

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590982

研究課題名（和文）グルコース応答性 MafA キナーゼの制御系から β 細胞の血糖感知システムの理解へ研究課題名（英文）Toward understanding the glucose-sensing system of β -cells from analysis of glucose-responsive MafA kinase.

研究代表者

片岡 浩介（KATAOKA KOHSUKE）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：20262074

研究成果の概要（和文）：血糖値維持に必須な膵 β 細胞の機能を支える転写因子 MafA を、GSK3 に加えて MaCK がリン酸化することが MafA の機能発揮（DNA 結合と Beta2 との会合）に必須であることを明らかにした。また、糖尿病による β 細胞の機能破綻には、原因不明の MafA リン酸化低下が主たる原因である可能性を突き止め、リン酸化を模倣する小分子化合物も 1 種同定した。リン酸化低下の原因解明により、 β 細胞の血糖感知系を含めた機能維持と、糖尿病時の機能破綻の分子機構の解明に近づくことができるだろう。

研究成果の概要（英文）：We have found that multiple phosphorylation events on MafA transcription factor by GSK3 and MaCK are required for its function in β -cells through enhancing DNA-binding and Beta2 association. Furthermore, We demonstrated that decreased MafA phosphorylation is one of the main causes of β -cell dysfunction in type II diabetes. We also identified a small molecule inhibitor that mimics endogenous MafA de-phosphorylation in β -cells. These findings led to understanding of molecular mechanisms of β -cell function and dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：エネルギー・糖質代謝異常・細胞内シグナル伝達・遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

膵島 β 細胞は、血糖値を維持するためにきわめて特化した細胞であり、血糖値を低下させることのできる唯一のホルモンであるインスリンを産生・分泌する。また膵島 β 細胞は、他の細胞とは異なる独特のグルコース感知とシグナル伝達系を備えている。インスリンの発現・産生・分泌と、グルコースの感受

システム・シグナル伝達システムは、 β 細胞の機能発揮に必須であり、この系の破綻は β 細胞のグルコース感受性の低下およびインスリン分泌の低下を招き、ひいては糖尿病（2型）につながる。しかしながら、2型糖尿病の発症・増悪の過程で、この系がどのような分子機構で破綻するのかは全く明らかになっていなかった。特に、グルコースの感

受システムおよびシグナル伝達システムがどのような生体分子から構成されているかについてすらほとんど分かっていなかった。

われわれを含む内外の研究グループは、これらのβ細胞特異的な一連の機能は、β細胞に特異的な遺伝子発現制御システムによって支えられており、その中核を担っているのはPdx1, Beta2, MafAの3つの転写制御因子であることをこれまでに明らかにしてきた。例えば、これらの3つの転写因子が同時に存在するときのみ、インスリン遺伝子のプロモーターは効率よく活性化されることをわれわれは示した。また、これらの3つの転写因子を膵外分泌細胞に導入すると、効率よくβ細胞へと分化転換（リプログラミング）できることも示されており（ただしBeta2は構造的に類似したNeurogenin3と置換が可能である）、実用的な遺伝子治療・細胞治療の開発のツールとしても用いられているのである。

これらの重要な転写因子群のうち、特にわれわれは、β細胞の成熟過程と機能維持に必須な転写因子としてMafAを同定してきた経緯から、MafAの機能制御機構に注目してこれまで詳細に解析を行ってきた。本研究の開始当初までに、MafAのN末端領域のLys32がSUMO化修飾を受けて、転写活性化能が抑制されることを見出してきた。また、タンパク質の安定性がMafAの複数部位のリン酸化によって制御されていることを明らかにし、そのリン酸化部位を同定し、当該のリン酸化を担っている責任キナーゼGSK3を発見することに成功してきた。

2. 研究の目的

これまでの一連の解析を通じて明らかになってきたことは、MafAの活性が、β細胞のグルコース感知システムおよびシグナル伝達システムによって制御されているという事実である。そこで、MafAタンパク質の活性の制御の分子機構を解明することによって、これまで未知であったグルコース感知システムとシグナル伝達システムの分子実体を明らかにすることができるだろうと考えた。このことは、膵島β細胞の特殊性を理解することにつながり、ひいては糖尿病の新しい予防法や治療法の確立に寄与できるだろう。

