

課題番号3

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：中島 修（山形大学医学部）
五十嵐 雅彦（山形市立病院済生館）
早坂 清（山形大学医学部）
研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

体内時計の破綻と種々の疾患との関係が近年報告されているが、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、及び加齢医学の観点から、プロテオミクス技術を取り入れて明らかにすることを本研究の目的とした。

哺乳類のCRY（クリプトクロム）遺伝子は、光回復酵素/青色光受容体のファミリーに属する、未知の機能の遺伝子として、1996年に安井明教授らにより見いだされ(van der Spek PJ *et al.*, *Genomics*, 37, 177-182, 1996)、1999年にはCRY欠損マウスが作製され、CRY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明らかになった(G.T. van der Horst *et al.*, *Nature*, 398, 627-630, 1999)。

代表者は、大学院博士課程で原生動物の光受容体の探索を試み、大学院修了後も理研仙台支所（光生物研究チーム[塚原保夫東北大学教授]）ポスドクとして、ショウジョウバエの未知の青色光受容体の単離を試みた。その課題遂行の為、加齢研・安井研究室に出向し加齢研で研究を行い、安井教授らとショウジョウバエCRYの単離に成功した(Okano S *et al.*, *Photochem Photobiol.*, 69, 108-113, 1999)。その後、理研ポスドクから加齢研ポスドクとなり、安井教授の指導のもとDNA修復の研究に携わった後、山形大学に着任した。

加齢研での、光回復酵素/青色光受容体のファミリーの分子進化的解析の経験を基に（*Photochem Photobiol.*, 1999: 図1）、動物の種々のCRY間で種を越えて保存されているシステイン残基（mCRY1のCys414）を見いだしたので（Cys414は現在では、mCRY1の亜鉛結合部位として機能することが明らかにされている[26年度の加齢研報告書を参照]）、

光回復酵素/クリプトクロムファミリーの分子系統樹

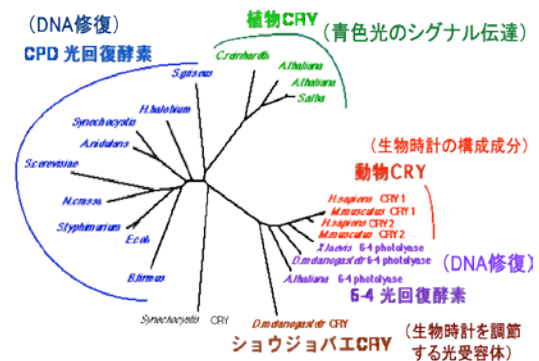


図1 (Okano S *et al.*, 1999)

Cys414-Ala 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（Cys414-Ala mCRY1-Tg マウス [以下 Tg マウスと略称]）を中島教授の支援を得て確立し、当該 Cys 残基のCRYの機能における役割の解明を目的とした研究を開始した。Tg マウスは極めて特異な概日リズムの異常（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）を示す。さらに、先天性代謝異常を専門とする早坂施設長（当時）らと共に、Tg マウスのオスは、重篤な糖尿病を発症することを明らかにし、2009年に論文として公表した(Okano S *et al.*, *Neurosci Lett.* 451, 246-251, 2009)。

早坂施設長（当時）の紹介を通して五十嵐科長も糖尿病共同研究に参画し、この研究グループで病態の詳細な特徴づけを行い、インスリン分泌不全を特徴とする、若年発症成人型糖尿病（MODY）と類似した糖尿病であることを、2010年に報告し(Okano S *et al.*, *Eur J Clin Invest* 40, 1011-1017, 2010)、2013年には、Tg マウスの膵β細胞は増殖能を低下させることが膵β細胞消失の重要な原因であることを報告した（Okano S *et al.*, *J Diabetes Investigation* 4, 428-435, 2013)。

平成25年度から開始した加齢研共同研究から、

- 1) Tg マウスの膵β細胞の増殖能の低下は、膵β細胞が細胞老化様の状態へ変化することに起因する。
- 2) Tg マウスの膵β細胞は脱分化し、膵β細胞の機能を失う。

の2点が、膵β細胞消失の重要な原因であることを新たに明らかにするとともに、その分子経路の一端を解明した。安井教授は mCRY1 及び Cys414-Ala mCRY1 を誘導的に発現することが出来る哺乳類細胞を樹立し、プロテオミクス解析を実施した(26年度報告書)。27年度は、解析を進展させ、いくつかの重要な知見を得た。連絡については、これまでと同様に代表者が加齢研に出向き、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、マウス組織を用いた膵島機能不全の解析

