

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790932

研究課題名(和文) 低酸素による膵細胞転写因子HNF4の発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Proteasomal regulation of HNF4 alpha protein by hypoxia in pancreatic beta-cells.

研究代表者

佐藤 叔史 (SATO, Yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90622598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子HNF4は膵細胞からのインスリン分泌に必須の分子であるが、低酸素によりその蛋白発現が著明に低下する。しかしその分子メカニズムは不明であった。本研究によって、低酸素によるAMPKの活性化がHNF4の発現低下に関与していることが明らかになった。低酸素によるHNF4蛋白の著明な発現低下は、転写レベルの制御ではなく翻訳後修飾により強く制御されており、低酸素条件下およびAMPK活性化条件下においてHNF4蛋白はユビキチン・プロテアソーム経路を介して積極的に分解されていることが判明した。今後、in vivoでも低酸素によりHNF4の発現が低下しているかが重要な検討課題である。

研究成果の概要(英文)：HNF4 alpha, a beta-cell transcriptional factor, is a key molecule for insulin secretion from pancreatic beta-cells. Although we found that HNF4 alpha protein was significantly reduced by hypoxia, its molecular mechanism was unclear so far. In this study, we demonstrated that hypoxia-induced activation of AMPK suppresses HNF4 alpha protein levels not via transcriptional regulation, but via ubiquitin-proteasome pathway mediated degradation in vitro. Further experiments are needed to see whether HNF4 alpha protein might be reduced by hypoxia or AMPK activators in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：糖尿病 転写因子 インスリン分泌 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン需要の高い膵細胞では、酸素の受給バランスが崩れやすいために、細胞内が容易に低酸素に陥ること (invitroでの検討) 更に肥満 2 型糖尿病モデルマウス (ob/ob マウス) 膵島は糖負荷時に著明に低酸素化されていることを見出し (in vivo での検討) 糖尿病の膵島が低酸素ストレスに曝されていることを明らかにした (Sato Y. JBC 2011)。

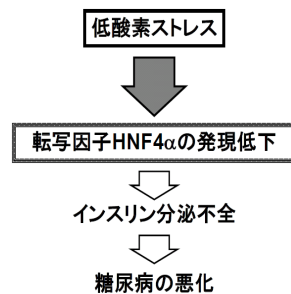
しかし膵島の低酸素ストレスを、糖尿病時の膵細胞機能障害メカニズムの一つとして想定した研究は認められない。

(2) 転写因子 HNF4、HNF1、PDX-1、HNF1、NeuroD の遺伝子異常により、インスリン分泌不全型の糖尿病 (Maturity onset diabetes of the young; MODY) が発症する (Fajans. N Engl J Med 2001) ことが知られている。膵細胞株 MIN6 細胞を低酸素に暴露した時に、これらの遺伝子群の中で HNF4 蛋白の発現が著明に低下することを新たに見出した。

(3) 転写因子 HNF4 は zinc フィンガー型核内転写因子の 1 つであり、MODY1 の原因遺伝子である (Yamagata K. Nature 1996)。また膵細胞特異的 HNF4 ノックアウトマウスはインスリン分泌不全を呈し (Miura. JBC 2006)、HNF4 は膵細胞からのインスリン分泌に必須の分子である。

(4) 肥満 2 型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウス膵島は低酸素化されているが同時に HNF4 の発現も低下していた。

(1)~(4) の背景から、肥満糖尿病の膵島は、低酸素ストレスに曝されており、HNF4 の発現低下が生じる。HNF4 の発現低下は、インスリン分泌不全を助長し、糖尿病の高血糖を増悪させる一要因になるといふ新たな糖尿病進展機構を着想するに至った (右図)。



## 2. 研究の目的

本研究では、低酸素ストレスが HNF4 の発現を低下させる分子メカニズムを in vitro、in vivo において明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 低酸素による HNF4 発現調節の解析

