

令和元年6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09763

研究課題名(和文) 2型糖尿病の膵細胞の機能不全につながる転写因子MafAの量的制御システムの破綻

研究課題名(英文) Breakdown of MafA regulatory system leading to b-cell failure during type 2 diabetes progression

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病では、インスリンを分泌する膵島細胞に必須な転写因子MafAの発現量が低下することにより、細胞の機能が低下する。そこでMafAの活性や量を調節する分子機構の解明を行った。細胞内でMafAの量を調節する仕組みとして、アミノ酸誘導体であるタウリンがキナーゼWNKの活性化を通じてMafA量を高く維持する機構があることを見出した。また、オートファジーがbasalレベルで常に起きていることが、mafA mRNAの転写レベルでの維持に重要であることが分かった。さらに、ステロイドホルモンによってMafA-Beta2-HNF1bによるglut2遺伝子の転写抑制が起きることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病において、膵島細胞の機能が次第に低下してインスリン分泌が減少してしまう問題について、その分子機構の解明を、細胞の機能に必須な転写調節因子MafAに注目することによって行った。MafAのタンパク質量を一定レベルに保つ細胞内のシグナル伝達の仕組みを一部あきらかにした。また、mafA mRNAの発現レベルの維持には、意外なことにオートファジーが関係することを見出した。また当初の目的とは異なるが、MafAを対象とすることによって、ステロイドの副作用として細胞の機能が低下する仕組みの一端を解明することもできた。

研究成果の概要(英文)：During progression of type 2 diabetes, pancreatic islet b-cells gradually lose their ability to secrete insulin in response to glucose. Loss or decrease of MafA transcription factor has been thought to be responsible for the b-cell dysfunction. Here, we identified an intracellular system regulating MafA protein function and stability. We found that an amino acid-related compound Taurine activates WNK kinase in b-cells, thereby maintains MafA protein levels. We also found that basal level autophagy is required for maintaining mafA mRNA transcription. Furthermore, glucocorticoid and related compounds inhibit ability of MafA-Beta2-HNF1b transcription factors to synergistically activate glut2 gene transcription. As Glut2 (glucose transporter 2) is an essential component of glucose-stimulated insulin secretion in b-cells, this mechanism may explain how steroids suppress b-cell function.

研究分野：内分泌学

キーワード：糖尿病 遺伝子発現調節 細胞内シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病の発症・進行の過程では、末梢のインスリン抵抗性に伴う持続的な高血糖ストレスによって、インスリン産生細胞である膵島細胞が次第に疲弊してゆき、機能不全に陥ってしまう。このことは、2型糖尿病の病態を増悪させる大きな要因であるが、その分子メカニズムは長年にわたって不明であった。ところが近年、膵島細胞の機能を担う重要な転写調節因子である MafA の発現が減少・消失することによって、インスリン遺伝子を含む細胞特異的遺伝子群の発現が低下し、機能不全につながることで、2型糖尿病モデルマウス *db/db* などの観察によって明らかにされてきた。この際の MafA の減少は、タンパク質レベルでの減少(すなわち MafA タンパク質の分解の亢進)によることをわれわれはあきらかにした。

(2) MafA は、インスリン遺伝子やグルコース・トランスポーター Glut2 をはじめとする細胞特異的遺伝子群の発現に必須で、細胞の機能を支える転写因子であることが、われわれのグループを含めた研究により明らかにされてきた。特にわれわれは、MafA の分子としての機能に焦点をあてて解析を行い、MafA タンパク質の翻訳後修飾と機能との関連(とりわけ MafA タンパク質のリン酸化および分解機構とその制御)や、他の転写因子群(とりわけ Pdx1 や Beta2 などの細胞転写因子群)との物理的・機能的な関連をあきらかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) 膵島細胞において MafA タンパク質の機能(とりわけ MafA タンパク質の量)を調節する仕組みを、これに関わる分子群を同定するとともに、その作動原理をあきらかにする。

(2) その上で、機能不全に陥った細胞では、その仕組みがどのように破綻するのかをあきらかにし、人為的な操作でその仕組みに介入することによって、細胞の機能不全を回避することができるかを試みる。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞株 MIN6 などを *in vitro* のモデルとして用いて、MafA タンパク質の機能を調節する分子を特定し、過剰発現やノックダウンによりその作動原理をあきらかにする。

