

高脂肪食下に2型糖尿病感受性遺伝子GCN2は 膵β細胞量の調節に関与する

神野 歩

神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学 博士課程

緒 言

近年、肥満や糖尿病人口の急速な増加は世界的に深刻な問題であり、日本においても重大な問題となっている。国民健康・栄養調査によると1960年代と比較して日本人の総エネルギー摂取量は減少しているが、2010年までに脂肪の摂取量が著明に増加し、総脂肪摂取率は総エネルギー量の1/4前後を占めるようになってきている。このような食習慣の変化も一因となり、日本人の2型糖尿病の有病率は増加していると考えられる。高脂肪食摂取により肥満や2型糖尿病が増加することが示されている¹⁾。

欧米人と比較すると日本人はより低いBMIで2型糖尿病を発症する症例が多く²⁾、日本人には膵β細胞機能不全を生じやすい遺伝的背景をもつ者が多いと考えられている³⁾。2型糖尿病患者では膵β細胞量が減少しているとの報告は多くあるが、我々の研究室では、膵β細胞量の維持にインスリンシグナルが重要であり⁴⁾、その慢性的な亢進はネガティブフィードバックを介し膵β細胞量を減少させることを明らかにしている⁵⁾。

General control nonderepressible 2 (GCN2) はアミノ酸欠乏を感知する分子であり、細胞内アミノ酸欠乏状態で増加したuncharged tRNAが結合することにより活性化される⁶⁾。日本人においてGCN2をコードする遺伝子*EIF2AK4*のSNPと2型糖尿病発症に有意な相関が報告された⁷⁾。マウスの各組織で比較したところ、GCN2は膵島に非常に多く発現していた。マウスを通常食で飼育した際にGCN2は活性化されなかったが、高脂肪食で飼育した際に膵β細胞においてのみ活性化されることが明らかとなった。全身性GCN2欠損マウスを高脂肪食下に飼育すると、膵β細胞量が有意に減少し耐糖能の悪化が認められた。GCN2欠損マウスの単離膵島においてはmTORC1活性の亢進とインスリンシグナルの減弱化が認められ、膵β細胞量減少の原因であると考えられた。

*EIF2AK4*に変異をもつ2型糖尿病患者では膵β細胞

におけるGCN2の活性が低下し、特に高脂肪食摂取や過食などを背景として耐糖能異常を発症している可能性がある。我々はさらに膵β細胞株にグルコース負荷を行うことによりGCN2の活性が亢進し、この活性は蛋白翻訳阻害剤により抑制されることを明らかにした。高脂肪食飼育下ではマウスの膵β細胞においてインスリン合成が亢進する⁸⁾。これらのデータより、GCN2は膵β細胞においてインスリン合成が亢進した際に活性化される可能性を考えた。膵β細胞におけるGCN2活性化機構について明らかにし、膵β細胞におけるGCN2の役割と2型糖尿病発症の関連について明らかにすることを研究の目的とした。

結 果

1. GCN2がmTORC1活性を制御するメカニズムの解明

GCN2の下流として唯一報告されている経路は、eIF2αのリン酸化と全般的な蛋白翻訳の低下、転写因子ATF4の選択的な翻訳促進である⁹⁾。GCN2の下流でATF4の発現低下がmTORC1活性調節に関わる可能性を考え、ラット膵β細胞株であるINS-1細胞において