そこで本研究では、申請者が同定したβ細胞の機能を司る転写制御因子MafAの翻訳後制御機構、特にリン酸化に注目し、それがどのような仕組みで制御されているのか、どのようなシグナル伝達系を介しているのか、などを解明することによって、β細胞の血糖感知系・シグナル伝達系を明らかにし、糖尿病における破綻の分子機構を解明することを

目指した。

3. 研究の方法

まず、MafAの翻訳後修飾としてリン酸化に注目した。リン酸化部位が複数あることがすでにわかっていたので、リン酸化される可能性が高いセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した変異体を多数作製し、膵島β細胞由来の細胞株（インスリノーマ）に導入し、Western blotによって移動度を判定することによって同定した。

また、リン酸化部位周辺のアミノ酸配列から、リン酸化を担う責任キナーゼ候補を選び、実際にMafAをin vitroおよびin vivoでリン酸化できるかを検証し、特異的阻害剤やRNAiによってMafAのリン酸化が低下するかどうかを調べた。

その上で、同定した候補キナーゼの活性が調節される仕組みを、培養β細胞株（インスリノーマ由来）を用いて、あるいは試験管内の生化学的な各種アッセイなどを用いて明らかにすることを試みた。

一方で、リン酸化によるMafAタンパク質の機能変換の仕組みを探るため、培養β細胞におけるタンパク質の安定性や、Pdx1, Beta2などの転写因子との相互作用、DNA結合能などを調べた。

4. 研究成果

インスリノーマ細胞株において、MafAを含む核内のDNA結合性の複合体を調べることによって、MafAが、これまでに知られていたβ細胞の機能に必須な転写因子Pdx1, Beta2だけではなく、発現がユビキタスでストレス応答などと関連の深い転写因子ATF2と複合体を形成することを明らかにした。この複合体形成には、MafAとATF2の双方のbasic-leucine zipper (bZip) 領域が必要であることを免疫沈降法やGST pull-down法によって示したが、MafAのリン酸化は無関係であった。さらに詳細な相互作用モードを免疫沈降実験などによって調べたところ、ATF2は予想外にも、Pdx1やBeta2とも直接に相互作用することも判明した。

そして、膵島β細胞株におけるクロマチン免疫沈降実験（ChIP assay）や、RNAiを利用した発現阻害実験などにより、ATF2は、MafA, Pdx1, Beta2などのこれまでに知られていたβ細胞特異的な転写因子群とともに、インスリン遺伝子のプロモーター上に結合することを示し、そしてインスリン遺伝子の発現を活性化する上で必須の因子であることを明らかにした。

また、MafAのN末端付近の5カ所（Ser49, Thr53, Thr57, Ser61, Ser65）のリン酸化部位のうち、Ser49, Thr53, Thr57, Ser61の4

カ所をリン酸化するキナーゼとして GSK3 を同定していたが、さらに C 末端付近のリン酸化部位 Ser342 をリン酸化する候補キナーゼとして MaCK (仮称) を同定した。GSK3 がリン酸化する前提条件として必須な Ser65 のリン酸化を担っているキナーゼはまだ同定できておらず、現在も候補を絞って探索を続けている。

MaCK に関しては、まず MafA と直接相互作用することを免疫沈降実験により証明した。この相互作用は、MafA のリン酸化状態や SUMO 化修飾には影響されないこともわかった。さらに、MaCK のキナーゼ活性を喪失させた点変異体も MafA と結合できたことから、MaCK のリン酸化活性も MafA との結合には必要がないことが明らかになった。MaCK の欠失変異体をいくつか作製し、それらと MafA との結合性を調べたところ、MaCK はその C 末端領域 (これまでに明確な機能が分かっていない) を介して MafA タンパク質と会合することも判明した。また、MaCK と複合体を形成することが知られているクロマチン・リモデリング因子についても MafA との会合の可能性を調べたところ、少なくとも強制発現系では、お互いに免疫共沈降することが判明した。従って、MafA は MaCK (キナーゼ) とともにクロマチン・リモデリング因子とも複合体を形成して、インスリンなどの β 細胞特異的遺伝子の発現を制御している可能性が示唆されたので、この点をさらに詳細に追究しているところである。

また、意外なことに、MaCK は Pdx1 および Beta2 をもリン酸化することが可能なことが分かった。したがって、MaCK は MafA, Pdx1, Beta2 を含む転写複合体の活性を統制的に制御することのできるキナーゼとして重要な役割を担っている可能性が示唆され、このことは、やはり MaCK や MafA を含む複合体の重要性を示しているだろう。

