

「生理学ものがたり第9回」 膵β細胞の代謝状態とインスリン分泌

滋賀医大名誉教授 北里 宏

このところ数式の多い話が続いた。数式は論理を確実なものにする一方、よそよそしい、取り付き難い感を与えてしまうので、今回は数式のないもっと生命現象らしい話をするにしよう。数式で表現できない分、泥臭いところが多くなる。泥臭いところが生命現象であるのかもしれない。

ところで、生理学に関心を持つ人は、生きていることとはどういうことかという疑問を持つことであろう。その答えは、一言で言うと、“生きていることは死んでいない状態”である。死んでいる状態は平衡に達した状態である。したがって、生きていることは平衡でない状態ということになる。平衡でない状態を維持するには常に外部から何らかの形でエネルギーを供給しなければならない。多くの細胞からなる個体は外部から食物を取り込み、個体を構成している細胞は細胞外からエネルギー供給の燃料となる物質を取り込んでいく。エネルギー源となる物質の主なものも glucose である。個体を構成する細胞の多くは glucose をその濃度勾配に逆らって細胞内に取り込む能力を持たない。それらの細胞では、glucose は濃度勾配に従ってのみ細胞内に流入する。流入した glucose を glycogen に合成して備蓄する能力に富んだ細胞もあれば脂肪に変えて備蓄する細胞もある。Glucose にしろ脂肪にしろ、エネルギー源となる物質を備蓄する能力に乏しい細胞にとって、自分が属する個体内に細胞外液中の glucose 濃度をある一定以上のレベルに保つ機構が存在することは、生きている状態を維持する上で必須の条件となる。細胞外 glucose 濃度を或るレベル以上に保つ仕組みの中心に膵臓ランゲルハンス島の

α細胞とβ細胞がある。この2者のうち、β細胞は血漿中 glucose 濃度の検出器として働き、細胞外に glucose の余裕があるときには、エネルギーを備蓄する能力を有する細胞に glucose の取り込みを増加させる指令を発する。細胞外の glucose が少ない時には、α細胞が肝細胞に glucose を細胞外液に放出させ、他の細胞に供給させるよう指令を発する。α細胞の活動はβ細胞によって制御されているようである。膵β細胞が血漿 glucose 濃度上昇に反応してインスリンを分泌することは1930年代には知られていたが、glucose 濃度に反応する機構の概要が明らかになったのは比較的最近のことである。また、インスリンによる筋および脂肪細胞の glucose 取り込み促進の機構が明らかになり始めたのもまた比較的最近のことである (Kono, 1983)。

膵β細胞においても神経や筋細胞と同様に活動電位が発生することは1970年 Dean & Matthews によって始めて報告された。彼らの報告が契機となり、幾つかの研究室において膵β細胞の電氣的活動とインスリン放出との関係についての研究が次第に進展し始めた。膵β細胞は神経細胞や筋細胞に較べて遥に小さいので、この細胞から電気現象を記録するには通常の微小電極より遥に細い先端を持つ微小電極（電極抵抗約 200MΩ～300MΩ）を作成しなければならず、また刺入の作業自体も極めて忍耐を要するものであった。ましてこのような細胞に voltage-clamp を行うことは全く不可能な試みであると思われていた。1980年、全く新しい技法が Sigworth & Neher によって発表された。それは細胞表面に先端をまるめた

ガラス電極をあて、電極先端壁のガラスと細胞膜とを密着させシール (giga-seal) をつくり、電極先端壁に囲まれた狭い範囲内の細胞膜にある極く少数のチャンネルを通して流れる電流を記録する方法である。この方法は、また、 β 細胞のような小さい細胞に voltage-clamp を行うことを可能とした。パッチクランプ法と呼ばれるこの全く新しい技法がこの分野の研究に急速な進歩をもたらした。1984 年、培養した β 細胞から取り出した inside-out パッチ膜に ATP に感受性をもつ K^+ channel が存在することが Cook & Hales によって報告され、それに引き続いて同じ年、Ashcroft らによって β 細胞に細胞外の glucose によって抑制される K^+ チャンネルがあることが報告された。その後、 β 細胞の電氣的活動とチャンネル活動との対比から、細胞外 glucose 濃度が上昇すると glucose の代謝を介して細胞内 ATP 濃度が上昇し、ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP}) が閉じて脱分極が起こり、その脱分極のうえに Ca^{2+} スパイクが発生して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が引き金となってインスリン分泌が起こるといった概念は急速に広く理解されるに至った。しかし、インスリン放出量の glucose 濃度依存性が如何にして生じるかという問いに対する答は 1990 年台の後半に至るまで得られていなかった。この稿では 1980 年台から 1990 年台にかけて進められたインスリン分泌の細胞外 glucose 濃度依存性解明の過程を私たちの研究室におけるデータを交えて概観し、またその後の進展についても触れることにする。

1. 膵 β 細胞の電氣的活動とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

(電氣的活動の特徴)

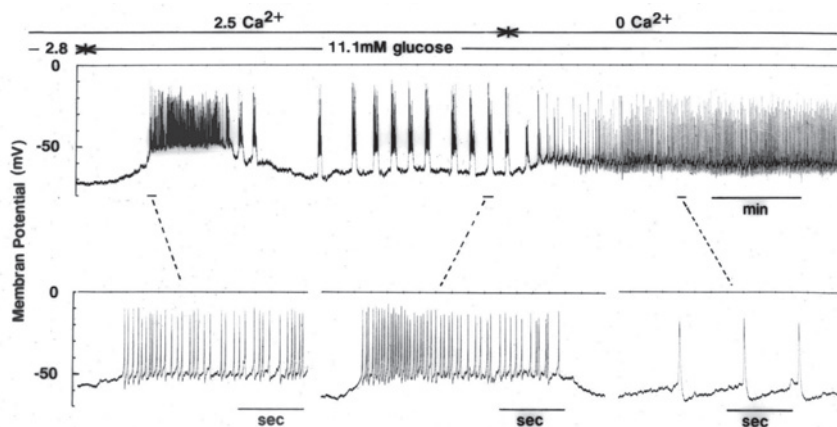
膵ランゲルハンス島 (膵島) には α 細胞、 β 細胞、および δ 細胞がある。このうち β 細胞が大部分を占める。したがって、膵島外から微小電極を刺入すると、 β 細胞に刺さる確率が最も高い。刺入した細胞が β 細胞であることはその特徴的な電氣的活動から識別することができる。すなわち細胞外 glucose 濃度が 2.8mM (50mg/dl) であるとき膵 β

細胞は電氣的に静止状態にあるが、細胞外 glucose 濃度が 6mM から 20mM の範囲内では、規則的に間欠的なスパイク群が発生する (図 1A)。この規則的な間欠的なスパイク群を spike-burst と呼ぶことにする。Spike-burst の持続時間は glucose 濃度の上昇と共に長くなり、逆に spike-burst と spike-burst との間の休止期の長さは短くなる。細胞外 glucose 濃度が 20mM に達すると、spike-burst 間の休止期はなくなり、spike は連続して発生する。

図 1A はマウス膵島内にある β 細胞の細胞内電位を示す。細胞外 glucose 濃度を 2.8mM から突然 11.1mM に高めると、膵島内細胞に緩やかな脱分極が起こり、続いて急激に脱分極が進行し、脱分極の上にスパイクが繰り返し持続的に発生する (以下、spike-train と呼ぶことにする)。この spike-train の持続時間は 1 分程度である。spike-train は再分極によって中断される。細胞内電位が元の静止時のレベルに戻る前に再び脱分極が起こり、それ以後、規則的に間欠的な spike-bursts が発生する。間欠的な spike-burst の持続時間は glucose 濃度を高くしたときに最初に発生する spike-train より遥に短く、細胞外 glucose 濃度が 11.1mM である場合、約 5 秒である。Spike-bursts 中の個々のスパイクの持続時間は数 msec である。スパイクの発生頻度は各 spike-burst の始まりにおいて高く、時間と共に次第に低くなる。このように膵島内の β 細胞が突然の細胞外 glucose 濃度上昇に反応して最初に長い spike-train を発射し (第 1 相)、暫くの休止期を挟んで、短い間欠的な spike-bursts が規則的に発生する (第 2 相)。この現象は Meissner (1976)、Meissner & Atwater (1976) によって報告されている。細胞外 glucose 濃度を突然高くしたときにみられるこの特徴的な 2 相性の電氣活動と、膵島灌流液に分泌されるインスリン分泌量の時間変化 (2 相性分泌パターン) がほぼ同じ時間経過を示すことはこの頃から注目されてきた。

単離された β 細胞でも細胞外 glucose 濃度を 2.8mM から 6~20mM の範囲に高めることによって、spike-burst の発生が認められるが、膵島内の β 細胞の電氣的活動とは対照的に、膵島内細

