

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790323

研究課題名（和文） 膵β細胞におけるクロマチン構造タンパク質 HMGN3 の機能解明

研究課題名（英文） Studies of chromatin architectural protein HMGN3 in pancreatic beta-cell

研究代表者

倉橋 敏裕 (KURAHASHI TOSHIHIRO)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00596570

研究成果の概要（和文）：

High mobility group N (HMGN) の機能解析により次の結果を得た。(1) HMGN3 は膵臓の内分泌細胞で高発現しており、その欠損マウスは糖尿病様の表現型を示した。(2) HMGN3 はスプライシング因子と相互作用している可能性がある。(3) 線維芽細胞に HMGN3 を過剰発現しても遺伝子発現にほとんど影響しないが、膵β細胞由来株細胞には多大の影響を与えた。(4) HMGN1 の過剰発現では HMGN3 と逆の結果が得られ、HMGN1 は PCNA に結合することでそのクロマチンとの相互作用を促進した。

研究成果の概要（英文）：

We studied physiological roles of high mobility group N (HMGN) and obtained following results. (1) HMGN3 was highly expressed in pancreatic endocrine cells, and *Hmgn3*-knockout mouse showed a diabetic phenotype. (2) HMGN3 might interact with a splicing factor. (3) Overexpression of HMGN3 affected the gene expression little in fibroblast but largely in pancreatic beta cell-derived cell. (4) Opposite results were obtained by overexpression of HMGN3 in these cells. HMGN1 interacted with PCNA and facilitated its binding to chromatin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：基礎医学・医化学一般

キーワード：(1) HMGN (2) クロマチン (3) 膵β細胞

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞からの正常なインスリン分泌は糖代謝制御に重要である。したがって、その分子メカニズムを理解することは、その破綻により引き起こされる糖代謝異常疾患を理解し適切な治療を行う上で重要であるが、未だに未解明な部分が多い。一方、遺伝子発現のエピジェネティックな制御は生体の発

生や高次機能の維持に重要であり、近年、その破綻と疾患との関係が注目されており、代謝異常との関連も報告されている。

クロマチン構造タンパク質の一つである HMGN ファミリータンパク質については、転写、DNA 修復、DNA 複製といった様々な核内反応の制御に関与していることが知られている。さらに近年になって、ヌクレオソームに結合

することによりエピジェネティックな制御に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。

これまでに研究代表者らは、HMGN3 が他のファミリーメンバーと異なり組織特異的に発現していることを見出している。そこで *Hmgn3* 欠損マウスを作成して表現型解析を行ったところ、野生型に比べて *Hmgn3* 欠損マウスは血中インスリン濃度が有意に低く、耐糖能も低下しており、糖尿病様の症状を示すことが分かった。これらの結果は HMGN3 が糖代謝の制御に関わることを示唆している。

2. 研究の目的

HMGN ファミリータンパク質が、エピジェネティックな制御や様々な核内反応への関与を通して、どのような高次生命現象の制御に関与しているかは不明な点が多い。また、哺乳類に 5 種存在する HMGN ファミリータンパク質間で重複する機能と、役割分担に関してはほとんどわかっていない。そこで、HMGN の生理的役割の解明およびファミリー間での機能的な違いを明らかにすることを目的とし、独自に作成した HMGN ファミリータンパク質全てに対する抗体、遺伝子欠損マウスおよび各マウスから樹立したマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) 等を用いて解析を行う。特に本研究においては組織特異的な発現が認められる HMGN3 に着目し、多くの組織に遍在する HMGN1 と比較検討することで、その生理的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) HMGN3 の機能解析

①定量的 PCR、イムノブロットングをはじめとする免疫組織学的手法を用いて、各 HMGN ファミリータンパク質がどういった細胞・組織に高発現しているかを検討した。

② *Hmgn3* 欠損マウスの表現型解析

Hmgn3 が膵内分泌細胞に高発現しているという結果をうけ、血中インスリン・グルカゴン濃度の測定および耐糖能試験、インスリン負荷試験等を行った。

③膵β細胞において HMGN3 と相互作用する因子の検索

Flag-HA tag を付加した HMGN3 を恒常的に発現している MIN6 細胞を樹立し、TAP (Tandem affinity purification) 法を行った。その後、質量分析 (MS) を行い、HMGN3 に相互作用す

る因子の検索を行った。

(2) HMGN タンパク質が遺伝子発現に及ぼす影響の解析

各 HMGN ファミリータンパク質が遺伝子発現に与える影響を調べる目的で、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) およびマウス膵β細胞由来 MIN6 細胞でそれらの遺伝子を恒常的に高発現する細胞株を樹立し、マイクロアレイ解析を行った。

(3) HMGN1 に相互作用する因子の検索

これまでに TAP 法を用いて HMGN1 に相互作用する因子の検索を行ってきたが、生理的機能が明確なタンパク質複合体は得られていない。そこで本研究では HMGN1 との相互作用が一過的な因子も視野に入れ、架橋剤を用いた蛋白質複合体精製を行った。

