

# インスリン分泌に関与する PKD 遺伝子欠損マウスの作製と 糖尿病モデルマウスとしての検討

大阪大学医学系研究科細胞生物学教室

教授 原田 彰 宏

(共同研究者)

群馬大学生体調節研究所 助 教 佐 藤 隆 史

同上 大学院生 國 井 政 孝

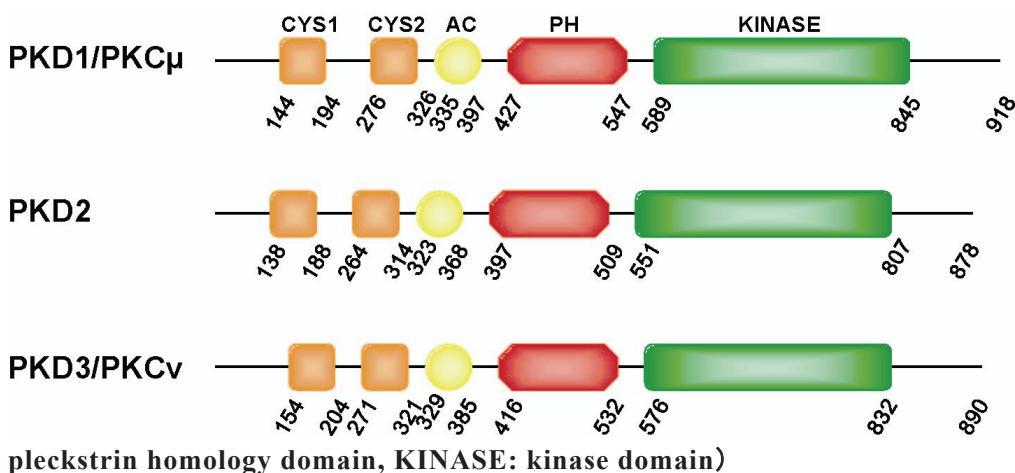
## はじめに

糖尿病はインスリンの分泌や感受性に異常を示すことが多い疾患である。

インスリンの分泌には膵臓ベータ細胞の分泌小胞と細胞膜との融合が、インスリン感受性には筋肉や脂肪の糖トランスポーター (Glut4) の存在する小胞と細胞膜との融合が関与していることが知られている。この過程には様々な分子が関与していることが知られている。

プロテインキナーゼ D1 (PKD1) は当初プロテインキナーゼ C (PKC) の一種として同定されたが、ドメイン構造が異なることやキナーゼの配列が他の PKC と異なることから、別のキナーゼとして分類された (文献 1) PKD には PKD1,2,3 の 3 つがあり、下記のようなドメイン構造を持つ (図 1)。

**図 1 : PKD1,2,3 の模式図 (CYS1,2: Zinc finger domain, AC: acidic domain, PH: pleckstrin homology domain, KINASE: kinase domain)**



後の研究から、PKDは細胞膜に分布する膜蛋白のトランスゴルジネットワーク (TGN) から細胞膜への輸送に重要なこと、また上皮細胞などにおいては TGN から側基底面(basolateral)への輸送に重要とされてきた (文献2, 3) (図2)。

