

〈一般研究課題〉 概日リズムを考慮した糖尿病克服・予防に最適な生活環境

助成研究者 豊橋技術科学大学 沼野 利佳



概日リズムを考慮した糖尿病克服・予防に最適な生活環境

沼野 利佳
(豊橋技術科学大学)

Impaired circadian rhythms effect on the hormonal secretion concerned with diabetics

Rika Numano
(TOYOHASHI University of Technology)

Abstract :

The hormonal secretion of hormone Insulin and GLP1 (glucagon-like peptide, gastric inhibitory peptide) is regarded as significant in connection with diabetes, because it controls the level of plasma glucose. It was reported that mutant mice of central clock gene (*Clock* and *Bmal1*), which regulate mammalian circadian rhythms, exhibited impaired glucose tolerance, reduced insulin secretion, and defected the size and proliferation in pancreatic islets. In this study we examine whether the impaired circadian rhythms with 24hr period effect on the hormone Insulin and GLP1 secretion.

The reaction of hormone secretion from single cell can be monitored in real time with the plasmid NPY::Venus which the neuropeptide Y (NPY) is fused to fluorescence protein (FP) Venus. In addition, we previously reported that photo-switched LiGluR (Light-Gated ionotropic Glutamate Receptor) could activate the cell membrane potential by photo illumination using original photoisomerizable chemicals (MAG).

We could observe that the hormone Insulin and GLP1 secretion were promoted using photo-activated GluR system by transient photo-stimulation remotely in secretory cells. After secretory cells were impaired circadian rhythms by knock-down of *Clock* and *Bmal1*, hormonal secretion were repressed the number of the secretion reactions by photo-activated GluR system. It suggests that

normal circadian rhythms are important for normal exocytosis in secretory cells by accommodating life cycle to environmental cycle.

1. はじめに

体内時計で制御される24時間周期の概日リズムは、脳の中枢時計からリズムを発振し、膵臓などの末梢分泌組織のリズムも制御する。リズムを規定する時計遺伝子の機能不全マウスでは、2型糖尿病を発症するなど、概日リズムとホルモン分泌制御は、密接に関連している。本研究の目的は、概日リズムが変化することにより、糖尿病関連のホルモンであるインスリンやインクレチン分泌がどう変化するかを、リアルタイム測定系で明らかにすることである。具体的には、概日リズムを規定する時計遺伝子の発現変化を抑制させることで、リズムを変化させた場合、グルタミン酸受容体を介した光照射で数回にわたりくりかえし刺激を与えつつ、分泌活動を顕微鏡下でのリアルタイムモニタリングにて、ホルモン分泌の変化を観察する。これらの知見は、概日リズムを正常に維持する生活環境が、血糖を低下させるホルモン分泌の効率を高く維持する可能性を示す。

生理活動の中でも、内分泌は、動物の恒常性、生殖、脳機能や行動を制御し、中でも、糖尿病にかかわるホルモンであるインスリンを分泌する膵臓β細胞や、インスリン分泌量をコントロールするホルモンであるインクレチン(グルカゴン様ペプチドや胃抑制ペプチドなど)を分泌する小腸内分泌細胞のホルモン分泌機能は重要である。一方、体内時計で制御される24時間周期の概日リズムは、地球上の全生物にとって普遍的なシステムであり、膵臓や小腸などの末梢組織の概日リズムも、中枢の体内時計によって制御されている。つまり、インスリンなどのホルモン分泌も概日リズムにより制御されている。高齢化社会を迎えた日本では、加齢による概日リズムの異常、また、不規則な生活習慣による概日リズムの変調が、内分泌の機能に影響し、糖尿病、高脂血症、循環器系疾患などのメタボリックシンドローム発症の一端となりうる。

哺乳類における概日リズム研究は、1990年代後半から脳の一部である視交叉上核(SCN)における*Clock*や*Bmal1*といった時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群の発現特性とその挙動で説明が行われてきた。*Bmal1*遺伝子と*Clock*遺伝子の転写産物はヘテロダイマーをつくって、他の時計遺伝子のプロモーター領域のE-boxesにつき、多くの時計遺伝子*Periods*, *Cryptochromes*などの発現を誘導する転写因子のひとつである。

