

氏 名	ばん のぶ ひろ 坂 信 広
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 119 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	人間・環境学研究科人間・環境学専攻
学位論文題目	Functional Analysis of Gene Transcriptional Regulation in the Pancreatic β -cells. (膵 β 細胞における遺伝子転写調節の機能的解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 津 田 謹 輔 教授 家 森 幸 男 教授 森 谷 敏 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は膵 β 細胞に発現する遺伝子の転写調節機構についてまとめたものである。第1章では転写因子 ATF-2 によるグルコース応答性インスリン遺伝子転写制御の分子機構を、第2章では MODY3 の原因遺伝子である転写因子 HNF-1 α の標的遺伝子の同定とその転写活性化機構について検討した。

(1)生体の血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンの生合成、および分泌能の低下は、糖尿病の病態と密接に関係している。インスリンは組織特異的発現を示す代表的な遺伝子であり、その遺伝子発現は膵 β 細胞にのみ局在する。膵 β 細胞においてグルコースが直接インスリン遺伝子発現を亢進することが、インスリン分泌の機構と共に知られているが、このグルコース応答性インスリン遺伝子転写制御の分子機構はいまだに解明されていなかった。インスリン遺伝子転写調節領域には cAMP/Ca²⁺ 応答配列 (CRE) が存在し、そこに結合する転写因子 ATF-2 に焦点をあてた。

生理学的な条件下でラットの単離膵ラ氏島において、グルコースで誘導されたインスリンプロモーターの活性化は ATF-2 により増強したが、転写因子のファミリーである CREB では抑制を示し、膵 β 細胞における転写因子の役割の特異性を明らかにした。さらに8週齢の雄性ラット膵組織の連続パラフィン切片を作製し、抗インスリン抗体及び抗 ATF-2 抗体を用いて免疫染色 (ABC 法) を行った結果、ATF-2 の膵 β 細胞の核における発現を確認し、転写因子として局在していることが示唆された。次に、インスリン分泌細胞株に ATF-2 の発現ベクター、及びインスリンプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼプラスミドを遺伝子導入し、42時間培養後、glibenclamide を6時間負荷することで細胞内カルシウムイオン濃度の上昇させた。これによりインスリン遺伝子の発現は増強されたが、EGTA 及び KN-93 の同時負荷によりその発現増強は完全に消失した。この結果は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による CaMKK の活性化を示し、インスリン遺伝子の発現調節に CaM kinase カスケードの存在を示唆している。また CaM kinase は Ser/Thr kinase であることから、PCR 法を利用した site-directed mutagenesis 法により ATF-2 の転写活性化領域の Ser/Thr site を Ala に置換することで Thr69, Thr71, Thr73 の3カ所が CaMKIV によるリン酸化部位であることを明らかにした。また、この CaMKIV による ATF-2 の転写活性化は JNK, p38 MAP kinase を介したものではなかった。さらに、CaMKIV の発現は脳、脾臓、胸腺、T 細胞に限られていると報告されていたが、RT-PCR 法、Western blotting 法により膵ラ氏島及びインスリン分泌細胞株にも発現を認めた。

また、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により ATF-2 の Thr71 site はリン酸化されていた。この結果は mutagenesis 法による結果と一致するものであった。

(2)常染色体優性の遺伝形式を示し、通常25歳以下の若年で発症する単一遺伝子異常による糖尿病、MODY (maturity-onset type diabetes of the young) は転写因子 HNF-1 α の遺伝子変異が原因である。MODY の病態は主にインスリン分泌不全による糖尿病であることから、HNF-1 α の膵 β 細胞内における標的遺伝子が注目されている。

今回、HNF-1 α の標的遺伝子の1つとして糖輸送担体 GLUT2 を同定し、その GLUT2 プロモーター領域における HNF-

1 α の結合領域を+200から+218であることを Deletion analysis 及び DNase I footprint 法により決定した。さらに HNF-1 α は転写の co-activator である p300と結合することにより、転写調節が行われることを示した。またそれぞれの蛋白のどの領域が結合に重要であるかを mammalian two-hybrid 法及び免疫沈降法により検討したところ、HNF-1 α のアミノ酸 391—540の領域が p300 のアミノ酸180-662とアミノ酸1818-2079の2つの領域において結合することを明らかにした。また、HNF-1 α と p300 は共に膵 β 細胞に発現していることを免疫染色法により示した。さらに MODY3 患者の HNF-1 α の遺伝子変異は単一遺伝子異常としては最も高頻度に認められる糖尿病であり、HNF-1 α の機能の loss of function 型と dominant negative 型の変異が存在するが、dominant negative 型の変異は p300 との結合領域に多く存在することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

糖尿病はインスリンの分泌・作用の障害によって高血糖をきたす遺伝的素因の濃厚な疾患であり、その背景には膵 β 細胞の遺伝子発現調節機構の異常が重要な因子の一つとして考えられるが、その詳細な分子機構については今なお明らかではない。一般に全ての細胞において、遺伝子発現は転写レベルにおける調節が最も重要な過程であると思われる。遺伝子転写開始部位の近傍に存在する転写調節領域に転写因子が複数結合し、それらの因子間の相互作用により転写が調節される。インスリン分泌という高度に分化した膵 β 細胞の転写調節機構は、エンハンサー領域に結合する特異的な転写因子により規定されていると考えられる。申請者は今まであまり研究が行われていなかったグルコース応答性インスリン遺伝子発現調節機構と MODY3 の原因遺伝子である転写因子 HNF-1 α の標的遺伝子の同定、およびその転写活性化機構について研究を行った。

申請者は、インスリン遺伝子のプロモーター領域に存在する CRE (cAMP/Ca²⁺ response element) に結合する転写因子 ATF-2に焦点をあて、その活性が細胞内情報伝達系によりどのように調節されているか検討した。まず細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によりインスリン遺伝子の発現は増強されたが、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase inhibitorによりその増強は消失し CaM kinase がインスリン遺伝子の発現調節に関与していると考えられた。CaM kinase は I~V まで同定されているが、mutagenesis study により膵 β 細胞では CaMKIV が膵 β 細胞の核内に存在する転写因子 ATF-2 の Thr69, Thr71, Thr73 の3カ所をリン酸化することで、ATF-2の転写活性化される事を解明した。さらにラットの単離膵ラ氏島において、グルコースの誘導によるインスリンプロモーターの活性化は ATF-2により増強したが、転写因子のファミリーである CREB では抑制を示し、膵 β 細胞における ATF-2 と CaMKIV の役割を明らかにした。この研究は Diabetes 49; 1142-1148 (2000) にすでに報告している。

さらに申請者は、常染色体優性の遺伝形式を示し、通常25歳以下の若年で発症する単一遺伝子異常による糖尿病、MODY (maturity-onset type diabetes of the young) 3の原因遺伝子である転写因子 HNF-1 α の標的遺伝子の同定及び、その転写活性化機構について研究を行った。その結果、HNF-1 α の標的遺伝子の1つとして糖輸送担体 GLUT2を同定し、その GLUT2 プロモーター領域における HNF-1 α の結合領域を+200から+218であることを Deletion analysis 及び DNase I footprint 法により決定した。さらに HNF-1 α は転写の co-activator である p300と結合することにより、転写調節が行われることを示した。また、それぞれの蛋白のどの領域が結合に重要であるかを mammalian two-hybrid 法及び免疫沈降法により検討した結果、HNF-1 α のアミノ酸391-540の領域が P300のアミノ酸180-662とアミノ酸1818-2079の2つの領域において結合することを明らかにした。さらに HNF-1 α と p300 は共に膵 β 細胞に発現していることを免疫染色法により示した。この研究は MODY 患者の新しい遺伝子治療に道を切り開く可能性があり、今後の発展が期待できる。

申請者の研究は、今まで未解決の点が多かった膵 β 細胞の遺伝子発現調節機構の解明に貢献し、また、グルコース応答性インスリン遺伝子発現調節機構の応用により ES 細胞からグルコース応答性インスリン分泌機能を持つ膵 β 細胞の作製という再生医学に役立つ可能性を示し、糖尿病患者の治療に大きく貢献すると期待できる。

よって本論文は博士(人間・環境学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成13年1月10日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。