

## 論文の内容の要旨

論文題目 マウス膵 $\beta$ 細胞におけるM型ピルビン酸キナーゼの機能解析

氏名 堀内 雄太

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 $\beta$ 細胞から分泌されるインスリンである。血糖値が上昇すると、それを感知した膵臓の $\beta$ 細胞（膵 $\beta$ 細胞）がインスリンの分泌を行い、他の臓器においてグルコースの取り込みやグリコーゲン合成などが促進される。それゆえ、インスリンの分泌やインスリンへの応答に異常が生じると、血糖値が維持できなくなり、高血糖や低血糖となってしまう。

慢性的な高血糖は生体に対して悪影響を及ぼすことが知られていることから、インスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖状態は、糖尿病（diabetes mellitus）として診断される。糖尿病の患者数は年々増えており、2017年現在で全世界に4億人以上いると推計されているが、2040年には約1.5倍の6億人以上に増加すると見込まれている。そのうち90%程度が生活習慣病とも呼ばれる2型糖尿病（type 2 diabetes mellitus, T2D）であるとされていることから、T2Dの発症を抑える、あるいは効果的な治療を行うことは、社会的にも重要かつ喫緊の課題となっている。

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 $\beta$ 細胞の機能不全などが考えられている。特に近年は、膵 $\beta$ 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 $\beta$ 細胞量の減少や個々の膵 $\beta$ 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。

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細胞への負担が増える、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。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。

本研究においてはまず、アミノ酸の一種、L-システインと膵β細胞機能との関係に着目した。これまでも血中の 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ついての報告がなされていたが、膵β細胞における具体的な作用メカニズムは不明であったことから、その解明を試みた。そしてその過程で、M 型ピルビン酸キナーゼの機能が膵β細胞において大きな役割をもつことが示唆された。そこで、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、M 型ピルビン酸キナーゼが膵β細胞において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。

本研究では主に、マウス膵β細胞由来の培養細胞である MIN6 細胞を用いた実験を行い、ピルビン酸キナーゼの 2 種のアイソフォーム、PKM2 と PKM1 が、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に関与していることを明らかにした。

まず初めに、L-システインが膵β細胞機能に与える影響を確かめたところ、L-システインを培地に低濃度（1 または 2 mM）かつ長時間（24 時間）添加した際に、MIN6 細胞におけるグルコース刺激誘導性インスリン分泌（glucose-stimulated insulin secretion, GSIS）が抑制されることがわかった。特に、GSIS はグルコース刺激後すぐに見られる第一相と、刺激から 10 分ほど後に見られる第二相からなる二相性を示すことが知られているが、L-システインが二相性の GSIS の第一相と第二相をともに抑制することを明らかにすることができた。また、この結果は、マウスの膵島を用いた実験によっても確かめられた。GSIS はグルコース刺激後の一時的な ATP 産生量の増加に伴って起こることから、続いて ATP 産生量を確認したところ、L-システイン添加によってグルコース刺激後の一時的な ATP 産生量増加が見られなくなっていることがわかった。更に、L-システインを添加した細胞において細胞内代謝産物の網羅的解析（メタボローム解析）を行ったところ、細胞内のピルビン酸量が減少していることが明らかとなった。これらの結果から、L-システインによる GSIS 抑制がピルビン酸キナーゼ活性の制御と関連することが考えられた。

膵β細胞においては、ピルビン酸キナーゼの 4 種のアイソフォームのうち M 型の 2 種、PKM1 と PKM2 が主に発現していると示唆されていることから、siRNA を用いて PKM1、及び PKM2 の発現抑制を行い、GSIS にどのような影響が出るかを確認した。その結果、PKM1 の発現抑制時には GSIS

に有意な変化は見られなかったものの、PKM2 の発現を抑制した際には、GSIS の抑制、及び、グルコース刺激後の一時的な ATP 産生量増加の抑制が見られることが確かめられた。GSIS の抑制については、L-システイン添加と PKM2 発現抑制の効果が重複しないことが示唆されたため、L-システインが PKM2 の活性抑制を通じて GSIS を抑制している可能性が考えられた。