A



B

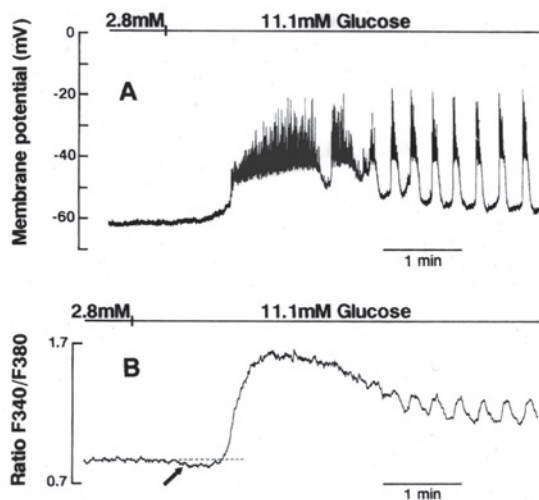


図1 膵島内β細胞の電気的活動と膵島細胞内Ca²⁺濃度の変動。

Aは膵島内のβ細胞に微小電極(300MΩ)を刺入して得た細胞内記録である。実験中の細胞外灌流液は36℃に保たれたKrebs-Ringer-bicarbonate溶液(135mM Na⁺, 2.5mM Ca²⁺)であり, Ca²⁺-free溶液はKrebs-Ringer-bicarbonate溶液からCaCl₂を除いたものである。下段は線で示した部分の時間軸を拡大したものである。細胞外glucoseおよびCa²⁺濃度は図中に示してある(未発表データ)

BのAは膵島内β細胞の電気的活動を示し, Bは同じ島の細胞内Ca²⁺濃度変化を示す。膵島は, 6~12週齢のICRマウスの膵臓をcollagenaseで処理し, 顕微鏡下で取り上げ, 11.1mM glucoseを含むRPMI液中で培養したものである。細胞内Ca²⁺濃度の測定には, あらかじめFura2-AMを取り込ませておき, 波長340nmおよび380nmの励起光を用い510nmにおける蛍光強度比を測定した。Glucose濃度は図中に示してある(Hattori, Kai & Kitasato: Jpn J Physiol 44: 283-293, 1994)

胞において必ず認められた初期の長く続く spike-train は見られず, spike-burst のみが見られる。すなわち, 単離された β 細胞では第 1 相は見られない。このことをまず覚えておいて欲しい。単離 β 細胞の spike-burst の持続時間は膵島内の β 細胞に発生する spike-burst の持続時間より長く, 多少不規則である。

膵 β 細胞の活動電位発生に関与する主なイオンチャンネルは膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの L-type と呼ばれるものである。この Ca^{2+} チャンネルは -30mV より正のレベルへ脱分極すると開き, 不活性化の速さは遅く, 110mM Ba^{2+} 溶液中におけるチャンネルコンダクタンスは 24pS (Rorsman, Ashcroft & Trube, 1988) と報告されている。スパイクの上昇相が Ca^{2+} チャンネルを通る内向き Ca^{2+} 電流に因るものであれば細胞外液から Ca^{2+} を取り去るとスパイク発生は抑制されると期待される。ところが予想に反して, 膵島外灌流液を Ca^{2+} -free Krebs-Ringer-bicarbonate 溶液 (Ca^{2+} -free KRB 溶液) に換えても, スパイク発生が抑制されないどころか, スパイク発生のパターンが spike-burst から連続発射パターンに変化する (図 1A)。よく見ると, Ca^{2+} -free KRB 溶液中におけるスパイクの持続時間は 2.5mM Ca^{2+} KRB 溶液中における持続時間の約 3 倍であるが, スパイクの発生頻度は 2.5mM Ca^{2+} KRB 溶液中における発生頻度の $1/15$ 以下である (図 1A 下段)。このことは, Ca^{2+} -free KRB 溶液中ではスパイク発生期間の単位時間に流入する陽イオン (Na^{+} であるのか?) の量が正常溶液中の流入量より遙に少ない (おそらく $1/5$ 以下であろう) ことを意味する。この現象を見たことが私たちの仕事の出発点となった。

細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定するために, 膵島培養液に Fura2-AM を加え, 洗浄した後, 島全体の蛍光を測定したものを図 1B に示す。細胞外 glucose 濃度が 2.8mM であるときスパイク発生はなく, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は約 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ である。細胞外 glucose 濃度を 2.8mM から 11.1mM に高めると, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は最初の長く続く spike-train の時期に急激に上昇して約 $3 \times 10^{-7}\text{M}$ に達し, spike-train の終了と共に緩やかに低下する。その後, 規則的

な spike-burst の出現に同期して細胞内 Ca^{2+} 濃度は規則的に昇降を繰り返す。一方, 図には示していないが, 単離した β 細胞では細胞外 glucose 濃度を高くした最初から spike-burst が繰り返し発生し, spike-burst に対応して細胞内 Ca^{2+} が昇降する。電氣的活動に一致して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することは β 細胞に発生する活動電位が Ca^{2+} スパイクであることを物語っている。また更に, 膵島内の個々の β 細胞の電氣的活動と膵島全体の Ca^{2+} 濃度変化との間に並行関係が認められることは膵島内 β 細胞が互いに同期して脱分極し, 同期して spike-burst が発生していることを示している。このことは, 正常な膵島内では β 細胞は互いにギャップ・ジャンクションによって結合し, 最も早くスパイク列を発生する細胞がペースメーカーとなっていることを示しているように思える。なお, 膵島内全体の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動と単離した β 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動の特徴は Henquin (2002) によって詳細に述べられている。

先に触れた Ca^{2+} -free 溶液中で発生するスパイクに話を戻すことにしよう。 Ca^{2+} -free 溶液中におけるスパイク発生の閾値は Ca^{2+} が存在する場合のそれより低く, またスパイクの後に undershoot が認められ, 2.5mM Ca^{2+} KRB 溶液中のスパイクと形が異なる。図には示していないが, 2.5mM Ca^{2+} KRB 溶液中でスパイクが発生しているとき, 細胞外液を同じ濃度の glucose を含む Ca^{2+} -free 溶液に置換すると, スパイクは連続的に発生し続けるにもかかわらず, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は正常溶液中における静止時のレベル近くまで低下する。このことも KRB 溶液中のスパイクは Ca^{2+} スパイクであることを示す。

(Ca^{2+} -free 溶液中の Na^{+} 濃度と電氣的活動)

細胞外 glucose に反応して spike-burst が発生しているときに細胞外液から Ca^{2+} を取り去った後においても発生するスパイクの性質を調べることを目的とした実験の結果を図 2 に示す。 Ca^{2+} -free 溶液の Na^{+} 濃度を 130mM から 70mM に下げると, 休止期の膜電位は一旦負方向に移動しスパイクの発生は停止するが, 再び緩やかに脱分極

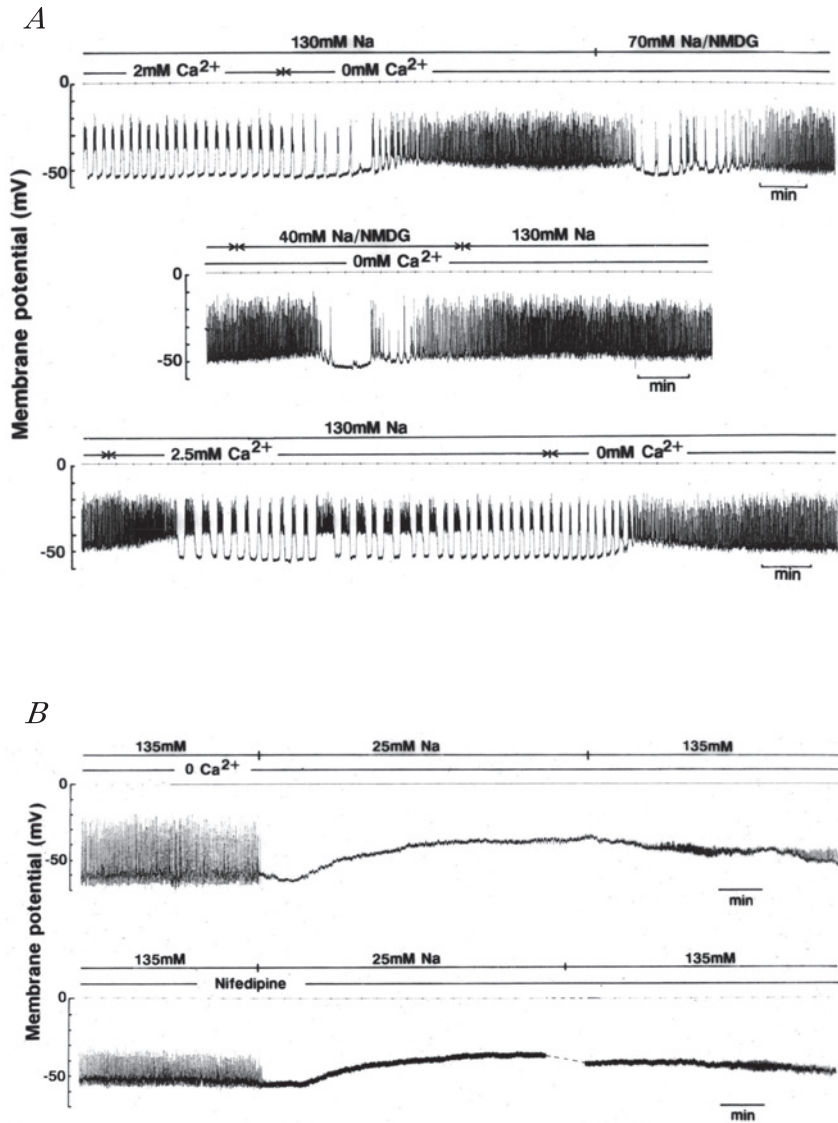


図2 様々な Na⁺ 濃度の Ca²⁺-free 溶液中における睥島β細胞の電気的活動。細胞外 Na⁺ を NMDG⁺ (N-methyl-D-glucamine) で置換することによって様々な Na⁺ 濃度の溶液を作成した。細胞外 glucose 濃度は 11.1mM である。A, B 共に微小電極を用いた記録である。

