

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 22日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390281

研究課題名（和文）膵β細胞発現転写因子を基盤とした2型糖尿病発症分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of type 2 diabetes based on pancreatic β-cell enriched transcription factors

研究代表者

山縣 和也（YAMAGATA KAZUYA）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70324770

研究成果の概要（和文）：

Hepatocyte nuclear factor (HNF)4αの遺伝子異常により、膵β細胞からのインスリン分泌が障害され、糖尿病を発症するが、その分子機構は不明である。本研究の結果、Anks4bが膵β細胞におけるHNF4α標的遺伝子であることが判明した。Anks4bは膵β細胞のERストレス感受性を制御していることも判明し、HNF4αによるERストレス制御機構の存在が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Mutation in the gene encoding hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) cause impaired insulin secretion and type 2 diabetes, but the molecular mechanism is unknown. In the present work, I found that Anks4b is a novel target gene of HNF4α in β-cells. Furthermore, I also identified that Anks4b regulates the sensitivity of ER stress in β-cells. This study revealed that HNF4α regulates ER stress in β-cells through Anks4b expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医学

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、インスリン、遺伝子、転写因子、hepatocyte nuclear factor、β細胞

## 1. 研究開始当初の背景

HNF4αは膵β細胞や肝臓に発現する核内受容体型転写因子であり、その遺伝子異常により maturity-onset diabetes of the young (MODY) とよばれるインスリン分泌不全型の糖尿病が発症する (Yamagata K. Nature 1996, Yang Q. Diabetologia 2000, Nammo T. Gene Expr Patterns 2008)。

HNF4αの肝臓における標的遺伝子として糖新生酵素である PEPCK などが同定されて

いるが、これらの遺伝子は膵βにおける標的遺伝子ではない。当初、培養細胞を用いた実験から、HNF4αは膵β細胞において、インスリンや HNF1α、ピルビン酸キナーゼの遺伝子発現を制御している可能性が示されたが、研究代表者らの HNF4αノックアウトマウスを用いた検討から、これらの遺伝子は HNF4αの標的遺伝子でないことも判明した (Miura A. JBC 2005)。

したがって膵β細胞における HNF4αの標的遺伝子については全く不明であり、

HNF4 $\alpha$ がどのようにインスリン分泌機構を制御しているかについては明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

膵 $\beta$ 細胞における HNF4 $\alpha$ の標的遺伝子を同定し、その機能を解明することで、膵 $\beta$ 細胞における HNF4 $\alpha$ の働きを理解する。

## 3. 研究の方法

### (1) HNF4 $\alpha$ 標的遺伝子の網羅的探索

膵 $\beta$ 細胞特異的 HNF4 $\alpha$ ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの膵島発現遺伝子について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討し、発現量に差があるものを同定する。得られた遺伝子のプロモーター領域について検索し、HNF4 $\alpha$ 結合配列を有する遺伝子を同定する。同様の HNF4 $\alpha$ 結合配列がヒトの遺伝子にも存在するか検討する。

### (2) HNF4 $\alpha$ による遺伝子制御機構の検討

候補標的遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、リポーター解析を行う。プロモーター領域における HNF4 $\alpha$ の結合をクロマチン免疫沈降法を用いて検討する。

### (3) 結合蛋白質の検索

GST pull-down 法により、HNF4 $\alpha$ 標的分子に結合する蛋白質を LC-MS/MS を用いた質量分析により同定する。両者の結合を免疫沈降法により確認する。

### (4) HNF4 $\alpha$ 標的遺伝子の機能解析

HNF4 $\alpha$ 標的遺伝子の過剰発現 MIN6 細胞、HNF4 $\alpha$ 標的遺伝子のノックダウン MIN6 細胞をレトロウイルスを用いて作製し、その機能を検討する。

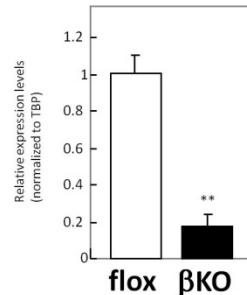
## 4. 研究成果

### (1) HNF4 $\alpha$ 標的遺伝子の網羅的探索

膵 $\beta$ 細胞特異的 HNF4 $\alpha$ ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの膵島発現遺伝子について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討したところ、ノックアウトマウス膵島において、100 遺伝子の発現が減少していることが判明した。データベースのサーチにより、その内 2 遺伝子においてプロモーター領域における HNF4 $\alpha$ 結合配列を見出した。さらに 2 遺伝子の内、3 遺伝子 (Anks4b, Gucy2c, Pgc1a) については該当するヒト遺伝子においても HNF4 $\alpha$ 結合配列が存在していた。

