

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007~2008
 課題番号：19591078
 研究課題名（和文） 転写因子 MafA の安定性制御機構から膵島β細胞のグルコース応答メカニズムにせまる
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism of glucose response in islet beta-cells by analyzing stability control system of transcription factor MafA.
 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：グルコース応答性でβ細胞の諸機能の発揮に必須の転写因子 MafA の制御機構の解明を通じて膵島β細胞がグルコース濃度を感知して応答する分子機構の解明を目指した。MafA タンパク質がリン酸化依存的に低グルコース条件下で分解が促進されること、MafA の分解は PA28γ タンパク質によって促進されることを明らかにした。この分解促進はこれまでに知られていない新規の分解系であった。また、MafA のリン酸化依存的に結合する新規因子を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：転写制御・シグナル伝達・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

膵島β細胞は、血糖値を感知し、インスリンを分泌するきわめて特化した細胞であり、その機能破綻は糖尿病を引き起こす。β細胞がグルコースに応答する分子機構については、インスリン分泌に関してはよく研究されており、グルコース取り込みに応答した ATP 産生に引き続く膜表面のチャネルの活性化によってインスリン分泌が起こることがわかっている。このチャネルを標的にしたインスリン分泌促進薬が実際に糖

尿病の治療に用いられていることから、グルコース応答の分子機構の解明は、応用面においても重要な位置づけがなされている。

一方で、遺伝子発現レベルでのβ細胞のグルコース応答メカニズムは、インスリン遺伝子の発現やβ細胞の機能維持・生存などとの関連から重要であることが示唆されているが、その分子機構の詳細ほとんど不明であった。特に、インスリン遺伝子発現のグルコース応答には、Pdx1 や Beta2 などの転写制御因子の関与が示されてきた

が、その意義がはっきりしない部分も多いのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究の研究代表者らは、インスリン遺伝子のグルコース応答性の発現制御において最も重要な転写制御因子として MafA を同定し、2002年に報告した (K. Kataoka et al. J. Biol. Chem. 277: 49903-49910. 2002)。そして、MafA は bZip 系に属する転写活性化因子であり、マウスにおいてはβ細胞にきわめて限局して発現していることをあきらかにしてきた (K. Kataoka et al. J. Mol. Endocrinol. 32: 9-10. 2004)。

MafA は、前述の Pdx1 や Beta2 と協調的にはたらくことにより、インスリン遺伝子のプロモーターを効率よく活性化することを発見した (S. Aramata et al. Biochim. Biophys. Acta 1730: 41-46. 2005)。また、MafA は、インスリン遺伝子のみならず、グルコースの取り込みを行うグルコース輸送体 (GLUT2)、取り込んだグルコースを解糖系へと送り込むことによって ATP 産生を促すグルコキナーゼ、インスリン分泌に必要な ATP 応答性のチャネル (SUR1, Kir6.2)、インスリンの成熟に必要なプロセシング酵素である PC1/3、インスリンの分泌を促進するホルモン GLP-1 の受容体 (GLP-1-Receptor) などの遺伝子の発現をも制御しており、β細胞が機能的であるために必須な役割を担っていることをあきらかにした (H. Wang et al. Diabetologia 50: 348-358. 2007)。すなわち、MafA はβ細胞に特有の機能発揮と維持に必須の因子であり、このことは *mafA* knockout マウスが加齢とともに糖尿病を発症することからも支持された。

また、MafA はインスリン遺伝子のグルコース濃度に応じた転写 (発現) において中心的な役割を担うことがわかり、このことが本研究の大きな動機となっている。すなわち、MafA のグルコースに応じた機能制御の分子機構をあきらかにすることを通じて、β細胞のグルコース感知と応答の分子機構を解明し、ひいては糖尿病の治療に役立てることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

これまでの解析により、MafA タンパク質の翻訳後制御機構 (特にタンパク質の量=分解速度) の制御がグルコース応答に重要であることをあきらかにしてきた。この応答には MafA がリン酸化されることが重要であったので、MafA タンパク質のリン酸化されるアミノ酸を計 8 カ所同定した。そのうちの 5 カ所のセリンおよびスレオニン残基

は MafA のアミノ末端側に 4 アミノ酸おきに並んでおり、未同定のプライミング・キナーゼと、Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) によって順次リン酸化されることを解明した。さらに、これらのリン酸化が、低グルコース条件下における MafA タンパク質の分解にとって必須であることもわかった。