A は Ca²⁺-free 溶液中の Na⁺ 濃度を 130mM から 70mM, さらに 40mM に下げた後, 再び 130mM に戻した場合の電気的活動を示す。細胞外 Na⁺ 濃度を下げると, 一過性に過分極が起こる。(未発表データ)

B は Ca²⁺-free 溶液中の Na⁺ 濃度を 25mM に下げた場合の電気的活動, および正常細胞外液溶液に Nifedipine を加えておき, Na⁺ 濃度を 25mM に下げた場合の電気的活動を示す。細胞外 Na⁺ 濃度を 25mM まで下げるとスパイク発生は抑制され, 一過性の過分極の後, 緩やかに脱分極する。(未発表データ)

し始める。脱分極の進行中に持続時間の短い spike-burst が発生し、やがて連続的なスパイク発生に移行する (図 2A 上段)。70mM Na⁺溶液中において発生するスパイクの頂点の膜電位は 130 mM Na⁺溶液中のスパイクのそれとほぼ同じであった。

細胞外 Na⁺濃度を 70mM から更に 40mM に下げると、休止期の膜電位は過分極方向に変化し一時的にスパイク発生は抑制される。この場合の抑制は Na⁺濃度を 70mM に下げた場合に見られた抑制より強い。40mM Na⁺溶液中においてもやがて緩やかな脱分極と共に短いながら burst 状にスパイクが発生し、連続的なスパイク発生に移行する。40mM Na⁺溶液中のスパイク頂時の膜電位もまた 130mM Na⁺溶液中のスパイク頂時のそれと殆ど異ならない (図 2A 中段)。細胞外 Na⁺濃度を 130mM に戻してもスパイク間の膜電位の値は殆ど変わらず、スパイクが発生し続ける。更に細胞外 Ca²⁺濃度を 2.5mM に戻すと、スパイク間の膜電位は徐々に脱分極方向へ移動し、spike-burst パターンに移行する (図 2A 下段)。Ca²⁺を取り去った場合および Ca²⁺濃度を再び元のレベルに戻した場合に見られる発火レベルの変化は表面電位の変化を反映しているのかも知れない。

ところで、Ca²⁺-free 溶液中の Na⁺濃度を 25mM にまで下げると、スパイク発生は完全に抑制され (図 2B)、一旦過分極した後、スパイクが発生することなく、緩やかに脱分極する (図 2B 上段)。同様の現象は細胞外から Ca²⁺を取り去る代わりに nifedipine を加えた溶液中においても認められる (図 2B 下段)。膵 β 細胞の電気現象は神経線維における現象より遥に複雑である。

Na/Ca 交換輸送においては、1 個の Ca²⁺を排出する度に 3 個の Na⁺が流入する。したがってこの交換輸送系が働くと同向きに電流が流れる。細胞外 Na⁺濃度を 25mM にまで下げた場合に起こる現象について考えられることは、Na/Ca 交換輸送系を介する内向き電流の減少とその結果である細胞内 Na⁺濃度の低下である。内向き電流の減少は直ちに過分極方向への膜電位変化をもたらすであろう。ところが Ca²⁺-free 溶液においては、僅かな

過分極の後に脱分極が認められた。同様の現象は Gall ら (1999) によっても報告されている。この現象に関して、K_{ATP} チャンネルの関与が考えられる。細胞内 Na⁺濃度の低下は Na⁺/K⁺-pump の活動を低下させる。Na⁺/K⁺-pump の活動低下は ATP 消費の減少をもたらす。細胞内 ATP レベルの上昇をもたらす筈である。細胞内 ATP レベルの上昇は K⁺コンダクタンスの低下を来す。ここに代謝との関係が生じてくる。

(細胞内 Ca²⁺濃度におよぼす細胞外 Na⁺濃度の影響)

細胞外に 11.1 mM の glucose と 2.5 mM の Ca²⁺が存在する条件下においても細胞外 Na⁺濃度を 25mM に下げると、spike-burst パターンは消失し、スパイクが連続して繰り返し発生する。Ca²⁺-free 溶液中の Na⁺濃度を下げた場合と異なり、2.5mM Ca²⁺が存在する条件下では Na⁺濃度を 25mM に下げてもスパイク発生の閾値は変化しない (図 3A)。しかしスパイク発生の頻度は低下する。このことはスパイク発生の背後にある持続的な内向き電流の減少を考えさせる。おそらく Na/Ca 交換輸送の減少が背景内向き電流の減少をもたらしているのであろう。

電氣的活動を記録したのと同じ条件下で細胞内 Ca²⁺レベルを測定した実験では、細胞外 NaCl を Tris-Cl で置き換えても LiCl で置き換えても、全く同じように細胞内 Ca²⁺レベルは上昇する (図 3B)。図には示していないが、細胞外 Na⁺を Tris で置換した場合には細胞内 pH は上昇するが、Li⁺で置換した場合には細胞内 pH は低下する。したがって、上に示した電氣的活動の変化は細胞内 pH の変化に因るものではない。この実験結果は、正常なイオン環境では、活動電位が発生しているとき、Na/Ca 交換輸送系が活発に Ca²⁺を細胞内から細胞外へ排出していることを示している。Na/Ca 交換輸送が盛んになると、細胞内に流入する Na⁺が増加する。細胞内へ流入する Na⁺の量が増加すると細胞内 Na⁺濃度が上昇し、Na⁺/K⁺-pump における ATP 消費が増大するであろう。Na⁺の排出という作業が細胞にどのような影響を与えているのであろうか、次にこの点を

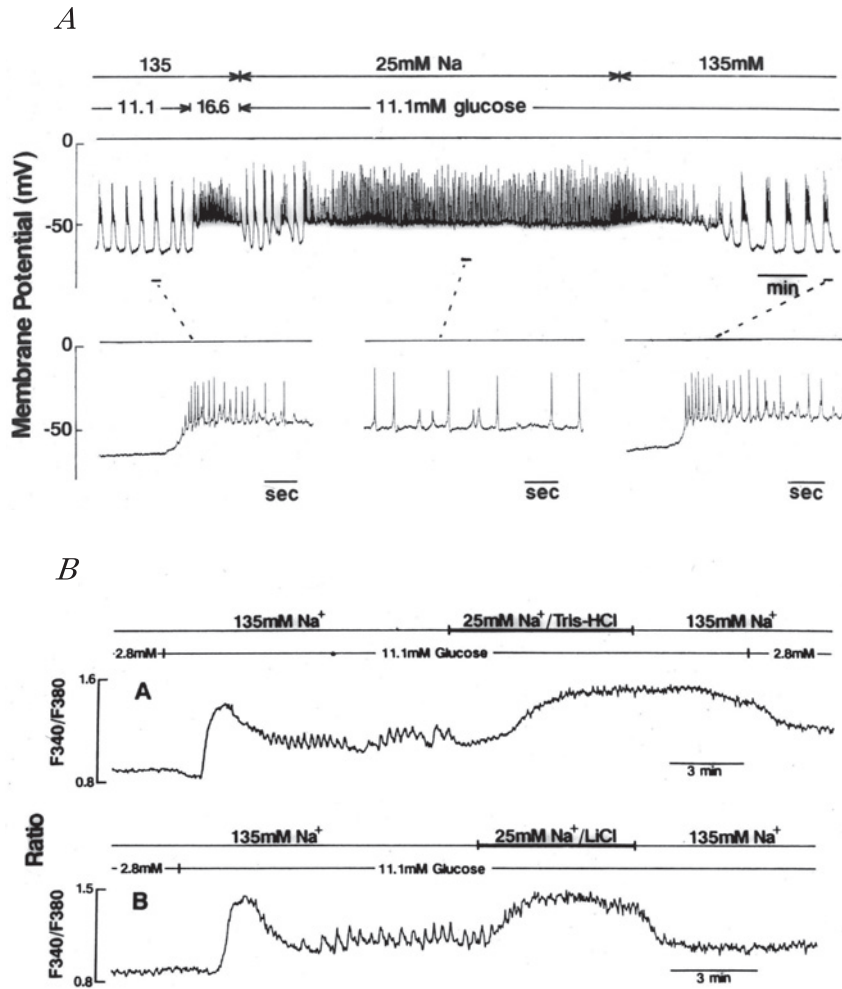


図3 正常濃度の Ca^{2+} (2.5mM) が存在する溶液の Na^+ 濃度を 25mM に下げた場合の電氣的活動および細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化. 細胞外 glucose 濃度は 11.1mM である. A は細胞外 Na^+ を 25mM に下げた場合の電氣的活動の変化を示す. 25mM Na^+ 溶液中では spike-burst 間の休止期は消失し, スパイクは連続して繰り返して発生する. 下段は線で示した部分の時間軸を拡大したものである. スパイクの形は 135mM Na^+ 溶液中におけるものと同じである. しかし, スパイク発生頻度は約 1/10 以下に低下する. 細胞外 Na^+ 濃度を 25mM から元の 135mM に戻すと, スパイク発射は spike-burst パターンに戻る. (未発表データ)
 B は細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を示す. 細胞内 Ca^{2+} 濃度は Fura2 を用いて測定した. B の A は細胞外 NaCl を Tris-Cl で置換した例であり, B の B は LiCl で置換した例である. Na^+ を Tris^+ で置き換えても, Li^+ で置き換えても細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇する. 細胞外 Na^+ 濃度を 135mM に戻すと, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は速やかに元のレベルに戻る. (Hattori, Kai & Kitasato. *Jpn J Physiol* 44 : 283-293, 1994)