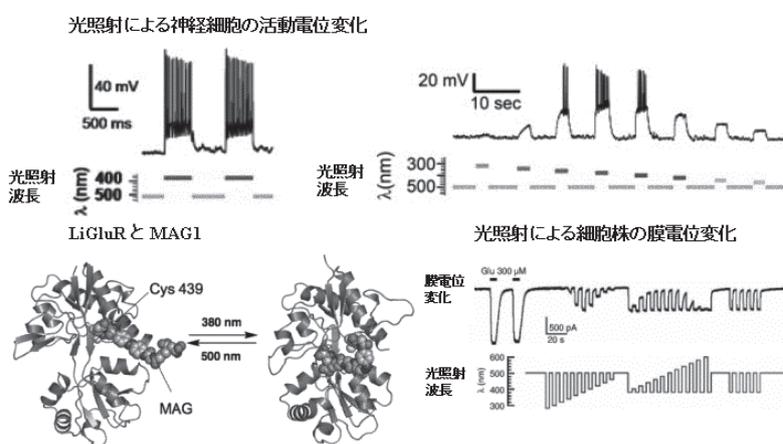


図1. LiGluRと光反応性化合物による光刺激系

膵臓特異的に時計遺伝子*Clock*や*Bmal1*をノックアウトしたマウスは、ランゲルハンス島の大きさが小さく、グルコース依存性インスリン分泌が起こらないために、2型糖尿病を発症することが報告されている(Marcheva B., 2010)。概日リズムとホルモン分泌制御は、密接に関連している。

2. 試料および実験方法

申請者は、新規に合成した光反応性化学物質MAGとグルタミン酸受容体iGluRのリガンド結合部位のまわりに化合物の接着部となるCys変異を導入した変異体LiGluRの組み合わせにより、紫外光でグルタミン酸受容体のイオンチャネルが開き、膜電位を変化させ活性化する、一方、可視光照射でイオンチャネルが閉まり、元の状態にもどすグルタミン酸受容体LiGluRの作製に成功している(図1)。つまり、光照射により、GluRを開閉させ、細胞膜の電位を可逆的に変化させ、UV照射で正確に再現性よく活動電位が発生し、可視光照射で静止した (Volgraf M., 2006, Szobota S., 2007, Numano R., 2009)。今回、この光刺激系を応用し、分泌細胞の膜電位を変化させ、電位依存性Ca²⁺チャネルを開けて、ホルモン分泌が起こるだろうと考えた。本研究では、この光照射による刺激系で、インスリンやインクレチンを分泌する膵臓β細胞や小腸内分泌細胞の細胞膜電位を変化させ、刺激を複数回にわたり任意のタイミングで与え、ホルモン分泌をONにする。

全反射蛍光顕微鏡を用いて、細胞からのホルモン分泌反応を蛍光蛋白でリアルタイムモニター

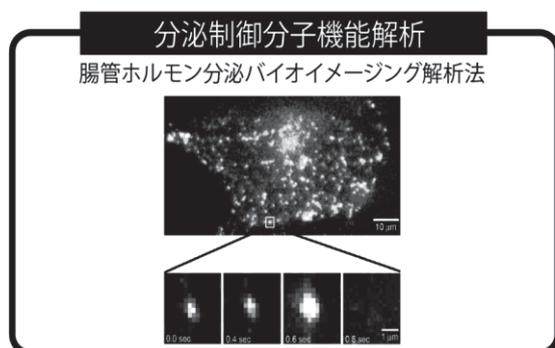


図2. NPY::Venusによるホルモン分泌のリアルタイム観察系

することができる。具体的には、分泌されるニューロペプチドY (NPY) に黄色蛍光タンパク質Venusを融合したプラスミドNPY::VenusをCMVプロモーターで強く発現させた組み換え遺伝子を、分泌細胞に遺伝子導入し、全反射顕微鏡にて、エパネッセント光で細胞膜の表層のみを励起することで、分泌の瞬間を蛍光シグナルの一瞬の強度変化で観察できる(図2)。(Tsuboi T., 2003)

3. 実験結果

3.1 外部光刺激にて可逆的にホルモン分泌刺激がおきる

膵臓β細胞株MIN6細胞や、小腸内分泌細胞株GluTag細胞に、分泌活動が蛍光シグナルの変化で観察できるNPY::Venusと光照射で膜電位を変化させるLiGluR受容体と赤色蛍光mCherryが連結した蛋白質LiGluR::mCherry受容体組み換え遺伝子をともに形質導入する。細胞を300nMの濃度の光反応性化合物が混入した培養液に15分培養する、その後、培養液中mCherryが発現している赤い細胞について、観察用のレーザーをNDフィルターなしで、強く細胞サンプルに照射したときとその前後の、ホルモン分泌を分泌刺激時の分泌顆粒動態、分泌反応数等を蛍光シグナルの変化として観察した。

その結果、レーザーを照射中や、その直後に、ホルモン分泌は、このようにサンダーイベントと呼ばれる蛍光輝度が上昇する現象がみられ、分泌活動が促進されていることがわかった(図3)。