一方で、N 末端の GSK3 によるリン酸化部位は、MafA タンパク質の分解に必須であることをわれわれはこれまでに明らかにしておき、また、その分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 や Lactacystin, Epoxomicin などによって阻害されることから、ユビキチン・プロテアソーム経路に依存することも示していたが、その分解経路の詳細は未知であった。われわれは、リン酸化された MafA を分解に導くタンパク質として、PA28 γ を同定した。PA28 γ は、6 量体を形成して 20S プロテアソームに結合し、いくつかの種類のタンパク質の分解を促進することが知られている。PA28 γ を臍島 β 細胞株で RNAi 法によってノックダウンすると、MafA タンパク質が安定化して蓄積することがわかった。

さらにわれわれは、免疫沈降実験や in

vitro の pull-down 結合実験などによって、PA28 γ がリン酸化された MafA タンパク質を特異的に認識するという新しい分子間の認識機構を発見した。類似のタンパク質ファミリーであるが細胞質で機能することが知られている PA28 α と PA28 β は、MafA の分解促進には無関係であった。さらに、PA28 γ は、リン酸化された分子種の MafA タンパク質の分解を特異的に促進することも明らかにした。ただし、この分解促進にユビキチン系が必要とされるかについては、明快な答えが得られていないのが現状である。その一方で驚いたことに、6 量体形成能、20S プロテアソームとの結合能、プロテアソームの持つ各種のプロテアーゼ活性の活性化能などのさまざまな機能の特異的に欠損するような一連の PA28 γ の変異体を用いることによって、PA28 γ がリン酸化型 MafA の分解を促進する分子機構は、これまでに知られていた p21Cip1 などの分解を促進する機構とは異なることを証明した。

また、MafA がリン酸化されることの意義をさらに深く理解することを目指して、臍 β 細胞株における MafA の DNA 結合能を、各種のリン酸化部位の変異体を用いて調べたところ、N 末端側の 5 カ所がリン酸化されることが、DNA との結合に必須であることが、ゲル・シフト法や DNA pull-down 法などによってわかった。このことは、 β 細胞を GSK3 阻害剤で処理して MafA のリン酸化を低下させたときにもその結合能が低下することからも示唆された。このことは、クロマチン免疫沈降実験によっても、MafA がリン酸化されないインスリンプロモーター上へのリクルートメントが低下することからも示された。

MafA のリン酸化が低下して DNA 結合能が失われると、それに伴ってインスリンおよび GLUT2 や Glucokinase などの β 細胞特異的な遺伝子群の発現が低下することを、定量 RT-PCR 法により確認することができた。

MafA の DNA 結合活性は C 末端領域にある bZip 構造に依存するのであるが、なぜ N 末端領域のリン酸化が DNA 結合活性に影響を与えるのかを調べることにした。リン酸化されない変異体を用いて 2 量体形成能を免疫沈降実験によって調べたが、2 量体形成能はリン酸化の有無とは無関係であった。一方、N 末端領域と C 末端領域を別々に分けて細胞内で発現させると、これら両者がお互いに免疫共沈降されることがわかった。さらにこの共沈降には、N 末端側のリン酸化が消失することと、C 末端側の DNA 結合性塩基性領域の双方が必要であった。したがって、N 末端領域がリン酸化されていないときのみ、C 末端側の DNA 結合領域に分子内で結合することによって、自身の DNA 結合能を阻害するので

はないかと考えられる。N 末端側がリン酸化されると、この分子内相互作用は解除され、DNA 結合活性が現れるのであろうと考えられた。

そこで次に、このリン酸化がβ細胞内でのように制御されているのかが大きな問題となる。この問題を解決するため、培養β細胞株を長期にわたって高グルコース条件下で培養することによって、再現的に機能低下させる系を確立し、MafA のリン酸化のようすを調べてみたところ、機能低下（インスリンをはじめとするβ細胞特異的遺伝子の発現低下）に伴って、MafA のリン酸化が低下することがわかった。このとき、MafA の DNA 結合活性が低下していることは、ゲル・シフト法、DNA pull-down 法、クロマチン免疫沈降実験によって証明した。従って、MafA のリン酸化の低下が、DNA 結合ひいては遺伝子発現の低下を招き、β細胞の機能低下・破綻につながっている可能性がある。

また、MafA のリン酸化は、Beta2 との会合にも必須であることが免疫共沈降実験から判明した。このことも、MafA のリン酸化が維持され続けることがβ細胞の機能を保持し続けるために必須であることを示唆している。

