

Cdk5によるインスリン分泌の制御機構

魏 范研^{a*}, 長嶋一昭^b, 大島登志男^c, 佐伯恭範^a, 陸 雲飛^a, 松下正之^a,
山田祐一郎^b, 御子柴克彦^c, 清野 裕^b, 松井秀樹^a, 富澤一仁^a

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学, ^b京都大学大学院医学研究科 糖尿病栄養内科,
^c理化学研究所 発生神経生物研究チーム

キーワード: Insulin, Cdk5, Calcium

はじめに

生体内におけるインスリン分泌は血中のグルコース濃度に応じて精巧に制御されている。すなわち、血中のグルコース濃度が上昇すると、膵臓β細胞よりインスリンが分泌されて糖代謝を促すことにより血糖値が正常に戻される。細胞生理学的なメカニズムにおいて、インスリン分泌は主に細胞膜上のATP作動性のカリウムチャンネルの開閉により制御されている。血糖値が上昇するとカリウムチャンネルが閉ざされ、その結果β細胞の細胞膜が興奮し脱分極する^{1,2}。そして、電位依存性のカルシウムチャンネルよりカルシウムが流入し、インスリンが放出される。現在インスリン分泌を促す殆どの糖尿病治療薬がカリウムチャンネルをターゲットとしている。一方、これらの薬剤は低血糖を引き起こすという副作用も抱えていて、慎重な服用が要求される³。従って、糖尿病を治療するためにより副作用の少ない薬剤の開発が急務である。本研究は、

Cdk5によるインスリン分泌制御のメカニズムを解明し、新規な糖尿病治療薬の開発を目指したものである。

膵臓β細胞におけるCdk5活性の発現

サイクリン依存性キナーゼ5（以下Cdk5）は神経細胞に主に発現しているセリン・スレオニン指向性のリン酸化酵素である^{4,5}。脳の発生期ではCdk5は受容体や細胞骨格タンパクなど様々な基質をリン酸化し、神経細胞の移動や分化を制御する^{6,7}。また、Cdk5はアルツハイマー病などのような神経変性疾患において病原因子として知られ注目されている⁶。一方、Cdk5が成熟した神経細胞における役割が長く解明されていなかった。最近本研究室により、Cdk5は成熟した神経細胞において神経伝達物質の放出を制御していることが明らかにされた⁸。

Cdk5はp35という活性化サブユニットと結合することにより酵素としての活性を持つようになる^{9,10}。p35の発現が主に神経細胞にしか見られないために、Cdk5の活性はこれまで神経細胞にしかないと考えられてきた。最近我々を含めた幾つかの研究グループが膵臓のβ細胞においてもp35が発現しCdk5の活性が確認された^{11,12}。図1で示したように、p35のmRNAは膵臓β細胞やβ細胞由来の培養細胞であるMIN6

平成19年2月受理

*Department of Psychiatry Yale University School of Medicine
34 Park Street, CMHC Rm 309 New Haven, CT 06519
電話: 1-203-974-7759 FAX: 1-203-974-7897
E-mail: fan-yan.wei@yale.edu

プロフィール



魏 范研

平成14年東京都立大学理学研究科修士課程卒。同年岡山大学医歯学総合研究科博士課程に入学し、細胞生理学教室に所属。松井秀樹教授及び富澤一仁助教授の指導の元で膵臓β細胞におけるCdk5の役割について研究を行い、Nat Medへ発表。上記の研究が評価され、岡山医学会賞（結城賞）を受賞。平成18よりHuman Frontier Science ProgramのLong Term Fellowとなり、Yale大学医学部へ留学。

細胞で発現している (図 1 a)。また, Cdk5の酵素活性も β 細胞及び MIN6細胞で確認された (図 1 b)。インスリン分泌に使用される幾つか重要なタンパクが神経細胞における神経伝達物質の放出にも使用されるために, 我々は Cdk5がインスリン分泌においても重要な役割を果しているとの仮説を立て実験を進めた。