見てみることにする。

2. Na^+/K^+ -pump の抑制および glucose 代謝阻害剤と電氣的活動

(膜電位に及ぼす ouabain 影響と mannoheptulose の作用)

細胞内 ATP 濃度は ATP 合成速度と ATP 消費速度のこの両方に依存する。ATP 消費を抑制すると、細胞内 ATP 濃度は上昇し、ATP 合成を抑制すると、ATP 濃度は低下する。ところで、 Na^+/K^+ -pump は発電性 (electrogenic) すなわち電流を運ぶポンプである。このポンプは $3\text{Na}^+ : 2\text{K}^+$ の割合で Na^+ および K^+ をそれぞれ外向きおよび内向きに輸送するので、正常な条件下でこのポンプが働くと外向きに電流が流れる。したがってこのポンプが働いている場合、膜電位は受動的なイオン電流の総和が零である場合の電位より若干負の方向に偏移する。通常の細胞では偏移の大きさは数 mV である。β 細胞においてもこの程度の偏移であろうと考えられるので、 Na^+/K^+ -pump を止めても高々数 mV 脱分極するに過ぎないと予想される。ところが、細胞外液に 11.1mM glucose が存在し spike-burst が発生している β 細胞に Na^+/K^+ -pump の阻害剤である ouabain を与えると、spike-burst の持続時間が長くなり、spike-burst 間の休止期の膜電位が短くなる。しかも spike-burst 間の膜電位は次第に脱分極方向へ移動し、連続してスパイクが発生するようになる (図 4A 上段)。Ouabain を取り除くとスパイク間の膜電位は次第に過分極方向へ移動し、再び spike-burst パターンが現われる。spike-burst 間の休止期の膜電位は更に過分極方向へ移動し続け、遂には spike-burst の発生は抑制され、膜電位は元のレベルより更に負となる。Ouabain を取り去った後、10 分程経過すると、緩やかな脱分極が起こり、spike-burst が再び現われる。注目すべきことは、豚島内 β 細胞では、正常イオン組成灌流液の glucose 濃度をスパイクが発生しないレベルから電氣的活動が出現するレベルに引き上げたとき、最初に比較的持続時間の長い spike-train が現われその後 spike-burst パターンに変化するが、ouabain 除去

後に再出現する電氣的活動においては非常に短い spike-train がまず現われ、それに引き続いて直ちに spike-burst が現われることである。これは β 細胞の glucose 代謝状態の変化を示すものであろう。

Ouabain が Na^+/K^+ -pump を抑制すると共に ATP 消費をも抑制することはよく知られていることである。ところで β 細胞の膜電位に及ぼす ouabain の影響は細胞外 glucose 濃度に依存する。細胞外 glucose 濃度が 8.4mM である場合、ouabain を与えたことによる spike-burst 間の休止期の膜電位は glucose 濃度が 11.1mM である場合と同様に脱分極方向へ移動するが、その移動速度は 11.1mM glucose 溶液中におけるものより小さく、また休止期が完全に消失することはない (図 4A 中段)。Ouabain を取り去ると、11.1mM glucose の場合と同様にスパイク発生は抑制され、膜電位は ouabain 投与前のレベルに戻る。8.4mM glucose 存在下で ouabain を作用させているとき、glucose の代謝阻害剤として知られる mannoheptulose を ouabain 投与中に与えると、速やかに spike-burst 発生は停止し、膜電位は ouabain 投与前の休止期のレベルにまで低下する (図 4A 下段)。Mannoheptulose を取り去ってもその効果は暫く残る。つまり glucose 代謝を抑制すると、 Na^+/K^+ -pump による ATP 消費を復活させたのと同じ効果が現われる。

(細胞内 ATP レベルの指標としての K_{ATP} チャネルの活動)

ATP 消費が減少すると細胞内 ATP 濃度は上昇すると予想されるが、細胞内 ATP 濃度そのものを経時的に測定することは出来ない。幸い、 K_{ATP} チャネルの活動が細胞内 ATP によって抑制されることは多くの研究者によって報告されているので、 K_{ATP} チャネルの活動を細胞内 ATP 濃度の指標として用いることが出来よう。すなわち、 K_{ATP} チャネルの開確率が高ければ細胞内 ATP 濃度は低く、開確率が低ければ細胞内 ATP 濃度は高いと判断する。図 4B は cell-attached モードで β 細胞から K_{ATP} チャネル活動を記録したものである。細胞外 glucose 濃度が 5.6mM であるとき、単離 β

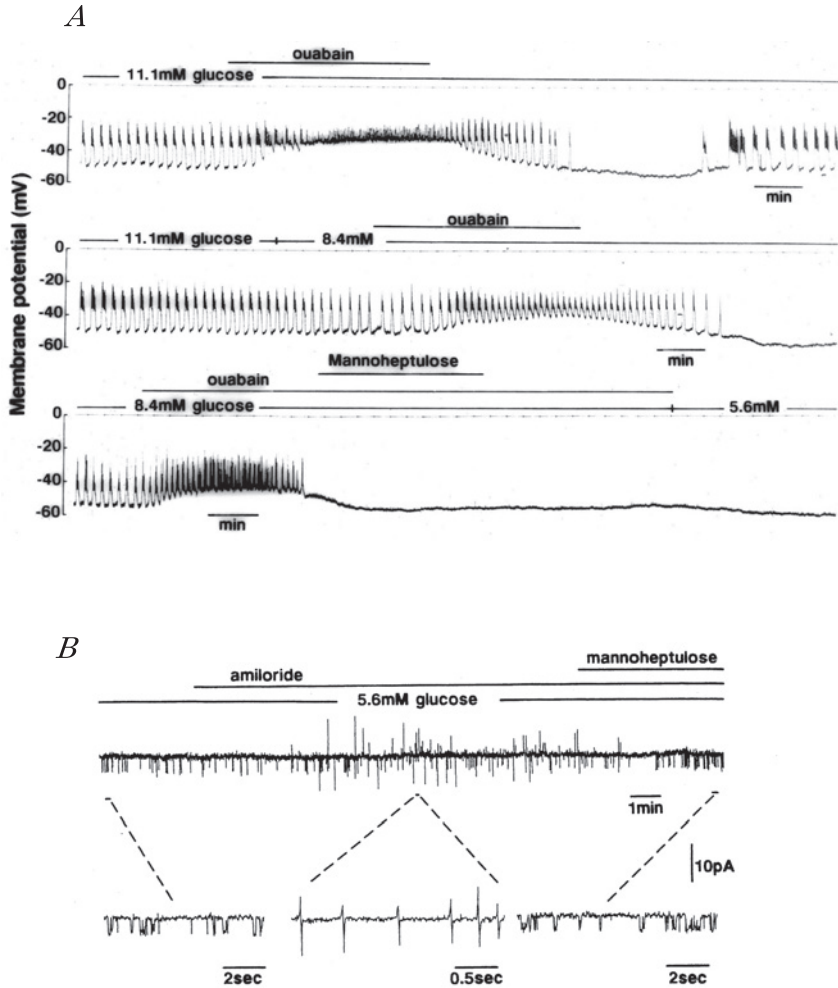


図4 膵島β細胞の電気的活動および K_{ATP} チャネルの活動に及ぼす Na^+/K^+ -pumpの抑制とglucose濃度との関係.

Aは細胞外glucose濃度が11.1mMである場合と8.4mMである場合の膵島内β細胞の電気的活動に及ぼすouabainによる Na^+/K^+ -pump抑制の影響を示す. Ouabain (0.1mM)を細胞外液に加えると, spike-burst間の休止期が短縮し, 休止期の膜電位は脱分極方向へ変化する. Ouabainが存在しても, 細胞外液にmannoheptulose (20mM)を加えると再分極が起これ, スパイク発生は停止する(Aの下段). (未発表データ)

Bは培養β細胞からcell-attachedモードで記録した K_{ATP} チャネルの活動を示す. 免疫組織化学的に抗インスリン抗体に反応する細胞は大きく, 顆粒を多く含んでいるが抗グルカゴン抗体に反応する細胞は少し小さいので, 顕微鏡下で或程度β細胞を識別することは可能である. 細胞外glucose濃度は5.6mMである. ピペット内溶液の K^+ 濃度は140mMであり, ピペット内電位は0mVである. Amiloride (0.1mM)を細胞外液に加えると K_{ATP} チャネル電流は消失し, スパイク電流が現われる. 更にmannoheptuloseを加えると, 再び K_{ATP} チャネルは開閉を繰り返す. (Ding & Kitasato *Jap J Physiol* **47**: 299-306, 1997)

細胞においては K_{ATP} チャンネルの活動が認められる。図には示していないが、この細胞外液に ouabain を加えると K_{ATP} チャンネルの活動は抑制され、電極先端のパッチ膜を貫く background 電流は僅かながら外向きとなり、活動電位発生による電流が記録される。