(2) 得られた結果に基づき、*in vivo* のモデルである *db/db* マウスの膵島における挙動を調べることによって、細胞の機能不全との関連をあきらかにする。細胞の機能不全を回避できる可能性のある分子が特定できれば、その Tg マウスや KO マウスなどを作製あるいは利用し、*db/db* マウスと交配することなどによって、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) MafA タンパク質のリン酸化や安定性(分解)の制御に関わる分子の同定を目指し、培養細胞株 MIN6 の長期培養系を利用することにした。MIN6 細胞は、数ヶ月間の長期にわたって継代を繰り返すと、インスリンなどの細胞特異的な遺伝子群の発現が転写レベルで低下することが知られていたからである。このとき、MafA のリン酸化が低下し、それに伴って DNA 結合能が著しく低下することをわれわれは見出していった。そこで、継代数の少ない機能的な MIN6 細胞と、継代数の大きい機能不全の MIN6 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析によって遺伝子の発現変動を網羅的に調べた。

この解析から、タンパク質キナーゼ WNK を候補として選抜し、解析を加えた。WNK の阻害剤を MIN6 細胞に添加しても MafA のリン酸化レベルや発現量には変化はなかった。一方、WNK を活性化することが知られているアミノ酸類似化合物であるタウリン(アミノエチルスルホン酸)を MIN6 細胞に添加すると、MafA タンパク質が安定化する(量が増加する)ことを見出した。この効果は、タンパク質キナーゼ WNK の阻害剤によってキャンセルされた。

タウリンは、食品成分として日常的に摂取され、体内に比較的豊富に含まれる化合物であるが、糖尿病との関連が指摘されている。すなわち、糖尿病の進行に伴って血中のタウリンが減少することが知られている。しかしながら、その意義は現在のところ、明確ではない。また、2型糖尿病モデルマウスなどにタウリンを投与(経口摂取)することにより、インスリン抵抗性が改善し、細胞の機能不全が軽減されることも知られている。ただし、その分子機構についてはよくわかっていない。

したがってわれわれの知見は、タウリンの糖尿病軽減・改善の効果の分子機構として、WNK キナーゼの活性化と、それに伴う MafA タンパク質の増加および細胞関連遺伝子群の発現上昇と機能向上の可能性を示している。WNK キナーゼから MafA に至るシグナル伝達系は現時点では不明であり、これを解明することによって、糖尿病治療や予防の新しい方策が見えてくる可能性がある。

(2) MafA タンパク質の量に影響を及ぼす因子の探索を行い、オートファジーを阻害する薬剤 Bafilomycin A1 やクロロキンが、MafA 量を減少させることを見出した。細胞においては、basal レベルでのオートファジーが常に生じており、不要となったインスリン顆粒の回収などを行っていると考えられている。また、細胞特異的にオートファジーを阻害したマウスでは、加齢にと

もなって 細胞機能が低下することも知られている。さらに、2型糖尿病モデルマウス *db/db* などの観察結果によると、機能低下した膵島 細胞では、オートファジーが阻害されたためと考えられる multivesicular body の蓄積が見られる。したがって、細胞の健全性のためにはオートファジーが必須であり、そのメカニズムの一端として MafA 量の維持を行っているとの仮説に基づいて、分子機構の探索を進めた。

当初、オートファジー阻害による MafA 量の低下は、プロテアーゼ阻害剤 MG132 によって回避されたことから、MafA タンパク質の安定性によるものと考えたが、その後の精査により、*mafA* mRNA の低下 (遺伝子発現レベルでの低下) によることが判明した。そこで、*mafA* 遺伝子のエンハンサー・プロモーター領域をクローン化し、Luciferase をレポーターとして *mafA* 遺伝子の転写をモニターできる系を構築した。この系を用いて、オートファジー阻害によってどのようなシグナル系が動き、*mafA* の発現低下に至るのかを調べているが、現時点では詳細はあきらかではない。持続的な高血糖ストレス (= グルコース過剰な状態) によってオートファジーが阻害されたときに、核内までどのようにして情報が伝達されるのかを、今後あきらかにすることができると思われる。

(3) MafA タンパク質は、その中央部分 (ヒトでは Thr131、マウスでは Thr132) がキナーゼ p38 MAPK 依存的にリン酸化されており、このことが酸化ストレスによってプロテアソーム経路で分解される際の前提条件となっていることが示されていた。一方われわれは、MafA の N 末端部分のリン酸化 (Ser49 から Ser65 までの 5 箇所) がキナーゼ GSK3 によってリン酸化されており、プロテアソーム経路での分解の前提条件であることをあきらかにしていた。これらの知見を総合的に理解するために一連の実験を行い、以下のことをあきらかにした。

