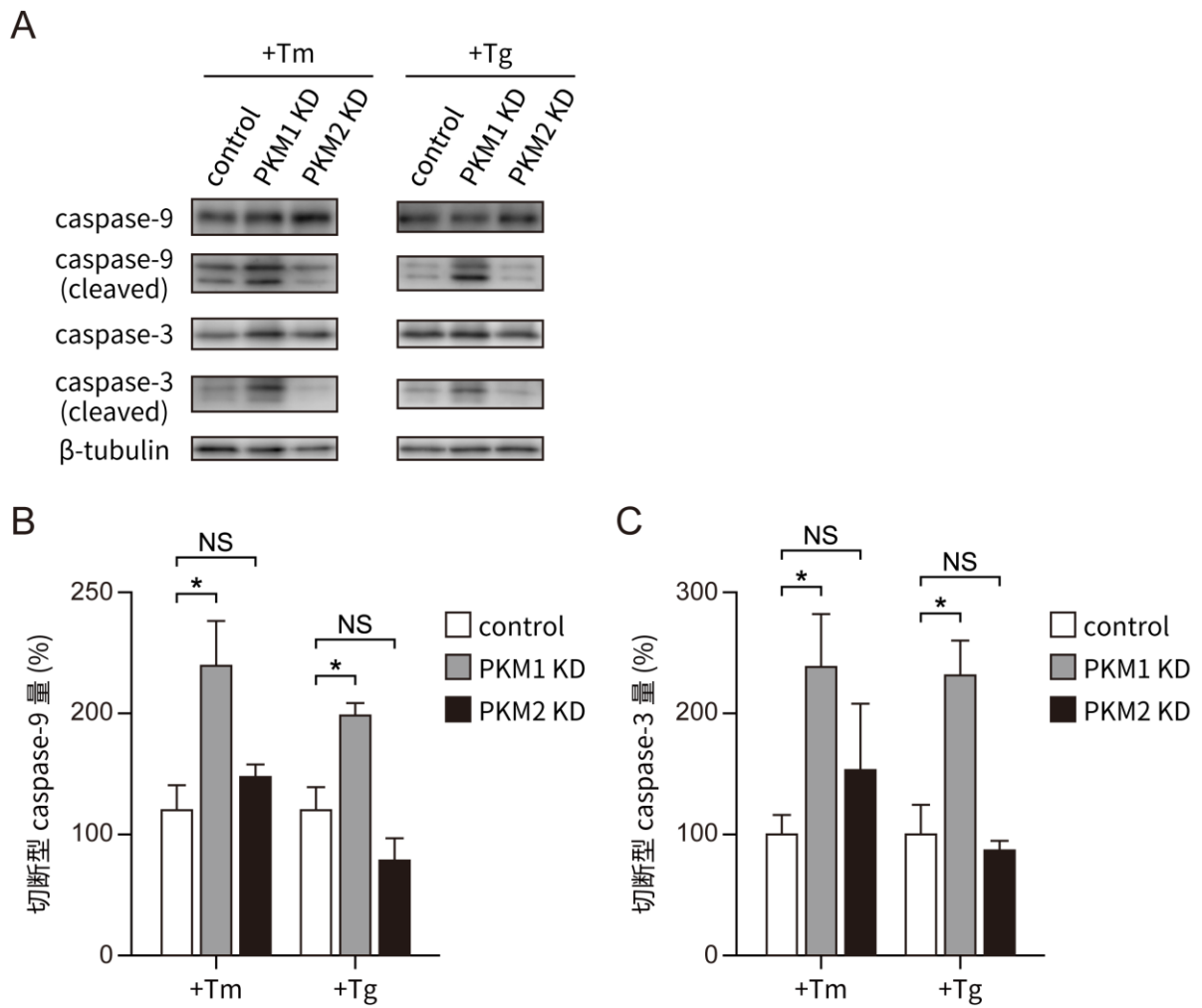


図 71 PKM1 の発現抑制により小胞体ストレス誘導時における Beta-TC-6 細胞内の切断型 caspase-9、切断型 caspase-3 量が増加するが、PKM2 の発現抑制は影響を与えない

(前ページ)

図 71 PKM1 の発現抑制により小胞体ストレス誘導時における Beta-TC-6 細胞内の切断型 caspase-9、切断型 caspase-3 量が増加するが、PKM2 の発現抑制は影響を与えない