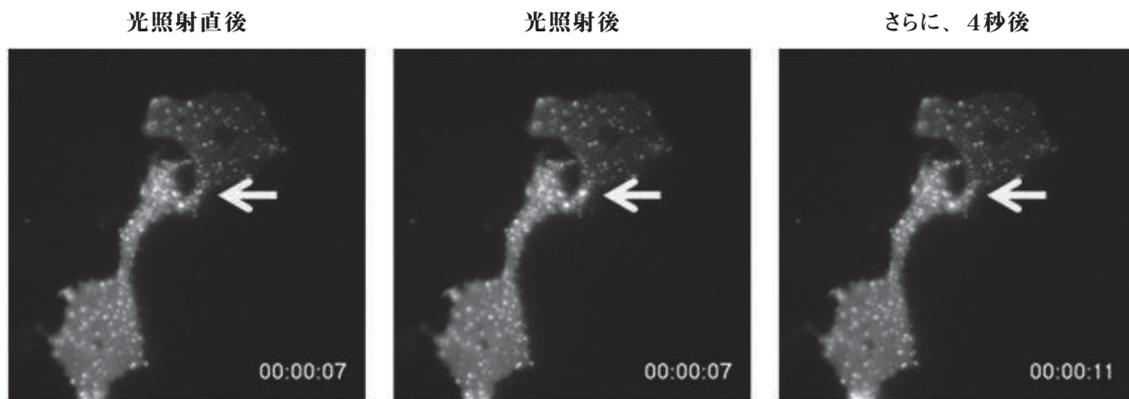


図3. GluTag細胞のホルモン分泌の可視化

3.2 時計遺伝子発現の異常はホルモン分泌に影響する

概日リズムを規定する重要な時計遺伝子である*Bmall*, *Clock*遺伝子の発現抑制は、1細胞の概日リズムを異常なリズムにすることが報告されている。Short hairpin(shRNA)による発現ノックダウンにより、*Bmall*, *Clock*遺伝子の発現をノックダウンした。膵臓β細胞株MIN6や、小腸内分泌細胞株GluTagにおいて、NPY::Venusにより、光刺激照射後、ホルモン分泌の回数を全反射顕微鏡で観察すると、正常のリズムを持つ細胞ではホルモン分泌が起こる条件で、ホルモン分泌がないか、頻度が著しく低くなる傾向がみられる。この事実は、膵臓特異的に*Bmall*をノックアウトマウスでは、インスリンを分泌が抑制され、糖尿病の発症・進展しやすいという報告と一致する。*Bmall*遺伝子の発現低下が、1細胞レベルでも、ホルモン分泌反応を抑制することがわかった。また、本研究では、1細胞レベルでの概日リズムを測定できなかったため、*Bmall*, *Clock*遺伝子のノックダウンにより、概日リズムがどのくらい異常をきたしているかを同時に測定ができなかったが、*Clock*遺伝子機能不全マウスのリズムは、完全には消失せず、野生型マウスよりも弱くなっているという報告がある。(King D.P., 1997, Jin X., 1999)この結果は、概日リズムが環境要因などにより弱くなっても、ホルモン分泌に影響をきたし、弱くなることを示唆する。

参考文献

- 1) B. Marcheva, K.M. Ramsey, E.D. Buhr, Y. Kobayashi, H. Su, C.H. Ko, G. Ivanova, C. Omura, S. Mo, M.H. Vitaterna, J.P. Lopez, L.H. Philipson, C.A. Bradfield., S.D. Crosby, L. JeBailey, X. Wang, J.S. Takahashi, J. Bass: Nature. 466 (2010) 627-631.
- 2) M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R.H. Kramer, E.Y. Isacoff, D. Trauner: Nat Chem Biol. 2 (2006) 47-52.
- 3) S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D.L. Fortin, K.D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H.L. Aaron, E.K. Scott, R.H. Kramer, J. Flannery, H. Baier, D. Trauner, E.Y. Isacoff: Neuron 54 (2007) 535-545.
- 4) R. Numano, S. Szobota, A.Y. Lau, P. Gorostiza, M. Volgraf, B. Roux, D. Trauner, E.Y. Isacoff: Proc Natl Acad Sci U S A. 58 (2009) 6855-6861.
- 5) T. Tsuboi and G.A. Rutter: Biochem Soc Trans 31 (2003) 833-836.
- 6) D.P. King, Y. Zhao, A.M. Sangoram, L.D. Wilsbacher, M. Tanaka, M.P. Antoch, T.D. Steeves, M.H. Vitaterna, J.M. Kornhauser, P.L. Lowrey, F.W. Turek, J.S. Takahashi: Cell. 89 (1997)

641-653.

- 7) X. Jin, L.P. Shearman, D.R. Weaver, M.J. Zylka, G.J. de Vries, S.M. Reppert: Cell 96 (1999) 57-68.

