

課題番号 30

新規CRY1結合タンパク質の解析を中心とした膵組織構築 変化の分子機構の解明

[1] 組織

代表者：岡野 聡

(山形大学医学系研究科)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

佐藤 賢一 (東北医科薬科大学)

五十嵐 雅彦 (山形市立病院済生館)

中島 修 (山形大学医学系研究科)

早坂 清 (山形大学医学部・みゆき会病院)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

代表者らは、時計蛋白質 mCRY1 の Cys414 (亜鉛 [Zn] 結合サイト) をアラニンに置換した変異体 (C414A-CRY1) を全身的に過剰発現させることで生物時計振動体に異常を生じさせ、マウスに若年発症成人型糖尿病 (MODY) 様糖尿病を惹起する新たな糖尿病モデルを確立し (以下このマウスを「Tg マウス」と称する)、膵β細胞機能障害に起因するインスリン分泌不全及びβ細胞そのものの週齢依存的な消失が Tg マウスの糖尿病の主因であることを、東北地域を横断する研究組織により、加齢研共同研究採択課題として明らかにしてきた [1]。解析をさらに進展させ、平成 29 年度に加齢研共同研究報告書 (課題番号 7) に記載したように、Tg マウスでは加齢に従い、種々の膵管異型病変が高頻度に出現することも見出している。

本研究はプロテオミクス解析と分子病理の解析とを組み合わせた研究から、1) 「C414A-CRY1 過剰発現に起因する膵β細胞機能障害」 2) 「膵管前癌病変生成生物」 3) 「時計制御」に関わる分子機構を具体的に明らかにすることを目的としている。

C414A-CRY1 タンパク質は、正常 CRY1 と比較して、in vivo において短寿命であることを示す結果を得ている [2]。FBXL21 タンパク質は CRY の安定化に寄与することが報告されている [3, 4]。代表者は FBXL21 の発現は Tg マウスで低下していることを示し [文献 1 の Table 1]、このことが C414A-CRY1 の分解促進の一因となっていると推測した。しかしながら、CRY の新たな翻訳後修飾機構が次々と報告されており、より詳細な解析が課題となった。本年度はこ

の点についても実験を実施した。

本研究課題に関連して、代表者は今年度、膵管前癌病変と KPNA2 との関わりを中心に力点をおいた総説を *BIO Clinica* 誌に、糖尿病と PDG 膵管異型 (pancreatic duct gland) の関係や、CRY1 の変異とヒトでの概日リズム障害のトピックスも加えた総説を *アグリバイオ* 誌に、それぞれ和文で印刷公表した [(4) 成果資料を参照]。さらに代表者は、共同研究者と綿密な連絡をとりつつ行なった研究の最新の成果の一部を原著論文として *J Diabetes Res* 誌に投稿し、2019 年 3 月 17 日付でアクセプトされた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

• 生化学的解析・培養細胞での解析

TDP-43 は RNA 結合タンパク質であり、CRY1 結合蛋白質として既に報告されている [5]。TDP-43 は CRY の安定化に働くことも報告されている [5]。

安井フェロー・菅野講師は大腸菌に野生型及び変異 CRY1 のリコンビナントタンパク質を作らせ、精製した (図 1)。

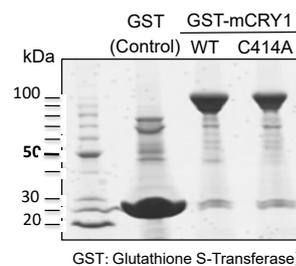


図1: 精製したリコンビナントCRY1蛋白質 (CBB染色)

これらとマウス脳抽出液を用いて、pull down アッセイを実施した。TDP-43 と CRY1 の結合が確認され、C414A 変異型に対しては結合が弱まること明らかになった (図 2A : 赤色矢印)。

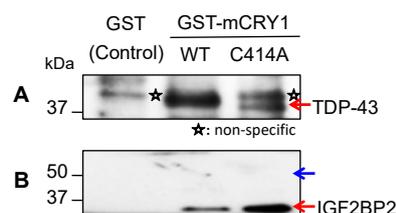


図2: リコンビナントCRY1蛋白質を用いたpull down アッセイ (western blot)

以上の結果から、C414A-CRY1 の過剰発現により FBXL21 量が減少することに加え、変異による TDP-43 との結合不全が、マウス体内での C414A-CRY1 の短寿命化 [2] に関与していることが強く示唆された。