・膵α細胞の解析
2週齢のマウス膵組織を用いて、膵α細胞領域測定と、膵α細胞の増殖能の評価を行った。その結果、2週齢で既に Tg マウスの膵島に当たりの膵α細胞エリアは野生型マウスと比較して 32%増加している一方、膵α細胞の増殖率は Tg と野生型マウス間で有意な相違は見られないことが新たに判明した。これらの結果から、Tg マウスの膵α細胞数の増加(J Diabetes Investig., 2013)は、膵β細胞の分化転換が主因であることが強く示唆された。

・膵島の異常な膵管様構造の解析

アダルトの Tg マウス膵島では、その多くでサイトケラチン 17/19 陽性の、異常な膵管様構造(嚢胞様構造)を伴うことを発見したので、40週齢マウス組織を用いて定量的評価を行い、この膵管様構造は Tg マウスで高頻度に出現することを示した。

・その他の解析

Rgs4 遺伝子は野生型と比較し、Tg マウス膵島で mRNA 発現が顕著に亢進していることは既に報告してきたが、膵島の免疫組織染色でタンパク質レベルでも発現が亢進していることを示す結果を得た。膵島の DNA マイクロアレイから、他の複数の Rgs 遺伝子も変化している結果を得ていることから、これらについても免疫染色にて調べている。以上の結果から、G-protein-coupled receptor のシグナル伝達経路の異常による、膵島内のセカンドメッセンジャーの擾乱が、膵β細胞の機能不全や老化様変化をもたらす重要な原因であることが改めて示唆された。

2、プロテオミクス解析

バキュロウイルスに mCRY1 及び Cys414-Ala mCRY1 を作らせ、これらのタンパク質と細胞エキストラクトを用いたプロテオミクス解析を安井教授と菅野講師(加齢研)が実施し、複数の新規な結合タンパク質の候補を見だし、現在確認のための実験を続けている。

3、時間生物学的解析(給餌性概日リズムの解析)

マウスの輪回し活動リズム実験、並びに Cys414-Ala CRY1 発現細胞(安井教授が樹立)や Tg マウス肝臓を材料とした分子的解析のデータのさらなる補強と論文執筆を行った。

(3-2) 波及効果と発展性など

・糖尿病の解析

Tg マウス膵島では、異常な嚢胞様の構造が、高頻度に生じていることを明らかにしたが、この解析を深化させることにより、膵β細胞の未知の分化転換の機構が解明できることが期待される。

・時間生物学的解析

アダルトのマウスの視交叉上核(SCN)は、通常、明暗サイクル(LD)には同調するが、一日の内一定の数時間のみ給餌を行うことを繰り返す給餌サイクル(RF)には同調しないことが知られている。

これまでのアダルト Tg マウスの解析から、その SCN は下記の特異な性質を有することを明らかにしてきた。

1) Tg マウス 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。

2) Tg マウスでは、SCN に対して、同調因子として RF が LD よりも優位に働く。

糖尿病解析と並行して、代表者がこの課題のデータの補強と論文執筆を進め、とりまとめた結果を、代表者が8月にヨーロッパ時間生物学会(マンチェスター)で発表した。その折の Hanspeter Herzel 教授(バルリン・フンボルト大学)との会話から着想を得て、論文原稿 discussion の中に、同教授らの数理モデルから Tg マウス SCN の挙動を説明する項目を追加して、原稿を完成させた。原稿は sleep and biological rhythms 誌に投稿し、平成28年1月7日付でアクセプトされた。詳細は上述の論文に記したが、SCN を構成するニューロン間 coupling の障害と、SCN ニューロンの細胞単位での時計振動の振幅の低下が、Tg マウス SCN が給餌刺激に同調してしまう主要な要因であり、これは Herzel 教授らのリミットサイクルモデルともよくフィットすることを、論文内で議論した。本論文の発表により、SCN の非光同調(non-photoc entrainment)の機構の理解や、そのさらなる具体的仕組みの解明に向けて、学界に一定のインパクトを与えることができたのではないかと考えている。

[4] 成果資料

Unique food-entrained circadian rhythm in Cysteine414-Alanine mutant mCRY1 transgenic mice. Sleep Biol Rhythms. 14, 2016 (in press) Okano S, Yasui A, Hayasaka K, Nakajima O