

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：中島 修（山形大学医学系研究科）
五十嵐 雅彦（山形市立病院済生館）
佐藤 賢一（東北医科薬科大学医学部）
研究費：物件費 18 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）に類似した糖尿病を生じさせる新たなモデルを確立した（1, 2）（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、加齢研共同研究採択課題として明らかにしてきた（1, 2）。解析をさらに進展させ、東北地域を横断する研究組織により、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（1-3）。

亜鉛結合能を欠いた CRY1 は膵β細胞において細胞老化をもたらす、これが起点となり膵構造の変容がもたらされる機序が想定される。Tg マウスで見られる特異な病変である膵島内膵管異型細胞（3）の特徴づけとその生成過程の解明は、特に重要であると代表者は考え、この数年、自身の研究エフォートを重点的にこの解析に割いてきた。

本共同研究は新規 CRY1 結合タンパク質を中心とした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、I「亜鉛結合不全 CRY1 タンパク質の過剰発現に起因する膵β細胞機能障害」II「膵島内膵管異型病変生成」III「生物時計制御」に関わる分子機序を具体的に明らかにすることを目的としている。2019年度は、テーマIとIIIに関連し膵β細胞の亜鉛を枯渇させる実験を、IIに関してはTgマウスの分子病理の解析を実施した。いずれの成果も国際学会（IDF congress 2019[釜山]及び第79回米国糖尿病学会 [サンフランシスコ]）でポスター発表し、国内外の糖尿病研究コミュニティに向けて広く発信した（e-poster としてwebにて公開中；[4] 成果資料）。

連絡状況であるが、加齢研にて複数回、安井明加齢研フェロー・菅野新一郎講師と打ち合わせを実施した。五十嵐雅彦 地域糖尿病センター長、佐藤賢一 消化器内科教授とはメールでの連絡に加え、学会参加時に打ち合わせを行った。早坂清 山形大学医学部名誉教授（前遺伝子実験施設 施設長・現みゆき会病院 小児科）は、本 CRY プロジェクトの主に病態面での相談役として、今年度からはオブザーバー参加となった。引き続き、代表者はメールにて早坂名誉教授と有意義な学問的議論を行った。

[3] 成果

（3-1）研究成果

・膵β細胞の亜鉛欠乏実験

KPNA2 は核タンパク質の核移行に関与する他にも、多様な細胞機能に関与することが報告されている。代表者らは、Tg マウス膵管異型病変で KPNA2 が増加することを報告し、論文(3)にて膵癌前癌病変生成や悪性化との関連について議論した。成獣 Tg マウスでは、同週齢の野生型マウスと比較して、膵β細胞における KPNA2 量が減少することも報告した。この結果は、KPNA2 の低下が Tg マウスの膵β細胞機能障害の一因となっていることを示唆している。若齢期では野生型マウスと Tg マウス間で膵β細胞の KPNA2 量に差は見られず、また成獣期以降になると Tg マウスは高血糖を呈することから、慢性高血糖状態が KPNA2 の発現量低下に関与する可能性を指摘した（3）。

膵β細胞は高い亜鉛含量を有する。亜鉛は主にインスリン顆粒中に濃縮され、インスリン分泌時に細胞外へ放出されることが知られている。慢性高血糖時には、インスリンの過剰分泌により膵β細胞の亜鉛量が減少し、それが膵β細胞に様々な影響を及ぼすことが推測されている。代表者は亜鉛を介して CRY1 の立体構造に変化が生じることで、時計遺伝子をはじめ各種の遺伝子発現にも影響が出てくると推測し、これを確かめる実験を行なった。具体的には、亜鉛による CRY1 の調節機構、および KPNA2 の発現調節機構をさぐるべく、文献（4）の手法に従って、膵β細胞株 MIN6 細胞を KCl で長期処理（24h）し、慢性高血糖を模倣するとともに亜鉛を枯渇させた。以下得られた結果の概要を述べる（詳細な議論及びデータは、成果資料 [4] ② IDF congress の e-poster に記載）。

1. 亜鉛欠乏は mRNA・タンパク質両レベルで KPNA2 を減少させた (Fig. 1)。各種の膵β細胞機能遺伝子の中では, Glut2 が特に影響を受け, その遺伝子発現は著しく減少することが判明した。亜鉛欠乏は膵β細胞株に Endoplasmic reticulum (ER) ストレスを誘導することも明らかにした。

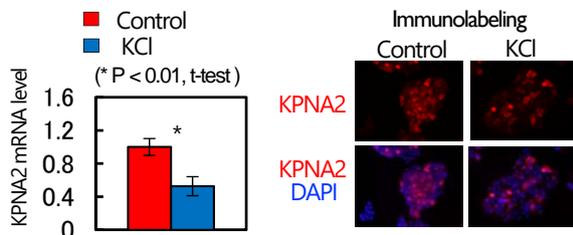


Fig. 1: adapted from Okano, S et. al. e-poster P- 0359, IDF congress 2019.

