

課題番号 6

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

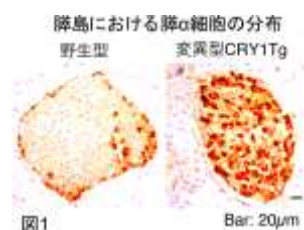
[1] 組織

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 40 万円

[2] 研究経過

本研究は、哺乳動物の概日リズム異常や膵β細胞機能不全の原因になる分子メカニズムを、時間生物学と分子糖尿病学の観点から、プロテオミクス技術を取り入れて明らかにすることを目的としている。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、その詳細に関する理解は不十分であり、研究の課題となっている。哺乳類において、CRY（クリプトクロム）蛋白質は、生物時計機構において中心的な役割を担っていることが、安井教授らにより1999年に明らかにされた(G.T. van der Horst *et al.*, *Nature*, 398, 627-630, 1999)。当時、代表者は、同研究グループにおいて主にショウジョウバエ CRY の単離と解析に携わった(Okano S *et al.*, *Photochem Photobiol*, 69, 108-113, 1999)。この経験を生かし、山形大学に着任後、動物の CRY 間に、種を越えて保存されているシステイン残基を見いだした。なお、この残基は亜鉛結合部位であることが最近明らかにされた(後述)。代表者らは、マウスの CRY1 (mCRY1) の当該システイン残基 (Cys414) をアラニンに置換した変異型 CRY1 タンパク質を全身的に高発現するトランスジェニックマウス (変異型 CRY1-Tg マウス) を確立し、同マウス (以下 Tg マウスと略称) は極めて特異な概日リズムの異常を示すことを示した (変異型 CRY1 の発現量に依存して活動のフリーラン周期が長くなり、高発現ラインではリズム分割を伴う: Okano S *et al.*, *Neurosci Lett.* 451, 246-251, 2009)。さらに若齢から、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, 1011-1017, 2010)。変異型 CRY1 は、E-box 制御下にある時計遺伝子の発現を強く抑制し、変動の振幅

を小さくすることも示した (*Neurosci Lett.*, 2009)。Tg マウス膵島では膵β細胞消失に伴い、膵α細胞の細胞数の増加と分布異常とが見られる (図1: Okano S *et al.*, *J Diabetes Investigation* 4, 428-435, 2013)。



昨年度、若齢 (4 週齢) マウス単離膵島を用いた DNA マイクロアレイ解析により、増殖抑制に働く CDK インビヒターの増加、各種サイトカイン・ケモカイン・組織リモ

デリング因子・分泌因子の増加を示すことを見いだした。SASP (senescence-associated secretory phenotype) と類似の発現パターンを示すこの結果から、Tg マウスの膵β細胞は細胞老化様の状態へと変化し、増殖を低下させることがβ細胞消失の重要な原因であることが示唆された。また、安井教授は、変異型 CRY1 過剰発現 HEK293 細胞を確立した。この細胞を用いプロテオミクス解析を含む種々の実験を実施した。連絡状況に関しては、昨年度に引き続き、代表者が加齢研に出張し、安井教授と研究成果の議論と研究打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

- 1、マウス個体を用いた膵島機能不全の解析
 - 1) Vgf遺伝子の発現が、若齢Tgマウス膵島で野生型と比較し増加していることを新たに見いだした。Vgfはプロホルモンをコードしており、この産物は、膵β細胞の細胞死の抑制効果を有することが報告されている。代表者らは、Tgマウスで膵β細胞のアポトーシスの亢進は認められず、Tgマウスでは野生型マウスと比較してβ細胞の増殖が低下し、このことが同マウスの膵β細胞消失の主因であることを既に報告している (*J Diabetes Investig.*, 2013)。Vgfの増加は、この機序の要因の一つである可能性が考えられる。
 - 2) (A) 昨年度のDNA マイクロアレイ解析により、若齢Tgマウス膵島において膵前膵細胞のマーカー

一であるSox9の発現亢進を認めた。また、発生や分化に関わることが知られるヘッジホッグシグナル経路の因子の亢進も認められた。そこで、膵β細胞の消失が顕著な、成熟Tgマウスの膵臓を用いて、インスリンとSox9の二重免疫染色をおこなったところ、Tgマウスの膵島ではインスリン陰性且つSox9陽性の細胞が多数観察された。これらの結果から、Tgマウスの膵β細胞では脱分化が亢進しており、増殖能低下に加え脱分化の亢進も、膵β細胞の消失の重要な要因であることが強く示唆された。脱分化の誘導の経路の一つとして、ヘッジホッグシグナル経路が関与する可能性が考えられる。