#### 転写レベルの発現解析

マウス膵細胞株である MIN6 細胞を低酸素に暴露した後、トータル RNA を調製、cDNA を合成しリアルタイム PCR 法により HNF4 mRNA の発現を検討した。

#### 蛋白レベルの発現解析

同様の条件で回収した蛋白サンプルと HNF4 特異的抗体を用いてウエスタンブロッ

ティング法により、HNF4 蛋白を検出し、そのシグナルの強度を定量・数値化した。

### (2) HNF4 発現低下に関連している低酸素シグナルの検討

#### 低酸素誘導因子 HIF1 の関与

HIF1 ノックダウン MIN6 細胞を作製し、低酸素による HNF4 蛋白発現低下に HIF1 が関与しているかどうかをウエスタンブロットティング法にて検討した。さらに HIF1 安定化剤 (DF0) および恒常的活性型 HIF1 が HNF4 蛋白に与える影響を検討した。

#### AMPK の関与

AMPK の活性化剤 (AICAR、メトフォルミン) およびカルシウムイオノフォア (A23187) が HNF4 蛋白に与える影響を検討した。また AMPK シグナルの阻害剤 (Compound C) と CAMK の阻害剤 (STO-609) を用いることで低酸素による HNF4 蛋白発現低下に AMPK が関与しているかどうかをウエスタンブロットティング法にて検討した。

### (3) HNF4 蛋白の安定性に関する検討

低酸素および AMPK 活性化剤が遺伝子導入して発現させた FLAG-HNF4 蛋白に与える影響を、FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットティング法にて検討した。

タンパク翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加後、低酸素条件下あるいはメトフォルミン存在下で HNF4 蛋白の発現変化を検討し分解速度を算出した。

低酸素条件下あるいはメトフォルミン存在下での HNF4 蛋白の分解にユビキチン・プロテアソーム経路が関与しているかを、タンパク分解阻害剤 MG132 を用いて検討した。

### (4) 生体内における HNF4 発現調節の解析

Invitro で確認できたように、低酸素による HNF4 発現低下やメトフォルミンによる HNF4 発現低下が生体内でも再現できるかを検討する。マウスにメトフォルミンを投与した後、膵島を単離しウエスタンブロットティング法にて HNF4 蛋白発現を検討する。またマウス個体を低酸素環境 (7 %O<sub>2</sub>) に暴露した後に同様に HNF4 蛋白発現を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素による HNF4 発現調節の解析

MIN6 細胞を低酸素に暴露した時、HIF1 蛋白の発現誘導を認め、低酸素関連遺伝子 (解糖系遺伝子など) の有意な発現上昇を認めた。この時、細胞関連の転写因子に注目して検討したところインスリン合成やインスリン分泌機構に関与する転写因子 Mafa、Pdx1 の著明な mRNA 発現の低下を認める一方で、HNF4 mRNA の軽度な発現低下を認めた。更に蛋白レベルでの評価を行ったところ、低酸素によって HNF4 蛋白が著明に低下することが判明した。すなわち低酸素による HNF4 発現の低下に関して、蛋白レベルと転写レベルとは乖離があり転写調節による制御は軽度であるのに対し、翻訳後修飾により強く制御

されていると考えられた。このことから、低酸素による HNF4 蛋白の低下機序に着目して以降の検討を行った。

## (2) HNF4 発現低下に關与している低酸素シグナルの検討

低酸素は、細胞内の種々のシグナルを活性化することで細胞機能あるいは細胞生存に影響を与えている。低酸素誘導因子 (HIF) は低酸素応答の主要な調節因子であるので、次に低酸素による HNF4 蛋白の抑制に HIF が關与しているかどうかを検討した。HIF1 ノックダウン MIN6 細胞を作製し、低酸素に暴露した。この時の HNF4 蛋白低下への影響を検討したところ、低下度に有意な差は認められなかった。また遺伝子導入や薬剤によって通常酸素下において HIF1 を恒常的に発現させた場合においても、HNF4 蛋白の発現に変化を認めなかった。つまり低酸素による HNF4 蛋白の低下に HIF の關与は否定的であった。

