

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	西 勇一
論文題目	Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. （ラットインスリノーマ細胞株 INS-1 の代謝-分泌連関におけるミトコンドリアリン酸キャリアの役割）		
（論文内容の要旨）			
背景：膵β細胞はグルコース濃度依存的にインスリンを分泌する。その機序として、細胞内グルコース代謝とインスリン分泌を密接に連関させる代謝-分泌連関が重要である。即ち膵β細胞に取り込まれたグルコースは解糖系とミトコンドリアで代謝され、細胞内 ATP および ATP/ADP 比の上昇、ATP 感受性 K⁺チャネルの閉鎖、細胞膜脱分極、電位依存性 Ca²⁺チャネルを介した細胞内への Ca²⁺流入、細胞内 Ca²⁺濃度上昇を経て、インスリン顆粒の開口放出を惹起する。ミトコンドリア内膜に存在してミトコンドリア内外の様々な溶質輸送を担い、遺伝学的に相同性が高く、分子構造上も共通の特徴を有する分子群であるミトコンドリア溶質キャリア（SLC25A）ファミリーに含まれるいくつかの分子は、膵β細胞のインスリン分泌に関与することが知られている。ミトコンドリアリン酸キャリア（PiC または SLC25A3）は ATP 産生に必要な基質の一つであるリン酸をミトコンドリア内に供給する分子であるが、PiC の膵β細胞代謝-分泌連関における役割は不明であり検討した。 方法：1）ラット膵島、グルコースによる良好なインスリン分泌反応がみられるラットインスリノーマ細胞株（INS-1 細胞）における PiC の遺伝子発現を PCR 法で確認した。2）ラット PiC の発現を選択的に阻害する siRNA をリポフェクション法で INS-1 に導入した。3）リポフェクション 48 時間後に細胞を回収し、Western Blotting 法で PiC 蛋白量を検討した。4）リポフェクション 48 時間後の INS-1 細胞における代謝-分泌連関における指標の評価（インスリン分泌、ATP/ADP 比、細胞内 Ca²⁺濃度、ミトコンドリアでの ATP 産生、ミトコンドリア膜電位）を行った。 結果：PiC には 2 つのアイソフォーム（PiC-A、PiC-B）が知られているが、ラット膵島、INS-1 細胞には両アイソフォームともに遺伝子発現がみられた。ただ PiC-A の発現は弱く、PiC-B が主要なアイソフォームであることが示唆された。ラット PiC 選択的 siRNA により、INS-1 細胞における PiC 蛋白発現が約 40%抑制された。PiC 抑制により、グルコース刺激（10mM）によるインスリン分泌の抑制、10mM グルコース存在下での ATP/ADP 比の低下、10mM グルコース刺激時の細胞内 Ca²⁺濃度上昇の抑制が認められたが、10mM グルコース刺激時のミトコンドリア膜電位（Δψ_m）の過分極の抑制は認められなかった。単離ミトコンドリア分画にミトコンドリアにおける糖質代謝基質である 1mM コハク酸を暴露して ATP 産生を評価すると、PiC 抑制群ではいかなる濃度のリン酸存在下においても一様に ATP 産生が抑制されたが、Δψ_mの代謝基質による過分極は単離ミトコンドリアを用いた評価においても変化を認めなかった。ミトコンドリア呼吸鎖蛋白（複合体 I、III、IV、V）の発現量は PiC 抑制の影響を受けなかった。 結論：PiC は膵β細胞における代謝-分泌連関において重要な役割を果たしている。PiC を介するミトコンドリアへのリン酸の供給は、膵β細胞におけるミトコンドリア ATP 産生においてミトコンドリア膜電位に依存しない律速段階である。			

(論文審査の結果の要旨) 膵β細胞インスリン分泌においては代謝-分泌連関が重要である。ミトコンドリアリン酸キャリア (PiCまたはSLC25A3) はATP産生に必要な基質の一つであるリン酸をミトコンドリア内に供給する分子であるが、膵β細胞代謝-分泌連関におけるPiCの役割は不明であり検討した。ラットPiC選択的RNA阻害により、INS-1細胞におけるPiC蛋白発現が約40%抑制された。PiC抑制により、グルコース刺激によるインスリン分泌の抑制、ATP/ADP比上昇の抑制、細胞内Ca²⁺濃度上昇の抑制が認められたが、グルコース刺激時のミトコンドリア膜電位の過分極の抑制は認められなかった。単離ミトコンドリア分画に糖質代謝基質であるコハク酸を暴露してATP産生を評価すると、PiC抑制により、いかなる濃度のリン酸存在下においてもATP産生が抑制されたが、内膜過分極は抑制されなかった。これらの結果より、PiCは膵β細胞における代謝-分泌連関において重要な役割を果たしており、PiCを介するミトコンドリアへのリン酸の供給は、膵β細胞におけるミトコンドリアATP産生においてミトコンドリア膜電位に依存しない要因であることが明らかとなった。 以上の研究は膵β細胞におけるインスリン分泌機構の解明に貢献し糖尿病学の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成23年7月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降