The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The HNF-1 target Collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation
Author(s)	福井, 健司
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46367
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【33】

氏　　名	福　井　健　司（ふくい けんじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２００９０　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	The HNF-1 target Collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation **(HNF-1 標的遺伝子コレクトリンは SNARE 複合体形成に作用しインスリン開口放出を制御する)**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　下村伊一郎 （副査） 教　授　宮崎　純一　　教　授　荻原　俊男

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

Maturity-onset diabetes of the young（MODY）は単一遺伝子異常を原因とし、若年発症とインスリン分泌不全を特徴とする。MODY3 は転写因子 Hepatocyte nuclear factor-1α（HNF-1α）の遺伝子異常を原因とするが、HNF-1α異常によるインスリン分泌不全の発生機序には不明な点も多く、この HNF-1α の膵β細胞内における標的遺伝子の解析は調節性インスリン分泌機構の理解、糖尿病発症機序の解明に有用と考えられる。HNF-1α の膵β細胞における標的遺伝子を検索し、インスリン分泌に関与する新たな分子の同定、その機能を明らかにする目的で本研究を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

ラット膵β細胞系培養細胞である INS-1 細胞にドミナントネガティブ変異体 HNF-1α を発現させたときに発現抑制される遺伝子をサブトラクション法によりスクリーニングし、ノザンブロッティングの結果、HNF-1α に転写制御される遺伝子としてコレクトリンを同定した。コレクトリンのプロモーター領域をクローニングしたところプロモーター領域に HNF-1 結合領域を認め、その配列はヒト、マウス、ラットのいずれにおいても保たれていた。ゲルシフトアッセイ、リポーターアッセイにより解析した結果、コレクトリンは HNF-1α に直接転写制御されていた。コレクトリンに対する特異的抗体を作製し膵組織の免疫染色を行ったところ、コレクトリンは膵β細胞に発現していた。また Real time PCR を用いて生理的病態的条件下でのコレクトリン発現量変化を検討したところ、インスリン分泌不全をきたす MODY3 モデルマウスではコレクトリンの発現は著しく低下していたが、高脂肪食負荷マウスや肥満糖尿病モデルマウスなどの高インスリン血症の状態では上昇していた。

コレクトリンの安定過剰発現 INS-1 細胞は、通常の INS-1 細胞に比較し、グルコース応答性インスリン分泌は増加していたが、細胞内インスリン含量、グルコース負荷時の細胞内 Ca^{2+} 濃度には変化はなかった。一方、RNAi を用いてコレクトリン発現を抑制すると、グルコース応答性インスリン分泌は低下した。細胞内局在を免疫染色にて調べたところコレクトリンはインスリン分泌顆粒と重なって見られ、免疫電顕の結果、コレクトリンはインスリン分泌顆粒の膜上に存在した。

生体内での機能解析のため、ラットインスリンプロモーター下流にコレクトリン cDNA を連結した発現ユニットを用いて膵β細胞に特異的にコレクトリンを過剰発現させたトランスジェニック（Tg）マウスを作製、インスリン分泌能および耐糖能について検討した。腹腔内グルコース負荷試験において Tg マウスのグルコース負荷後インスリン分泌は増加し、血糖上昇は抑制された。膵組織切片を用いインスリンを免疫染色し形態計測から膵β細胞量を算出し検討したところ、Tg マウスと正常対照の膵β細胞量には差がなかった。単離膵島を用いた環流試験において、グルコース刺激による Tg マウス膵島からのインスリン分泌量は、正常対照マウスの膵島における分泌に対し増加していた。二光子励起顕微鏡を用いたインスリン顆粒開口放出回数の計測の結果、Tg マウスのβ細胞においてグルコース負荷後の開口放出は増加していた。

さらにコレクトリン相互作用物質をツーハイブリッド法を用いて検索し、SNARE 蛋白の一つ SNAP-25 に結合する蛋白 snapin を同定した。GST プルダウン、免疫沈降反応を用いた検討の結果、コレクトリンは snapin と直接結合しており、またコレクトリンは snapin を介して SNARE 複合体と結合していた。またコレクトリン過剰発現 INS-1 細胞では SNARE 複合体の形成が増加していた。

〔 総　　括 〕

膵β細胞における HNF-1α の新規標的遺伝子コレクトリンを同定した。コレクトリンはインスリン分泌促進作用を有していた。コレクトリンはインスリン分泌顆粒の膜上に存在し、snapin を介し SNARE 複合と結合していた。またコレクトリン発現増加により SNARE 複合体形成は増加しており、コレクトリンは SNARE 複合体形成を促進しインスリン分泌顆粒の開口放出を増やす事によりインスリン分泌を増やすと考えられた。

またコレクトリンの発現増強は糖応答性インスリン分泌の増加をもたらすことから、２型糖尿病においてみられるインスリン分泌の相対的不足に対する治療への応用の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、転写因子である hepatocyte nuclear factor (HNF)-1α の膵β細胞における標的遺伝子を検索し、インスリン分泌機構に関与する新たな分子の同定を行ったものである。申請者は HNF-1α により発現制御される遺伝子をサブトラクションにより検索し、コレクトリンを同定、それが膵β細胞に発現し、HNF-1α に直接転写制御されていることを明らかにした。コレクトリンを膵β細胞に過剰発現させるとグルコース応答性インスリン分泌が増加した。さらにコレクトリンの結合蛋白として snapin を同定、コレクトリンが snapin を介し SNARE 複合体に結合し、複合体形成を促進することによりインスリン開口放出を促進する、というインスリン分泌増加作用のメカニズムを明らかにした。以上の研究結果は、調節性インスリン分泌に関与する新たな分子を示すとともに、糖尿病に対する新たな治療戦略の可能性を示すものとして、その成果は意義深く学位の授与に値すると考えられる。