4. 研究成果

(1) HMGN3 の機能解析

これまでに、HMGN3 は他のファミリータンパク質とは異なり組織特異的に発現していることを研究代表者らは明らかにしてきた。そこで、独自に作成した *Hmgn3* 欠損マウスについて、特に HMGN3 の発現の高い組織に焦点を絞って表現型解析を行ったところ、*Hmgn3* 欠損マウスでは食後血中インスリン濃度が野生型に比べて減少しており、その結果と一致して耐糖能が野生型に比べて有意に低下していた。次に、HMGN3 特異的抗体を用いた免疫染色により、HMGN3 の膵臓における発現様式を調べた。その結果、HMGN1 や HMGN2 が膵外分泌細胞ならびに膵内分泌細胞の両方で発現しているのに対し、HMGN3 は膵内分泌細胞でのみ発現が認められた。各膵内分泌細胞種に特異的な抗体を用いた二重染色を行い、膵内分泌細胞内での HMGN3 の局在をさらに詳細に調べた結果、HMGN3 は α 、 β 、 δ 、PP 細胞の全てに発現していることが分かった。

HMGN3 の膵β細胞における生理的機能を明らかにする目的で、マウス膵β細胞由来 MIN6 細胞を用いて、膵β細胞内で HMGN3 と相互作用する因子の検索を行った。その結果、HMGN3 と相互作用する可能性のある因子としてスプライシングに関与することが報告されている因子 X を同定した。その相互作用を確認する目的で組換えタンパク質を用いて *in vitro* での相互作用を調べたところ、培養細胞を用いた解析結果と一致して *in vitro* に

においてもその候補因子と HMGN3 の相互作用が確認できた。このことは、今回同定したスプライシング因子と HMGN3 が直接相互作用している可能性を示唆している。今後は、今回得られた相互作用候補因子と HMGN3 との間どのような機能的相互作用があるかを明らかにする必要がある。

(2) HMGN タンパク質が遺伝子発現に及ぼす影響の解析

研究代表者らが樹立した各細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、多くの細胞・組織で発現している HMGN1 を MEF に過剰発現させると遺伝子発現プロファイルに影響を与えた。一方、組織特異的に発現がみられる HMGN3 の過剰発現は MEF における遺伝子発現プロファイルにほとんど影響を与えなかった。一方で、マウス脾β細胞由来 MIN6 細胞に HMGN1 を過剰発現させても遺伝子発現プロファイルに対する影響は小さかったが、HMGN3 を過剰発現させた場合に大きな影響がみられた。

(3) HMGN1 に相互作用する因子の検索

HMGN ファミリータンパク質内で最も古くから存在が明らかとなっていた HMGN1 は、その遺伝子欠損マウスも一番初めに作成され解析された。研究代表者が所属していた研究室では *Hmgn1* 欠損マウスの解析を行い、放射線に高感受性であることを明らかにした。その他の解析結果から、HMGN1 が DNA 修復に関与していることが示唆されてきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで、今後 HMGN ファミリータンパク質間での機能的相違・重複性を明確にするためにも、解析が進んでいる HMGN1 のさらなる機能解析が重要と考え、HMGN1 に相互作用する因子の検索を行った。その結果、HMGN1 に相互作用する候補因子として DNA 修復や複製において重要な役割を担うことが知られている PCNA を同定した。*in vitro* で合成した欠失変異体タンパク質を用いた詳細な解析から HMGN1 と PCNA の相互作用には HMGN1 のヌクレオソーム結合ドメインが必要であること、また、PCNA が 3 量体を形成していることがその相互作用に必要であること等が示唆された。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いたマイクロ放射線照射実験を行った結果、*Hmgn1* 欠損マウス由来 MEF においては PCNA の放射線照射部位へ

の集積に遅延が認められ、その遅延は HMGN1 を過剰発現させることにより回復した。さらに、*in vitro* における nucleosome mobility shift assay の解析結果においても、HMGN1 存在下では PCNA がよりヌクレオソームと相互作用しやすいことを明らかにした。

以上の結果から、HMGN3 は組織・細胞特異的に発現することで特有の蛋白質ネットワークを構築し、独自の機能を発現していることが示唆された。一方で HMGN1 は、PCNA というより普遍的な因子の機能発現に関与していることが明らかとなり、HMGN1 はよりグローバルな生命現象の制御機構に関与していることが示唆された。

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 3 件)

- ① Kurahashi T, Konno T, Otsuki N, Kwon M, Tsunoda S, Ito J, Fujii J. A malfunction in triglyceride transfer from the intracellular lipid pool to apoB in enterocytes of SOD1-deficient mice. *FEBS Lett.* 2012 Dec 14; 586 (24):4289-95.
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.09.047
査読有り
- ② Postnikov VY*, Kurahashi T*, Zhou M and Bustin M. The Nucleosome Binding Protein HMGN1 Interacts with PCNA and Facilitates its Binding to Chromatin. *Mol Cell Biol.* 2012 May; 32(10), 1844-54. (*contribute equally)
DOI:10.1128/MCB.06429-11
査読有り
- ③ Rochman M, Taher L, Kurahashi T, Cherukuri S, Landsman D, Ovcharenko I and Bustin M. Effects of HMGN variants on the cellular transcription profile. *Nucleic Acid Res.* 2011 May; 39(10):4076-87.
DOI:10.1093/nar/gkq1343
査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 倉橋敏裕ら、酸化ストレス亢進による小腸の脂質代謝異常、第 35 回日本分子生物学

会年会、2012年12月、福岡、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

- ② Kurahashi, T. et al., SOD1 deficiency causes postprandial dyslipidemia due to impaired lipid metabolism in the intestine.

16th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Imperial College, London, UK, Sep, 2012

- ③ 倉橋敏裕ら、SOD1欠損マウス小腸における脂質代謝の解析、第65回日本酸化ストレス学会学術集会、2012年6月、徳島、徳島郷土文化会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 敏裕 (KURAHASHI TOSHIHIRO)
山形大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00596570