さらに、培養β細胞の長期培養系での機能破綻の際に MafA のリン酸化が低下するにも関わらず、キナーゼ GSK3 の活性は全く低下していなかった。MafA のリン酸化低下の原因を詳細に調べたところ、GSK3 がリン酸化する前提条件である Ser65 のリン酸化が低下するためであることが判明した。Ser65 をリン酸化する責任キナーゼはまだ同定できていないので、これを同定することが現在の急務となった。

そこでこのキナーゼを同定するため、各種のキナーゼ阻害剤を用いて、β細胞株の内在性 MafA のリン酸化を低下させるものをスクリーニングしたところ、1種の低分子化合物を同定することができた。培養β細胞にこの化合物を添加すると、MafA のリン酸化が GSK3 を阻害したときよりもさらに低下することが判明し、また、MafA の一連のリン酸化部位の変異体を用いることによって、Ser65 のリン酸化が阻害されていることも明らかにすることができた。また、この化合物を作用させたβ細胞では、MafA の DNA 結合活性が低下し、インスリンをはじめとするβ細胞特異的遺伝子発現が低下しており、糖尿病に伴うβ細胞の機能低下・機能破綻を模倣するような状態になっていることも明らかにすることができた。

現在、この低分子化合物が阻害するとされているキナーゼ・ファミリーを候補と考えて、RNAi を用いた阻害実験によって、MafA の

Ser65 をリン酸化する責任キナーゼの同定を行っているところである。

以上の成果から、β細胞の機能維持に必須な転写制御因子 MafA と、これを含むタンパク質複合体の成分を明らかにすることができ、またこれらの翻訳後修飾を丹念に解明することに成功した。特に MafA のリン酸化とそれに伴う機能発揮、あるいはリン酸化の低下に伴うβ細胞機能低下・機能破綻の分子機構の大枠を明らかにすることができた。したがって今後は、これらの成果を基盤として、糖尿病の発症と増悪におけるβ細胞の破綻の分子機構の全貌の解明が期待できる。

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 5 件)

- ① Han, S.-i., K. Yasuda, and K. Kataoka. ATF2 interacts with β-cell enriched transcription factors, MafA, Pdx1, and Beta2, and activates insulin gene transcription. *J. Biol. Chem.* 286:10449-10456 (2011). doi: 10.1074/jbc.M110.209510..
- ② Kanai, K., S. Aramata, S. Katakami, K. Yasuda, and K. Kataoka. Proteasome activator PA28γ stimulates degradation of GSK3-phosphorylated insulin transcription activator MAFA. *J. Mol. Endocrinol.* 47:119-127 (2011). doi: 10.1530/JME-11-0044.
- ③ Kamitani-Kawamoto, A., M. Hamada, T. Moriguchi, M. Miyai, F. Saji, I. Hatamura, K. Nishikawa, H. Takayanagi, S. Hitoshi, K. Ikenaka, T. Hosoya, Y. Hotta, S. Takahashi, and K. Kataoka. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. *J. Bone Miner. Res.* 26:2463-2472 (2011). doi: 10.1002/jbmr.458.
- ④ Noso, S., K. Kataoka, Y. Kawabata, N. Babaya, Y. Hiromine, K. Yamaji, Y. Fujisawa, S. Aramata, T. Kudo, S. Takahashi, and H. Ikegami. Insulin transactivator MafA regulates intra-thymic expression of insulin and affects susceptibility to type I diabetes. *Diabetes.* 59:2579-2587 (2010). doi. 10.2337/db.10-0476.
- ⑤ Kanai K., H.M. Reza, A. Kamitani, Y. Hamazaki, S.-i. Han, K. Yasuda, and K. Kataoka. SUMOylation negatively regulates transcriptional and

oncogenic activities of MafA. *Genes Cells*. 15:971-982 (2010). doi: 10.1111/j.1365-2443.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① K. Kanai. Phosphorylations regulate transcriptional and non-transcriptional activity of MafA in oncogenic transformation. 9th EMBL Conference Transcription and Chromatin. 2010. 8. 29. Heidelberg, Germany.
- ② 金井賢一. リン酸化による MafA の転写活性化能および新規の活性の制御機構の解明. 第 62 回日本細胞生物学会大会. 2010. 5. 20. 大阪

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 浩介 (KATAOKA KOHSUKE)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・准教授

研究者番号：20262074