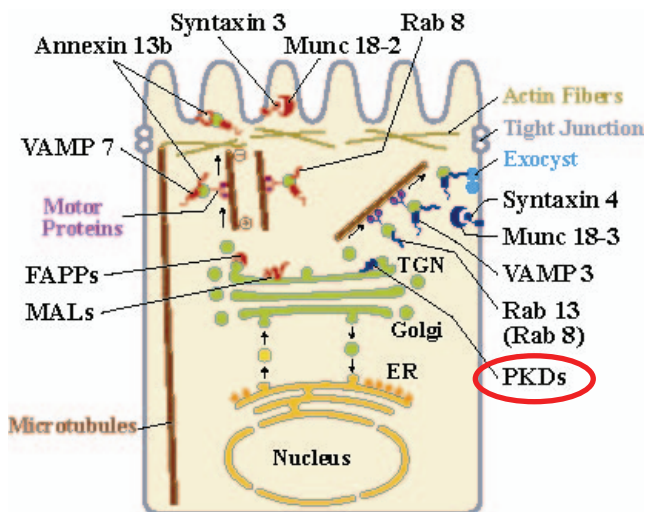


図2 :  
細胞内極性輸送に関与する分子  
\* PKDs (PKD1,2,3)を赤丸で示す

2009年にMAPキナーゼの一種であるp38 $\delta$ のノックアウトマウスでインスリン分泌の促進や高脂肪食によるインスリン感受性の低下の改善やストレスによる膵臓ベータ細胞の細胞死が抑制されることが判明した。p38 $\delta$ は細胞内でPKD1をリン酸化して不活性化することでその機能を果たすことがその研究から明らかとなった(文献4)。つまりPKD1はインスリン分泌に促進的な役割を果たすことが間接的に示された。しかし、実際にPKD1のインスリン顆粒と細胞膜の融合、インスリン感受性、細胞死における機能はよくわかっていない。またPKDにはPKD1, 2, 3の3種類があり、これらに機能上の重複がある可能性もあるため、PKD2や3がこの役割の一端を担っている可能性も高い。

本研究では、PKD1, 2を全身および膵臓のベータ細胞で欠損しているマウスを作製して、その組織やインスリン分泌の異常を解析した。

## 結果

我々は以前報告した表現型復帰可能なノックアウト (revertible knockout) 法を用いて (文献5) PKD1 の組織特異的ノックアウトマウスを作製した (図3)。このノックアウトマウス (geo/geo) は正常に生まれ、発育し、特に組織学的に大きな異常は認められなかった (図4)。PKD1 が膵臓のインスリン分泌に関係するという以前の報告から、膵臓ランゲルハンス島を抗インスリン抗体や抗グルカゴン抗体で染色したが、特にこれらの染色による違い (細胞の大きさ、分布、細胞内のインスリン・グルカゴンの量や分布など) には野生型とノックアウトマウスで大きな違いは認められなかった (図5)。そこで、野生型とノックアウトマウスの腹腔内にグルコースを投与し、その後の血中グルコースの値の変化を調べた (IPGTT) が、これでもやはり差は認められなかった (図6)。現在我々は PKD2 遺伝子についてもノックアウトマウスを作製したため、これと PKD1 ノックアウトマウスを交配して、その表現型を解析中である。

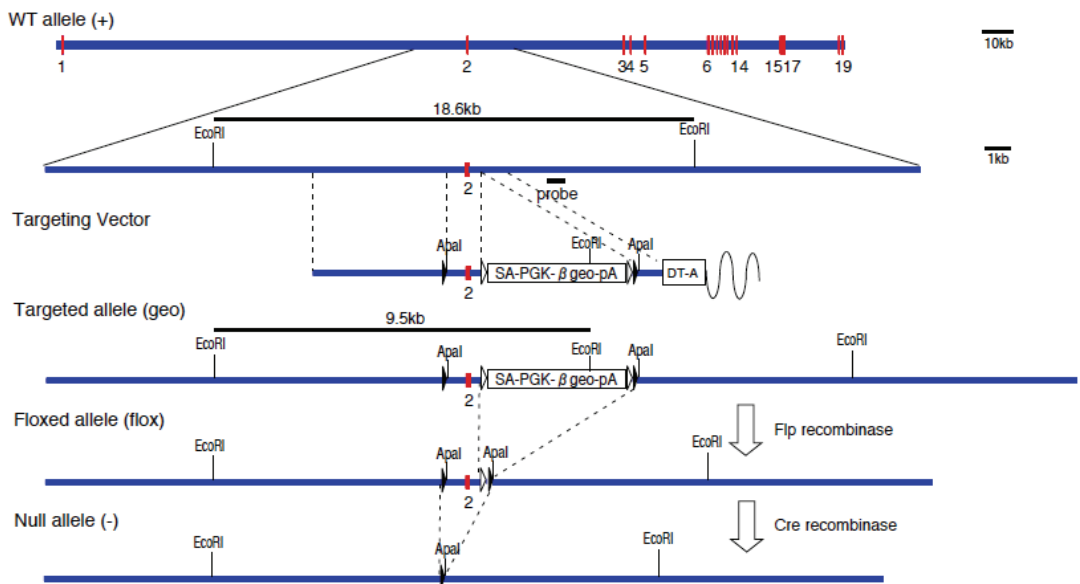


図3 : PKD1 knockout mouse の作製

WT allele (野生型遺伝子) が targeting vector と相同組換えを起こすことで targeted allele (相同組換え体) となる。その SA-PGK-bgeo-pA の部分を Flp で除去すると floxed allele になり、更に Cre で除去することで null allele となる。