(A) Beta-TC-6 細胞について、negative control (‘control’)、PKM1 標的 (‘PKM1 KD’)、または PKM2 標的 (‘PKM2 KD’) siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 10 $\mu\text{g/ml}$ のツニカマイシン (‘Tm’)、または 1 μM のタプシガルギン (‘Tg’) を含む培地に交換し、更に 24 時間おいた。その後細胞を回収してウェスタンブロッティングを行い、細胞内の caspase-9、切断型 caspase-9 (‘caspase-9 (cleaved)’)、caspase-3、切断型 caspase-3 (‘caspase-3 (cleaved)’) のタンパク質量を比較した。なお、切断型 caspase-9 は抗 cleaved caspase-9 抗体を用いて検出し、切断型 caspase-3 は抗 caspase-3 抗体を用いて検出した。また、 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) 各条件における切断型 caspase-9 / caspase-9 の割合を計算した。

(C) 各条件における切断型 caspase-3 / caspase-3 の割合を計算した。

結果はサンプルごとの平均値 \pm 標準誤差で、control サンプルの平均値を 100%とした際の割合で表した ($n = 3$ each)。^{NS} $P > 0.05$ 、* $P < 0.05$ 。

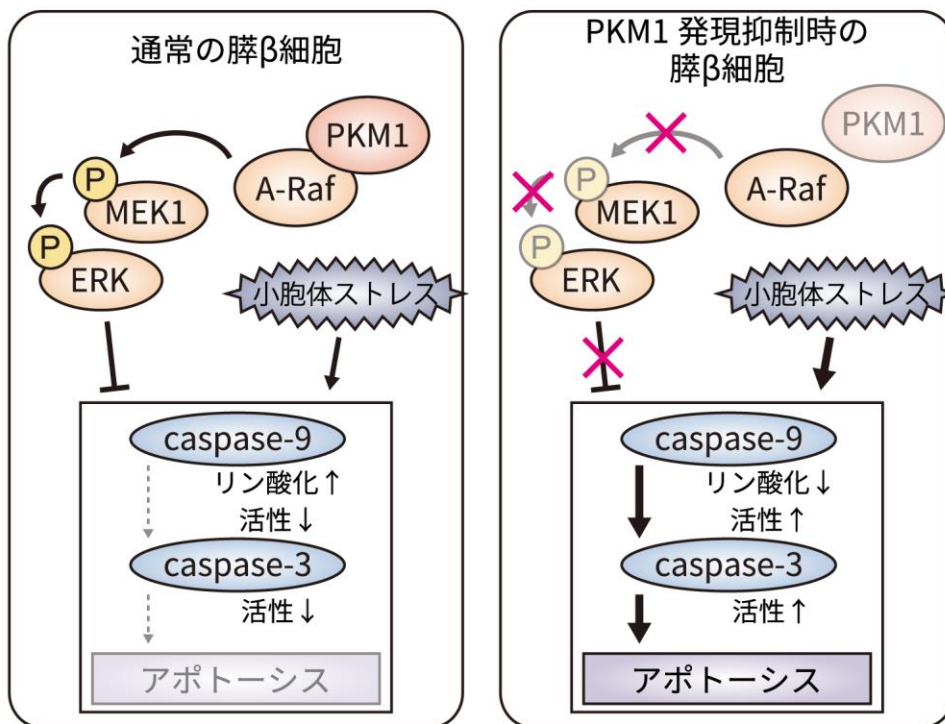


図 72 マウス膵β細胞における PKM1 を介した小胞体ストレス誘導性アポトーシス抑制のモデル図

通常の膵β細胞においては、PKM1 が A-Raf と相互作用することによって MEK1 のリン酸化（活性化）が起こり、続く ERK のリン酸化（活性化）、及び caspase-9（Thr125）のリン酸化（不活化）が生じていると考えられる。リン酸化が亢進した caspase-9 では活性化が起こりづらくなり、caspase-3 の切断、及び活性化も抑制される。こうしたメカニズムを通じて、PKM1 はアポトーシスを抑制する（左）。

一方で、PKM1 が存在しない場合には、A-Raf との相互作用がなくなることでリン酸化 MEK1、リン酸化 ERK が減少し、caspase-9（Thr125）のリン酸化も減少することが考えられる。その結果、caspase-9 は活性化しやすくなり、caspase-3 の活性化も容易となる。その結果、PKM1 の発現を抑制した際には小胞体ストレス誘導性アポトーシスが起こりやすくなる（右）。

