

リアルタイムイメージング技術を用いたインスリン分泌能評価系の構築 (II)

The establishment of a reliable real-time imaging system for evaluating insulin secretions (II)

田中 直子

Naoko Iida-Tanaka

大妻女子大学家政学部

Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

キーワード : インスリン, 膵臓β細胞, 糖尿病

Key words : Insulin, Pancreatic beta cells, Type 2 diabetes

1. 研究目的

膵臓β細胞は血中グルコース濃度を感知してインスリンを分泌する, 血糖値の調節の要となる細胞である。日々の食生活に対応して繊細にインスリン分泌を制御する一方で, ストレスに弱く障害を受けやすい細胞でもある。

本研究では, 酸化ストレスや老化の影響を受けやすい小胞体のカルシウム輸送の異常がインスリン分泌に与える影響を, リアルタイムで観察する細胞評価系を構築することを目標として, まず

(1) インスリン分泌をリアルタイムで蛍光観察する方法の確立と, (2) 小胞体 Ca^{2+} 濃度を観察するための小胞体移行性 Ca^{2+} センサータンパク質の遺伝子導入ベクターの構築を行った。

2. 研究内容及び成果

(1) 簡便でリアルタイムなインスリン開口分泌の可視化 : インスリン分泌を可視化する方法としては, 遺伝子組換えによって蛍光標識したインスリンあるいはインスリン顆粒のタンパク質を細胞に発現させる方法などが試みられているが, いずれも遺伝子改変が必要になる。本研究では, 可逆的に細胞膜に結合する蛍光色素 FM1-43 (図 1) を用いた簡便な方法を構築した。

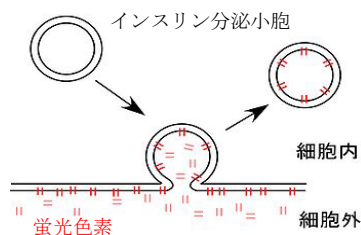


図 1. FM1-43 による染色のしくみ

この方法を用いると, 蛍光観察用の細胞外液に FM1-43 を添加することによって, インスリンが分泌されるたびに, 蛍光色素を含む小胞が細胞内に増えていくことになる。細胞内の蛍光強度 (蛍光小胞の数) の変化を経時的に調べたところ, 実際のインスリン分泌量の増減と非常に良く一致することが示された。

分泌された細胞外液中のインスリンの定量では, 一定時間ごとの細胞外液の採取と ELISA 法による定量という作業が必要になるが, FM1-43 を用いることにより, ELISA 法に匹敵する定量精度で, リアルタイムに観察および定量を行うことが可能になった。

(2) 小胞体移行性 Ca^{2+} センサータンパク質の遺伝子導入ベクターの構築 : Ca^{2+} が結合すると構造が変化するタンパク質の前後に青色蛍光タンパク質 (CFP) と黄色蛍光タンパク質 (YFP) をつなぐと, Ca^{2+} 濃度が高いとき (青色<黄色) と Ca^{2+} 濃度が低いとき (青色>黄色) とで蛍光の色調が変化するタンパク質 (“Cameleon”) を作ることができる (図 2)。これに小胞体移行シグナル配列を追加した配列を組み込んだ遺伝子 (プラスミドベクター) を合成した。

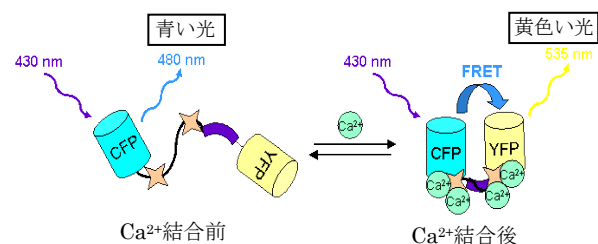


図 2. Cameleon のしくみ

3. まとめと今後の課題

本研究は、加齢やさまざまな環境ストレスによって増加する「小胞体ストレス」が、膵臓β細胞のインスリン分泌に与える影響を網羅的かつ体系的に調べる目的で、(1) インスリン開口分泌の可視化および(2)小胞体Ca²⁺濃度の可視化を試みた。

平成 27 年度は (1) インスリン分泌の簡便かつ定量的なリアルタイム評価系を確立することができ、また (2) 小胞体内に特異的に移行して小胞体内Ca²⁺濃度を定量する CFP/YFP-Cameleon 発現ベクターを構築した。平成 28 年度は、構築した Camelen の細胞系での発現条件の検討および人為的に小胞体ストレスをかけたときの小胞体Ca²⁺濃度の変化を実際に観察する予定である。

4. この助成による発表論文等

①雑誌論文

[1] 柴田みゆき, 田中直子. ノックダウン細胞とコントロール細胞の同視野内観察: アクアポリン 8 ノックダウン細胞がラット膵臓β細胞株のカルシウムシグナルに与える影響. バイオイメージング (査読無し), 24: 85, 2015.

②学会発表

[1] 稲垣里紗, 山下奈穂, 平塚美紗, 伊香賀玲奈, 田中光, 田中直子: ラット膵臓β細胞株 INS-1 に存在するアクアポリン 8 の局在と機能. 日本薬学会第 136 年会, 神奈川, 3, 2016.

[2] 川久保愛美, 柴田みゆき, 長山恵理子, 伊香賀玲奈, 田中直子: 可逆的細胞膜結合蛍光プローブを用いたインスリン分泌の可視化. 日本薬学会第 136 年会, 神奈川, 3, 2016.

(2016 年 3 月 31 日現在)