

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461353

研究課題名(和文) 細胞機能の維持に必須な転写因子MafAのリン酸化の破綻と 細胞の疲弊の分子機構

研究課題名(英文) Relationship between islet b-cell failure and phosphorylation of b-cell specific transcription factor MafA

研究代表者

片岡 浩介 (Kataoka, Kohsuke)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：20262074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病の進行の過程で、インスリンを分泌する細胞の機能が低下することが、根治を困難にしている。機能低下の仕組みは不明であるので、その解明のために、細胞に必須な転写因子MafAと、細胞機能の関係性を検討した。

MafAのリン酸化は転写因子Beta2との相互作用にも必須なことを明らかにし、細胞の転写システムの理解が深まった。また、MafAをリン酸化する責任キナーゼは複数存在し、2型糖尿病モデルマウスdb/dbを用いて、糖尿病の進行に伴ってそれらの細胞内局在やタンパク量が変化することを見出した。これらのキナーゼの制御機構を解明することで、機能不全の分子機構の解明と治療の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：During progression of type-2 diabetes, pancreatic islet b-cells gradually lose their ability to produce and secrete Insulin in response to high blood glucose. To clarify molecular mechanism of the b-cell failure, I analyzed function and activity of b-cell specific transcription factor MafA in b-cells during diabetes progression.

I found that multiple phosphorylation events on MafA regulates its interaction with Beta2, another important transcriptional regulator of b-cell function. I also found that multiple protein kinases phosphorylate MafA redundantly. In b-cells of type-2 diabetes model mice db/db, intracellular distribution and/or abundance of these kinases change during progression of diabetes. Elucidating the mechanism of regulation of these kinases in b-cells may lead to understanding of b-cell failure and contribute to prevention and treatment of diabetes.

研究分野：内分泌学

キーワード：糖尿病 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

(1) 2型糖尿病の発症の過程で、末梢のインスリン抵抗性による持続的な高血糖などがストレスとなって、膵島細胞が機能不全に陥ることが知られている。機能不全は不可逆であると考えられており、その結果としてインスリンの産生・分泌が低下することから、糖尿病のさらなる悪化を招くが、その分子機構は不明であった。細胞の機能不全の背景には、細胞特異的な転写システムの破綻があることが認識されつつあった。とりわけ、細胞特異的な転写因子 MafA や Pdx1 の発現や活性の低下が原因ではないかと考えられてきた。

(2) MafA は、インスリンをはじめとする一群の遺伝子の転写を介して細胞の機能を支える転写因子であることが明らかにされてきた。われわれは、MafA タンパク質の量的制御機構を精査し、MafA が複数の残基のリン酸化によってその量や活性が制御されていることを明らかにし、糖尿病時の細胞の機能不全との関連性の重要性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 細胞の機能不全の分子機構を、転写因子 (特に MafA) の量・活性制御機構の観点から解明すること。

(2) さらに、得られた知見をマウスに応用することによって、機能不全を回避 (予防) し、あるいは機能不全からの回復 (治療) を試みること。

3. 研究の方法

(1) 転写因子 MafA の量・活性を制御するリン酸化酵素を特定し、それらの活性が細胞においてどのように制御されているのか、とりわけ細胞の疲弊の過程でどのように制御され変化するのかを明らかにすることを試みた。高血糖の培地で継代培養することによってインスリンの産生・分泌が低下する細胞由来の培養株 MIN6 を *in vitro* のモデルとして利用し、得られた結果を *in vivo* モデルマウス *db/db* (レプチン受容体欠損による2型糖尿病モデルマウス) を用いて検証する。

(2) また、MafA を制御し、かつ糖尿病モデルにおいて破綻するリン酸化酵素の制御機構が明らかになれば、トランスジェニックマウスなどを作製することによって、細胞の機能不全を回避できるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) 転写因子 MafA の量および活性を制御する上で重要なリン酸化部位 Ser65 を同定していた。Ser65 のリン酸化に引き続いて

Ser61, Thr57, Thr53, Ser49 の計4カ所がキナーゼ GSK3 によってリン酸化されることで、プロテアソームを介した分解が促進されることと、DNA への結合が促進されることを明らかにしていた。また、培養細胞株 MIN6 の長期培養系において、インスリン遺伝子の発現低下に伴って、MafA の Ser65 のリン酸化が低下することを見出しており、細胞の機能不全と Ser65 リン酸化の関連性が強く疑われた。そこで、その意義の解明と、MafA の Ser65 をリン酸化するキナーゼの挙動の解析が必要であった。

