

(乙)

学位論文抄録

インスリノーマMIN6細胞でのインスリン遺伝子発現における
Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIの役割

(The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II on insulin gene expression in Insulinoma
MIN6 cells)

末藤美星

指導教員

荒木 栄一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻代謝内科学

学位論文抄録

[目的] カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) は膵 β 細胞に発現し、Ca 依存性インスリン分泌において重要な役割をすることが報告されている。また、cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) のリン酸化に関与することも報告されており、Ser133 と Ser142 をリン酸化することで抑制的に働くことが示されている。一方、インスリン遺伝子のプロモータ領域にはこの CREB の結合により転写調節をする CRE が存在する。本研究では、CaMKII の野生型、キナーゼ抑制型の過剰発現モデルと siRNA を用い、インスリン遺伝子転写調節における CaMKII の働きを解析することで、2 型糖尿病経過中のインスリン分泌低下のメカニズムの解明を目指すことを目的とした。

[方法] (1) 糖濃度と KCl による強制的 Ca チャネル開放での MIN6 細胞におけるインスリンプロモータ活性を測定した。(2) CaMKII 野生型、キナーゼ抑制型の過剰発現と CaMKII siRNA を発現させた MIN6 細胞でインスリンプロモータ活性を測定し、インスリン mRNA 発現レベルを定量的 PCR 法にて測定した。(3) インスリンプロモータの CRE1,2 に変異を加え、プロモータ活性を測定した。(4) CaMKII 野生型、キナーゼ抑制型の過剰発現と CaMKII siRNA を発現させた MIN6 細胞における CREB Ser133 と Ser142 リン酸化状態と、CREB と CREB binding protein (CBP) の結合状態を Western blot 法や IP・Western blot 法にて解析した。

[結果] (1) MIN6 細胞におけるインスリンプロモータ活性は、糖濃度を上昇させると増加し、 Ca^{2+} の細胞内流入により低下した。(2) キナーゼ抑制型の CaMKII 過剰発現では変化がなかったが、CaMKII 野生型過剰発現はインスリンプロモータ活性を優位に低下させ、siRNA 法による CaMKII の抑制で優位に増強した。この結果は糖濃度の変化や Ca^{2+} の細胞内流入により変動しなかった。また、mRNA もプロモータの変化と同様の変化を認めた。(3) インスリンプロモータの転写部位である CRE2 に変異を加えると、インスリンプロモータ活性の CaMKII 野生型過剰発現による低下の部分的な改善が見られた。また、この部分的改善は CRE1/2 に変異を加えた場合でも同程度であった。(4) CaMKII 野生型過剰発現は CREB Ser142 のリン酸化を増強し、CREB と CBP の結合を抑制した。

[結論] インスリンプロモータ活性の抑制に CaMKII による CREB のリン酸化が部分的に関与していることを確認した。機序として、転写調節部位のひとつである CRE への CBP 結合の抑制が考えられ、それを調節しているのが CaMKII による CREB Ser142 のリン酸化であると考えられる。