インスリン分泌における Cdk5 の役割

β 細胞における Cdk5の役割を調べるために, 我々はまず Cdk5の阻害剤である Olomoucine の存在下で MIN6細胞をグルコースで刺激し, インスリン分泌量を調べた。Cdk5の阻害剤である Olomoucine は, 低グルコース (2.8mM) 時では, どの濃度においてもインスリン分泌に影響を及ぼさなかった。一方, Olomoucine の存在下で MIN6細胞を高グルコース (16.7mM) グルコースで刺激したところ, グルコースに応答して分泌されるインスリンの量は, Olomoucine の濃度依存的に増加した (図 2 a)。

次に我々は単離したランゲルハンス島を Olomoucine 存在下の培養液中で培養し, 高グルコースで刺激した。その結果, インスリン分泌は Olomoucine の濃度依存的に上昇した (図 2 b)。さらに Cdk5の活性化サブユニットである p35遺伝子を欠損したマウス (p35KO) ならびに野生型のマウスよりランゲルハンス島を精製し, グルコース刺激を加え

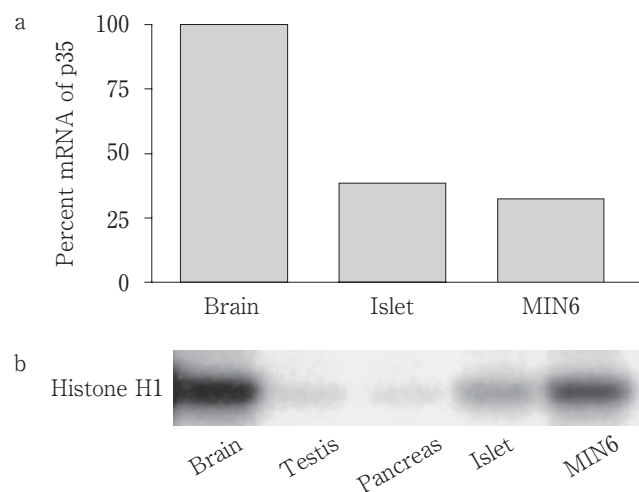


図1 β 細胞における Cdk5の活性
定量 PCR を行った結果, Cdk5の活性化サブユニットである p35の mRNA は膵臓 β 細胞及び β 細胞の培養細胞である MIN6細胞に発現していることがわかった(a)。Cdk5の活性をヒストン H1 を用いて測定した。活性は β 細胞及び MIN6細胞で確認された。

それぞれのインスリン分泌を測定した。その結果, p35KO ランゲルハンス島のインスリン分泌は野生型と比較して, 高グルコース刺激時において有意に上昇した (図 2 c)。一方, Olomoucine を p35KO ランゲ