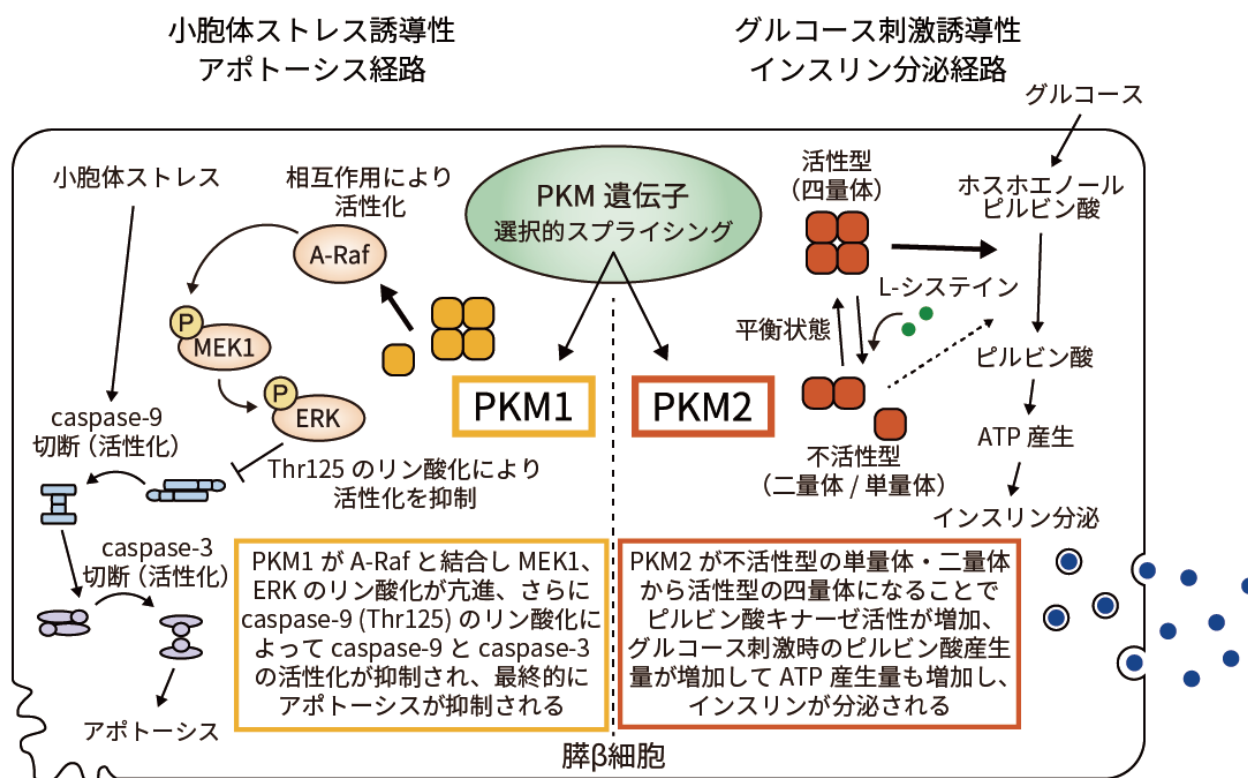


図 73 マウス膵β細胞における PKM1、PKM2 の機能のモデル図

本研究によって明らかとなった、マウス膵β細胞における M 型ピルビン酸キナーゼ、PKM1 と PKM2 の機能。

PKM1 は膵β細胞において、小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する機能をもつ。具体的なメカニズムとしては、A-Raf との相互作用を通じて MEK1 のリン酸化、ERK のリン酸化を亢進させる。リン酸化された ERK は caspase-9 の Thr125 残基をリン酸化することで、caspase-9 の活性化を抑制する。これにより caspase-3 の活性化も抑制され、小胞体ストレス誘導時にアポトーシスが抑制される。

PKM2 は膵β細胞において、グルコース刺激誘導性インスリン分泌を制御する機能をもつ。具体的なメカニズムとしては、グルコース刺激時にホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に変える解糖系の反応に関わる。L-システインの作用などによって不活性型の単量体、二量体で存在する際にはピルビン酸キナーゼ活性が低く、ピルビン酸の産生能も低い。四量体となることで活性が上昇し、グルコース刺激時のピルビン酸の産生量増加、ATP 産生量増加を介してインスリン分泌が生じる。

このように PKM1 と PKM2 が膵β細胞において異なる経路の制御に関わることで、正常な膵β細胞の機能が維持されていると考えられる。