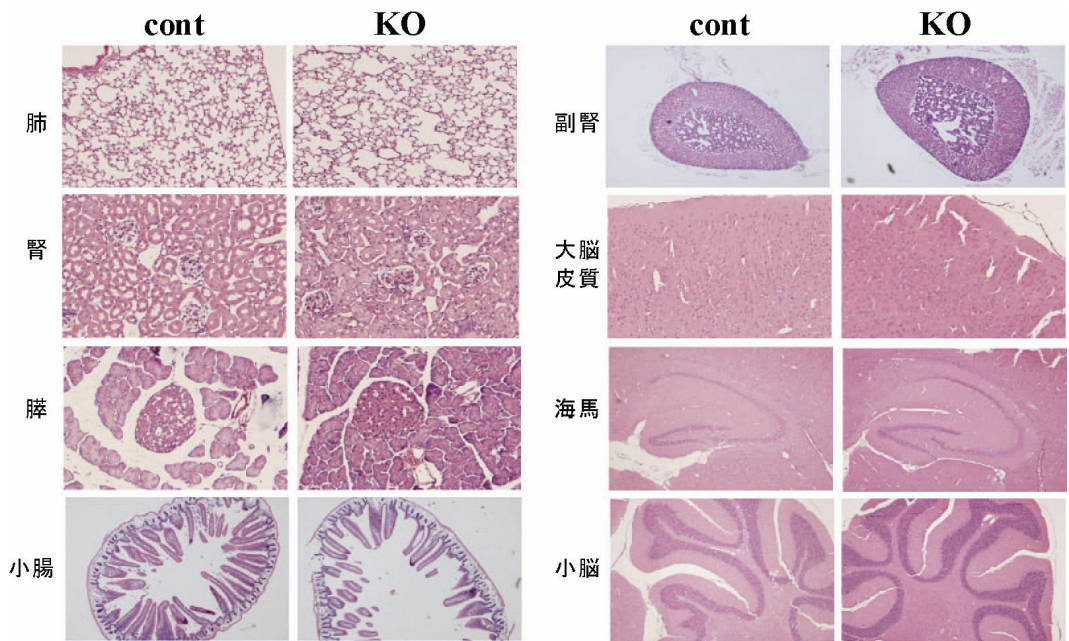
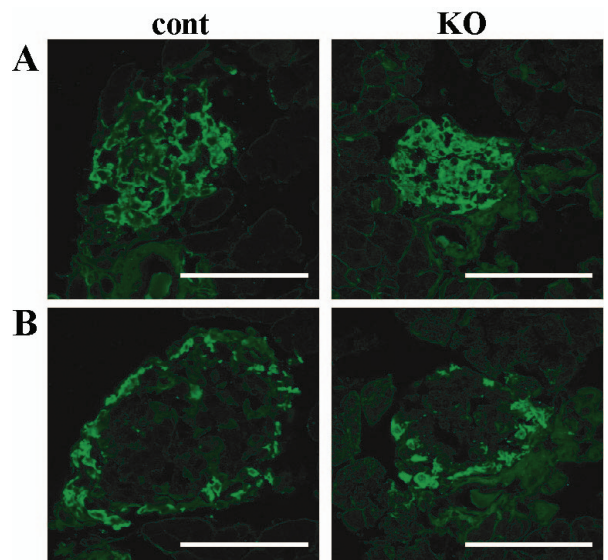


図 4 : PKD1 ノックアウトマウス (KO) とコントロール (cont) の各種組織のヘマトキシリン・エオジン染色

図 5 :  
 PKD1 ノックアウトマウス (KO)  
 とコントロール (cont) の膵島の  
 蛍光免疫染色  
 (A は抗インスリン抗体、B は抗  
 グルカゴン抗体で染色したもの)