酸化ストレス刺激によって MafA の分解が促進される際には、N 末端部分のリン酸化 (Ser49 から Ser65 までの 5 箇所) が主要な働きをするが、これらに加えて、Thr132 や Ser72、さらには C 末端部分の Ser342 のリン酸化も寄与することが分かった。阻害剤を用いた実験から、p38 MAPK は酸化ストレス刺激によって誘導される分解には、少なくともわれわれの実験系では関与しないことが分かった (Thr132 のリン酸化にも関与しない。したがって、細胞内で Thr342 をリン酸化する責任キナーゼは不明である)。また、リン酸化型 MafA と結合するユビキチン・リガーゼを 1 つ同定した。酸化ストレスによって、リン酸化の程度が変化する様子は観察されないが、このユビキチン・リガーゼをノックダウンすると、酸化ストレスによる MafA の分解が阻害された。また、*db/db* マウスの膵島において、このユビキチン・リガーゼの発現は亢進していた。

持続的な高血糖は 細胞に対して酸化ストレスを与えられていると考えられている。したがって以上の知見からは、機能不全の 細胞においては、このユビキチン・リガーゼの発現が何らかの要因によって亢進し、酸化ストレスと相まって MafA タンパク質の分解を促進していることが予想された。酸化ストレスを軽減する N-アセチルシステインを投与 (経口摂取) させた *db/db* マウスにおいては、MafA の減少がキャンセルされることをわれわれは観察しており、このことは、MafA 分解を止めることによって 細胞の機能を保全する方策として有効である可能性を示している。

(4) 広い意味でのストレスによって、ストレス・ホルモンであるグルココルチコイドの分泌が亢進することはよく知られている。グルココルチコイドは、細胞に対してその機能を抑制し、血糖値を高く維持する生理作用があることに加えて、慢性的には 細胞の機能を低下させる。このことは、薬剤としてのグルココルチコイド誘導体 (ステロイド) の副作用としても知られている。グルココルチコイドによる 細胞の機能低下の分子機構を探索することを、上記の研究と併せて行ったところ、以下の知見を得た。

まず、合成グルココルチコイドの 1 種である Dexamethasone (Dex) を培養 細胞である MIN6 に添加すると、インスリン遺伝子の発現は変化しないものの、グルコース・トランスポーター *glut2* 遺伝子の発現が低下することがわかった。Glut2 タンパク質は、細胞外グルコース濃度の感知・取り込みを通じてインスリン分泌応答に必須であるので、この発現低下が 細胞の機能低下の主要因である可能性が考えられた。

Glut2 遺伝子の発現調節機構はほとんど分かっていないので、*glut2* 遺伝子のエンハンサー領域を探索し、遺伝子下流域 (3' UTR より下流) に 細胞特異的なエンハンサーを同定した。さらに、細胞の機能と関連の深い転写因子群の中から、MafA, Beta2, HNF1b が協調的に *glut2* 遺伝子エンハンサーを活性化することを見出した。また、この活性は、グルココルチコイド受容体 GR と Dex によって抑制されることも見出した。

以上の知見は本研究の本来の目的とは異なるものの、これまでよく分かっていなかったグルココルチコイドによる 細胞の機能低下のメカニズムの解明につながるものであり、ステロイドの副作用を回避し、より有効で安全な薬剤の開発に資するものである。また、転写因子 HNF1b は若年性の 1 型糖尿病 MODY5 の原因遺伝子であり、細胞における新たな機能が判明したことで、1 型糖尿病の理解と治療につながる可能性もある。また当然ながら、MafA や Beta2 との機能的な相互作用があきらかになったことにより、本研究の本来の目的である 細胞の機能不全との関連についても、今後は HNF1b (さらには、関連タンパク質であり MODY3 の原因遺伝子でもある HNF1a) も視野に入れつつ調べてゆく必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Han SI, Tsunekage Y, and Kataoka K. Phosphorylation of MafA enhances interaction with Beta2/NeuroD1. *Acta Diabetologica*. 53:651-660 (2016). 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, and Kataoka K. Transcription factor MafB coordinates epidermal keratinocyte differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 136:1848-1857 (2016). doi: 10.1016/j.jid.2016.05.088. 査読有.

Miyai M, Tsunekage Y, Saito M, Kohno K, Takahashi K, and Kataoka K. Ectopic expression of the transcription factor MafB in basal keratinocytes induces hyper-proliferation and perturbs epidermal homeostasis. *Experimental Dermatology*. 26:1039-1045 (2017). doi: 10.1111/exd.13364. 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

韓 松伊, 常陰 幸乃, 片岡 浩介 「MafA はリン酸化により Beta2/NeuroD1 との相互作用が亢進する」 第 39 回 日本分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日~12 月 02 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。