

小胞体ストレスがインスリン分泌に与える影響： 小胞体カルシウムを観る

A study of relationships between endoplasmic reticulum stress and insulin secretion :
Live cell imaging of Ca²⁺ flux into/from endoplasmic reticulum

川久保 愛美
Megumi Kawakubo

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 健康・栄養科学専修

キーワード：インスリン分泌，リアルタイムイメージング，小胞体ストレス
Key words : Insulin secretion, Real time imaging, ER stress

1. 研究目的

小胞体はタンパク質の生合成や細胞内情報伝達に重要な Ca²⁺の貯蔵など，生命維持に欠かせない役割を持つ。膵臓β細胞では，インスリン顆粒の細胞膜への移動・融合・開口放出という一連の過程に細胞質内の Ca²⁺濃度のオシレーションが重要なシグナルとなることが知られており，小胞体は Ca²⁺の取込み・放出を通して，インスリン分泌機能の調節を行っている。一方，小胞体はストレスを受けやすい細胞内小器官の1つでもある。本研究では，小胞体ストレスが細胞内 Ca²⁺動態およびインスリン分泌に与える影響を，個々の細胞についてリアルタイムで観察する方法を確立することを目的として，脂肪酸添加が与える影響を調べた。

2. 研究実施内容

ラット膵臓β細胞株 INS-1 細胞を用いた。

実験 1 ◆小胞体 Ca²⁺の蛍光観察法の確立
Ca²⁺と濃度依存的に結合して赤色蛍光を示す小胞体移行性蛍光タンパク質 R-CEPIA を INS-1 細胞に遺伝子導入し，3 日後に蛍光顕微鏡で観察した。
R-CEPIA の局在の確認：小胞体染色色素 EverFluor FL Thapsigargin で同時染色し，蛍光の重なりを観察した。

小胞体 Ca²⁺濃度の観察：20mM グルコース刺激後の蛍光強度の変化を 40 分間経時的に観察した。

小胞体の貯蔵機能の観察：グルコース刺激後 3 時間の観察により，Ca²⁺の放出による減少に続く Ca²⁺の回収による回復を追った。

実験 2 ◆脂肪酸添加が与える影響

0.8%BSA 培地を基本 (control) とし，200μM の脂肪酸を含む培地 (パルミチン酸(PA)・オレイン酸(OA)) で 5 日間培養した細胞を用いた。

小胞体ストレス等の解析：活性酸素の増加に伴って発現量が増加する SOD1 (細胞質基質に存在)・SOD2 (ミトコンドリアに存在)・アポトーシス誘導酵素 Casp3・小胞体ストレスによって誘導されるタンパク質 Hspa5・Ddit3・Hsp90b，解糖系酵素の1つである LDHa の mRNA 発現量を Real-time PCR 法によって調べた。

小胞体 Ca²⁺濃度への影響：脂肪酸添加培地で培養した細胞に実験 1 と同様に R-CEPIA を遺伝子導入し，20mM グルコース刺激後の蛍光強度の変化を 40 分間経時的に観察した。

インスリン分泌への影響：細胞膜を染色する 2μM FM1-43 で室温 10 分処理を行い，20mM グルコース刺激後，インスリン分泌に伴って増加する細胞内蛍光小胞を蛍光強度の変化として 40 分間にわたり経時的に観察した。

1 ◆小胞体 Ca²⁺の蛍光観察法の確立

R-CEPIA を遺伝子導入した INS-1 細胞を小胞体染色色素と共染色し観察したところ，染色域がよく重なったことから R-CEPIA が小胞体に局在していることを確認した (図 1)。グルコース刺激後の小胞体 Ca²⁺は漸減し，また，細胞質内の Ca²⁺濃度やインスリンの開口分泌に見られるオシレーションが同様に観察された (図 2)。インスリン分泌の

ためのシグナルとして細胞質内へ Ca^{2+} が供給されていることが示唆された. さらに, 小胞体内 Ca^{2+} 濃度はグルコース刺激後 3 時間後には回復に転じる様子も観察された. これらから, INS-1 細胞の小胞体 Ca^{2+} 観察に R-CEPIA が有用であることが示された.