ATP の大部分は酸化的磷酸化反応によって合成されている。細胞内のミトコンドリアにおいては常に酸素が消費され、 CO_2 が発生し、 CO_2 の一部はガスのまま細胞外へ拡散するが、 CO_2 の大部分は水と結合し H^+ と HCO_3^- に解離し、 H^+ は細胞外の Na^+ と交換して細胞外へ出て行く。このことは細胞が生きた状態である限り、 Na/H 交換輸送系を介して常に Na^+ が細胞内へ流入していることを意味している。この他に、活動電位発生と共に流入した Ca^{2+} も Na/Ca 交換輸送系を介して細胞外へ排出されている。流入した Na^+ は Na^+/K^+ -pump によって常に細胞外へ排出され、ATP は消費されている。したがって Na^+ 流入を抑制すると ATP 消費が減少し、細胞内 ATP 濃度は上昇するであろう。ところで、amiloride が Na/H 交換輸送を抑制することはよく知られている。5.6mM glucose 存在下では K_{ATP} チャンネルは開閉を繰り返している。この状態にあるとき、amiloride を細胞外液に加えると、 K_{ATP} チャンネルの活動は抑制され、活動電位が発生するようになる(図 4B)。この所見は Na/H 交換輸送が抑制されると、細胞内 ATP 濃度が上昇するとの予想を支持するものである。Amiloride 投与後 K_{ATP} チャンネル活動が抑制されているときに mannoheptulose を与えると、 K_{ATP} チャンネル活動は再び現われる。つまり Na^+/K^+ -pump における ATP 消費が減少していても、ATP 合成が抑制されれば、細胞内 ATP 濃度は低下することを示している。

これまで述べた所見から、連続的なスパイク発生の停止に関して、次のように考えられる。すなわち、スパイクの連続発生と共に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に従って、 Na/Ca 交換輸送系を介する Na^+ 流入が増加し、細胞内 Na^+ 濃度は上昇する。細胞内 Na^+ 濃度の上昇が Na^+/K^+ -pump における ATP 消費を増加させ、

ATP 消費増大は細胞内 ATP 濃度の低下をもたらす。細胞内 ATP 濃度の低下は K_{ATP} チャンネルの開確率を上昇させ、 K^+ コンダクタンスの上昇がスパイク発生を停止させ、再分極をもたらす。

スパイク発生の停止後も細胞内 Na^+ 濃度の高い状態が続く限り細胞内 ATP 濃度は低いレベルに留まり、 K^+ コンダクタンスの高い状態が持続する。この期間が spike-burst 間の休止期である。細胞内 Na^+ 濃度が次第に低下し、 Na^+/K^+ -pump における ATP 消費速度が ATP 合成速度より低くなると、膜電位は再び脱分極方向へ変化し始め、次の spike-burst が発生する。

β 細胞が定常的に spike-burst を発射している時期に起こる現象をまとめてみることにする。ATP 消費速度は細胞内 Na^+ 濃度に依存し、一方、 β 細胞における ATP 合成速度は細胞外から流入した glucose の量に依存する。ATP 合成速度が ATP 消費速度を上回る期間が長いほど、spike-burst の持続時間は長くなり、ATP 合成速度が ATP 消費速度より低い期間が短いほど spike-burst 間の休止期の持続時間は短くなる。したがって細胞外 glucose 濃度が 6~20mM の範囲では、glucose 濃度が高くなるほど spike-burst の持続時間は長く、spike-burst 間の休止期は短くなる。細胞外 glucose 濃度が 20mM 以上に達すると、ATP 合成速度が ATP 消費速度より常に高いので、spike-burst 間の休止期は消失し、スパイクが持続的に発生する。これが細胞外 glucose 濃度が 6~20mM の範囲では spike-burst が周期的にあらわれ、glucose 濃度が 20mM 以上に達すると spike-burst パターンから連続的なスパイク発射パターンに移行する理由であると、私たちは考えている。

細胞外 glucose 濃度が高くなると、単位時間に占める spike-burst 期間の割合が長くなる。単位時間に流入する Ca^{2+} の量に従って細胞内 Ca^{2+} 濃度の平均値は高くなるので、単位時間に占める spike-burst 期間の細胞外 glucose 濃度依存性はそのまま細胞内 Ca^{2+} 平均濃度の細胞外 glucose 濃度依存性に反映されることになる。一方、インスリン放出量と細胞内 Ca^{2+} 濃度との間には密接な

関係があるので、インスリン放出量は細胞外 glucose 濃度に依存することになる。

つぎに、細胞外 glucose 濃度を突然高くした場合に、規則的な間欠的 spike-bursts に先立って出現する持続の長い spike-train, 即ち電氣的活動の第 1 相, の発生機構について考えてみることにする。この機構にはグルカゴンが関与していると思える。

3. グルカゴンと β 細胞の代謝状態

(ランゲルハンス島内の β 細胞の電氣的活動と細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動)

電顕像を調べてみると、 β 細胞にも glycogen 顆粒がある。グルカゴンは肝細胞において glycogen 顆粒内の glycogen 分解を促進することはよく知られた事実である。膵 β 細胞においても glycogen は細胞内の glycogen の分解を促進するであろうか。細胞外 glucose 濃度を突然高くするとインスリン分泌が 2 相性に増加することは既に指摘されているが、その機構は 1990 年の初頭に至っても未だ解明されていなかった。あるいは今でも未だ十分に解明されていないのかもしれない。ランゲルハンス島には β 細胞の他に α 細胞も存在する。 β 細胞からインスリンが放出されていないとき、 α 細胞からグルカゴンが放出される。同じ島の中にあつて α 細胞から放出される高濃度のグルカゴンに β 細胞が曝されていれば、 β 細胞に何らかの変化が起こっている可能性は高い。

モルモット膵から分離した α 細胞は 5~20mM の濃度の glucose が存在しても活動電位を発射する (Rorsman & Hellman, 1988)。つまり、細胞外液の glucose は直接的には α 細胞の活動を抑制しない。 α 細胞上には GABA_A 受容体がある (Rorsman ら, 1989)。一方、 β 細胞からインスリンの分泌と共に GABA および ATP も分泌されることが報告されている。したがって β 細胞に活動電位が発生しているとき、 α 細胞の活動は β 細胞から分泌される GABA によって抑制されているであろう。

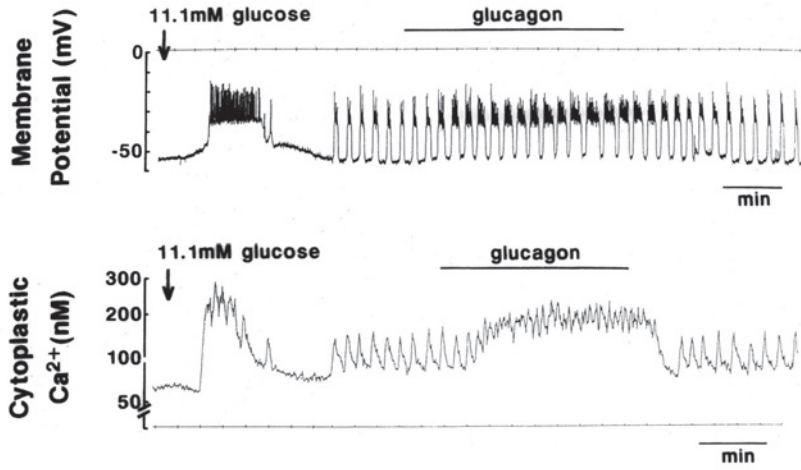
Glucose 濃度が低く β 細胞に電氣的活動が発生していないとき、細胞外液にグルカゴンを加えて

も膜電位には何の変化も認められない。ところが細胞外 glucose 濃度を高くし spike-burst が発生しているとき、細胞外液にグルカゴン ($2.9 \times 10^{-7}\text{M}$) を加えると spike-burst の持続時間が長くなり、spike-burst 間の休止期は短くなる (図 5A)。この効果はグルカゴンの濃度に依存する。細胞内 Ca^{2+} 濃度は spike-burst の持続時間の延長と共に高くなる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、それ自体、神経終末の伝達物質の放出に見られるように、分泌顆粒の開口分泌のトリガーとなると同時に、glycogen 分解に関する酵素の活性化を介して ATP 合成を促進させる可能性もある。

(K_{ATP} チャンネルの活動に及ぼすグルカゴンの作用)

さきにも述べたように K_{ATP} チャンネル活動は細胞内 ATP 濃度の指標となる。すなわち、 K_{ATP} チャンネルの活動が抑制されていれば細胞内 ATP 濃度は上昇していると判断し、パッチ内の K_{ATP} チャンネルの多くが開閉を繰り返していれば ATP 濃度は低いと判断する。5.6mM glucose 溶液中の培養 β 細胞について cell-attached モードでパッチクランプを行い K_{ATP} チャンネル電流を記録したものを図 5B に示す。2.8mM glucose KRB 溶液にグルカゴン ($2.9 \times 10^{-7}\text{M}$) を加えると K_{ATP} チャンネルの活動は完全に抑制され、活動電位が発生する。グルカゴンが存在している期間に calmodulin の阻害剤である W-7 を与えると、 K_{ATP} チャンネル活動が再び現われる。すなわちグルカゴンの効果は W-7 によってかなり相殺される。W-7 を取り除くと K_{ATP} チャンネルの活動は完全に抑制され、その後グルカゴンをも取り去ると、 K_{ATP} チャンネルの活動が再び現われる。この所見はグルカゴンが Ca^{2+} /calmodulin を介して glycogen の分解を促進していることを示しているように思える。肝細胞においてグルカゴンが phosphorylase-kinase の活性化を介して glycogen の加燐酸分解を引き起こすことはよく知られている。おそらく β 細胞においても cyclic AMP の増加と共に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が phosphorylase-kinase の活性化を来とし、glycogen-phosphorylase が活性化されるのであろう。