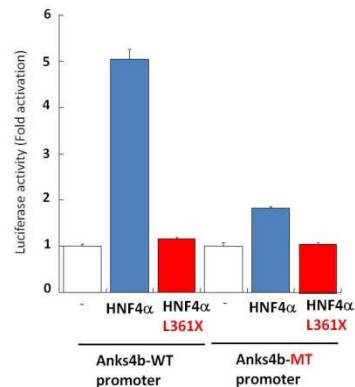
別のノックアウトマウスを用いてこれら 3 遺伝子の発現を再検討したところ、膵 $\beta$ 細

胞特異的 HNF4 $\alpha$ ノックアウトマウス膵島において、Anks4b および Gucy2c の遺伝子発現低下が確認された (図)。また、HNF4 $\alpha$ のノックダウン MIN6 細胞においても Anks4b の遺伝子発現低下を認めたため、Anks4b は HNF4 $\alpha$ の直接の標的遺伝子であると予想された。



### (2) HNF4 $\alpha$ による遺伝子制御機構の検討

Anks4b 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、リポーター解析を行った。HNF4 $\alpha$ の過剰発現でルシフェラーゼ活性の増加、HNF4 $\alpha$  の dominant negative 変異体の過剰発現ではルシフェラーゼ活性の低下を認めた (図)。HNF4 $\alpha$ 結合配列に変異を導入したリポーターでは活性に変化は認められなかった。



HNF4 $\alpha$ の Anks4b プロモーター領域への結合をクロマチン免疫沈降法で確認した。以上の結果から、Anks4b 遺伝子発現は HNF4 $\alpha$ により制御されていることが判明した。

### (3) 結合蛋白質の検索

Anks4b は遺伝性の難聴をきたす疾患である Usher 症候群原因遺伝子である harmonin に結合する蛋白質としてクローニングされたものである。Anks4b は N 側に Ankyrin リピートドメイン、また、C 側に SAM ドメインを有しているが (図)、その機能は全く不明である。



そこで Anks4b に結合する蛋白質を GST pull-down と質量分析により検索した。その結果、ER ストレスを制御する分子シャペロンである GRP78 が同定された。Anks4b と GRP78 の結合は免疫沈降法でも確認され、GRP78 は Anks4b の結合蛋白質であることが判明した。

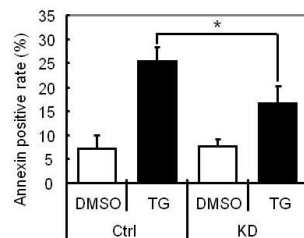
培養細胞に Anks4b と GRP78 の発現ベクターを遺伝子導入し、局在を検討したところ、両者は ER の近傍で共局在することが判明した。

#### (4) HNF4 $\alpha$ 標的遺伝子の機能解析

Anks4b 過剰発現 MIN6 細胞を作製し、thapsigargin (TG) 誘導性の ER ストレス、アポトーシスについて検討を行った。TG 非添加の状況では、Anks4b 過剰発現細胞は MIN6 細胞と差を認めなかった。しかし、TG を添加した際には、Anks4b 過剰発現 MIN6 細胞で ATF4 遺伝子発現増加、CHOP 遺伝子発現増加、アネキシン V 陽性アポトーシス細胞の増加を認めた。

一方、Anks4b ノックダウン MIN6 細胞においては、TG 誘導性の CHOP 遺伝子発現低下、アネキシン陽性アポトーシス細胞の現象を認めた (図)。

ノックダウンによるアポトーシスの変化



以上の結果より、Anks4b は膵  $\beta$  細胞における ER ストレス依存性アポトーシスの感受性を制御していることが明らかとなった。

本研究の結果、HNF4 $\alpha$ は Anks4b 遺伝子発現を制御することで膵  $\beta$  細胞における ER ストレス制御に関与していることが考えられた。

#### 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 9 件) 全て査読有り

①Sato Y, Hatta M, Karim Fazlul, Sawa T, Wei F-W, Sato S, Magnuson MA, Gonzalez FJ, Tomizawa K, Akaike T, Yoshizawa T, Yamagata K: Anks4b, a novel target of HNF4 $\alpha$  interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum

stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells.

**J Biol. Chem.** (in press)

②Iwahashi H, Akita E, Tokunaga A, Okita K, Horikawa Y, Imagawa A, Funahashi T, Shimomura I, Yamagata K: Clinical features of Japanese type 2 diabetics with insulinogenic index in normal range after treatment of glucotoxicity.