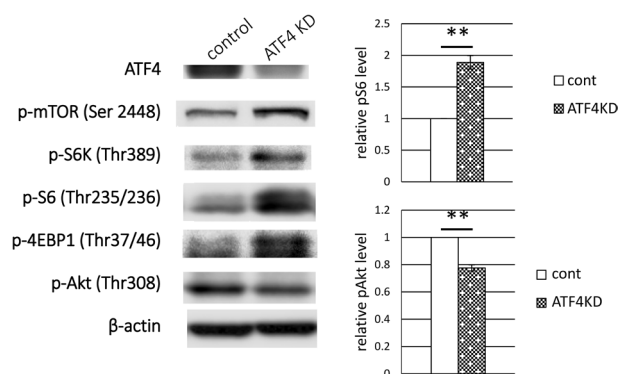


図1 ATF4ノックダウンINS-1細胞におけるインスリンシグナルの変化

ATF4ノックダウン細胞(ATF4 KD)においてmTORC1活性の亢進、インスリンシグナルの減弱化が認められた。

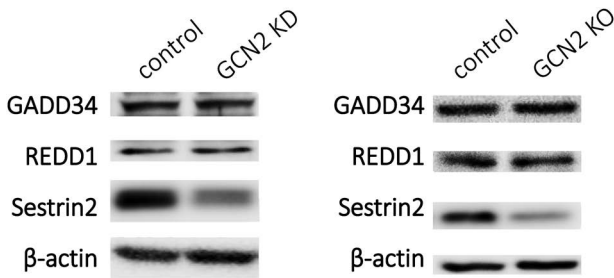


図2 GCN2ノックダウンINS-1細胞 (GCN2 KD、左)、GCN2欠損マウスの膵島 (GCN2 KO、右) におけるGADD34、REDD1、Sestrin2の発現

いずれにおいてもSestrin2の発現低下が認められた。

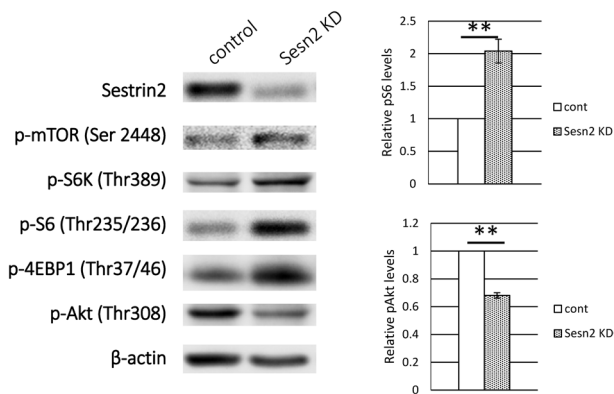


図3 Sestrin2ノックダウンINS-1細胞におけるインスリンシグナルの変化

Sestrin2ノックダウン細胞 (Sesn2 KD) においてmTORC1活性の亢進、インスリンシグナルの減弱化が認められた。

ATF4をノックダウンした。その結果、ATF4ノックダウンINS-1細胞においてmTORC1活性の亢進とインスリンシグナルの減弱化が認められた (図1)。次に、ATF4が転写を制御する分子の中にmTORC1活性を調節する分子があるのではないかと考えた。既報からREDD1¹⁰⁾、GADD34¹¹⁾、Sestrin2¹²⁾を候補としGCN2欠損マウスの膵島とGCN2ノックダウンINS-1細胞においてこれら分子の発現を確認したところ、Sestrin2の発現が低下していた (図2)。したがってINS-1細胞においてSestrin2をノックダウンしたところ同様にmTORC1活性亢進とインスリンシグナル減弱化が認められ (図3)、GCN2、ATF4の下流でSestrin2がmTORC1活性を負に制御していると考えられた。

