

氏名	いな だ あか り 稲 田 明 理
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2307 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	The regulation of insulin gene transcription by CREM family (転写因子 CREM によるインスリン遺伝子の転写調節) (1) The Cyclic AMP Response Element Modulator Family Regulates The Insulin Gene Transcription by Interacting Transcription Factor II D (CREM と TF II D の相互作用によるインスリン遺伝子の転写調節) (2) Transcriptional Repressors Are Increased in Pancreatic Islets of Type 2 Diabetic Rats (2 型糖尿病ラット膵ラ氏島における転写抑制因子の増加)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 清 野 裕

論 文 内 容 の 要 旨

グルコースおよび膵β細胞内の cAMP の濃度上昇はインスリン遺伝子の転写を促進させるが、これらの刺激に対応して転写を調節する *cis*-acting element の一つに cAMP response element (CRE) がある。ヒトインスリン遺伝子には CRE に類似した塩基配列が 4ヶ所存在することが報告されているが、どのような転写因子が関与し転写を制御しているかは明らかでない。そこで、CRE に結合する蛋白として転写因子 CREM (CRE Modulator) に着目し、CREM によるヒト・インスリン遺伝子の転写調節機構を検討した。

(1) 膵β細胞における CREM の発現

ラット膵の連続切片を用いて抗インスリン抗体、抗 CREM 抗体にて免疫組織染色を行った。膵ラ氏島において抗インスリン抗体陽性の細胞は抗 CREM 抗体陽性であり CREM が膵β細胞に発現していることが明らかとなった。さらに、ラット膵ラ氏島より抽出した RNA を用い RT-PCR 法にて isoform の発現を検討し、選択的スプライシングや intronic promoter により 8 種類の CREM isoform の発現を認めた。5 つ (CREM $\tau\alpha$, CREM α , ICER I, ICER I γ , CREM17) は既知のものであり 3 つ (CREM Δ Q1, CREM Δ Q2, CREM17X) は新しい isoform であった。

(2) ヒトインスリン遺伝子のプロモータ活性に及ぼす影響

各 CREM isoform を発現ベクターに組み込み、ヒト・インスリン遺伝子のプロモータ領域を含むリポータープラスミドと共に HIT-T15 細胞 (ハムスター膵β細胞由来細胞株) に遺伝子導入した。CREM $\tau\alpha$, CREM Δ Q1, CREM Δ Q2 はヒト・インスリン遺伝子のプロモータ活性をそれぞれ約 9 倍, 8 倍, 2 倍亢進し, activator として機能した。一方, CREM α , ICER I, ICER I γ , CREM17, CREM17X は約 50-25% にまで抑制し repressor として作用した。次に activator と等量の repressor を HIT-T15 細胞に共発現させヒト・インスリン遺伝子のプロモータ活性に与える影響を検討した。Activator によって活性化されたヒト・インスリン遺伝子のプロモータ活性は repressor によって 50-30% にまで抑制され, repressor は強い抑制能を示した。

(3) 転写を導く基本転写因子との直接結合

転写開始複合体の必須因子である TBP および TAF $_{II}$ 130 と CREM isoform との直接結合を検討した。activator (CREM $\tau\alpha$, CREM Δ Q2) は TBP と TAF $_{II}$ 130 の両方に結合したが, repressor (ICER I γ) は TBP, TAF $_{II}$ 30 ともに結合しなかった。activator は転写活性化領域を介して TAF $_{II}$ 130 と結合すること, さらに基本転写因子と結合することによりプロモータとの結合を安定化し機能を増強することが明らかになった。

(4) ヒトインスリン遺伝子 CRE への結合

CREM α , CREM Δ Q2, ICER I γ GST 融合蛋白を精製し, ヒト・インスリン遺伝子に結合するか否かをゲルシフトアッセイにて検討した。それぞれの蛋白はヒト・インスリン遺伝子の CRE 類似配列 4 ケ所すべてに結合し, CRE 類似配列が CRE として機能することが明らかとなった。次に, activator である CREM α および CREM Δ Q2 と repressor の ICER I γ が CRE への結合に競合するか否かを検討した。ICER I γ が増加するにつれ CREM α または CREM Δ Q2 の CRE への結合が減少した。また, ICER I γ と CREM α が等量の場合, ICER I γ が CREM α の CRE への結合を阻害したことから, repressor は DNA に対する結合能が高く activator の DNA への結合を競合し阻害することが明らかになった。

(5) 2 型糖尿病モデル動物における CREM isoform の発現量

2 型糖尿病モデル動物 (GK ラット) の膝ラ氏島より抽出した RNA を用い competitive PCR 法にて CREM isoform の発現量を検討した。精巢では対照の Wistar ラットに比し CREM isoform の発現量に変化は認められなかったが, 膝ラ氏島では repressor (ICER1, ICER I γ , CREM17, CREM17X) の発現が増強していた。

以上のことより, ヒトインスリン遺伝子の転写調節に CREM isoform が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また, repressor が activator を競合的に阻害することを考え合わせると, 増加した repressor がヒトインスリン遺伝子の転写を阻害していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ヒト・インスリン遺伝子には cAMP 応答配列 (CRE) 類似配列が 4 ケ所存在する。

申請者はヒト・インスリン遺伝子の転写調節機構を解明するため, CRE に結合すると推測される転写因子 CREM (CRE Modulator) に着目し機能解析を行った。

ラット膝 β 細胞における CREM の発現を検討し, 5 つの既知の isoform (CREM α , CREM α , ICER1, ICER I γ , CREM17) と 3 つの新規の isoform (CREM Δ Q1, CREM Δ Q2, CREM17X) を同定した。これらの CREM isoform はヒト・インスリン遺伝子の CRE 類似配列 4 ケ所すべてに結合し, 転写活性を強力に亢進あるいは抑制した。ICER I γ (repressor) は CREM α および CREM Δ Q2 (activator) CRE への結合を競合, 阻害した。

また, 基本転写因子との相互作用を検討したところ, activator は TBP と TAF $_{II}$ 130 の両方に結合したが repressor はどちらにも結合しなかった。さらに, 2 型糖尿病モデル動物の膝ラ氏島において repressor の発現量の増加を認めた。

以上の結果より, ヒト・インスリン遺伝子の転写は CRE 類似配列に結合した CREM activator が基本転写因子と相互作用することにより活性化され, repressor が activator の DNA への結合を競合阻害することによって抑制されることが明らかになった。

以上の研究はヒト・インスリン遺伝子転写調節機構とその異常を明らかにし, 糖尿病の病因解明に寄与するところが大きい。

したがって, 本論文は博士 (医学) の学位論文として価値があるものと認める。

なお, 本学位授与申請者は, 平成12年12月11日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格とみとめられたものである。