(B) グルカゴン遺伝子の転写に関与する転写因子Foxa1が、若齢Tgマウス膵島で発現が亢進していることを新たに見いだした。得られた結果を総合すると、Tgマウス膵島でβ細胞消失に伴い増加するα細胞(図1)は、脱分化β細胞が分化転換したものに由来することが強く示唆された。

- 3) DNAマイクロアレイ解析の結果を、最新の学問的知見も加味したパスウェイ解析を実施し、発現変動の上流にある転写因子の候補を複数同定した。これらについて抗体を購入し、免疫染色による解析を進めている。免疫細胞の膵島への浸潤についても解析中である。

2、CRY 発現哺乳類細胞の解析

昨年度、変異型CRY1過剰発現HEK293細胞でSASP様の発現パターンが見られることを報告した。各種ケモカイン・サイトカインの発現については、空ベクター導入細胞と比較し、明確に発現は増加するが、野生型CRY1過剰発現細胞でも同様に増加するものもあることから、γH2AXフォーカス形成の程度を解析したが、各細胞間で明確な相違は観察されなかった。HEK293細胞において、細胞老化を誘導するかについては、さらに解析する必要がある。プロテオミクス解析では、新規な結合タンパクの同定には至っておらず、さらに条件を変え探索を行っている。分子機序解明の新たなブレイクスルーとすべく、安井教授がマウス膵β細胞株を宮崎純一教授(大阪大学)から入手し、レンチウイルスを用いた変異型CRY発現系の構築を鋭意行っている。

3、マウス個体を用いた時間生物学的解析

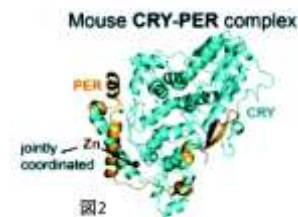
周期的な給餌刺激により誘起される概日リズム(給餌性概日リズム)の恒明条件(LL)でのデータをさらに補強するとともに、代表者が論文執筆を進めている。

(3-2) 波及効果と発展性など

1. 波及効果

国内外の研究者と積極的に交流し、本共同研究の成果を発信した。波及効果の一端として、下記に記すような研究成果の報告がなされている。

既に報告した通り、代表者は昨年度ミュンヘンで開催されたヨーロッパ時間生物学会に出席し共同研究の成果を発表した。その折、ルートヴィヒ・マクシミリアン大学のEva Wolf教授と、構造的な観点からのmCRY1のCys414の役割と、変異型CRY1-Tgマウスの表現形との関連について議論した。Wolf教授らの研究グループは最近、mCRY1-mPER2複合体の結晶構造をCell誌に報告し、mCRY1 Cys414の役割も解明した(Cys414はmCRY1のPER蛋白との結合面に位置し、複合体においてPER蛋白の特定の残基と共に、亜鉛を配位する残基として機能する)。従って、mCRY1の機能の制御の上で重要なアミノ酸残基であることが構造生物学的にも示された(Schmalen I *et al.*, Cell, 157, 1203-1215, 2014; 図2)。mCRY2の当該システイン残基についても、同様に亜鉛結合部位であることが、他のグループから報告された(Nangle *et al.*, eLife, 3, e03674, 2014)。



同論文では、さらに、Cys414変異mCRY1をCRY欠損MEF細胞に導入し、Per2-Lucレポーターを用いて分子時計への影響を調べている。その結果、変

異型mCRY1導入により分子時計の振幅は低下し、周期は長くなることが示された(同eLife論文Figure 5B)。これは、代表者らのマウス個体レベルでの結果を裏付ける結果であると考えられる。

2. 発展性

膵β細胞の脱分化や脱分化後他の内分泌細胞へと分化する分化転換は、動物モデルで現象が最近明らかになったばかりであり未解明の部分が多い。本研究から、膵β細胞機能障害の未知の側面を明らかにできると期待される。

[4] 成果資料(学会発表に於ける主要なもの)

Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism Tokyo Translational Therapeutics Meeting, Regulation of Rgs4 in the islet of mutant cryptochrome1 transgenic mice. : Okano S, *et al.* 2014年9月, 東京大学伊藤謝恩ホール