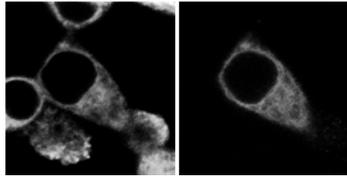


図 1. 小胞体染色色素(左)と R-CEPIA(右) 同視野内での観察

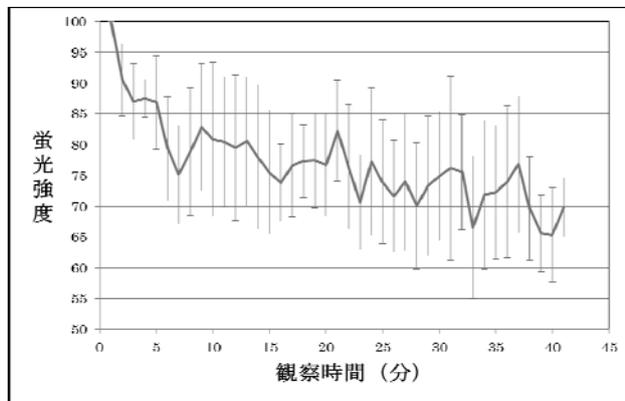


図 2. グルコース刺激後の小胞体内 Ca^{2+} 濃度の経時変化. グルコース添加時を 100 としたとき

2 ◆ 脂肪酸添加が与える影響

小胞体ストレスマーカータンパク質の発現量の変化には, PA と OA で違いが見られ (図 3), PA と OA がそれぞれ異なる機序で, 小胞体にストレスを与えている可能性が示唆された.

一方, control 細胞で小胞体 Ca^{2+} 濃度はグルコース刺激後に速やかに減少するが, PA 処理および OA 処理細胞ではその減少量が 1/2 以下であり, 脂肪酸処理細胞では, グルコース刺激による小胞体からの Ca^{2+} 放出が低下していることがうかがえた. また, 小胞体 Ca^{2+} 放出に続くインスリン分泌も control 細胞と比較して, 脂肪酸処理細胞では 1/2 程度であった.

よって, 脂肪酸添加が細胞内の小胞体ストレスを誘引し, 小胞体からの Ca^{2+} 放出低下を介してインスリン分泌機能に影響を与えている可能性が示唆された.

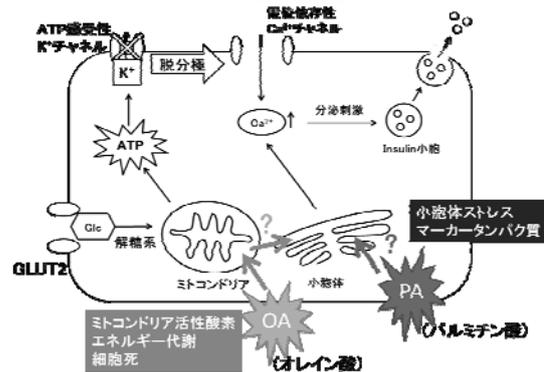


図 3. Real-time PCR の結果から推測した脂肪酸が細胞に与える影響の図

3. まとめと今後の課題

CEPIA を遺伝子導入した INS-1 細胞では, 小胞体内の高い Ca^{2+} 濃度範囲で, 刺激に応答して減少する Ca^{2+} 濃度を捉えることができた. 小胞体 Ca^{2+} 濃度が細かく振幅している様子をとらえることもでき CEPIA を用いることによって小胞体内の Ca^{2+} の微細な出入りを観られることがわかった.

遊離脂肪酸がインスリン分泌に与える影響を脂肪酸毒性と呼び, 小胞体ストレスを介してインスリン分泌に影響を与えている可能性が示唆されてきたが, 実際に小胞体 Ca^{2+} 濃度の経時変化をとらえた研究はこれまでにない. 今回の CEPIA を用いた系によって, 遊離脂肪酸が小胞体 Ca^{2+} の放出, それに伴うインスリン分泌に影響を与えることを観察することができた. 細胞内では, 小胞体以外にもミトコンドリアやゴルジ体がカルシウム貯蔵庫として機能していると言われていることから, これらの小器官内の Ca^{2+} 濃度を観察する系を立ち上げることは今後の課題である.

4. この助成による発表論文等 学会発表

- [1]川久保愛美, 小胞体移行性 Ca^{2+} インジケータ CEPIA を用いた膵臓 β 細胞株 INS-1 の小胞体 Ca^{2+} の可視化, 日本薬学会, 2017/3/25, 仙台
- [2]川久保愛美, 小胞体ストレスがインスリン分泌に与える影響: 小胞体カルシウムを観る, 日本農芸化学会, 2017/9/2, 筑波
- [3]川久保愛美, 小胞体ストレスがインスリン分泌に与える影響: 小胞体カルシウムを観る, 日本薬学会, 2018/3/26, 金沢 (発表確定)