

プロテオミクス解析技術を用いた日周リズムの異常がもたらす糖尿病と加齢疾患の分子機構の解明

[1] 組織

代表者：岡野 聡（山形大学医学部）
対応者：安井 明（東北大学加齢医学研究所）
分担者：早坂 清（山形大学医学部）
中島 修（山形大学医学部）
五十嵐 雅彦（山形市立病院済生館）
研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

近年生物時計と種々の疾患との関係が報告されているが、その全容は明らかではなく、研究の課題となっている。CRY1 は生物時計機構において中心的な役割を担っていることはよく知られているが、生物時計における CRY1 の具体的な役割、及び生物時計以外の機能については未知の部分が多い。

申請者らは、以前に時計遺伝子産物のクリプトクロム 1 (mCRY1) に変異を導入した変異型 CRY1 タンパク質 (システイン 414 をアラニンに置換した) を全身的に高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを確立した。これまでに、同マウスは極めて特異な概日リズムの異常を示すこと (リズム分割を伴う極めて長周期のフリーラン周期で活動すること) を見いだした (Okano S *et al.*, *Neurosci Lett.* 451, 2009)。さらに、周期的な給餌刺激 (RF) により誘起される概日リズム (給餌性概日リズム) にも異常を示すことを発見した (国際会議: 第 6 回アジア睡眠学会・日本睡眠学会第 34 回定期学術集会・第 16 回日本時間生物学会学術大会合同大会にて代表者が筆頭演者として発表; 2009 年 10 月)。また同マウスは、若齢から、膵β細胞の機能不全によるインスリン分泌不全を示し、ヒトの遺伝性疾患の若年発症成人型糖尿病 (MODY) と類似した糖尿病を発症することを明らかにした (Okano S *et al.*, *Eur J Clin Invest* 40, 2010; Okano S *et al.*, *J Diabetes Investig* 4, 2013)。同マウスにおいて、老化が加速する兆候も見いだしている。

本共同研究では、変異型 CRY1 を高発現するヒト細胞系を新たに確立し、この細胞と Tg マウス

個体を材料に、上記の概日リズム異常及び病態の原因になる分子メカニズムを、プロテオミクス技術と分子細胞生物学的手法、並びに時間生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。

なお、代表者が定期的に加齢研に出向き、安井明教授とヒト細胞での実験及びプロテオミクス解析等に関して研究打ち合わせを行い、糖尿病と概日リズム解析の研究結果について議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1、マウス個体を用いた糖尿病及び細胞老化の解析

Tgマウスの糖尿病発症機序の解明を目的とし、血糖値が正常で糖毒性の影響がない若齢マウスから膵島を単離し、これを用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、

A, E-box制御下にある種々の時計遺伝子 (PER1, PER2等) 及び出力系遺伝子 (DBP等) の発現が、野生型マウスと比較してTgマウス膵島で強く抑制されていることが判った。一方、E-boxによる直接の制御下にはない時計遺伝子のBMAL1に関しては、発現が亢進していることが判明した。これらの結果から、Tgマウス膵島の生物時計機能は障害されていることがあらためて示された。

B, 膵β細胞においてM₃ムスカリン性アセチルコリン受容体を介するインスリン分泌経路の抑制因子として働くことが報告されている、RGS (regulator of G protein signaling) 4の発現が、Tgマウス膵島で顕著に亢進していることを見いだした。このことは、Tgマウスのインスリン分泌不全の、重要な要因の一つであると考えられる。

C, 細胞老化のマーカーである細胞周期阻害因子 (p15及びp21) の発現が、Tgマウス膵島で増加していることを発見した。さらに老化細胞に特徴的な現象であるSASP (senescence-associated secretory

phenotype)のマーカーである炎症性サイトカイン・ケモカイン (IL-6、MCP-1、CXCL1等) の一群の遺伝子の発現が、野生型と比較して増加していることを明らかにした。

以上の結果から、①変異型CRY1は膵島において時計遺伝子のみならず、膵β細胞のインスリン分泌制御に関与する遺伝子の発現に影響を及ぼすこと、②変異型CRY1は膵島において細胞老化を惹起し、細胞老化と膵β細胞の機能破綻・糖尿病発症は密接に関連していること、が強く示唆された。

