

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591049

研究課題名（和文）切断型コレクトリンを用いた膵ホルモン分泌能評価のための  
新たなバイオマーカーの確立研究課題名（英文）Generation of novel biomarker for pancreatic hormone secretion using  
shedding form of collectrin

研究代表者

山縣 和也（YAMAGATA KAZUYA）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：70324770

研究成果の概要：

研究代表者は転写因子であるHNF-1 遺伝子異常によりインスリン分泌不全型糖尿病が発症すること、コレクトリンがHNF-1 の標的遺伝子であり、インスリン分泌促進作用を有していることを見出した（Nature 1996, Cell Metabolism 2005）。本研究の結果、コレクトリンは膜貫通領域の近傍で切断されてそのN末が細胞外へ放出されることが判明した。分泌型コレクトリンの抗体がインスリン分泌のマーカーになりえるものと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	105,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は転写因子である HNF-1 、HNF-1 、HNF-4 の遺伝子異常によりインスリン分泌不全を伴う糖尿病が発症することを明らかにし（Nature 1996a, 1996b, Nature Genetics 1997）、HNF が膵細胞におけるインスリン分泌に必須な分子であることを見出した。ついで研究代表者は ACE2 に相同性

を有する機能未知の腎集合管特異的膜結合タンパク質として報告されていたコレクトリンが膵細胞における HNF-1 の新規標的遺伝子であることを明らかにした（Cell Metabolism 2005）。機能解析の結果、コレクトリンはインスリン開口放出に重要な SNARE complex の形成を促進させることで、インスリンの分泌を増加する作用を有していることが判明した。また、種々の病態マウ

スの検討を行ったところ、高インスリン血症を示すマウスにおいてはコレクトリンの発現量は増加していることが判明した。

## 2. 研究の目的

コレクトリンはインスリン分泌促進作用を有することから、コレクトリンが細胞から分泌されていれば、コレクトリンの血中濃度測定系を構築することでインスリン分泌を評価しうる新たなバイオマーカーとなりうる可能性が考えられた。そこで膜結合タンパク質であるコレクトリンが細胞内で切断され、細胞外への放出が実際におきているのかを検討し、放出がおきている場合にはコレクトリンの特異的抗体を用いた血中濃度測定系を構築することを本研究の目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

コレクトリンはN末にシグナルペプチド配列を持ち、中央部に膜貫通領域を有する。シグナルペプチド配列の直下にmycタグ配列を導入した発現プラスミド (pcDNA3.1-myc-collectrin) を作成し、MIN6細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 36 時間後から無血清培地に交換し、24 時間培養後に上清を回収した。回収した上清を TCA 処理し、遠心後の沈殿物をウエスタンブロットに用いた。

切断部位を同定するために MIN6 細胞のライセートの 2 次元電気泳動を行い、コレクトリンの C 末を認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。電気泳動後、シプロルビー染色を行い、ウエスタンブロットでシグナルの認められたスポットの回収を行った。

## 4. 研究成果

### (1) コレクトリン切断に関する検討

コレクトリン発現プラスミドを MIN6 細胞に遺伝子導入後、培養上清を回収し、ウエスタンブロットを行った (図 1)。

図 1 に示すように、myc 抗体を用いた場合、MIN6 細胞のライセートでは全長のコレクトリンより小さいサイズのバンドが検出された (レーン 3)。培養上清を回収したサンプルでは、このようなバンドは検出されなかったが (レーン 2)、60 倍に濃縮した培養上清中には切断されたコレクトリンと考えられる短いサイズのバンドが検出された (レーン 1)。一方、培養上清中には全長サイズのコレクトリンは検出されなかった。このよう