2. 亜鉛欠乏は膵β細胞において, 各種時計遺伝子の発現に影響を及ぼした。Cry1 遺伝子の発現量は, 対照と比較し, 程度は少ないものの高い統計的有意差をもって増加した。
 3. 亜鉛欠乏により, 膵β細胞の機能維持に重要な転写因子である PDX-1 が mRNA・タンパク質両レベルで低下した。PDX-1 と CRY1 の二重染色を実施したところ, 核内 CRY1 のタンパク質の量と PDX-1 の量には逆の相関を示す傾向が観察された。この点については, さらなる慎重な解析が必要ではあるが, CRY1 は PDX-1 をタンパク質レベルで調節して, 亜鉛欠乏等のストレス負荷時の PDX-1 量の調節に寄与している可能性がある, 代表者は推測している。
- Tg マウスの分子病理の解析
1. 代表者は, 膵島内膵管異型細胞を特徴づけるマーカーを探るべく, スクリーニング的に各種の染色実験を行い, Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)-レクチンの反応性が, 正常膵管と比較し弱いことを発見した (Fig. 2)。膵島内膵管異型細胞は膵β細胞が分化転換した細胞に由来し, 膵管細胞としては未成熟な段階にあることに起因すると考えている。
 2. FAM98A (共同研究にて特定した CRY1 複合体構成タンパク質)が膵管異型細胞で高発現していることを示した (Fig. 2)。

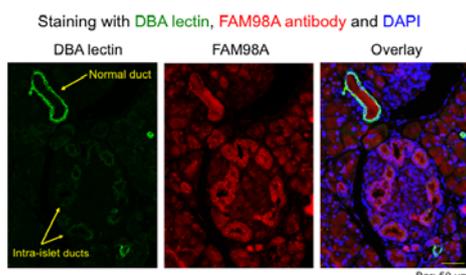


Fig. 2: adapted from Okano, S et. al. e-poster 328-LB, 79th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA), 2019.

(3-2) 波及効果と発展性など

代表者らが確立したモデルマウスにおいて, 糖尿病発症時に膵β細胞特異的に KPNA2 が減少することを既に公表した (3)。膵β細胞の機能維持における KPNA2 の重要性を他のモデルでも明らかにし, 検証することが課題として残されていた。今年度の研究から, MIN6 細胞でも KPNA2 の減少が起こることを示すことができ, 懸案を解決するとともに KPNA2 量調節メカニズムの重要な情報を得ることに成功した。本成果を起点に, KPNA2 の機能不全に関わる膵β細胞機能障害の新しい分子機序が解明されると期待される。

ER ストレスは膵β細胞障害の主要な要因である。亜鉛の欠乏により ER ストレスが誘導されることも明らかにになり, 新たな ER ストレスの誘起メカニズムの知見が得られた。細胞内の亜鉛減少刺激により種々の時計遺伝子が増加し, β細胞における分子時計と亜鉛との相互作用が示唆された。

膵島内膵管異型病変の分子的特徴を明らかにする目的で実験を行い, DBA-レクチンの反応性への相違を見出した。この結果は, 膵ラ氏島内膵管細胞の発生機序を明らかにする上で重要な成果である。代表者は, 膵β細胞リプログラミングの膵管細胞発生への関与を明らかにすることを目的に, 本 CRY1 研究チームで密接に連携しながら, さらなる実験を鋭意実施している。安井明加 齋藤研フェロー・菅野新一郎 講師が中心となって展開している CRY1 複合体の生化学的解析であるが, 新たに転写因子 PDX-1 との関連にも力点をおいた実験が進行中である。

参考文献

- (1) Okano S: *J Diabetes Res.*, Manuscript NO. 3459246, 2016. [英文総説]
- (2) 岡野聡: 「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」, アグリバイオ (北陸館), 69-79, 2018年11月号. [和文総説]
- (3) Okano S., et al., *J Diabetes Res.*, Manuscript NO. 7234549, 2019.
- (4) Lawson R. et al. *J Trace Elem Med Biol.* 49: 51-59, 2018.

[4] 成果資料

成果を下記の国際学会で報告した。

- ① Characteristic features in the intraislet ductal cells of diabetic C414A-CRY1 transgenic mice (e-poster: 328-LB): Okano S. et al., 79th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA), 2019年6月9日
- ② Altered expression of karyopherin α2 and circadian clock genes in MIN6 cells mimicking hyperglycemia (e-poster: P-0359): Okano S. et al., International Diabetes Federation (IDF) Congress 2019 in Busan. 2019年12月3日