

研究題目 VIKING 法を用いた膵β細胞における ChREBP と炎症シグナルの クロストークメカニズムの解明

研究組織

研究代表者：横山 敦（東北大学大学院医学系研究科）

共同研究者：福本 誠二（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：沢津橋 俊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

グルコースは生理的に最も強力なインスリン分泌刺激因子であると同時に、膵β細胞の細胞増殖の刺激因子としても作用する。インスリン抵抗性出現時、膵β細胞はその容量を拡大させることでインスリン需要に応答するが、慢性的な高血糖はやがてβ細胞不全に陥り2型糖尿病を引き起こす。これまでのところ、慢性的な高血糖により代償性のβ細胞増殖機構が破綻するメカニズムについては未解明である。

このグルコース依存的な膵β細胞増殖に関与する因子の一つとして、我々は転写因子 ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) に着目している。ChREBP はグルコース依存的に核内移行し標的遺伝子を発現上昇させるグルコース応答性の転写因子である。ChREBP は肝臓、膵臓、腎臓、脂肪組織などで発現していることが知られており、膵臓ではβ細胞に特異的な発現が見られる。グルコース濃度の上昇に伴って ChREBP が活性化すると、核内移行した ChREBP は結合 DNA 配列に結合することで標的遺伝子の発現を正に調節する。

これまでに、我々は膵β細胞における ChREBP と炎症シグナルとのクロストークを見出している。具体的には、炎症性サイトカイン IL-1β で活性化した転写因子 NFκB が ChREBP と核内で相互作用し ChREBP の転写活性を抑制し、結果としてグルコース依存的な細胞増殖を抑制する。さらに、この転写抑制には IL-1β により活性化した NFκB の p65 サブユニットが ChREBP に結合し転写を抑制するトランスリプレッションの機構を示唆するデータを複数得ている。

NFκB によるトランスリプレッション機構はこれまでに報告がなく、その一般性からも大きなインパクトが期待されるがその客観的証明のためにはゲノムワイドな解析データが必須となる。そこで以下の実験を計画している。

ラットβ細胞由来の INS1 832/13 細胞を用いて VIKING 法によるゲノム編集を行い、p65 遺伝子を欠損した INS1 細胞を樹立する。さらにこの p65 ノックアウト INS1 細胞に、DNA 結合ドメインを欠いた p65 変異体、もしくはコントロールとして野生型 p65 を安定発現した細胞株を樹立し、ChIP-seq を行いゲノムワイドでの ChREBP との共局在を示すことにより、NFκB によるトランスリプレッション機構の存在を直接的に証明することを計画している。

[1-2] 研究の方法・経過

ラットβ細胞由来の INS1 832/13 細胞を用いて、NFκB p65 遺伝子を欠損する細胞株を沢津橋博士の協力のもと VIKING 法によるゲノム編集にて樹立を試みた。得られた薬剤耐性クローンからゲノム DNA を抽出し、ゲノム PCR により目的のバンドパターンが得られるかを評価した。目的のバンドパターンが得られた細胞クローンについて、細胞抽出液を調製しウェスタンブロットにて足シクアに NFκB p65 タンパク質が欠損しているかを確認した。

さらに、得られた p65 ノックアウト INS1 832/13 細胞に DNA 結合ドメインを欠いた p65 変異体、もしくはコントロールとして野生型 p65 を発現するプラスミドをトランスフェクションし ChREBP の転写活性の評価を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

まずゲノム編集により NFkB p65 遺伝子を欠損した p65 ノックアウト細胞を樹立することに成功した。この p65 ノックアウト細胞では、IL-1b による ChREBP の転写抑制が消失していたことから、我々の以前に得ていた ChREBP と NFkB のクロストークに関するデータとの整合性が確認された。

続いて、このノックアウト細胞に野生型 p65 もしくは DNA 結合能を欠いた p65 を発現するプラスミドをトランスフェクションし ChREBP の転写活性を評価するルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、野生型および変異型どちらをトランスフェクションした細胞でも IL-1b による ChREBP の転写抑制能が回復した。このことは、NFkB による ChREBP の転写抑制には NFkB の DNA 結合を介さないトランスリプレッションのメカニズムが生じていることを強く示唆する結果であると考えている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今回の共同研究からゲノム編集により任意の遺伝子、もしくは DNA 領域を欠損した細胞株を迅速に樹立する実験系を確立することができた。このことは、本研究の発展のみならず、今後の別の研究プロジェクトにおいても大きな意味をもつと考えられる。すなわち、本共同研究の結果、今後の我々の研究においてゲノム編集を取り入れた実験を組み込むことができ、研究推進の可能性を大きくすることができ非常に意義のある共同研究であった。この場を借りて徳島大学先端酵素学研究所に感謝申し上げたい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

横山 敦、野呂 英理香、岡本 好司、松澤 拓郎、吉川 雄朗、島 弘季、五十嵐 和彦、菅原 明. 炎症シグナルによるグルコース応答性転写因子 ChREBP の機能制御メカニズムの解明.

第 94 回日本生化学会、横浜 (オンライン)、11 月 5 日、2021 年

小林 研太郎、横山 敦、清水 恭子、菅原 明. タバコによるアンドロゲン受容体制御メカニ

ズムの解析. 第 25 回日本臨床内分泌病理学会 学術総会、仙台 (オンライン)、10 月 8 日、2021 年

横山敦、野呂英理香、岡本好司、松澤拓郎、吉川雄朗、島弘季、五十嵐和彦、菅原明. 膵β細胞におけるグルコース応答性転写因子 ChREBP の機能制御因子の探索.

第 94 回日本内分泌学会学術総会、高崎 (オンライン)、4 月 22 日、2021 年

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後の展開としては、このノックアウト細胞に p65 の野生型、もしくは変異型をトランスフェクションした後に ChIP アッセイを行い、どちらも ChREBP 標的遺伝子上にリクルートされているかどうかを検証したいと考えている。

さらに、将来的には ChIP-seq によりゲノムワイドの p65 結合部位を解析していきたいと考えている。