2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 １３ 日現在

機関番号：３２６２０
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１６３７３

研究課題名（和文）膵β細胞におけるユビキチン様修飾因子UFM1の役割の解析

研究課題名（英文）The physiological roles of UFMylation in pancreatic beta cells

研究代表者
鵜澤　博嗣（Uzawa, Hirotsugu）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：５０８４８１７４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：UFMylation（UFM化）は細胞内恒常性維持に関与するユビキチン様の翻訳後修飾である。本研究では膵β細胞においてもUFM化がその機能維持に寄与するという仮説に基づき、膵β細胞特異的にUFM化が欠損したUFM1-βノックアウト（UFM1-βKO）マウスを作製し解析した。UFM1-βKOは対照群と比べ耐糖能が悪化し、細胞死や分化転換に伴うと想定される膵β細胞容積の減少を認めた。超微形態からはERストレス増大が示唆され、ERストレスモデルであるAkitaマウスとの交配では耐糖能が顕著に悪化した。以上の結果から、UFM化はER恒常性維持を介して膵β細胞の機能維持に重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
UFM化が膵β細胞の恒常性維持機構に重要な役割を果たしていることを見出した。特に、UFM化がERストレスの制御を通じて膵β細胞恒常性を制御することが示唆された。本研究はUFM化の膵β細胞での病態生理学的意義を明らかにした初めての知見であり、極めて学術的な意義が高い。一方で、その詳細な分子機構は不明でありUFM化が関連するER品質管理機構として注目されているERファジーの関与なども未解明である。今後は、UFM化を受ける基質の同定を中心に研究を進め、UFM化による膵β細胞恒常性調節のメカニズムを明らかにする。その制御により、新しい糖尿病治療法の創出に結びつくという社会的意義は大きいと期待される。

研究成果の概要（英文）：UFMylation is a ubiquitin-like modification essential for maintaining cellular homeostasis. We hypothesize that UFMylation contributes to preserving pancreatic beta cell function and aim to elucidate the role of UFMylation in pancreatic β cells, primarily through analyses of pancreatic β cell-specific UFM1 knockout (UFM1-βKO) mice. Compared to the control group, these mice exhibited glucose intolerance and reduced β cell volume, probably associated with apoptosis and trans-differentiation. In addition, electron microscopic analysis revealed that ER stress is increased in beta cells in UFM1-βKO, and UFM1-βKO interbred with Akita mice, a representative ER stress model in beta cells, showed significant glucose intolerance. These findings demonstrate that UFMylation is essential in protecting beta cell function through maintaining ER homeostasis.

研究分野：代謝内分泌内科学

キーワード：UFM1　UFMylation　膵β細胞　糖尿病　ERストレス

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

UFM1 は全身に発現するユビキチン類似分子 (ULMs) の一つであり (*EMBO J.* 23, 1977–1986, 2004)、ユビキチンと類似した立体構造を有する。UFM1 はユビキチン修飾と類似した E1-E2-E3 の一連の酵素反応により基質を UFMylation (UFM 化) する。UFM 化 の主たる制御因子は ER に局在し、ER ストレス制御機構との密接な関連が指摘されている (*Trends Cell Biol.* 29, 974–986, 2019)。また、ER の品質制御機構として重要な ER 選択的分解である ER-phagy の制御に UFM 化が関与することも報告されている (*Cell* 180, 1160-1177, 2020)。ユビキチン修飾系が選択的タンパク分解をはじめ広範な生理作用の制御に関与することが明らかにされている一方で (*Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479, 1998)、UFM 化に関しても分子メカニズムの解明とともに生理機能の解析が進められている (*Nat Commun.* 2:181, 2011. *Cell Discov.* 5, 7, 2019. *Nat Commun.* 10:1084, 2019)。

糖尿病の成因として多数を占める 2 型糖尿病の発症には、インスリン抵抗性が深く関与すると考えられている。インスリン抵抗性の増大に伴って膵 β 細胞のインスリン分泌は代償性に増加するが、過剰なインスリン分泌による膵 β 細胞の恒常性維持機構の破綻は膵 β 細胞不全を惹起し、2 型糖尿病の発症に至る (*JCI.* 1, 246-257, 1997. *PNAS.* 13, 7475-7480, 2001)。申請者らは、糖尿病の発症・進展に深く関与する膵 β 細胞不全のメカニズムについて研究を行ってきた。これまでに、膵 β 細胞の恒常性維持にオートファジーが重要な役割を担っていることを、膵 β 細胞特異的オートファジー欠損マウスを用いた検討により明らかにし (*Cell metab.* 4, 325-332, 2008)、また、膵 β 細胞不全を惹起する異常タンパクの除去にオートファジーが重要であることも報告した (*JCI.* 8, 3634–3644, 2014)。さらに、2 型糖尿病発症には ER ストレス応答 (UPR) の障害が関与することが明らかにされており (*Annu. Rev. Biochem.* 81, 767-793, 2012)、UPR の制御が膵 β 細胞の恒常性維持と糖尿病発症抑制に重要な役割を担うことも報告されている (*PLOS Biol.* 10: e1002277, 2015)。これらの知見から、UFM 化は ER ストレス応答やオートファジーの制御を介して膵 β 細胞の恒常性維持に寄与し、2 型糖尿病の発症・進展に深く関与することが予想される。そこで申請者は、膵 β 細胞における UFM 化の病態生理学的意義を解明することを目的に、本研究計画を立案した。

２．研究の目的

本研究では、UFM 化が膵 β 細胞の恒常性維持に寄与し、2 型糖尿病の発症・進展に関与するという仮説に基づき、膵 β 細胞における UFM 化の意義を明らかにすることを目的とする。本研究を通じて UFM 化による膵 β 細胞恒常性維持の機構が解明されれば、その制御によりインスリン抵抗性増大に対する膵 β 細胞機能不全を改善できる可能性がある。