(2) MafA の Ser65 がリン酸化されることにより、細胞機能に重要なもうひとつの転写因子 Beta2/NeuroD1 との結合も促進されることを新たに発見した。MafA および Beta2/NeuroD1 のそれぞれの結合に必要な領域を特定したところ、Beta2/NeuroD1 側は C 末端の転写活性化領域、MafA は中央部分のヒンジ領域から C 末端の DNA 結合領域にかけてであった。MafA の N 末端のリン酸化 (Ser65 から Ser49 にかけて) が、どのようにして中央から C 末端領域における結合に影響を及ぼすのかが新しい謎として浮上したのでこれを追究し、MafA がリン酸化によってその全体的な構造を大きく変化させることを示すことができた。これらの知見は、少なくとも MIN6 細胞の長期培養系において、MafA の Ser65 のリン酸化の低下が、インスリン遺伝子などのプロモーターへの結合や、転写因子 Beta2/NeuroDa および Pdx1 との協調的な転写活性化の不具合につながることを強く示唆する結果である。

(3) MafA の Ser65 をリン酸化するキナーゼに関して、MIN6 細胞を用いた機能障害実験を試みたが、難航した。siRNA を導入することによる発現障害は、トランスフェクション効率が悪く、条件検討により効率の改善を図ったものの、明確な結果を得ることができなかった。また、当該のキナーゼにはファミリーを形成していることは分かっていたが、siRNA を用いた研究の過程で、MIN6 細胞においては redundant に機能しているらしいことが明らかになってきた。このことも、機能障害実験を難しくしている要因らしいことが判明した。

そこで、Crispr/Cas9 システムを利用した遺伝子破壊実験を MIN6 細胞で行うことにした。細胞株は MIN6 を含めて一般に極端に増殖が遅く、単一クローンを得ることが難しいが、当該キナーゼのうちで貢献度の高そうな二種類について、それぞれ両アレルが破壊されたロックアウト株を複数クローンずつ得ることに成功した。しかしいずれについても MafA のリン酸化レベルに変化はなく、同時に両方のキナーゼを破壊した株の取得が必要であることが示唆された。この問題については、現在継続して解析中である。

(4) 培養細胞系での機能阻害実験は難航したが、*in vivo* モデルにおける挙動の解析を並行して進めた。マウスの膵島の組織切片を用いた免疫染色によって、ファミリーのうちの一つは、野生型マウスでは細胞のゴルジ体に多く集積するようすが観察された。一方、*db/db* マウスの膵島においては、糖尿病発症の初期 (MafA タンパク質の減少が観察され始める時期) にゴルジ体への集積がみられなくなることが分かった。また、ファミリーのもうひとつのメンバーは、野生型の細胞では細胞質に染色が観察され、*db/db* マウスでは MafA の減少に先立つ時期に発現が減弱・消失するようすが観察された。以上の知見は、細胞の機能不全に伴う MafA タンパク質の減少に、これらのキナーゼが関与していることを示唆するよう思われる。

したがって、これらのキナーゼの膵細胞における機能・役割と、機能不全に伴う MafA の減少との関連を明確にするためには、前項にあげた MIN6 培養細胞系における二重欠損細胞の樹立が必須である。一方、これらのキナーゼの局在部位は MafA の細胞内局在 (核内) とは異なることも明らかになった。このことから、これらのキナーゼが MafA を直接リン酸化するのではない可能性も考慮する必要が出てきた。あるいは、これらのキナーゼあるいは MafA (あるいはその両方) が、核内と細胞質をシャトルしている可能性も考えられる。これらの諸問題は今後解決すべき課題である。

(5) さまざまな週齢の *db/db* マウスおよび野生型マウスから膵島を単離し、MafA、Pdx1、Beta2 などの転写因子の発現のようすを Western blot 法で調べたところ、糖尿病の進行のごく早い時期に MafA タンパク質が減少するようすが観察された。一方、Beta2 た Pdx1 は糖尿病が進行した 12 週齢でもその発現レベルに変化はなかった。したがって、やはり MafA タンパク質の減少が細胞の機能不全の引き金になっている可能性が高いことが再確認された。