A



B

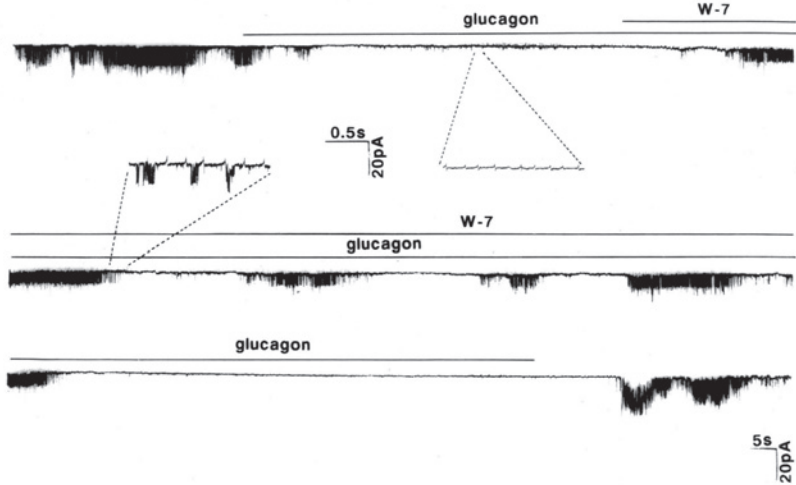


図5 膵島β細胞の電気的活動，細胞内Ca²⁺濃度，およびK_{ATP}チャネル活動に及ぼすグルカゴンの影響。

Aの上段は膵島β細胞の微小電極を用いて得た細胞内記録であり，下段は膵島の細胞内Ca²⁺濃度の変動を示す．細胞外glucose濃度は11.1mMであり，線で示した部分はグルカゴンを細胞外液に加えた期間を示す．グルカゴンの濃度は 2.9×10^{-7} Mである．(未発表データ)

Bは培養β細胞からcell-attachedモードで記録したK_{ATP}チャネル電流を示す．ピペット内溶液のK⁺濃度は140mMであり，ピペット内電位は0mVである．細胞外glucose濃度は2.8mMである．グルカゴンの濃度は 2.9×10^{-7} Mであり，W-7の濃度は 3×10^{-5} である．グルカゴンを与えると，K_{ATP}チャネル電流は消失し，スパイク電流が現われる．(He, Mears, Atwater & Kitasato *J Membrane Biol* **166** : 237-244, 1998)

(細胞内 NADH および Ca²⁺)

細胞内 glucose 濃度が上昇すると、解糖が亢進し、NADH レベルは上昇する。したがって、NADH レベルを指標として glucose 供給の状況を知ることが出来よう。NADH は固有の蛍光を持っているので、この蛍光強度を指標として NADH レベルを調べることができる。ただ NADH と NADPH とは同じ波長の蛍光をもっているため、この両者を区別することはできない。β細胞の電気的活動におよぼすグルカゴンの作用を調べた場合と同様に、細胞外 glucose 濃度を 2.8mM から 11.1mM に変えると、細胞内 NADH と NADPH の蛍光の和は約 35% 増加する(図 6A)。この状態に達した後、グルカゴンを与えると蛍光強度は更に増加し、2.8mM glucose 溶液中における蛍光の約 1.8 倍に達する。ところが Ca²⁺-free 溶液中では細胞外 glucose 濃度を 2.8mM から 11.1mM に変化させても、細胞内 NAD(P)H レベルの増加は遅く、しかも増加の大きさは約 20% にしか過ぎない。この状態に達した後、グルカゴンを与えても NAD(P)H の上昇は認められない。つまりグルカゴンは glycogen の分解を促進し、細胞内 NADH の濃度を上昇させるが、この作用は細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が無ければ現われない。細胞内 NADH レベルの上昇は ATP 合成反応の亢進を来し、細胞内 ATP 濃度は上昇するであろう。

(グルカゴンに曝された β細胞の ATP レベルと細胞内 Ca²⁺)

Glycogen-phosphorylase の活性化には燐酸化された phosphorylase-kinase が関与している。Phosphorylase-kinase の燐酸化は活性化された A-kinase と共に 3×10^{-7} M 程度の Ca²⁺を必要としていることは既に知られている。2.8mM glucose KRB 溶液中、すなわち活動電位が発生していない状態では、caged-Ca²⁺を取り込ませておいた β細胞の K_{ATP} チャンネルの開確率は高い。この細胞外液にグルカゴンを加えても K_{ATP} チャンネルの活動は殆ど変化しない。つまりこの状態では細胞内 ATP レベルは変化しない。ところがフラッシュ光を与え caged Ca²⁺から Ca²⁺を放出させると K_{ATP} チャンネルの開確率は低下し、活動電位が発

生する(図 6B)。この実験結果は、グルカゴンの存在下で細胞内 Ca²⁺濃度が上昇すると、細胞内 ATP レベルが上昇することを示す。

同じ glucose 濃度の溶液において、グルカゴンを加える代わりに dibutyl-cyclicAMP を加えても K_{ATP} チャンネルの活動は殆ど変化しない。この細胞にフラッシュ光を照射し caged Ca²⁺から Ca²⁺を放出させると、グルカゴンに曝していた場合と同様に、K_{ATP} チャンネルの開確率が低下し、活動電位が約 120 秒間ほどにわたって繰り返し発生する(図 7A)。以上の所見は、β細胞においてもグルカゴンは細胞内 cyclic AMP を増加させ、増加した cyclic AMP が Ca²⁺と協同して phosphorylase-kinase を活性化させ、その結果、glucose の供給が増大し、ATP 合成が亢進し、細胞内 ATP 濃度が上昇する、という考え方を支持するものである。

β細胞に perforated patch をつくり whole-cell clamp の状態にした上で膜電位固定を行うと、膜電流を測定できる。また bridge を用いて交流信号を与え、膜容量を測定することも出来る。膜電位を -70mV の holding potential から 0mV にクランプすると、内向きに Ca²⁺電流が流れ、膜容量が 8fF ほど増加する。細胞外液にグルカゴンを加えると、脱分極によって誘発される Ca²⁺電流には認められるほどの変化は起こらないが、脱分極によって誘発される膜容量の増加は 90fF ほどにも達する(図 7B)。分泌顆粒が細胞膜と融合し開口すると膜容量が増加する筈であるので、膜容量の変化は開口した分泌顆粒の数を反映すると考えられる。この所見は細胞内 Ca²⁺濃度上昇の大きさが同じであっても細胞内 cyclic AMP 濃度あるいは細胞内 ATP 濃度が上昇していると、Ca²⁺に誘発されて開口分泌を起こす顆粒の数が増加することを意味している。

細胞外 glucose 濃度が低く β細胞が電気的活動を示していないとき、α細胞に活動電位が繰り返し発生し、グルカゴンが常に分泌されている。グルカゴンは同じ島内の β細胞に働き、β細胞内の cyclic AMP 濃度を上昇させ、A-kinase は活性化された状態にある。しかし β細胞に活動電位が発生していない状況下では、細胞内 Ca²⁺濃度は低い

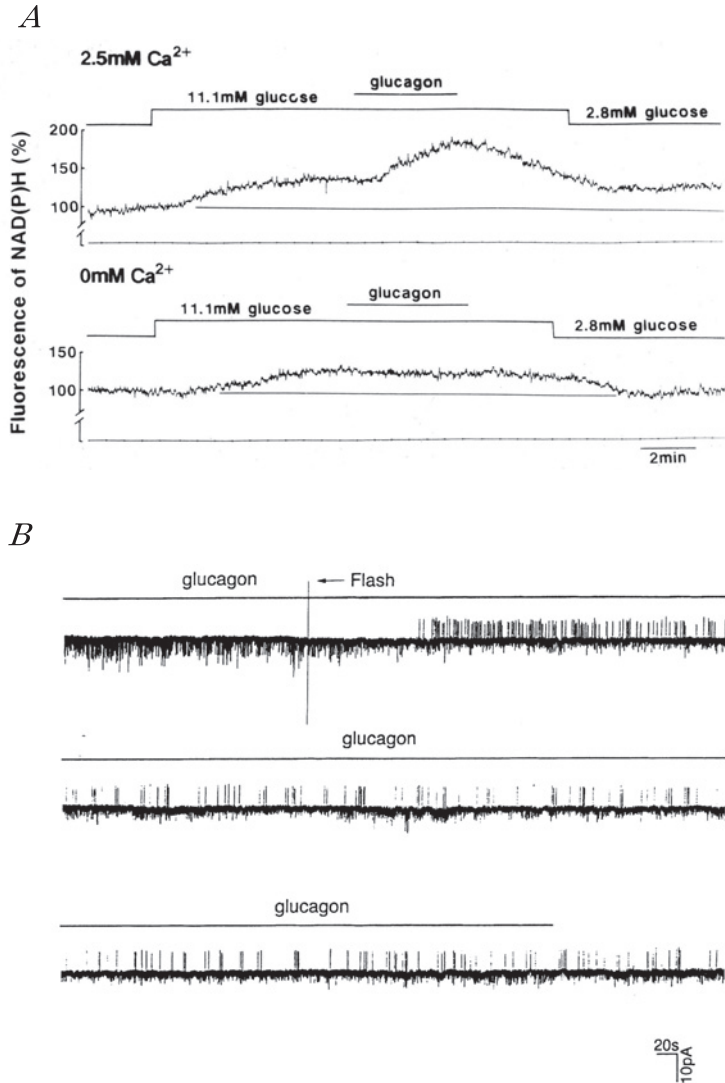


図6 β 細胞のNADHおよびNADPHレベルおよび K_{ATP} チャネルの活動に及ぼすグルカゴンの影響.