次に、低栄養や低酸素状態で活性化される AMPK シグナルの關与について検討した。MIN6 細胞に対して AMPK の活性化剤である AICAR やメトフォルミンを添加した時、HNF4 蛋白の発現は有意に低下した。またその発現低下の度合いは薬剤濃度に依存した (図 1)。細胞内カルシウムの上昇は CAM キナーゼを活性化し、AMPK の活性化を引き起こすことが知られていたため、カルシウムを強制的に細胞内に取り込ませるカルシウムイオノフォア (A23187) を細胞に添加し AMPK を活性化させた時の HNF4 蛋白の発現を検討した。その結果、A23187 によっても HNF4 蛋白の発現著明に低下した。さらに低酸素による AMPK の活性化が HNF4 蛋白の発現低下に重要かどうかを検討するため、AMPK 阻害剤 (Compound C) および CAMK 阻害剤 (STO-609) を同時添加した。その結果 HNF4 蛋白の発現低下が抑制されたことから、低酸素によって引き起こされる AMPK 活性化が HNF4 蛋白の抑制に關与していることが明らかとなった。

このように低酸素で発現が調節される遺伝子群は、HIF 経路の影響を受ける報告が多いが、今回の HNF4 の場合は HIF 経路の關与はなく、低酸素で活性化される AMPK が発現低下に重要な役割を果たしているという新見を得ることができた。

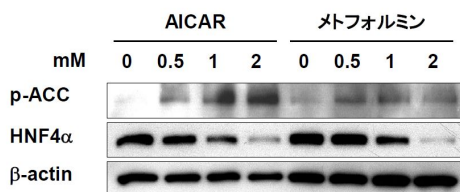


図1 AMPK活性化剤によるHNF4 $\alpha$ 蛋白の減少

## (3) HNF4 蛋白の安定性に関する検討

上記の結果より、低酸素条件下では HNF4 蛋白の安定性が変化していることが考え

られたので、蛋白翻訳阻害剤シクロヘキシミドを添加し細胞内の HNF4 蛋白の経時的変化について検討した。その結果、低酸素条件下ならびにメトフォルミン存在下では HNF4 蛋白の分解速度が上がるのが明らかになった (図 2, 低酸素条件のデータのみ提示)。またこの分解速度の上昇はタンパク分解阻害剤である MG132 でキャンセルできることから、ユビキチン・プロテアソーム経路による蛋白分解の亢進によるものであると結論付けた。このように翻訳後修飾による調節であることから、細胞外から遺伝子導入し発現させた HNF4 蛋白に対しても、低酸素およびメトフォルミンはその蛋白発現抑制効果を発揮した。

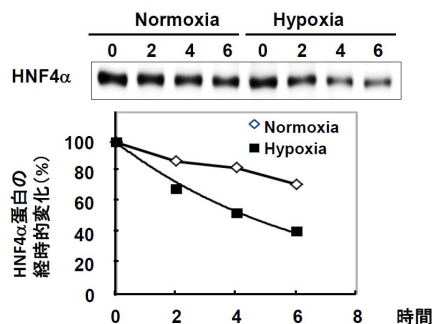


図2 シクロヘキシミド添加後のHNF4 $\alpha$ 蛋白の分解速度

## (4) 生体内における HNF4 発現調節の解析

以上の検討より低酸素下での AMPK 活性化が HNF4 の蛋白分解速度を規定していると考えられた。生体内でも同様の現象が見られるかを検討する必要がある。現在マウスに対して、AMPK 活性化剤メトフォルミンを持続的に投与し、in vivo での HNF4 の蛋白発現について検討を進めているところである。まだ条件の最適化などを行っている段階であり有力なデータは得られていない。しかしながら、今後マウス個体を低酸素環境に暴露するなどの検討も含め継続して行っていく予定である。