なバンドは MIN6 細胞に導入したときのみ認

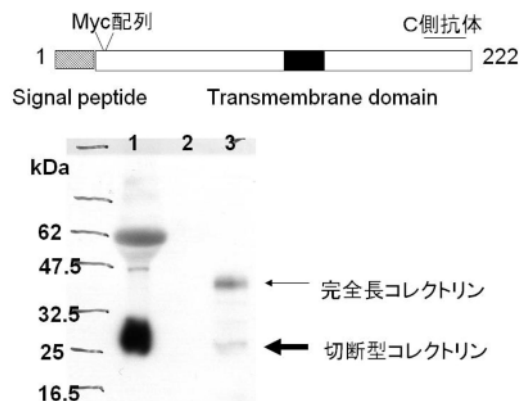


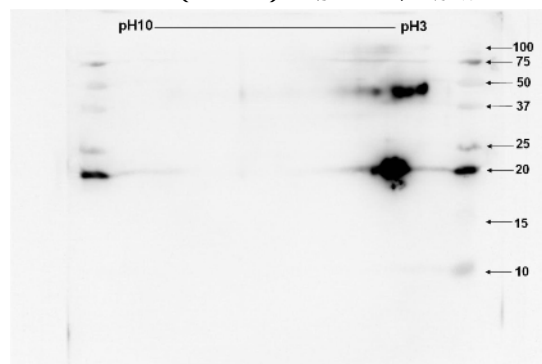
図 1. Lane 1. 培養上清、濃縮 (+)、Lane 2. 培養上清、濃縮 (-)、Lane 3. MIN6 細胞ライセート、いずれも N 側の myc 抗体でプロットしたもの。

められ、コレクトリンがインスリン細胞特異的に切断され、N 端が放出されている可能性が示された。

### (2) コレクトリン切断部位の検索

コレクトリンの切断部位を決定するために 2 次元電気泳動後、ウエスタンブロットを行った。

その結果、図 2 に示すように全長のコレクトリンのバンド (45kDa) に加えて、切断型コ



レクトリンのシグナルが検出された (20kDa)。現在、バンドを切りだし、タンパク質の同定を試みている。

本研究の結果、HNF-1 標的遺伝子であるコレクトリンは N 末が切断され、細胞外に放出されることが判明した。切断部位の同定、放出されるコレクトリンを認識する抗体を作成し、インスリン分泌のバイオマーカーとして利用することが可能か、さらに検討していく。現在、コレクトリンの膜結合ドメインより N 側部分を GST と融合させた発現ベクターを作成しており、融合タンパク質をウサギに免疫することで抗体の作成を行っていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計16件）すべて査読有

Yasuhara A, Yamagata K ( 1 2 番中 1 0 番目 ), Makino H: Collectrin is involved in the development of salt-sensitive hypertension by facilitating the membrane trafficking of apical membrane proteins via interaction with soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex. *Circulation* 118: 2146-2155, 2008

Enya M, Yamagata K ( 1 4 番中 9 番目 ), Takeda J: Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. *Hum Mutat.* 29: E271-277, 2008

Yasuda K, Yamagata K ( 4 7 番中 1 1 番目 ), Kasuga M: Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 40: 1092-1097, 2008

Tokunaga A, Horikawa Y, Fukuda-Akita E, Okita K, Iwahashi H, Shimomura I, Takeda J, Yamagata K: A common P2 promoter polymorphism of the hepatocyte nuclear factor-4a gene is associated with insulin secretion in non-obese Japanese with type 2 diabetes. *Endocr J.* 55: 999-1004, 2008

Tamba S, Yamagata K ( 1 4 番中 1 1 番目 ), Matsuzawa Y: Relationship between the serum uric acid level, visceral fat accumulation and serum adiponectin concentration in Japanese men. *Intern Med.* 47:1175-1180, 2008

Okauchi Y, Iwahashi H, Okita K, Yuan M, Matsuda M, Tanaka T, Miyagawa J, Funahashi T, Horikawa Y, Shimomura I, Yamagata K: PGC-1 $\alpha$  Gly482Ser polymorphism is associated with the plasma adiponectin level in type 2 diabetic men. *Endocr J.* 55: 991-997, 2008

Horikawa Y, Yamagata K ( 1 8 番中 6 番目 ), Kasuga M: Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 889-893, 2008