Aは培養 β 細胞内のNADHとNADPHの蛍光の和を示す. 励起光の波長は360nmであり, 蛍光測光の波長は465nmである. Aの上段は Ca^{2+} が2.5mMである溶液中の蛍光であり, 下段は Ca^{2+} -free溶液中の蛍光である. 細胞外glucose濃度を11.1mMに高める前のglucose濃度は2.8mMである. (He & Kitasato *BBA* **1310**:325-333, 1996)

Bは培養 β 細胞からcell-attachedモードで記録した K_{ATP} チャネルの活動を示す. ピペット内溶液の K^+ 濃度は140mMであり, ピペット内電位は0mVである. 培養 β 細胞を40~50分間5 μ Mのcaged Ca^{2+} (Nitr-5/AM)を含む溶液中で培養し, 細胞外液のCaged Ca^{2+} を洗い流した後, パッチクランプ実験に用いた. 細胞外glucose濃度は2.8mMである. 大きな縦線はフラッシュ発光の際のアーティファクトである. (He, Mears, Atwater & Kitasato, *J Membrane Biol* **166**:237-244, 1998)

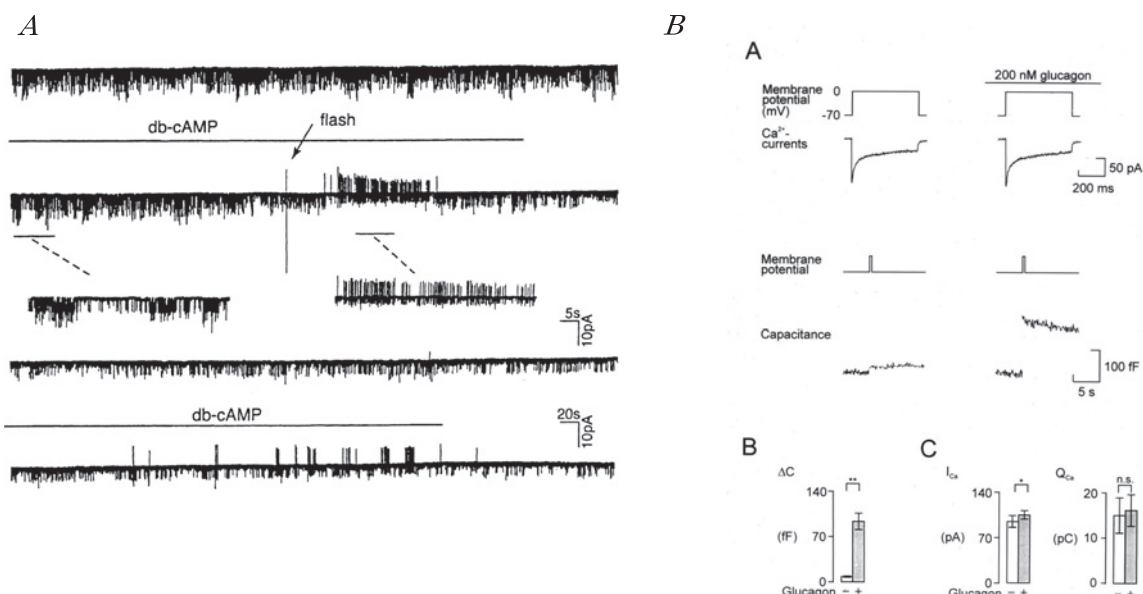


図7 db-cyclicAMPを取り込ませておいたβ細胞の細胞内Ca²⁺濃度を上昇させたことがもたらすK_{ATP}チャネル活動の抑制，および脱分極により誘発される膜容量の変化に及ぼすグルカゴンの作用。

Aはdb-cyclicAMP存在下でphotolysisによってcagedCa²⁺から放出されたCa²⁺がK_{ATP}のチャネル活動に与える影響を示す。細胞外glucose濃度は2.8mMであり，db-cyclicAMPの濃度は0.125mMである。Cell-attachedモードでの記録。ピペット内のK⁺濃度は140mMであり，ピペット内電位は0mVである。(He, Mears, Atwater & Kitasato, J Membrane Biol 166 : 237-244, 1998)

Bはperforated patch clamp法を用いてβ細胞を膜電位固定実験を行った例である。Holding potentialは-70mVであり脱分極の大きさは70mVである。

BのAの上段は脱分極により誘発される膜電流の記録を示す。左はグルカゴンを含まないKRB溶液中での記録であり，右はグルカゴンを加えた溶液中での記録である。溶液中のグルカゴンの濃度は2×10⁻⁷Mである。下段は脱分極により誘発される膜容量変化の記録を示す。左はcontrolであり，右はグルカゴン存在下での記録である。

BのBはグルカゴンが存在しない場合と存在する場合の脱分極により誘発される膜容量変化の比較の為のグラフである。BのCは脱分極により誘発されるCa²⁺電流の最大値と脱分極中に流れるCa²⁺によって運ばれた電気量を示す。(Ding & Rorsman 未発表データ)

ので，β細胞内ではphosphorylase-kinaseの活性化はおこらず，glycogenの加燐酸分解は進行しない。ところが細胞外glucose濃度が上昇するとglucoseが細胞外から流入し，β細胞内のglucose濃度の上昇がATP合成反応を増加させ，細胞内ATPレベルの上昇が脱分極を引き起こし，活動電位の発生と共にCa²⁺が流入する。細胞内に流入したCa²⁺は活性化されたA-kinaseと共にphosphorylase-kinaseの燐酸化を促進し，燐酸化されたphosphorylase-kinaseがglycogen-phosphorylaseを活性化する。Glycogen-

phosphorylaseの活性化の結果，glycogenの分解が進み，細胞外から流入するglucoseに加えて細胞内glycogenの分解からもglucoseが供給されるので，細胞内glucose濃度は更に上昇し，ATP合成速度が上昇してglycogenの分解が停止するまで，細胞内ATP濃度は高いレベルに留まるというスキームを描くことが出来よう。

ATP合成速度の上昇は細胞内ATP濃度の高い状態をかなりの時間にわたって維持する。一方，活動電位の発生によってβ細胞から分泌されたGABAがα細胞の活動電位発生を抑制し，グル

カゴン分泌は停止する。その結果、同じ膵島内の細胞外液中のグルカゴン濃度は低下する。細胞外グルカゴン濃度の低下はβ細胞内の cyclic AMP 濃度の低下をきたし、一旦活性化された phosphorylase-kinase は不活性な状態に戻り、glycogen の分解は停止する。この時期になるとβ細胞に供給される glucose は細胞外から流れ込むもののみとなり、長く続いたスパイク発生は細胞内 ATP 濃度の低下に従って停止し、再分極が起こる。

以上をまとめると、glucose 濃度が低いときにα細胞から分泌されたグルカゴンによってβ細胞内の cyclic AMP が増加し、glycogen 分解の準備状態が完了している。細胞外 glucose 濃度が上昇すると、細胞内に流入する glucose が増加する結果、細胞内 ATP 濃度が上昇し、活動電位発生と共に Ca^{2+} が流入することによって glycogen の分解に関与する酵素系が一挙に活性化され glycogen の分解が進み、ATP 合成が亢進して細胞内 ATP 濃度の高い状態が暫く持続する。細胞外 glucose 濃度が高くなった初期において細胞内 ATP 濃度が比較的長時間にわたって高く維持される時期が電気活動の第1相の時期であり、この時期の大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が大量のインスリン分泌をもたらす。β細胞から活動電位発生と共に分泌された GABA によってα細胞の活動電位発生が抑制された後では、β細胞に利用される glucose は細胞外から流れ込むもののみとなり、glucose 供給に関しては定常状態となる。Glucose の供給が定常状態にまで低下する一方、連続するスパイク発生時の Ca^{2+} 流入に由来する ATP 消費の増大が ATP レベルの低下を引き起こし、活動電位発生の停止と再分極を来す。休止期における細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下と共にインスリン分泌は一旦低下する。インスリン分泌の初期相（第1相）はこのようにして形成される、と私たちは考える。しかしこの考えはまだ広く承認されるには至っていない。

ATP 合成系への glucose の供給増大は ATP 生成を促進し、その結果、細胞内 ATP 濃度が上昇する。インスリン前駆物質は粗面小胞体において作

られ、Golgi 装置を経て分泌顆粒の内容物となる過程において pro-insulin からインスリンとなり、分泌顆粒は細胞膜に向かって運ばれる。分泌顆粒の細胞内運搬にエネルギーを供給するものも ATP である。開口分泌の増加について考える際、細胞内 ATP 濃度の上昇が分泌顆粒の移動速度に与える影響も考慮に入れておかなければならない。