これらの成果から、MafA タンパク質は恒常的にリン酸化されており、低グルコース条件下ではその分解が促進される、というしくみによって MafA のタンパク質量が制御されていることがあきらかとなった (S.-i. Han et al. Mol. Cell. Biol. 27: 6593-6605. 2007)。したがって、本研究においては、その分解系に関与する分子をあきらかにし、その性質を詳細に調べることを試みた。具体的には、分子生物学的手法によって MafA のリン酸化部位の変異体などを作製し、培養β細胞株に導入することによって発現させ、また、生化学的手法を用いて発現レベルや半減期の測定などを行った。

4. 研究成果

MafA の特定部位のリン酸化が低グルコース条件下での MafA タンパク質分解の前提条件であることがあきらかになっていたので、その分解に関与するタンパク質の同定を試みた。阻害剤を用いた研究から、MafA の分解にはプロテアソームが関与することがわかったので、ユビキチン・プロテアソーム系の関与が疑われた。しかしながら、多方面にわたる検証にも関わらず、MafA がポリ・ユビキチン化されるという証拠を得ることができなかったため、MafA はポリ・ユビキチン化を介さずにプロテアソーム経路で分解されるという、きわめてまれに見られるタンパク質分解系が関与している可能性が考えられた。

そこで、そのような分解促進を行うタンパク質の候補をデータベース検索から絞り込み、PA28 の関与を調べることにした。通常の 26S プロテアソームは、1つの 20S のコア・サブユニットと2つの 19S のサブユニットから成るのに対して、PA28 タンパク質は7量体を形成し、19S サブユニットの代わりに 20S サブユニットと複合体を形成することによって、20S サブユニットの持つタンパク質分解活性を促進することが知られている因子である。また、哺乳動物においては PA28 α 、 β 、 γ の3種類が存在することがわかっており、特に PA28 γ は核内に存在するとされている。

MafA とともに PA28 γ を細胞に導入すると、MafA タンパク質の分解が促進された。このことは、定常状態における Western blot および、シクロヘキシミド処理による半減期

の測定によって検証した。また、MafA の分解促進に伴って、MafA によるインスリン遺伝子プロモーターの活性化は抑制された。この分解促進は PA28 α/β ではおこらないことから、PA28 γ に特異的であった。さらに、リン酸化を受けることができない MafA の変異体は PA28 γ の共存による分解促進が起こらなかったため、この分解促進には、MafA のリン酸化が必須であることが判明した。また、プロテアソームの阻害剤である MG132, Lactacystin などを細胞に処理することによって MafA の PA28 γ による分解促進はキャンセルされたことから、この分解はプロテアソームを介していることがわかった。以上の結果から、PA28 γ が β 細胞におけるグルコース応答性の MafA タンパク質分解に関与している可能性が示唆された。

また、繊維芽細胞において RNAi 法によって PA28 γ タンパク質の発現を低下させると、遺伝子導入によって発現させた MafA タンパク質の量の増加が認められた。同様の効果が β 細胞においても認められるかどうか重要な鍵であるが、現在までのところ、RNAi の導入と PA28 γ タンパク質の発現抑制を効率よく行うことに成功していない。技術的問題を解決することによって、今後必ず検証せねばならない。

一方で、PA28 γ による MafA の分解促進の分子機構の解明を目指した。そのためにもまず、両者の結合を調べることにした。HA タグを付加した MafA と、FLAG タグを付加した PA28 γ を HeLa 細胞に発現させ、HA 抗体によって免疫沈降を行ったところ、PA28 γ タンパク質が共沈してくることがわかった。MafA のリン酸化変異体とは共沈しなかった。したがって、両者は MafA のリン酸化依存的に結合することがわかった。この結合が直接的であるかどうかを検証するためには、それぞれの組換えタンパク質を準備し、MafA を試験管内でリン酸化して結合を調べる必要がある。MafA タンパク質の試験管内におけるリン酸化を行うには、GSK3 によるリン酸化の前駆となる priming kinase の同定が不可欠であるが、ごく最近になってその候補を得ることができたので、今後の検証が可能になった。

PA28 γ タンパク質は、20S プロテアソームのタンパク質分解活性を促進するとされているが、その研究は短いペプチド基質を用いて行われており、MafA のような 40kDa もあるようなタンパク質の分解がどのような分子機構で促進されるのかは全く謎である。そこで、各種の PA28 γ 変異体を作製した。すなわち、7 量体を形成できない変異体、7 量体は形成するが、20S サブユニットと結合できない変異体、20S サブユニットと結合してもプロテアーゼ活性を促進できない変

