

論文内容の要旨

申請者氏名 荒俣 晋作

インスリン遺伝子の膵島β細胞特異的な発現は、そのプロモーター領域の *cis* 配列に Pdx1、Beta2 などの転写因子が結合することによって厳密に制御されている。近年、bZip モチーフを持ちβ細胞特異的に発現する転写因子 MafA が、*cis* 配列 RIPE3b/C1 に結合する因子として同定された。MafA はインスリン遺伝子だけでなく、グルコース代謝やインスリンの成熟・分泌などのβ細胞に特異的な機能に関わる複数の遺伝子の発現も制御しており、また、*mafA* 欠損マウスは加齢とともに糖尿病を発症する。本研究は、膵島β細胞内における転写因子 MafA の活性の制御機構の理解を目的に行った。

MafA はβ細胞内でリン酸化酵素 GSK3 によって N 末端の 5 アミノ酸がリン酸化され、分解制御の標識となっていることが明らかとなっている。そこで、アラニンへの置換変異体を作製することにより、これらの部位以外にも MafA の Ser14, Ser72, Ser342 がβ細胞株においてリン酸化されていることを明らかにした。*in vitro* リン酸化アッセイによってこれらの残基をリン酸化するキナーゼの検索を行い、MAP キナーゼ類縁の Dyrk1A と HIPK2 が組換え MafA タンパク質の Ser14, Ser342 をリン酸化することを見いだした。また、Dyrk1A の阻害剤 Purvalanol A 処理によってβ細胞株 MIN6 における MafA のリン酸化が低下したことから、Dyrk1A は *in vivo* においても MafA のリン酸化酵素として機能している可能性が高いと判断した。

一方で、インスリン遺伝子プロモーター上に転写因子 MafA、Pdx1, Beta2 が結合する意義について、ヒト・インスリンプロモーターのレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼ・アッセイにより検討した。その結果、MafA, Pdx1, Beta2 はいずれも単独ではごく弱くしかプロモーターを活性化できないが、3 者の共存下では協調的に活性化することが明らかとなり、これらの 3 つの転写因子が共発現するβ細胞においてのみインスリン遺伝子が特異的に発現するメカニズムを反映していると考えられた。

次に、MafA のリン酸化がその転写活性におよぼす影響を調べるため、Dyrk1A および GSK3 によるリン酸化部位のアラニン置換変異体の、インスリンプロモーター活性化能を比較した。その結果、いずれの変異型 MafA も、単独では野生型 MafA の転写活性とほとんど差が見られなかったが、Pdx1, Beta2 との共存下で生じる協調的な活性化については、Ser342 変異体のみが野生型 MafA と比較して強く、これまで機能領域として不明であった MafA の C 末端領域の Ser342 のリン酸化によって協調的な転写活性が負に制御されていることがわかった。

以上の結果を併せて、MafA は GSK3, Dyrk1A などの複数のリン酸化酵素によって多段階にその活性が制御されていること、また、インスリン遺伝子発現に重要な 3 つの転写因子 MafA, Pdx1, Beta2 が協調してインスリンプロモーターの効率の良い活性化を達成していることをあきらかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 荒俣 晋作

インスリン遺伝子は膵島β細胞にきわめて限局して発現することから、その制御メカニズムは学術的にも興味深い問題であると同時に、その破綻により糖尿病を発症することや、発現を人工的に制御するような遺伝子治療などの応用的な側面からも詳細な解析がなされてきている。その制御因子として Pdx1 や Beta2 がこれまでに同定されてきたが、本研究では、最近になって同定された転写因子 MafA を含めて解析を行い、以下の新しい知見を得た。

まず、MafA タンパク質がβ細胞内で翻訳後に修飾を受けてその活性が制御される可能性を考えて、β細胞内でリン酸化を受けるアミノ酸残基を新規に3カ所 (Ser14, Ser72, Ser342) 同定し、そのうちの2カ所 Ser14, Ser342 をリン酸化する酵素として Dyrk1A, HIPK2 を同定した。これらのキナーゼのうち、特に Dyrk1A については阻害剤を用いた実験により、β細胞内でも機能している可能性が示唆された。Dyrk1A は酵母におけるグルコース応答性のキナーゼ Yak1p の哺乳類ホモログであることから、β細胞に特異的で新規なグルコース応答シグナル伝達機構の発見につながりうる知見である。

また、インスリン遺伝子プロモーターは、Pdx1 や Beta2 に加えて MafA が共存することによって協調的に活性化されることをあきらかにした。インスリン遺伝子プロモーターを活性化する転写因子を異所的に強制発現することにより、内在性のインスリン遺伝子の発現やβ細胞への分化転換を促すような遺伝子治療法が模索されているが、これまでのところ効率のよい方法は達成できていないのが現状である。本研究の成果は MafA, Pdx1, Beta2 の組み合わせが有望な候補であることを示しており、今後の糖尿病の遺伝子治療分野の発展に寄与しうる結果である。また、MafA の Ser342 のリン酸化は、Pdx1, Beta2 との協調的な転写活性を負に制御していることを示し、MafA と類縁の転写因子 MafB, c-Maf では協調的な活性化は見られないこともあきらかにした。これらの結果は、今後、協調的な転写活性化の分子機構を解明する上で重要な知見を与えるものである。

以上のように、本論文は膵島β細胞におけるインスリン遺伝子発現を制御する転写因子 MafA の活性のリン酸化による制御機構と、Pdx1, Beta2 との共存による協調的な活性化機構を初めてあきらかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。