4. 1990 年台後期後半以降の進展

1990 年台の半ばまでにインスリン分泌は glucose の代謝を介する現象であり、代謝と電気的活動の接点となるものは K_{ATP} チャネルであるという概念は一般に広く受け入れられた。その時点において未だ解明されていなかった点は、glucose によって誘発されるインスリン分泌が2相性を呈することに関するものである。丁度その頃、神経伝達分子の放出に関与する蛋白分子の存在が次々と明らかにされた。それらの物質のうち最も注目を引いているものは SNARE(s) (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment protein receptor (s)) である。この物質とインスリンの放出との関係が次第に注目されるようになった。

インスリン分泌に関しては、次の4つのステップがある。

- (1) 細胞外から流入する glucose および細胞内備蓄から供給される glucose の経路
- (2) 解糖から ATP 合成に到る経路
- (3) K_{ATP} チャネルの closing から活動電位発生に到るまでの経路
- (4) 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇から分泌顆粒の開口分泌に到る経路

分泌に直接関与する蛋白分子は上記の(4)に関与するものである。電子顕微鏡的研究によると、各β細胞には10,000~13,000個の顆粒がある。そのうち約600個が細胞膜にdockしている(Olofssonら, 2002)。約1500個は細胞膜内側表面から0.2μm以下のところにある。L-type Ca^{2+} チャネルのまわりに分泌顆粒は集積している(Wiserら, 1999)。インスリンの2相性分泌に関連して、1997年 Eliasson らは非常に示唆に富む実験結果を報告している。彼らの報告によると、perforated

patch 膜電位固定法を用いる脱分極によって誘発される膜容量の変化を指標とする exocytosis は、細胞外 glucose 濃度を 0mM から 5mM に変えると約 5 倍増大し、更に glucose 濃度を 20mM に高めると、exocytosis は更に 2 倍増加する。この膜容量変化は mannoheptulose によって抑制され、また、細胞内 ATP を AMP-PCP (adenosine 5'-[β , γ methylene] triphosphate) で置換すると、脱分極により誘発される exocytosis は 80% 抑制される。細胞内に導入した caged ATP から ATP を放出させると、exocytosis は 2 相性に増大する。ATP 放出による exocytosis の潜時は 400msec である。Caged Ca^{2+} から Ca^{2+} を放出させても 2 相性の exocytosis 増大がおこる。 Ca^{2+} 放出による exocytosis の潜時は 200msec 以下であり (Barg ら (2001) の報告では約 10msec となっている)、細胞内 ATP を AMP-PCP で置換すると、exocytosis の第 2 相が消失する。興味深いことに、細胞内に N-ethylmaleimide (0.5mM) を 3 分間作用させると、細胞内 ATP を AMP-PCP で置換したのと同様に exocytosis を抑制するとのことである。彼らは膜容量の変化から開口分泌を起こした分泌顆粒の数を計算し、約 40 個の顆粒が直ちに開口分泌し得る状態にあると推定した。この第 1 相の exocytosis は ATP に依存しないものであろう。

Caged Ca^{2+} から放出される Ca^{2+} により誘発される exocytosis の第 1 相において開口する分泌顆粒は 40 個であるとする、直ちに開口し得る状態にある顆粒は形質膜に dock している顆粒のごく一部ということになる。この点に関してもっと直接的な所見が Ohara-Imaizumi ら (2004) によって報告されている。彼らは MIN6 β 細胞に green fluorescent protein のタグをつけたインスリンを含有する分泌顆粒を作らせ、TAT-conjugated Cy3-labeled 抗 syntaxin 抗体を細胞内に transduce し、更に TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) を用いることによって syntaxin 1 が形質膜上にクラスターとなって存在し、そこに分泌顆粒が dock していること、50 mM KCl によって細胞を脱分極させると、分泌顆粒と形質膜との融合が syntaxin クラスターの存

在場所でおこることを観察している。また彼らの報告によると、MIN6 β 細胞を methyl- β -cyclodextrin 処理するによって形質膜の cholesterol を減少させると、syntaxin 1 のクラスターは崩壊し、数も減少する。Syntaxin 1 のクラスターが崩壊すると、形質膜に dock している分泌顆粒は減少し、形質膜と融合する分泌顆粒の数は有意に減少しているとのことである。Glucose によって誘発される 2 相性インスリン分泌の第 1 相が既に形質膜に dock している顆粒の開口によるという考え方に異論 (Shibasaki ら, 2007) もある。

β 細胞の分泌顆粒の中にはインスリンの他に ATP, GABA, セロトニン, グルタミンがある。 β 細胞に purinergic 受容体である P_{2u} を発現させておくと、ATP 濃度依存性に内向き電流が流れるので、exocytosis が起こる条件下で測定された内向き電流を測定することによって、ATP の大きさ程度の低分子量の分泌顆粒内容物の放出量を推測することができる。0mV に脱分極することにより誘発される ATP 分泌量から推測される開口分泌速度は約 10 granules/sec である。一方、インスリン放出量から推測される開口分泌速度は 0.16 granules/sec にしか過ぎない。この差は非常に大きい。この値の比は脱分極により誘発される膜容量変化とインスリン放出量の比に非常に近い。この点に関して、形質膜に dock している分泌顆粒が開口分泌に到るまでに分泌顆粒と結合している syntaxin 内のポアが拡大し、ポア内径が拡大する間、低分子量分泌物質 (ATP, GABA 等) がインスリン分泌に先立って分泌され、分泌顆粒が形質膜と融合した段階で最終的にインスリンも分泌されるのではないかと考えられている。形質膜に syntaxin を介して dock している分泌顆粒の中にはインスリンを放出するに到らず低分子量物質のみを放出し、細胞質に引き戻されるものもあるであろう (Tsuboi & Rutter, 2003)。

注目すべきことは、 β 細胞にも GABA 受容体が存在することである。GABA_B 受容体の antagonist である CGP55845 は glucose により誘発されるインスリン放出を増加させる (Braun ら, 2004)。一

方, GABA_B受容体の agonist である baclofen は glucose により誘発されるインスリン放出を 60% 抑制するとのことである。β細胞から放出された GABA がβ細胞自体のインスリン放出を抑制しているとは考え難い。おそらく膵島内では δ細胞から分泌されているソマトスタチンがβ細胞上の GABA 受容体の感受性を制御しているであろう。

2000 年代に入り, β細胞内の分泌顆粒の動きの詳細が明らかになり, 細胞内 Ca²⁺濃度上昇による開口分泌が 2 相性を呈する機構は, かなりの程度, 解明されたが, 分泌顆粒の docking の Ca²⁺感受性の機構, あるいは syntaxin 内のポアの開口の機構, 分泌顆粒の細胞内輸送の ATP 感受性といった問題は未だ十分に解明されていない。また, 以上紹介した研究成果は 1 個の細胞における開口分泌の過程を説明するものではあるが, これらの所見は必ずしも膵島内 β細胞の特異的な電気活動および細胞内 Ca²⁺濃度の 2 相性上昇とは直接的には結びつかない。細胞外 glucose 濃度上昇によって引き起こされる 2 相性のインスリン分泌を理解するには 1 個の細胞内でおこる分泌顆粒の動きを調べる視点とは異なる視点も必要であろう。

最後に

インスリンの分泌に関する研究は, 膵臓全体の灌流実験から始まり, 膵島の灌流および膵島内細胞の電氣的活動および細胞内 Ca²⁺濃度の測定から単離された β細胞についての研究に移り, さらに単一 β細胞内の分泌顆粒の動き, 形質膜との融合の研究へとどんどん微細なものに対象は移っていった。この研究の進展の過程で明らかになったものは多い。しかし対象が微細化しても全体を見る眼を失ってはならない。

この研究の歴史から感じられることは, 新しいアイデアは新しい技術の上にも生まれるということ

である。研究者は常に新しい技術を獲得するように努めると共に, 研究者自身が新しい技術を自ら開発することが大切である。それを可能とする環境が整備されていることが望ましい。研究環境の整備, それは経済効果から判断されるものではない。分からない点があればこれを解明する。1つの問題を解決しても必ず次の疑問が浮かび上がってくる。分からないことを解明し続けているところに人間の輝きがあり, 人間の輝きが社会を若々しく保つてであろう。これこそ学問の効用といえるものかもしれない。

文 献

1. Braun M, Wendt A, Buschard K, Salehi A, Sewing S, Gromada J & Rorsman P: GABA_B receptor activation inhibits exocytosis in rat pancreatic beta-cells by G-protein-dependent activation of calcineurin. *J Physiol* **559** (Pt 2): 397-409, 2004
2. Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P & Rorsman P: Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca²⁺ induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* **503** (Pt 2): 399-412, 1997
3. Eliasson L, Abdulkader F, Braun B, Galvanovskis J, Hoppa MB & Rorsman P: Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* **586**: 3313-3324, 2008
4. Gilon P, Ravier MA, Jonas J-C & Henquin J-C: Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* **51**: S114-S151, 2002
5. Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Kumakura K, Nakamichi Y & Nagamatsu S: Site docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 β cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biol Chem* **279**: 8403-8408, 2004
6. Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, Sunaga Y, Matsu-mura K, Yamanaka M, Zhang C, Tamamoto A, Satoh T, Miyazaki HI & Seino S: Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19333-19338, 2007