2、CRY 発現ヒト細胞株の樹立及び細胞老化の解析及びプロテオミクス解析

変異型CRY1のN末端にFLAGタグを付けたタグ付CRYタンパク質を、テトラサイクリン添加によって誘導的に発現する、HEK293細胞株を樹立した。この細胞を用いて、タグ付CRYタンパク質をテトラサイクリンにて誘導させた後、リアルタイムPCRにて種々の遺伝子の発現を調べた。その結果、

A、変異型CRY1過剰発現細胞では、E-box制御下にある時計遺伝子 (PER2等) の発現が、対照のHEK293細胞と比較して顕著に減少し、BMAL1は増加した。この結果は個体レベルで得られた結果 (上記DNAマイクロアレイ、及び以前の結果Okano S *et al.*, *Neurosci Lett.* 451, 2009) と一致しており、本細胞は変異型CRY1の機能を明らかにする上で適した実験系であることが裏付けられた。

B、RGS4の発現は、変異型CRY1を過剰発現させても変化が見られなかった。HEK293細胞は腎臓由来であり、変異型CRY1は膵β細胞特異的にRGS4の発現を亢進させる可能性が示唆された。

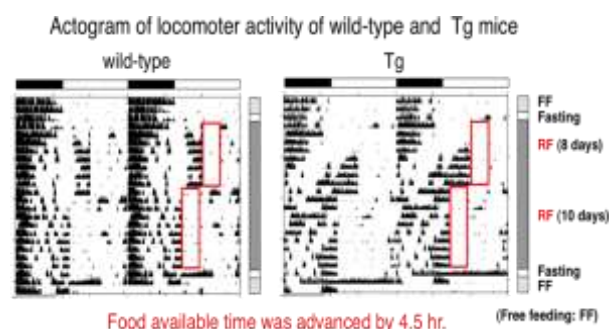
C、細胞老化のマーカーとして細胞周期阻害因子 (p16及びp21)の発現を調べたところ、変異型CRY1過剰発現細胞で増加した。さらにIL-6、IL-1alpha、MCP-1等の一群のサイトカイン・ケモカインを調べたところ、いずれも変異型CRY1過剰発現細胞で対照のHEK293細胞と比較して増加した。

以上の結果から、変異型CRY1は、HEK293細胞においても細胞老化を惹起することが強く示唆された。さらに細胞から抗FLAGタグ抗体を利用して免疫沈降を行い、沈降物をSDS-PAGEで分析し、新規CRY1結合候補タンパク質を見いだした。現在こ

れらタンパク質の同定を、nano LC-MS/MS質量分析装置を用いて行っている。

3、マウス個体を用いた時間生物学的解析

以前の解析において、Tgマウスにおいては同調因子として給餌刺激が明暗刺激よりも優位に働き、Tgマウスの視交叉上核 (SCN) の生物時計は、野生型マウスと異なりRF周期に同調してしまうという、特異な性質を持つことを既に明らかにしている。今年度はRFの時間タイミングを前進させる給餌のjet lag実験を実施したところ、Tgマウスは新たな給餌時刻に合わせてRF同調活動の位相が前進した (下図)。この結果から、TgマウスSCNの生物時計はRFに同調するのみならず、RFの位相前進に合わせて新たなRF時刻に再同調が可能であること示された。現在、時計振動体の特徴をさらに明らかにすべく解析を続けているとともに、代表者が研究成果を論文にまとめている。



(3-2) 波及効果と発展性など

RFにより誘起される概日リズムの分子機構や、活動成分が分割するリズム分割の機構は現在のところほとんど明らかになっていない。25年度の解析を深化させることにより、これらの分子機構やCRY1の時計制御における新たな役割が解明されることが期待される。さらに、未知の膵β細胞の機能の制御機構及び細胞老化制御の分子機構と、時計蛋白質と細胞老化が関与する新しい糖尿病発症の分子機序が明らかになることが期待される。

[4] 成果資料 (学会発表に於ける主要なもの)

(1) 第13回ヨーロッパ時間生物学会 (EBRS Congress 2013 in Munich), Unusual food-entrained circadian rhythm and diabetes mellitus in mutant CRY1 transgenic mice, Okano S *et al.*, ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン, 2013年8月。