異体などである。これらの変異型 PA28 γ と MafA を細胞に共導入し、MafA の分解が促進されるかどうかを調べたが、意外なことに、いずれの変異体も MafA の分解を促進した。一方、プロテアーゼ促進活性が向上した変異体によっては、むしろ全く MafA タンパク質の分解は促進されなかった。これらの結果は、これまでに信じられているような分子機構、すなわち、7 量体形成とそれに伴う 20S プロテアソームへの結合と分解の促進といったようなステップとは全く異なる機構によって MafA タンパク質の分解は行われることを示している。これは、これまでにない新しいタイプのタンパク質分解促進機構であり、タンパク質分解系分野において注目すべき成果であるとともに、このような特殊な分解系が、膵島 β 細胞のグルコース応答とどのような関わりを持つのかを解明する必要がある。以上の成果は、学会にて発表を行い、学術論文として投稿準備中である。

また、本研究の目的とは必ずしも合致するものではないが、PA28 γ タンパク質が別の転写制御因子 Snail と結合することを発見した。Snail は、上皮間柔織転換や発癌との関連が深い転写因子である。Snail の転写活性、タンパク質分解、細胞内局在は GSK3 によるリン酸化によって制御されており、その点ではいくぶん MafA と共通している。しかしながら、Snail タンパク質は、PA28 γ と共存すると、タンパク質分解が阻害されてむしろ蓄積することを見いだしている。したがって、PA28 γ はこれまで考えられて来たのとは異なる多機能なタンパク質であり、さまざまな生命現象に関与していることが示唆される。

一方で、MafA の分解にポリ・ユビキチン化が全く関与していないかどうかについては疑問が残る。そこで、MafA と構造的に類似した MafB のタンパク質分解について検証を行ったところ、やはりリン酸化依存的に分解が促進されるが、MafA とは異なって明確にポリ・ユビキチン化の関与が認められた。この違いの分子基盤は現時点では不明であるが、互いに類似したタンパク質である MafA と MafB は、それぞれユビキチンを介する系と介さない系で分解されるものの、その関与の強さに差があるものと考えられた。そこで、MafB のリン酸化依存的に結合する因子の同定を試み、ユビキチン・リガーゼをひとつ同定することに成功した。このユビキチン・リガーゼが MafA の分解にも関与しているかどうか、また関与しているとすれば、 β 細胞におけるグルコース依存性の MafA タンパク質分解シにどのように関与しているかをあきらかにしてゆく必要がある。

PA28 γ の関与する分解システムおよび、同定したユビキチン・リガーゼの関与する分解システムの性質をそれぞれより詳細に（特にその上流の制御機構）解析することにより、今後グルコース応答システムの全貌を解明できると期待される。

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 Takahashi, R.U., S.N. Kanesashi, T. Inoue, T. Enomoto, M.A. Kawano, H. Tsukamoto, F. Takeshita, T. Imai, T. Ochiya, K. Kataoka, Y. Yamaguchi, and H. Handa. Presentation of functional foreign peptide on the surface of SV40 vilus-like particles. *J. Biotech.* 135: 385-392 (2008). 査読有

② Inoue, T., M. A. Kawano, R. U. Takahashi, H. Tsukamoto, T. Enomoto, T. Imai, K. Kataoka, and H. Handa. Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J. Biotech.* 132: 181-192 (2008). 査読有

③ Hase Y., M. Tatsuno, T. Nishi, K. Kataoka, Y. Kabe, Y. Yamaguchi, N. Ozawa, M. Natori, H. Handa, and H. Watanabe. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 66-72 (2007). 査読有

④ Aramata, S., S.-i. Han, and K. Kataoka. Roles and regulation of transcription factor MafA in islet β -cells. *Endocr. J.* 54:659-666 (2007). 査読無

⑤ Tsukamoto H., M. A. Kawano, T. Inoue, T. Enomoto, R.-u. Takahashi, N. Yokoyama, N. Yamamoto, T. Imai, K. Kataoka, Y. Yamaguchi, and H. Handa. Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. *Genes Cells.* 12:1267-1279 (2007). 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

① 片岡浩介、金井賢一「Maf 転写因子群の多重なリン酸化を介した複数の分解経路」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008. 12. 12 神戸

② 片上紗世、金井賢一、片岡浩介「転写因子 Snail の PA28 γ によるタンパク質安定性制御」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008. 12. 11 神戸

〔図書〕（計 1 件）

① 分子糖尿病学の進歩 2009（分担）「膵 β 細胞の分化と機能維持を司る転写因子 MafA」（金原出版）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者