この可能性を検証するため、PKM2 の特異的な活性化剤として知られる DASA-10 を添加し、L-システインによる阻害効果が回復するかどうかを確認した。その結果、L-システイン存在下であっても、DASA-10 添加によって GSIS の第一相、第二相がともに回復することが明らかになった。この DASA-10 の効果は、マウス膵島を用いた実験においても同様であることが確かめられた。また、グルコース刺激後の一時的な ATP 産生量の増加についても、L-システイン非添加の細胞と同程度まで回復することがあわせて確認できた。PKM2 は四量体の時にピルビン酸キナーゼ活性が最も高く、二量体及び単量体へ解離すると活性が低下することから、L-システイン処理によって四量体の量に変化が見られるかを確かめたところ、実際、L-システイン添加時には四量体が減少し、DASA-10 の添加によって四量体の量が回復することが明らかとなった。

この結果から、L-システインが PKM2 の四量体の解離を介してマウス膵β細胞の GSIS 制御を行っていること、及び、グルコース刺激後の一時的な ATP 産生量増加とそれに伴うインスリン分泌が PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性の調節によって制御されていることが明らかになった。

PKM2 や PKM1 が種々の細胞において細胞死の促進や抑制に関与することが報告されていたことから、続いて、M 型ピルビン酸キナーゼが膵β細胞の細胞死の制御を行っている可能性について検証することとし、特に、T2D 発症の一因ともなる小胞体ストレス誘導性アポトーシスに着目して研究を進めた。

その結果、特に PKM1 の発現抑制時に、ツニカマイシン及びタブシガルギンによって誘導される小胞体ストレス誘導性アポトーシスが増加することが明らかになった。その一方で、PKM2 の発現抑制時にはアポトーシス細胞数には大きな変化が見られなかった。この時、DNA 傷害の増加やピルビン酸産生量の減少、ATP 産生量の減少や小胞体ストレス応答 (unfolded protein response, UPR) の攪乱などが細胞に影響を与えている可能性が考えられたが、PKM1 の発現抑制はこれらに影響を与えないことがわかった。

そこで、PKM1 が他のタンパク質と相互作用する可能性について検証し、M 型ピルビン酸キナーゼと相互作用するという報告のあった A-Raf に着目したところ、A-Raf が PKM1 と結合することが明らかになった。更に、A-Raf は MEK1 のリン酸化 (活性化) を行うことが知られているが、PKM1 の存在下ではそのリン酸化が亢進することもわかった。実際、PKM1 の発現を抑制した細胞においては、リン酸化 MEK、そしてその下流であるリン酸化 ERK の量が減少していることが確かめられた。

PKM1 発現抑制時の MEK/ERK 経路の不活性化がどのような影響を与えるかを更に検証したところ、リン酸化 caspase-9 (Thr125) 量が減少していることがわかった。caspase-9 は 125 番目のスレオ

ニン残基 (Thr125、マウスでは Thr163 として保存されている) が ERK によってリン酸化されることで、切断 (活性化) が起こりにくくなることが知られている。小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおいては caspase-9 の切断 (活性化) と、caspase-9 による caspase-3 の切断 (活性化) が重要となることから、切断型 caspase-9、caspase-3 の量を確認したところ、PKM1 の発現を抑制して小胞体ストレスを誘導した際には切断型 caspase-9、caspase-3 量が大きく増加することが確かめられた。

PKM1 が A-Raf と結合して MEK/ERK を活性化し、caspase-9 (Thr125) のリン酸化を介して caspase-9、caspase-3 を抑制するという上述の経路は、他のマウス膵β細胞由来の培養細胞である Beta-TC-6 細胞においても同様に確かめられたことから、PKM1 がマウス膵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していることがわかった。

本研究を通して、マウス膵β細胞における PKM2 の機能と PKM1 の機能について、それぞれ新たな役割を明らかにすることができた。すなわち、M 型ピルビン酸キナーゼの PKM2 と PKM1 が、それぞれインスリン分泌の制御とアポトーシスの抑制という、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た (下記モデル図)。

また、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期待される。

