

79. 多機能ペプチダーゼによる転写制御機構の解明

西 英一郎

*京都大学 医学部 循環器内科学

Key words : 糖代謝, インスリン分泌, 転写コレギュレーター

緒言

グルコースは生命維持に必要な不可欠な栄養素であり、その血中濃度（血糖値）は常に一定の範囲内に収まるように厳密な調節を受ける。膵 β 細胞より分泌されるインスリンは、血糖値を低下させる唯一のホルモンであり、血糖値の調節に重要な役割を果たす。膵 β 細胞の機能不全はインスリン分泌の不足などを来し、糖尿病の病態に重要な役割を果たすが、同機能の制御機構には不明な点も多い。

我々は、ナルディライジン（別名 N-arginine dibasic convertase、以下 NRDC と略）を増殖因子 HB-EGF の新規細胞表面受容体として同定¹⁾し、同分子が細胞内局在に依存して異なる機能（細胞外-膜タンパク質細胞外ドメインシエディング活性化、核内-転写調節、細胞質-ペプチダーゼ）を有する多機能タンパク質であることを明らかにしてきた。個体における分子機能を明らかにするために *Nrdc*^{-/-}マウスを作製したところ、成長遅延、軸索・髄鞘形成不全²⁾など多彩な表現型を呈し、中でも、やせ（脂肪組織の減少）、血清中性脂肪低値、褐色脂肪組織における熱産生制御不全³⁾などエネルギー代謝に関連する様々な表現型を示した。そこで糖代謝における NRDC の役割を明らかにするために、本研究を行った。

方法および結果

Nrdc^{-/-}マウスを用いてグルコース負荷試験を行ったところ耐糖能異常を示し、グルコース負荷に対するインスリン分泌反応が著明に減弱していることがその原因と考えられた。次に、*Nrdc*^{-/-}マウスの全身表現型の二次的な影響を除外し、膵 β 細胞における NRDC の役割を明らかにするために、 β 細胞特異的 NRDC 欠損 (β KO) マウスを用いた解析を行った。 β KO マウスは、*Nrdc*-floxed マウスと RIP (rat insulin promoter) -Cre マウスとの交配によって樹立した。 β KO マウスに対する糖負荷試験では、*Nrdc*^{-/-}マウスと同様に、著明なインスリン分泌反応の減弱と耐糖能異常を認め、膵 β 細胞の NRDC がインスリン分泌に重要な役割を果たすことが確認できた。