３．研究の方法

本研究では、タモキシフェン投与により膵 β 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Ins1-*

Cre-ERT マウスおよび *Ufm1*$^{flox/flox}$ マウスを交配することで、タモキシフェン誘導性に膵 β 細胞特異的 UFM1 ノックアウトが可能となる UFM1-βKO マウス (UFM1-βKO) を作製し、そのマウスを用いた解析を中心として、UFM 化と膵β細胞機能不全との関連を検討した。

４．研究成果

はじめに、UFM1 抗体を用いて野生型マウスの様々な組織を免疫染色したところ、膵島では、肝臓や脾臓といった他組織と比較して著しく UFM1 の発現が高いことが明らかとなった。また、ウェスタンブロットによる評価を行ったところ、野性型マウスよりも糖尿病モデルマウスの膵島では UFM 化を受けたタンパク量が増加していた。これらの結果から、UFM 化は膵島を中心とした耐糖能異常の病態に重要であることが推察された。

次に、通常食飼育下の UFM1-βKO マウスと対照群 (Ctrl) マウスに糖負荷試験を行ったところ、UFM1-βKO マウスでは Ctrl マウスと比較して耐糖能の悪化が認められた。次に、膵島の免疫組織学的検討を行ったところ、UFM1-βKO ではインスリン陽性となる膵 β 細胞の容積が減少していた。TUNEL 染色による評価では、UFM1-βKO ではアポトーシス細胞の増加が認められた。

次に、UFM1-βKO 膵島の電子顕微鏡による超微形態の観察を行ったところ、ER の拡大や変性が顕著であり、ER ストレスの亢進が示唆された。膵 β 細胞株である INS1 細胞を用いて CRISPR/Cas9 法により UFM1-KO 細胞を作製し解析したところ、UFM1 KO INS1 細胞では ER ストレスシグナルが増強することが明らかとなった。さらに、UFM1 が欠損した膵β細胞は ER ストレスの負荷に対して脆弱であることが予想された。Akita マウスはインスリン遺伝子の点突然変異を有する糖尿病モデルマウスであり、異常インスリン発現によって強い ER ストレスが惹起されることが知られている (*PLoS One*. 2010; 5: e13333)。そこで、Akita マウスと UFM1-βKO マウスを交配し Akita: UFM1-βKO マウスを作製して解析した。Akita マウスはオスでは早期に耐糖能異常を示すが、Akita:UFM1-βKO ではさらに顕著な高血糖を示した。また若齢では耐糖能が正常であるメスにおいても、早期に耐糖能異常が顕在化した。この結果から、膵β細胞の UFM 化が ER ストレス応答において重要な役割を果たしていると考えられた。

最近、膵島細胞には可塑性があると考えられており、膵β細胞の他の内分泌細胞への分化転換が報告されている (*Cell* 150, 1223-1234, 2012)。UFM1-βKO 膵島の免疫組織学的検討を行ったところ、グルカゴンやソマトスタチンの陽性細胞が増加しており、膵β細胞の分化転換があることが示唆された。したがって、UFM 化は膵β細胞死の抑制だけではなく、脱分化や分化転換の制御を介して膵β細胞の恒常性の維持に関与していると考えられた。

今後は、膵β細胞における UFM 化が ER ストレス応答や分化転換を制御するメカニズムを明らかにしていきたい。そのためには、UFM 化を受ける基質の同定が重要であると考えられる。具体的には UFM 化タンパクに対する免疫沈降とその質量分析による同定を行い、ER ストレス応答の分子機構との関連、また ER の品質管理機構としての重要性が指摘されているオートファジー機構である ER ファジーとの関係について解析を進める。これらの検討を行うことで、UFM 化により制御される膵 β 細胞内の恒常性維持機構の全体像が解明され、その調節を介した新し

い糖尿病治療法の開発につながることが期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

1．著者名	4．巻
Shuhei Aoyama, Yuya Nishida,Hirotsugu Uzawa, Miwa Himuro, Akiko Kanai, Kyosei Ueki, Minami Ito, Hitoshi Iida, Isei Tanida, Takeshi Miyatsuka, Yoshio Fujitani, Masaki Matsumoto and Hirotaka Watada	23
2．論文標題	5．発行年
Monitoring autophagic flux in vivo revealed its physiological response and significance of heterogeneity in pancreatic beta cells	2023年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Cell Chemical Biology	658-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1016/j.chembiol.2023.03.001	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	－

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

1．発表者名
Hirotsugu Uzawa, Yuya Nishida, Shuhei Aoyama, Akiko Kanai, Minami Ito, Kyosei Ueki, Satoshi Waguri, Masaaki Komatsu and Hirotaka Watada
2．発表標題
UFMylation is associated with maintaining function of Pancreatic Beta Cells
3．学会等名
The 10th International Symposium on Autophagy（国際学会）
4．発表年
2022年

1．発表者名
鵜澤博嗣、西田友哉、青山周平、金井晶子、伊藤南、植木響政、和栗聡、小松雅明、綿田裕孝
2．発表標題
膵β細胞におけるUFMylation の病態生理学的意義の検討
3．学会等名
日本糖尿病・肥満動物学会
4．発表年
2023年

1．発表者名
鵜澤博嗣、西田友哉、青山周平、金井晶子、伊藤南、植木響政、和栗聡、小松雅明、綿田裕孝
2．発表標題
膵β細胞におけるUFMylationの 病態生理学的意義の検討
3．学会等名
日本糖尿病学会年次学術集会
4．発表年
2023年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関