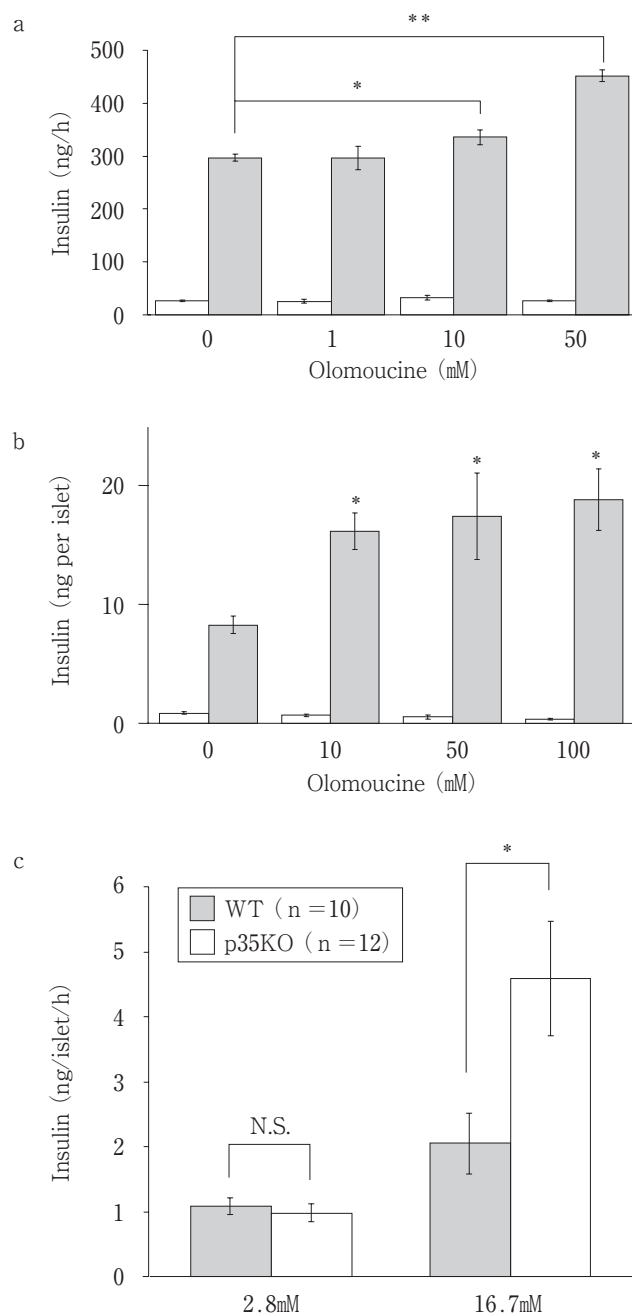


図2 Cdk5阻害によるインスリン分泌の増加
Olomoucine 存在下で MIN6細胞(a)または単離したランゲルハンス島(b)にグルコースを加え, インスリン分泌を測定した。Cdk5阻害によるインスリン分泌の亢進は高グルコース刺激時にもみ見られた。p35欠損マウスより単離したランゲルハンス島にグルコースを加え, インスリン分泌を測定した(c)。Cdk5活性の低い p35欠損ランゲルハンス島におけるインスリン分泌が野生型より亢進した。

ルハンス島に添加しても、インスリン分泌促進効果が認められなかった。また、低グルコース時では、野生型と p35KO ランゲルハンス島においてインスリン分泌に差は認められなかった。

Cdk5 によるインスリン分泌制御のメカニズム

1. カルシウム動態

グルコース刺激後に起きるカルシウムイオンの流入がβ細胞のインスリン分泌において重要なステップである。Cdk5 によるインスリン分泌制御のメカニズムを調べるために我々はまずβ細胞内のカルシウム動態を調べた。高グルコース刺激時における MIN6細胞内カルシウム動態をカルシウム指示薬である Fura-2 を用いて測定した。Olomoucine 存在下では、グルコース刺激後の細胞内カルシウム濃度は阻害剤のない時と比較し有意に上昇した(図3)。阻害剤存在下でのピーク時の細胞内カルシウム濃度は阻害剤無添加時と比較し113%であった。この効果は、p35KO マウスのランゲルハンス島より分離したβ細胞でも確認した。高グルコースで p35KOβ細胞を刺激すると、同細胞内カルシウム濃度が野生型のβ細胞と比較し有意に上昇した。Cdk5によるカルシウム動態の制御は、Cdk5がカルシウムチャンネル活性を直接に制御していることを示唆している。この仮説を証明するために我々は Cdk5活性を阻害したときに内向き電位依存性カルシウム電流をパッチクランプ法を用いて検討した。Olomoucine 処理した MIN6細胞における内向き電位依存性カルシウム電流は、未処理の細胞と比較して有意に大きかった。また、p35KOβ細胞でも野生型β細胞と比較して、同電流の有意な上昇が認められた。