一方興味深いことに、 β KO マウスの膵島では α 細胞/ β 細胞比の有意な上昇、 α 細胞の膵島辺縁部から中心部への局在変化を認めた (図 1)。

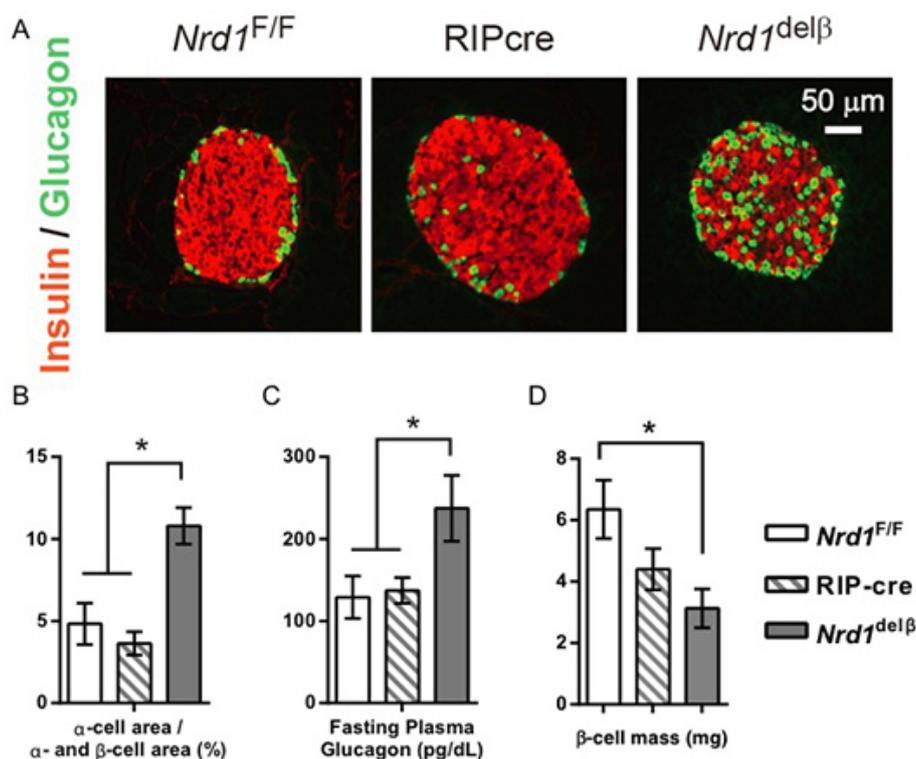


図1. β KO マウス膵島における α 細胞/ β 細胞比の上昇

A) 左から、*Nrdc*-floxed マウス、RIP(rat insulin promoter) - Cre マウス、 β KO マウス由来の膵島におけるインスリン、グルカゴンの免疫染色を示す。赤色：インスリン、緑色：グルカゴン。 β KO マウス膵島においてグルカゴン陽性 α 細胞の増加および局在異常を認めた。

B~D) *Nrdc*-floxed マウス、RIP(rat insulin promoter) - Cre マウス、 β KO マウスの膵島における α 細胞/ β 細胞面積比 (B)、空腹時血糖値 (C)、 β 細胞重量 (D) を示す (n = 4~5 per genotype, Error bar: SE, * P < 0.05, ANOVA)。

β KO マウス膵島の遺伝子発現を検討したところ、 α 細胞産生ホルモンであるグルカゴンだけでなく、*Ngn3* など膵内分泌幹細胞のマーカー遺伝子の発現も上昇しており、 β 細胞の脱分化 (dedifferentiation) や分化転換 (transdifferentiation) が起こっている可能性が示唆された。そこで細胞系譜解析を用いて解析したところ、 β KO マウスの膵島においては、いったんインスリン産生 β 細胞に分化した細胞のうち、ごく一部はグルカゴン産生能を有する α 細胞様細胞に変化していることが明らかになった。このことから、NRDC はインスリン分泌制御だけではなく、 β 細胞の分化維持にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

β KO マウス膵島における遺伝子発現を見ると、*GLUT2* や *Gck* などグルコースの取込みや利用に関わる遺伝子群の発現が低下していた。次にそれらの遺伝子上流にある膵 β 細胞特異的転写因子群について解析したところ、特に *MafA* の発現が低下していることがわかった。さらに、膵 β 細胞株 INS832/13 を用いて検討したところ、NRDC のノックダウンによって *MafA* 発現およびインスリン分泌の減弱が、NRDC の過剰発現によって *MafA* 発現およびインスリン分泌の亢進が、それぞれ認められた (図2)。