IGF2BP2 ファミリーは多機能の RNA 結合タンパク質である [6]。この中で IGF2BP2 はヒトの糖尿病感受性遺伝子として特定されているが、糖尿病発症に於ける具体的役割は明らかになっていない [6]。プロテオミクス解析から IGF2BP2 が CRY1 と結合することを示す結果を得て、上記 pull down アッセイにて、C414A 変異が如何に IGF2BP2 への結合に影響するかを調べた。抗 IGF2BP2 抗体を用いた western blot では、想定される分子量 (~62 kDa; 図 2B: 青色矢印) より小さな分子量 (~30 kDa) の位置に IGF2BP2 のバンドが検出された (図 2B: 赤色矢印)。これは、IGF2BP2 がプロテアーゼにより切断されたものと考えられる。図 2B の結果から、IGF2BP2 は C414A 変異型 CRY1 に対し、正常 CRY1 と比較して結合が強まることが示唆された。IGF2BP2 の新たな機能を明らかにする目的で、HeLa 細胞を用いて 1mM 過酸化水素で処理 (10 min) 後の局在変化を免疫染色にて調べた。その結果、通常の条件では細胞質に分布していた IGF2BP2 は、過酸化水素処理により核内の核小体へ集積することが判明した (図 3)。

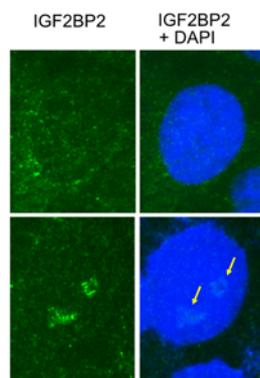


図3: IGF2BP2の核小体への集積
(上段: Control, 下段: H₂O₂処理)

以上の結果より、酸化ストレス負荷時の核小体での応答反応に、IGF2BP2 が関与することが示唆された。安井グループ及び代表者らは、本研究課題での使用を目的として、宮崎純一教授 (大阪大学) から MIN6 細胞 (膵β細胞株) の分与を既に受けている。Tg マウスでの解析に加え、MIN6 細胞に於ける機能解析も推進させる予定である。KPNA2 (平成 29 年度の報告書 [課題番号 7] を参照) についても、MIN6 での実験を実施する予定である。

- 組織学的解析

以前の解析から特定した一群の CRY1 結合候補蛋白質と膵管異型病変との関連を、Tg マウス組織の免疫染色により調べた。その過程で、FAM98A タンパク質

が PanIN 様膵管病変で高発現することを見出した。病理学的な解析をさらに進めるとともに、膵管癌細胞株を用いた機能解析の準備を進めている。

- (3-2) 波及効果と発展性など

本研究から、これまでに知見を蓄積してきた Tg マウスの病態及び、上述の蛋白質のさらなる機能解明を軸に、膵β細胞の細胞老化様性質を主たる要因とする膵癌前癌病変生成や、悪性化の新しい分子機序が解明されると期待される。RNA 制御蛋白質の体内時計制御に於ける役割の新しい知見も得られると期待される。

参考文献

[1] Okano S: *J Diabetes Res.*, Manuscript NO. 3459246, 2016. [2] Okano S., et al., *Neurosci Lett.* 451, 246-251, 2009. [3] Hirano A, et al., *Cell*, 152, 1106-1118, 2013. [4] S.-H. Yoo, et al., *Cell*, 152, 1091-1105, 2013. [5] A. Hirano, et al., *PLoS ONE*, 11, e0154263, 2016. [6] Bell J.L. et al., *Cell Mol Life Sci.*, 2657-2675, 2013.

- [4] 成果資料

成果の一部を下記の国際学会や国際会議で報告した。

- ① Mucin-producing duct-like cells in the islet of aged diabetic C414A-CRY1 mutant mice: Okano S. et al., Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018 [札幌] 2018年7月14日
- ② Mucin-producing duct-like cells in the islet of aged diabetic C414A-CRY1 mutant mice: Okano S. et al., 3rd Asian Forum on Chronobiology in 2018 [札幌] 2018年7月12日
- ③ Unusual duct-like cells in the islet of diabetic C414A-CRY1 transgenic mice (e-poster: 2127-P): Okano S. et al., 78th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA) [オーランド] 2018年6月22日

総説・論文

- ① Karyopherin alpha 2-expressing pancreatic duct glands and intra-islet ducts in aged diabetic C414A-mutant-CRY1 transgenic mice: Okano S. et al., *J Diabetes Res.* in press 2019.
- ② 亜鉛結合部位変異導入CRY1がマウスにもたらす概日リズムの異常と糖尿病・ヒト病態との関連、及び膵管異型病変: 岡野聡 *アグリバイオ* 2(12) 69-79, 2018年10月
- ③ 亜鉛結合部位変異クリプトクロムタンパク質がマウスにもたらす概日リズムの異常と膵β細胞の障害及び膵管異型病変の生成: 岡野聡 *Bio Clinica* 33(5)453-462, 2018年4月