2. 膵β細胞におけるGCN2活性化メカニズムの解明

高脂肪食下に飼育されたマウスの膵島においてGCN2

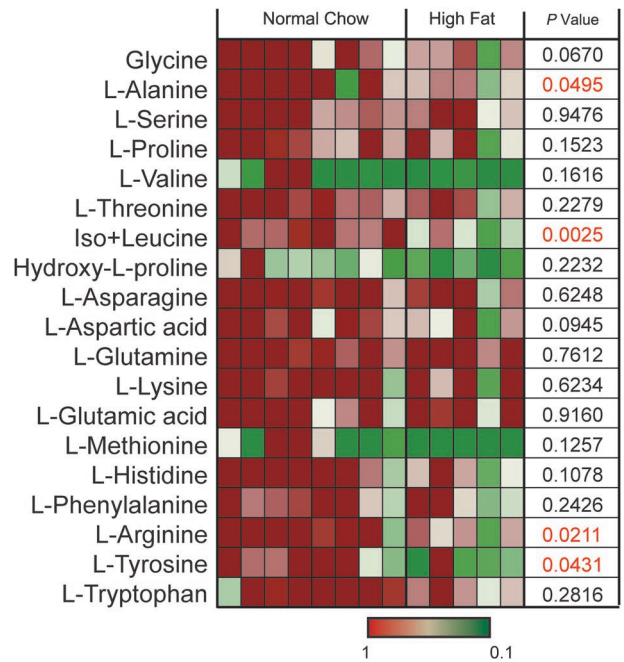


図4 通常食 (Normal Chow) 及び高脂肪食 (High Fat) 下飼育マウスの膵島におけるアミノ酸

高脂肪食下飼育マウスの膵島において多くのアミノ酸濃度が低下していた。

が活性化していたが、そのメカニズムを解析することを目的とした。高脂肪食負荷マウスの膵島においてGCN2活性化のリガンドとなり得るアミノ酸とアミノアシル化tRNAの測定を行い、通常食下飼育マウスの膵島と比較した。

①マウス膵島とその他各組織におけるアミノ酸濃度の測定

通常食もしくは高脂肪食で飼育したマウスの膵島における各アミノ酸濃度について質量分析を用いて測定したところ、高脂肪食負荷マウスの膵島においては多くのアミノ酸濃度が低下していた (図4)。一方、高脂肪食負荷マウスの血清や肝臓においては多くのアミノ酸濃度が増加しており、視床下部においてはアミノ酸濃度にはほとんど変化が見られなかった。

②マウス膵島におけるアミノアシル化tRNAの測定

通常食もしくは高脂肪食で飼育したマウスの膵島における各アミノアシル化tRNA量について質量分析法で測定したところ高脂肪食負荷マウスの膵島ではアミノアシル化tRNAが全般的に減少していた。すなわち、高脂肪食負荷マウスの膵島ではuncharged tRNAが増加していた (図5)。

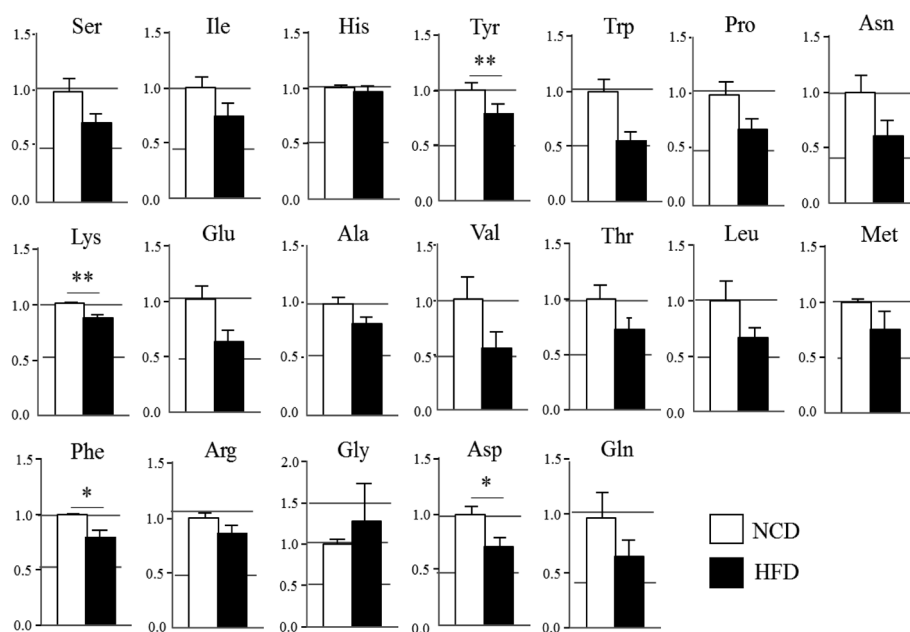


図5 通常食 (NCD) 及び高脂肪食 (HFD) 下飼育マウスの膵島におけるアミノアシル化tRNA
高脂肪食下飼育マウスの膵島において多くのアミノアシル化tRNAが減少していた。