一方、MafA のリン酸化レベルは、タンパク質の減少に先立って (SDS-PAGE 上の移動度から判定して) 少し減少することが観察されたが、Ser65 のリン酸化が低下するわけではないことも判明した。このことは、MIN6 細胞の長期培養系では MafA の Ser65 リン酸化が著しく低下することとは異なっていた。したがって、MIN6 培養細胞 (*in vitro* 実験系) は、実際の 2 型糖尿病を反映していない可能性が浮上した。しかしながら、MafA タンパク質の機能が特異的に低下するという点では、MIN6 系も *db/db* マウスも同じであり、MafA タンパク質の機能が、さまざまに異なるメカニズム (量の減少、あるいは Ser65 リン酸化低下による機能低下) で破綻することが、細胞の機能不全につながることを示

しているとも考えることもできる。2 型糖尿病といってもその原因や病態はさまざまであることを考慮すると、*db/db* マウスではない別の糖尿病モデルマウスや、ヒト患者サンプルを調べれば、両方のメカニズム例や、これ以外のメカニズムも見つかる可能性がある。

(6) 前述の免疫組織染色の結果から、MafA-Ser65 キナーゼは膵島細胞ではゴルジ体に局在し、*db/db* マウスにおいてはその局在が消失することがわかった。これらの観察結果から、膵島細胞にかかるストレスとゴルジ体機能との関連が示唆されたので、この点をさらに追究することにした。

これまでに、培養系を用いた系で、ゴルジ体に対するストレスと関連して、リソソーム機能の阻害や、オートファゴソームの阻害によって、MafA のタンパク質量が減少することを見出した。オートファジーと細胞機能についてのこれまでの知見によれば、basal レベルでのオートファジーによって余剰の分泌顆粒や機能低下したミトコンドリアなどのクリアランスが行われていることがわかっている。したがって、糖尿病の進行に伴う高血糖状態によって basal レベルのオートファジーが阻害され、何らかのシグナル伝達が行われた結果、MafA タンパク質が低下し、細胞の機能不全につながる可能性が考えられた。このことを追究することによって、これまで全く不明であったメカニズムを明らかにできると期待されるので、現在、注力しているところである。

(7) 以上のように、細胞の機能不全に関して、当初予想していなかったようなメカニズムが発動している可能性が明らかになってきたため、トランスジェニックマウスなどを作製することによって細胞の機能不全を回避するような実験には取り組むまでには至らなかった。しかし、細胞に対するストレスとしてオートファジー阻害が重要である可能性が見出され、今後深く追究すべき新しい方向が示された。

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 4 件)

Suda N, Itoh T, Nakato R, Shirakawa D, Bando M, Katou Y, Kataoka K, Shirahige K, Tickle C, Tanaka M. Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis. *Development*. 141:2885-94. (2014). doi: 10.1242/dev.099150. 査読有。

Han, S.-i, Y. Tsunekage, K. Kataoka. Gata3 cooperates with Gcm2 and MafB to activate parathyroid hormone gene

expression by interacting with SP1. Mol. Cell. Endocrinol. 411:113-120 (2015) doi: 10.1016/j.mce.2015.04.018. 査読有.

Han, S.-i, Y. Tsunekage, K. Kataoka. Phosphorylation of MafA enhances interaction with Beta2/NeuroD1. Acta Diabetol. in press. doi: 10.1007/s00592-016-0853-1. 査読有.

Miyai M, Hamada M, Moriguchi T, Hiruma J, Kamitani-Kawamoto A, Watanabe H, Hara-Chikuma M, Takahashi K, Takahashi S, Kataoka K. Transcription factor MafB coordinates epidermal keratinocyte differentiation. J. Invest. Dermatol. in press. doi: 10.1016/j.jid.2016.05.088. 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

金井賢一、片岡浩介、藤島 細胞特異的転写因子 MafA の多重リン酸化による細胞増殖制御機構. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 01-04 日. 神戸ポートアイランド.

韓松伊、常陰幸乃、片岡浩介. Gata3 は SP1 との相互作用を介して MafB 及び Gcm2 と協調的に副甲状腺ホルモン遺伝子の発現を活性化する. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 01-04 日. 神戸ポートアイランド.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片岡 浩介 (KATAOKA, Kohsuke)
横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授
研究者番号 : 2 0 2 6 2 0 7 4

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :