

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	吉原 栄治
論文題目	Thioredoxin binding protein-2(TBP-2)による糖・脂質代謝制御機構の解析		
（論文内容の要旨） ヒトを含む哺乳類の個体レベルにおける糖代謝の恒常性は、膵臓の膵島に存在する β 細胞（膵 β 細胞）からのインスリン分泌量と末梢組織でのインスリン感受性によって厳密に制御されている。一方、過栄養状態になり脂肪組織が肥大化すると脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの影響を受け、膵 β 細胞からのインスリンの分泌能と末梢組織でのインスリン感受性がともに低下して、高血糖を特徴とする 2 型糖尿病を引き起こすことが知られている。しかしながら、この糖代謝の恒常性の破綻がどのような分子メカニズムで引き起こされるかは明らかではない。これまでに私の所属する研究室においてチオレドキシンと結合する蛋白質として同定された Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)は、様々な組織に発現し、核に局在することが知られている。その後の解析で、TBP-2 は絶食時に発現が亢進する分子であることが明らかとなり、当研究室で作製された TBP-2 遺伝子欠損マウスが絶食時に低血糖、高インスリン値、高脂血症を引き起こし死に至ったことから、TBP-2 は飢餓時の血糖値の維持に必須の分子であることが推測されていた。さらに最近になって、TBP-2 の発現が、絶食時のみでなく 2 型糖尿病患者の骨格筋においても亢進していることが報告された。 このような背景のもと、申請者は 2 型糖尿病モデルである ob/obマウスの膵島や骨格筋において、TBP-2 の発現が野生型マウスと比較し顕著に亢進していることを見出した。そこでTBP-2 を欠損したob/obマウスを作製し詳細な解析を行った。その結果、TBP-2 欠損のob/obマウスは、通常のob/obマウスと同等な肥満を示したが、高血糖を引き起こさない糖尿病耐性を示すことが明らかとなった。肥満は末梢組織でのインスリン感受性の低下と膵β細胞障害を引き起こすことが知られているが、TBP-2 欠損のob/obマウスでは骨格筋でのインスリンによる細胞内へのグルコースの取り込みを担う分子である insulin receptor substrate-1 (IRS-1)$\rightarrow$Akt シグナルの活性化を伴ってインスリンの感受性が亢進しており、また膵β細胞においてはミトコンドリア脱共役を引き起こし、インスリン分泌を抑制する分子であるuncoupling protein-2 (UCP-2) の発現低下を伴ってグルコース刺激性のインスリン分泌が改善していた。これらの結果は肥満によるインスリン抵抗性やインスリン分泌不全はTBP-2 依存的に引き起こされていることを示している。さらに、TBP-2 によるインスリン分泌制御機構を詳細に検討するため、TBP-2 発現を誘導可能な INS-1 膵β細胞株を構築した。膵β細胞株においてTBP-2 の発現を亢進させると、UCP-2 の発現増加を伴ってグルコースによるATP産生、細胞内Ca²⁺流入やインスリン分泌が抑制されることが明らかになった。この時、UCP-2 プロモーター上へのperoxisome proliferator activated receptor γ-coactivator-1 α (PGC-1α)の動員の増加とUCP-2 の転写活性化が観察された。一方、TBP-2 タンパク質を結合させた磁性ナノビーズを用いたINS-1 細胞株におけるTBP-2 の結合因子の解析から、PGC-1αの機能抑制分子であるMyb binding protein 1a (Mybbp1a)が、TBP-2 と結合していることを示した。さらに、Mybbp1aはPGC-1αによるUCP-2 転写活性化能を抑制するが、TBP-2 との共発現ではその抑制作用が失われることを明らかにした。これらの結果は膵β細胞でのTBP-2$\rightarrow$Mybbp1a$\rightarrow$PGC-1αを介した新たなインスリン分泌制御機構と骨格筋でのTBP-2$\rightarrow$IRS-1$\rightarrow$Aktを介したインスリン感受性制御機構の存在を示している。 以上の解析結果から、TBP-2 は、本来哺乳類では飢餓時にインスリンの感受性と分泌反応の両方を抑制することで血糖値を維持するために機能する分子であるが、人類が初めて体験する飽食時代では、これらの抑制作用が血糖値を増加させるため、過栄養時の糖尿病の発症もしくは悪化をもたらすことに中心的な役割を果たす分子であると考えられる。2 型糖尿病時に発現が亢進する TBP-2 の発現抑制は、肥満であっても高血糖を惹起しないことが明らかとなったため、本研究から TBP-2 を標的とした新たな糖尿病治療薬開発が期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

糖代謝の恒常性は、膵臓β細胞からのインスリン分泌量と末梢組織でのインスリン感受性によって厳密に制御されている。2型糖尿病では、インスリンの分泌能とインスリン感受性がともに低下して、糖代謝の恒常性の破綻を引き起こすことが知られているが、この破綻の分子メカニズムは明らかではない。また、Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)は、飢餓応答に必須の分子であり、インスリン分泌やインスリン感受性を調節していることが報告されていたが、その詳細な分子機構は不明であった。

申請者は2型糖尿病モデルであるob/obマウスの膵島や骨格筋において、TBP-2の発現が野生型マウスと比較し顕著に亢進していることを示し、TBP-2を欠損したob/obマウスを作製して詳細な解析を行った。TBP-2欠損のob/obマウスは、ob/obマウスと同様に肥満を示したが、高血糖を引き起こさないことを明らかにした。

TBP-2欠損のob/obマウスでは、ob/obマウスで見られるグルコース刺激性のインスリン分泌低下が改善していた。単離膵島を用いた実験でも、TBP-2欠損のob/obマウスでは、ob/obマウスで見られるグルコース刺激性のインスリン分泌とATP産生の低下が改善していた。ラット膵β細胞株INS-1細胞を用いて、ドキシサイクリン除去依存的にTBP-2の発現を誘導する細胞を作成して検討したところ、TBP-2の過剰発現はグルコースによるインスリン分泌とATPの産生を抑制することを示した。膵β細胞ミトコンドリアにおいてグルコースによるインスリン分泌とATP産生の抑制に重要な役割を果たしているuncoupling protein-2 (UCP-2)に注目して検討を行った。UCP-2の膵島での発現はob/obマウスで上昇しており、TBP-2欠損のob/obマウスでは低下していた。INS-1細胞において、TBP-2を過剰に発現させると、UCP-2のmRNAレベルが増加し、UCP-2プロモーターを活性化することを示した。さらに、TBP-2はUCP-2プロモーター上へのperoxisome proliferator activated receptor γ -coactivator-1 α (PGC-1 α)の結合を増加させることをクロマチン免疫沈降法で示した。これらの結果より、TBP-2はPGC-1 α のUCP-2プロモーター上への動員の増加を介して、グルコースによるATP産生とインスリン分泌調節を行っていると考えられる。さらにINS-1細胞株におけるTBP-2の結合因子の解析から、PGC-1 α の機能抑制分子であるMyb binding protein 1a (Mybbp1a)が、TBP-2と相互作用しうることを示した。Mybbp1aはPGC-1 α によるUCP-2転写活性化能を抑制するが、TBP-2を共発現させると、その抑制作用が失われることを明らかにした。

一方、TBP-2欠損のob/obマウスでは、ob/obマウスと比較してインスリン感受性が回復していた。その機構として、TBP-2欠損によりインスリンシグナルに重要な分子insulin receptor substrate-1 (IRS-1)の骨格筋での発現が転写レベルで上昇しており、Aktシグナルの活性化が回復していることが示された。

以上の結果は、糖代謝の恒常性調節にTBP-2が重要な役割を果たしていることを明らかにしただけでなく、TBP-2は、PGC-1 α のUCP-2プロモーター上への動員の調節を介して、UCP-2の転写制御を行うことにより、グルコース刺激性のインスリン分泌調節を制御している分子機構を明らかにしたことで、糖代謝における転写調節分子機構の解明に繋がる研究として評価される。

以上より、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成23年1月28日論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日