## (5) まとめと展望

本研究では、低酸素条件下で蛋白レベルで著明に低下する転写因子 HNF4 に着目し、その発現低下の分子メカニズムの解明を目指した。低酸素で発現制御を受ける多くの遺伝子は、HIF 経路の影響を受けることが報告されているが、HNF4 に関しては HIF 経路の關与はなく、低酸素で活性化される AMPK が HNF4 発現低下に重要な役割を果たしていた。分子機序としても非常に興味深い。膵細胞機能の回復効果を見込んだ治療薬の開発に繋がるだけでなく、AMPK を治療標的とした糖尿病治療薬がすでに汎用されていることから薬剤選択の際に有益な情報となることが期待される。

研究期間全体を通して、当初の研究計画とは異なるアプローチになってしまったが、低酸素が HNF4 の発現を低下させるメカニズ

ムの一端を明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Karim MF, Yoshizawa T, Sato Y, Sawa T, Tomizawa K, Akaike T, Yamagata K. Inhibition of H3K18 deacetylation of Sirt7 by Myb-binding protein 1a (Mybbp1a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441:157-63, 2013 査読あり  
DOI:10.1016/j.bbrc.2013.10.020.

Ohki T, Sato Y, Yoshizawa T, Yamamura K, Yamada K, Yamagata K.

Identification of hepatocyte growth factor activator (Hgfac) gene as a target of HNF1 in mouse  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425: 619-24, 2012 査読有り

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.07.134.

Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, Wei FY, Sato S, Magnuson MA, Gonzalez FJ, Tomizawa K, Akaike T, Yoshizawa T, Yamagata K. Anks4b, a novel target of HNF4 interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 287: 23236-45, 2012 査読有り

DOI:10.1074/jbc.M112.368779

[学会発表](計6件)

佐藤叔史、井上正宏、山縣和也

軽度低酸素による膵細胞障害機構の検討 学会名:第36回日本分子生物学会年会 場所:神戸 2013年12月3日 査読あり(ポスター1P-0904)

佐藤叔史

低酸素による糖代謝異常の解析 学内発表:第1回熊本大学医工連携フォーラム 場所:熊本 2013年5月29日

佐藤叔史、井上正宏、山縣和也

軽度低酸素による膵細胞障害機構の検討 学会名:第56回日本糖尿病学会年次学術集会 場所:熊本 2013年5月16日 査読あり(ポスター1-P-344)

Yoshifumi Sato, Masahiro Inoue, Kazuya Yamagata

Moderate hypoxia impairs glucose stimulated insulin secretion and accelerates apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. 学会名:Beta Cell Workshop 2013 場所:京都 2013年4月23日~26日 査読あり(ポスターP-25)

Yoshifumi Sato, Masahiro Inoue, Iichiro Shimomura, Kazuya Yamagata

Cellular hypoxia caused dysregulation of HNF4 expression in pancreatic  $\beta$ -cells. 学会名:The 33rd NAITO CONFERENCE 場所:CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO (北海道) 2012年6月26-29日 査読あり

(ポスターPS[ ]-16)

佐藤叔史、井上正宏、下村伊一郎、山縣和也

膵島低酸素による転写因子 HNF-4 の発現低下機構の解析 学会名:第55回日本糖尿病学会年次学術集会 場所:横浜 2012年5月17-19日 査読あり(ポスター -P-211)

[図書](計2件)

佐藤叔史、山縣和也、井上正宏

科学評論社 内分泌・糖尿病・代謝内科 35: 264-269, 2012 低酸素と糖尿病、癌

佐藤叔史、山縣和也

羊土社 :146-152,2012 実験医学増刊 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患 監修:山本雅之、膵細胞における低酸素応答と糖代謝異常

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep t/biochem2/biochem2.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤叔史(SATO, Yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号:90622598

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

山縣 和也(YAMAGATA, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号:70324770

井上 正宏(INOUE, Masahiro)

大阪府立病院機構大阪府立成人病センター・生化学部門 部長  
研究者番号:10342990

岡本 士毅(OKAMOTO, Shiki)

自然科学研究機構生理学研究所・助教  
研究者番号:40342919