**Diabetol Int 2**: 208-213, 2011.

③Wei F-Y, Suzuki T, Watanabe S, Kimura S, Kaitsuka T, Fujimura A, Matsui H, Atta M, Michiue H, Fontecave M, Yamagata K, Suzuki T, Tomizawa K: Deficit of Lys-tRNA Modification by Cdkal1 Causes the Development of Type 2 Diabetes in Mice.

**J. Clin. Invest.** 121: 3598-3608, 2011

④Yamagata K, Senokuchi T, Lu M, Takemoto M, Karim MF, Go C, Sato Y, Hatta M, Yoshizawa T, Araki E, Miyazaki J, Song W-J: Voltage-gated K<sup>+</sup> channel KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6  $\beta$ -cell line.

**Biochem Biophys Res Commun.** 407: 620-625, 2011

⑤Sato Y, Endo H, Okuyama H, Takeda T, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Shimomura I, Inoue M: Cellular hypoxia of pancreatic  $\beta$ -cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro.

**J Biol. Chem.** 286: 12524-12532, 2011

⑥Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K, Oike Y: Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1 null mice.

**J Biol Chem.** 286: 3992-4002, 2011

⑦Higuchi Y, Shiraki N, Yamane K, Qin Z, Mochitate K, Araki K, Senokuchi T, Yamagata K, Hara M, Kume K, Kume S: Synthesized basement membranes direct the differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic lineages.

**J Cell Sci.** 123: 2733-2742, 2010

⑧Kozawa J, Okita K, Imagawa A, Iwahashi H, Holst JJ, Yamagata K, Shimomura I: Similar incretin secretion in obese and non-obese Japanese subjects with type 2 diabetes.

**Biochem Biophys Res Commun.** 393: 410-413, 2010

⑨Saisho K, Fukuhara A, Yasuda T, Sato Y, Fukui K, Iwahashi H, Imagawa A, Hatta M, Shimomura I, Yamagata K: Glucose enhances collectrin protein expression in insulin-producing MIN6  $\beta$  cells.

**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 389:

133-137, 2009

[学会発表] (計9件)

- ①Yoshifumi Sato, Mitsutoki Hatta, Md. Fazlul Karim, Tatsuya Yoshizawa, Kazuya Yamagata. Analysis of a novel HNF4 $\alpha$  target gene Anks4b in pancreatic  $\beta$ -cells. 第34回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 (横浜) 2011.12.13
- ②山縣和也: シンポジウム1 「酸素センサーとシグナル応答」 膵 $\beta$ 細胞における低酸素ストレス 第17回MPO研究会 アークホテル熊本 (熊本) 2011.10.28
- ③山縣和也: 2型糖尿病疾患感受性遺伝子KCNQ1によるインスリン分泌 第49回日本糖尿病学会九州地方会 アクロス福岡 (博多) 2011.10.14
- ④山縣和也: 核小体因子 SIRT7による糖脂質代謝制御 第32回日本肥満学会 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫) 2011.9.24
- ⑤山縣和也: 膵 $\beta$ 細胞と低酸素ストレス 第5回 Diabetes Leading-edge Conference ロイヤルオークホテル (滋賀) 2011.8.7
- ⑥瀬ノ口隆文、郷 知佐、吉澤達也、宮田敏士、Eva Bober、尾池雄一、荒木栄一、山縣和也: NAD依存性脱アセチル化酵素 SIRT7の糖代謝への関与の検討 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 ロイトン札幌 (北海道) 2011.5.21
- ⑦佐藤叔史、今川彰久、山縣和也、下村伊一郎、井上正宏: HIF-1 $\alpha$ による酸素消費の抑制は膵 $\beta$ 細胞の細胞内低酸素を回避する 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 ロイトン札幌 (北海道) 2011.5.21
- ⑧八田光世、Md. Fazlul Karim、佐藤叔史、瀬ノ口隆文、山縣和也: 膵 $\beta$ 細胞における新規 HNF-4 $\alpha$ 標的遺伝子 Anks4bの機能解析 BMB2010 (第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会) 神戸ポートピアホテル (兵庫) 2010.12.7
- ⑨ Kazuya Yamagata: Regulation of insulin secretion by HNF-4 transcription factor BMB2010 (第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会) 神戸ポートピアホテル (兵庫) 2010.12.7

[図書] (計1件)

山縣和也他 メディカルレビュー社、糖尿病ナビゲーター、2010、pp36-37

[その他]

ホームページ等

[http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep\\_t/biochem2/biochem2.html](http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep_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・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 70324770

### (2) 研究分担者

瀬ノ口 隆文 (Senokuchi Takafumi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 00530320

(平成21年度～22年度)

八田 光世 (Hatta Mitsutoki)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 30344518

(平成21年度～22年度)