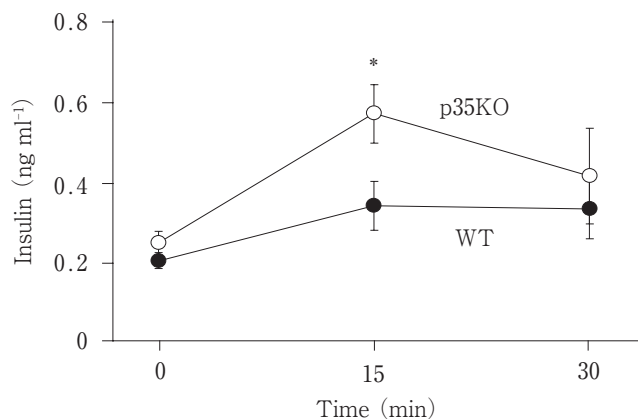


図3 p35欠損マウスの血中インスリン濃度
p35欠損マウス及び野生型マウスに糖負荷を行い、血中インスリン濃度の変化を調べた。

胞と比較して、同電流の有意な上昇が認められた。

2. カルシウムチャンネルのリン酸化

Cdk5によるカルシウムチャンネルの制御がどのようなメカニズムで行われているかを調べるために、我々は生化学的な検討を行った。Lタイプ電位依存性カルシウムチャンネルのL_{II-III}領域を含む組み換えタンパクを精製した後、γ32P-ATPの存在下でCdk5/p35と反応させリン酸化を行った。その結果、L_{II-III}領域はCdk5によりリン酸化されることが分かった。さらに、L_{II-III}領域にある783番のセリンをアラニンに換えた変異型L_{II-III}をCdk5と反応させても、リン酸化が観察されなかった。したがって、L_{II-III}領域にある783番のセリンがCdk5によってリン酸化されることが判明した。次に、あらかじめCdk5によってリン酸化されたL_{II-III}領域蛋白と非リン酸化L_{II-III}領域蛋白を用いて、インスリン分泌に重要なSNAREタンパクであるSyntaxinやSNAP-25に対して共沈実験を行った。その結果、L_{II-III}領域とSyntaxin及びSNAP-25との結合はCdk5による783番セリンのリン酸化によって阻害されることが分かった。

Cdk5によるインスリン分泌制御—In Vivo

Cdk5阻害によるインスリン分泌促進効果をin vivoで検討するために、我々はp35KOマウスおよび野生型のマウスにそれぞれ糖負荷を与え、血中のインスリン濃度及び血糖値について経時的に測定した。糖負荷15分後の血中インスリン濃度はp35KOマウスが野生型マウスより有意に高かった(図3)。また、糖負荷30分後の血糖値はp35KOマウスのほうが野生型と比べて有意に低かった。

考 察

本研究により、Cdk5の膵β細胞における生理機能を明らかにした。Cdk5は、電位依存性カルシウムチャンネルをリン酸化することにより、同チャンネルのSNARE蛋白との結合を制御することにより、インスリン分泌を抑制していることが明らかになった。Cdk5阻害剤は、低グルコース時ではインスリン分泌に影響を及ぼさないが、高グルコース刺激時ではインスリン分泌を上昇させた。スルフォニル尿素剤を内服している患者ではしばし低血糖の副作用が認められる。これは、同薬剤が血中グルコース濃度に非依存的にインスリン分泌を促進することに起因する。本研究により、

Cdk5阻害剤はこのような副作用が無い新しい糖尿病治療薬になる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Inagaki N, et al. : Reconstitution of IKATP : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* (1995) **270**, 1166-1170.
- 2) Bratanova-Tochkova TK, et al. : Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* (2002) **51**, S83-90.
- 3) Moller DE : New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* (2001) **414**, 821-827.
- 4) Tsai LH, Takahashi T, Caviness VS Jr, Harlow E : Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* (1993) **119**, 1029-1040.
- 5) Lew J, et al. : A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* (1994) **371**, 423-426.
- 6) Cruz JC, Tsai LH : A Jekyll and Hyde kinase : roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol* (2004) **14**, 390-394.
- 7) Ohshima T, et al. : Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) **98**, 2764-2769.
- 8) Tomizawa K, et al. : Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci* (2002) **22**, 2590-2597.
- 9) Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae T, Harlow E : p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* (1994) **371**, 419-423.
- 10) Tang D, et al. : An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem* (1995) **270**, 26897-26903.
- 11) Wei FY, et al. : Cdk5 dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat Med* (2005) **11**, 1104.
- 12) Ubeda M, Kemp DM, Habener JF : Glucose-induced expression of the cyclin-dependent protein kinase 5 activator p35 involved in Alzheimer's disease regulates insulin gene transcription in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* (2004) **145**, 3023-3031.