bar:100μm

# グルコース負荷試験

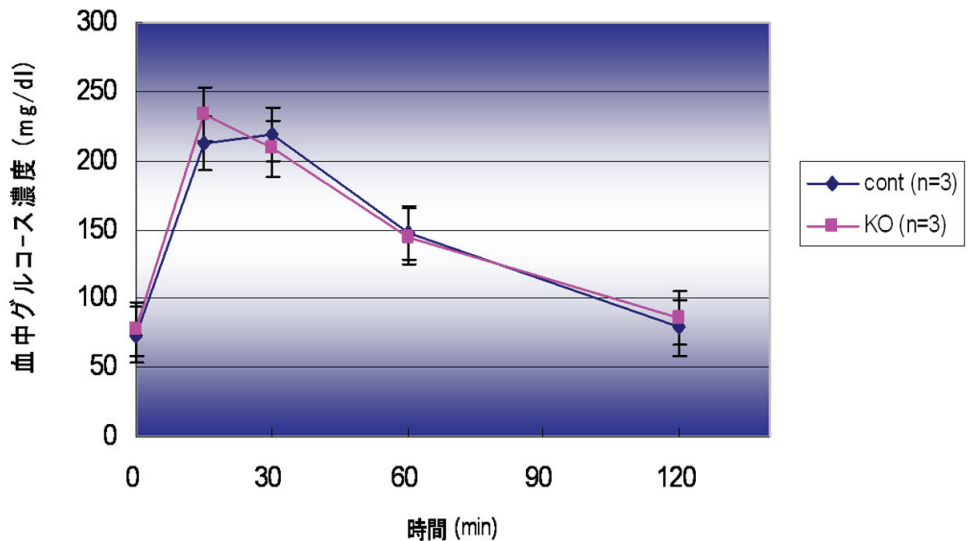


図6：グルコース負荷試験：特にノックアウトマウスとコントロールの間で違いは認められなかった。

## 考察

以前得られた PKD1 と耐糖能との関係について我々は大きな差を見ることが出来なかった。以前の観察では直接 PKD1 のノックアウトマウスを用いた結果ではないため、他の PKD (PKD2, 3) が関与する可能性は否定できない。また、in vitro での PKD1 knockdown の結果は PKD1 antisense の off-target effect である可能性もある。そのため、まず前者の可能性を否定するため、我々は PKD1, 2 を共に欠損したマウスを作製して、その表現型を解析する予定である。

## 要約

PKD1 は間接的な証拠からインスリン分泌への関与が示唆されたため、我々は PKD1 knockout mouse を作製した。しかし、以前の報告と異なり、我々は PKD1 knockout mouse の膵臓のランゲルハンス島の  $\alpha$ ,  $\beta$  細胞の量・分布や、他の組織の異常、耐糖能の異常は認めなかった。この結果は他の PKD によって表現型が見られなかったという可能性も考えられるため、我々は他の PKD、特に PKD2 のノックアウトマウスを作製して、PKD1,2 二重欠損マウスを作製してその表現

型を解析する予定である。もしそれで耐糖能の異常などが観察されれば、このマウスを更に糖尿病のモデルマウスとして用いることも検討したい。

#### 文献

1. A. Rykx, L.D. Kimpe, S. Mikhalap, T. Vantus, T. Seufferlein, J.R. Vandenheede, J.V. Lint.

Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett.* 546: 81-86 (2003)

2. M. Liljedahl, Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, J.V. Lint, V. Malhotra.

Protein Kinase D Regulates the Fission of Cell Surface Destined Transport Carriers from the Trans-Golgi Network. *Cell* 104(3):409-420 (2001)

3. C. Yeaman, M.I. Ayala, J.R. Wright, F. Bard, C. Bossard, A. Ang, Y. Maeda, T. Seufferlein, I. Mellman, W. J. Nelson, V. Malhotra.

Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network *Nat. Cell Biol.* 6, 106-112 (2004)

4. G. Sumara, I. Formentini, S. Collins, I. Sumara, R. Windak, B. Bodenmiller, R. Ramracheya, D. Caille, H. Jiang, K.A. Platt et al.

Regulation of PKD by the MAPK p38 $\delta$  in Insulin Secretion and Glucose Homeostasis. *Cell* 136(2):235-248 (2009)

5. T. Sato, S. Mushiake, Y. Kato, K. Sato, M. Sato, N. Takeda, K. Ozono, K. Miki, Y. Kubo, A. Tsuji, R. Harada, and A. Harada

The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells.

*Nature* 448:366-369, (2007).