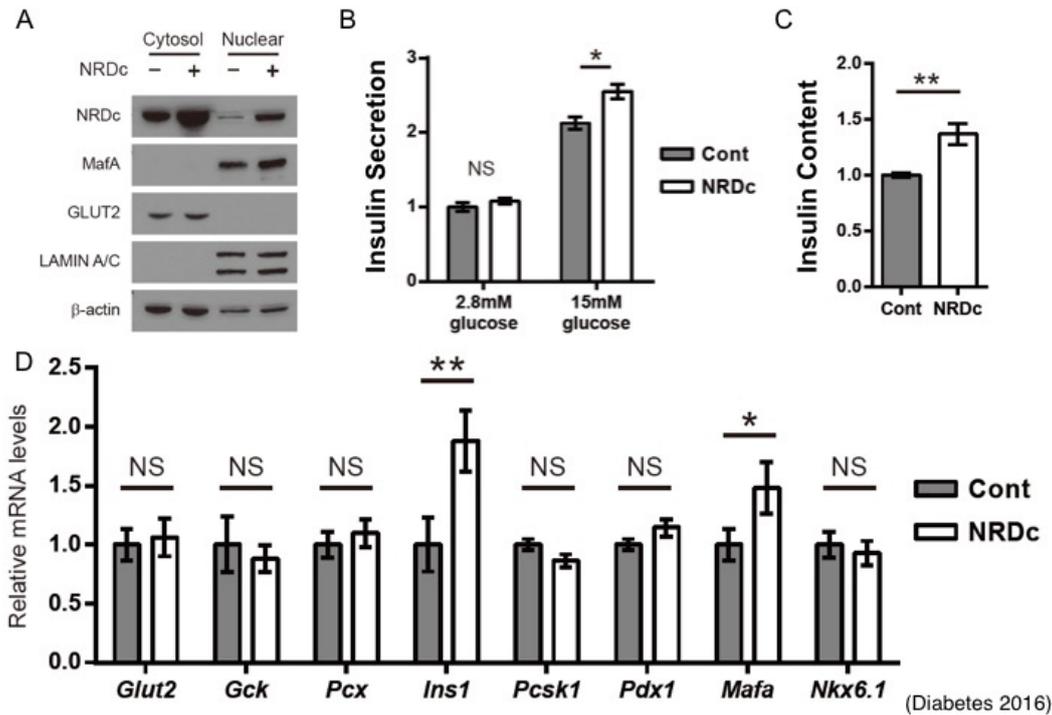


図 2. β 細胞株 INS832/13 細胞における NRDC 強発現は MafA 発現とグルコース応答性インスリン分泌を増強した

A) 細胞質分画および核分画における NRDC、MafA、GLUT2 のタンパク質発現。NRDC の強発現に伴い MafA 発現（核分画）の増加を認めた。

B) NRDC 強発現によるグルコース応答性インスリン分泌量の増加。

C) NRDC 強発現による細胞内インスリン含有量の増加。

D) NRDC 強発現によるインスリン関連遺伝子発現の変化。Ins1 および Mafa の mRNA レベルは NRDC 強発現によって有意に増加した。

(n = 5~9 per group, Error bar: SE, * P < 0.05, ** P < 0.01, Student t-test)

以上の結果から NRDC が膵 β 細胞において細胞自律的にインスリン分泌を制御していることがわかった。さらに、NRDC の過剰発現と MafA のノックダウンを組み合わせると、NRDC 過剰発現によるインスリン遺伝子 (*Ins1*, *Ins2*) の発現亢進は、MafA に依存していることが明らかになり、NRDC が MafA 発現制御を介してインスリン遺伝子発現を制御していることが明らかになった。

NRDC による MafA 発現の制御機構を検討したところ、NRDC が MafA のエンハンサー領域 (MafAR3) に結合し、MafAR3 のエンハンサー活性を正に制御することがわかった。さらに検討を進め、MafAR3 に結合することが報告されている既知の転写因子のうち、Islet1 が NRDC と特異的に複合体を形成することがわかった。そのため、Islet1 に着目して解析を進めたところ、1) NRDC をノックダウンすると MafAR3 上の Islet1 が減少する、2) 高度酸性ドメインを欠損した NRDC や LIM ドメインを欠損した Islet1 では複合体形成が著明に障害される、3) 複合体形成が障害される変異体を膵 β 細胞株に過剰発現しても野生型の過剰発現に比べて MafA の発現上昇が軽度である、ことがわかった。

考 察

以上の結果から、NRDC は Islet1 との相互作用を介して MafA の発現を制御し、MafA の発現制御を介してインスリンの発現および分泌を制御していることが明らかになった⁴⁾。また、細胞表面における NRDC の作用を阻害しても、MafA 発現における NRDC の効果に変化がなかったことから、膵 β 細胞の核内に発現する NRDC が MafAR3 への結

合を介して MafA 転写を調節していることが示唆された。さらにペプチダーゼ活性を欠損した変異体 NRDC による MafA 転写の増強効果が、野生型 NRDC と比較して有意に減少していたことから、NRDC が、自身のペプチダーゼ活性を介して MafA 転写を制御していることが示唆された。今後 NRDC のペプチダーゼ活性が、いかに下流遺伝子の転写制御に関わっているのか、その分子機構を明らかにすることが重要と考えられた。

共同研究者

本研究の共同研究者は京都大学医学研究科循環器内科の西清人、大野美紀子、西城さやか、森田雄介、松田真太郎、木村剛、神戸学院大学薬学部の中岡義範、京都大学糖尿病栄養内科の佐藤雄一、稲垣暢也である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Nishi E, Prat A, Hospital V, Elenius K, Klagsbrun M. N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. *EMBO J.* 2001 Jul 2;20(13):3342-50. PMID: 11432822
- 2) Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci.* 2009 Dec;12(12):1506-13. doi: 10.1038/nn.2438. PMID: 19935654
- 3) Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T, Nishi E. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. *Nat Commun.* 2014;5:3224. doi: 10.1038/ncomms4224. PMID: 24492630
- 4) Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin Is Required for Maintaining Pancreatic β -Cell Function. *Diabetes.* 2016 Oct; 65(10):3015-27. doi: 10.2337/db16-0178. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27385158