考 察

本研究により、膵β細胞においてGCN2がATF4とSestrin2の発現を介してmTORC1活性を負に制御することが明らかとなった。また、通常食マウスと高脂肪食負荷マウスの各組織における検討から、高脂肪食負荷マウスにおいては膵島特異的にアミノ酸濃度が減少しuncharged tRNAが増加することによってGCN2が活性化したと考えられた。膵β細胞においては大量のインスリン合成が必要でありそれに伴ってアミノ酸が消費されてアミノ酸が減少した可能性を第一に考えている。アミノ酸欠乏を感知する分子であるGCN2が膵β細胞において高脂肪食という栄養過剰状態で活性化され、同様にアミノ酸を感知するシグナルであるmTORC1シグナルを調節していることは非常に興味深いと考える。

今までのデータと合わせると、高脂肪食下に膵β細胞でインスリンの翻訳が亢進し、アミノ酸濃度が低下してuncharged tRNAが増加するとGCN2がリン酸化する。リン酸化したGCN2はATFとSestrin2を発現させ、mTORC1活性を適度に抑制しているが、GCN2欠損マウスの膵島においてはアミノ酸の低下、uncharged tRNAの増加を感知することが出来ずATF4、Sestrin2の発現低下からmTORC1活性が亢進し、慢性化することによってnegative feedbackを介しインスリンシグナルが減弱化、膵β細胞量の減少に至ったものと考えられる。

要 約

日本人においてGCN2をコードする遺伝子である*EIF2AK4*のSNPと2型糖尿病に有意な相関が報告された。GCN2はアミノ酸欠乏状態で活性化する分子である。我々は全身性GCN2欠損マウスが耐糖能異常と膵β細胞量の減少を示すことを明らかにした。高脂肪食下に飼育されたマウスの膵β細胞では全般的なアミノ酸濃度が低下し、uncharged tRNAが増加して野生型マウスではGCN2が活性化するが、GCN2欠損マウスにおいてはGCN2が活性化しないためにATF4、Sestrin2の発現が低下しmTORC1活性が慢性的に亢進する。mTORC1活性の亢進はネガティブフィードバックを起こしてインスリンシグナル減弱化させGCN2欠損マウスにおける膵β細胞量減少が引き起こされたと考えられる。*EIF2AK4*にSNPをもつヒトでは高脂肪食摂取や過食を背景に耐糖能異常を発症している可能性がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) B. Vessby, et al.: *Diabetes*, **43**, 1353-1357, 1994.

- 2) K. H. Yoon, et al.: *Lancet*, **368**, 1681–1688, 2006.
- 3) R. C. Ma, et al.: *Ann. NY Acad. Sci.*, **1281**, 64–91, 2013.
- 4) N. Hashimoto, et al.: *Nat. Genet.*, **38**, 589–593, 2006.
- 5) Y. Shigeyama, et al.: *Mol. Cell Biol.* **28**, 2971–2979, 2008.
- 6) R. C. Wek, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4579–4583, 1989.
- 7) K. Yasuda, et al.: *Nat. Genet.*, **40**, 1092–1097, 2008.
- 8) A. Kanno, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **458**, 681–686, 2015.
- 9) B. A. Castiho, et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **1843**, 1948–1968, 2014.
- 10) M. P. DeYoung, et al.: *Genes. Dev.*, **22**, 239–251, 2008.
- 11) R. Watanabe, et al.: *Int. J. Mol. Med.*, **19**, 475–483, 2007.
- 12) L. Chantrranupong, et al.: *Cell. Rep.*, **9**, 1–8, 2014.