Tokunaga A, Miura A, Okauchi Y, Segawa K, Fukuhara A, Okita K, Takahashi M, Funahashi T, Miyagawa JI, Shimomura I, Yamagata K: The -1535 promoter variant of the visfatin gene is associated with serum

triglyceride and HDL-cholesterol levels in Japanese subjects. *Endocr J.* 55: 205-212, 2008

Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, Yamagata K, Sakashita N, Takeya M: Immunochemical detection of N<sup>ε</sup>-carboxyethyl lysine using a specific antibody. *J Immunol Methods* 332: 112-120, 2008

Miyake K, Yamagata K ( 2 3 番中 8 番目 ), Kasuga M: Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J Hum Genet.* 53: 174-180, 2008

Nammo T, Yamagata K, Tanaka T, Kodama T, Sladek FM, Fukui K, Katsube F, Sato Y, Miyagawa J, Shimomura I: Expression of HNF-4 (MODY1), HNF-1 (MODY5), and HNF-1 (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas. *Gene Expr Patterns.* 8: 96-106, 2008

Fukuda-Akita E, Okita K, Okauchi Y, Ryo M, Nakamura T, Funahashi T, Iwahashi H, Shimomura I, Miyagawa J, Yamagata K: Impaired early insulin secretion in Japanese type 2 diabetes with metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 79: 482-489, 2008

Yamagata K, Nammo T, Sato Y, Saisho K, Shoda H, Fukui K: The HNF-1 $\alpha$ -SNARE connection. *Diabetes Obes Metab. Suppl* 2: 40-45, 2007

Zhang J, Tokui Y, Yamagata K ( 1 3 番中 3 番目 ): Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia* 50: 1900-1909, 2007

Okauchi Y, Yamagata K ( 1 2 番中 9 番目 ), Matsuzawa Y: Reduction of visceral fat is associated with decrease in the number of metabolic risk factors in Japanese men. *Diabetes Care.* 30: 2392-2394, 2007

Zhang Y, Wada J, Yamagata K ( 1 5 番中 8 番目 ), Makino H: The Role for HNF-1b-targeted collectrin in maintenance of primary cilia and cell polarity in collecting duct cells. *PLoS ONE.* 2: e414, 2007.

〔学会発表〕（計7件）

山縣和也

レクチャー「糖尿病と遺伝子」MODY  
第43回糖尿病学の進歩  
2009.2.20-21,松本

山縣和也

核内受容体 HNF4 による膵 細胞制御機構  
BMB2008(第31回日本分子生物学会・第81回  
日本生化学会大会)  
2008.12.9-12.12,神戸

山縣和也

シンポジウム3：糖尿病発症機序研究の進展  
「2型糖尿病の遺伝因子とインスリン分泌  
不全」  
第46回日本糖尿病学会九州地方会  
2008.10.10-11,久留米

山縣和也

HNF 転写因子と膵 細胞  
第51回日本糖尿病学会年次学術集会  
2008.5.22,東京

山縣和也

転写因子異常によるインスリン合成分泌障  
害  
第42回糖尿病学の進歩  
2008.2.15-16,高松

山縣和也

リリー賞受賞講演：膵 細胞転写因子による  
インスリン分泌制御とその破綻  
第50回日本糖尿病学会年次学術集会  
2007.5.24-26,仙台

山縣和也、堅田温子、佐藤叔史、福井健司  
シンポジウム18「転写因子と糖尿病」2型  
糖尿病の膵 細胞障害における転写因子の  
関与  
第50回日本糖尿病学会年次学術集会  
2007.5.24-26,仙台

〔図書〕（計1件）

山縣和也

日本臨床 新時代の糖尿病学(4) コレクト  
リン  
p673-677, 2008

〔その他〕

ホームページ

[http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep  
t/biochem2/biochem2.html](http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep<br/>t/biochem2/biochem2.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山縣 和也 (YAMAGATA KAZUYA)  
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：70324770

(2)研究分担者

(3)連携研究者

沖田 考平 (OKITA KOHEI) (平成19年度  
は研究分担者)  
大阪大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10403180