



Title	Characterization of PDX-1 Function in $\beta$ -Cell Specific Genes
Author(s)	綿田, 裕孝
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40036">https://hdl.handle.net/11094/40036</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	わた 綿 だ 田 ひろ 裕 たか 孝
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 13017 号
学 位 授 与 年 月 日	平成9年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Characterization of PDX-1 Function in $\beta$ -Cell Specific Genes (膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子群の発現における転写因子 PDX-1の生理的意義の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二  (副査) 教 授 松澤 佑次 教 授 宮崎 純一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

膵 $\beta$ 細胞には、glucose 応答性 insulin 分泌という固有の機能を担うために必要なユニークな遺伝子群が発現する。これらの膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子群の転写を誘導する転写因子を明らかにすることは、将来の遺伝子治療に向けた非 $\beta$ 細胞の $\beta$ 細胞化～バイオ人工膵島の構築にもつながり得るもので臨床的にも極めて意義深い。insulin 遺伝子転写調節に関わる転写因子群の中で、A領域と呼ばれるcis 調節領域に結合する転写因子 PDX-1 は、homeodomainを有する蛋白で、その欠損マウスでは膵が欠失するなど、膵の発生・分化に広範な生理機能を有することが示唆されている。そこで、私は、PDX-1 が単なる insulin 遺伝子の転写因子としての機能を超えて、複数の膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子に共通する転写因子として機能する可能性を探索するため、膵 $\beta$ 細胞に特徴的に発現する glucokinase (GK) 遺伝子及び amylin (IAPP) 遺伝子の転写活性化における PDX-1 の関与を検討した。また各遺伝子の promoter レベルでの解析に加え、PDX-1 を外来性に発現させた非 $\beta$ 細胞において膵 $\beta$ 細胞特徴的遺伝子群の発現が誘導されるか否かを解析した。

### 【方法】

1. 転写活性の評価：insulin, GK, IAPP 各遺伝子の promoter 活性の評価は、reporter gene analysis によって行った。即ち、それぞれの遺伝子の promoter 領域、あるいは、その mutant を luciferase 遺伝子上流に挿入した reporter gene construct および（遺伝子導入効率を補正する目的に） $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) 発現 plasmid を各 host cell に co-transfect し、48時間後に細胞抽出物を用いて、luciferase 活性及び $\beta$ -gal 活性を測定した。転写活性は、luciferase 活性を $\beta$ -gal 活性で除した relative luciferase activity により評価した。
2. stable transformant の作成：PDX-1 発現 plasmid で Neo<sup>r</sup> を有する pcDNA 3-PDX-1 を膵 $\alpha$ 細胞株  $\alpha$ TC-1 細胞に遺伝子導入し、G418耐性 clone を単離した。その後、PDX-1 の発現していない clone (PDX (-)  $\alpha$ TC-1) 及び PDX-1 の発現している clone (PDX (+)  $\alpha$ TC-1) をそれぞれ選別し実験に供した。
3. 蛋白、RNA の定量及び、転写因子の DNA 結合能の解析：PDX-1 蛋白の定量は独自に作成した抗 PDX-1 抗体を用いた Western-blot 法により、各 mRNA の定量は Northern-blot 法及び RT-PCR 法により、各蛋白の DNA 結合能は Gel-shift assay 法により、それぞれ評価した。

#### 【成績】

1. GK 遺伝子転写因子における PDX - 1 の関与：ヒト GK 遺伝子の promoter 領域を解析した結果、少なくとも約 650bp の 5' 隣接領域が膵  $\beta$  細胞における転写活性に重要であり、特にその領域に存在する insulin 遺伝子 A 領域に類似する hUPE 3 領域と、2 カ所存在する hPal 領域が重要な役割を有することが明らかとなった。さらに gel - shift assay の結果、hPal 領域には膵  $\beta$  細胞に特異的でない核蛋白が結合するのに対し、hUPE 3 領域には抗 PDX - 1 抗体により認識される蛋白が結合することが示された。また、非  $\beta$  細胞において PDX - 1 を過剰発現させると、hUPE 3 領域を介してヒト GK 遺伝子を活性化することが示された。以上のことより PDX - 1 は膵  $\beta$  細胞における GK 遺伝子活性化に重要な役割を担うことが示唆された。一方で、insulin 遺伝子において認められる E 蛋白との相乗的転写活性化作用が認められないなど、PDX - 1 による転写活性化機構はその対象となる遺伝子により若干異なることが示された。

2. IAPP 遺伝子転写活性における PDX - 1 の関与：ヒト IAPP 遺伝子の promoter 領域には A 領域に類似する領域が 3 カ所存在する。それらのうちの 2 つの領域を介して、PDX - 1 がヒト IAPP 遺伝子の転写を活性化し、膵  $\beta$  細胞における発現に関与していることが示唆された。

3. PDX - 1 発現  $\alpha$  TC - 1 細胞における検討：PDX - 1 が実際に非  $\beta$  細胞に  $\beta$  細胞特異的遺伝子群の発現を誘導し得るか否かを検討するため、発生学的に膵  $\beta$  細胞の近傍に位置する glucagon 産生細胞株  $\alpha$  TC - 1 に PDX - 1 を発現させた stable transformant を作成した。RT - PCR 法により内因性膵  $\beta$  細胞特徴的遺伝子発現に与える影響を検討した結果、PDX - 1 (+)  $\alpha$  TC - 1 細胞では IAPP 遺伝子発現の誘導を認めた。その際、insulin, GK 両遺伝子の発現は認められなかったが、さらに成長因子 betacellulin を加えることにより (PDX (-)  $\alpha$  TC - 1 では認められない) insulin, GK の各遺伝子発現を認めた。また、このような現象は EGF, TGF  $\alpha$ , IGF - I, bFGF, あるいは TGF  $\beta$  によってはいずれも認められなかった。

#### 【総括】

PDX - 1 は GK, IAPP 各遺伝子の 5' 隣接領域に存在する insulin 遺伝子 A 領域類似構造を介して、それらの遺伝子の転写を活性化させることを認めた。さらに betacellulin の存在下では、PDX - 1 は  $\alpha$  細胞系細胞株  $\alpha$  TC 1 に (膵  $\beta$  細胞に本来特異的とされる) insulin, GK, および IAPP の各遺伝子の発現を誘導し得た。以上より、PDX - 1 は膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子群に共通する転写因子として機能することが示され、「非  $\beta$  細胞の  $\beta$  細胞化」に際しての潜在的有用性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はインスリン遺伝子と並び、膵  $\beta$  細胞に特徴的に発現を認める膵  $\beta$  細胞型グルコキナーゼ、及び Islet Amyloid Polypeptide 遺伝子の発現においてインスリン遺伝子転写因子 PDX - 1 が重要な働きをすることを、レポーター遺伝子解析及びゲルシフト解析の手法を用いて証明した。

次にその結果を受けて、膵  $\beta$  細胞の発生学的近傍に位置するものの非膵  $\beta$  細胞である膵  $\alpha$  細胞に PDX - 1 を発現させ、そこに成長因子、betacellulin を添加することにより、インスリン、グルコキナーゼ、Islet Amyloid Polypeptide 遺伝子の発現誘導に成功した。

本研究は PDX - 1 の膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子発現に対する重要性を証明するとともに、非膵  $\beta$  細胞の膵  $\beta$  細胞化に対する PDX - 1 の潜在的有用性を示唆したものであり、学位の授与に値するものと考えられた。