



Title	Functional analysis of novel candidate regulators of insulin secretion in the MIN6 mouse pancreatic β cell line
Author(s)	小林, 正樹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59534
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	小林 正樹
論文題名 Title	Functional analysis of novel candidate regulators of insulin secretion in the MIN6 mouse pancreatic β cell line (マウス膵 β 細胞株MIN6におけるインスリン分泌制御に関わる候補遺伝子の機能解析)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
MIN6細胞は、マウス由来の膵β細胞株であり、生体内のβ細胞と同じグルコース応答性インスリン分泌 (glucose stimulated insulin secretion: 以下GSIS) 挙動を示すため、β細胞におけるGSISを解析するにあたって非常に有用なツールとなる。ところが、そのGSIS能は継代とともに低下してしまう。過去当研究室は、継代を重ねてもGSIS能が維持されるサブクローン"clone 4" (以下MIN6c4) を樹立し、このMIN6c4と親株のMIN6 (以下MIN6Pr) のそれぞれの継代数が低いもの (low passage: LP) と高いもの (high passage: HP) との間で網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、MIN6PrにおいてLPで高い発現を示していてもHPでは低下するが、MIN6c4ではHPでも高い発現を維持する遺伝子が多数同定された。(Yamato E et al PLOS ONE 2013) これらの遺伝子は、膵β細胞におけるGSIS機構に重要なものであると期待される。今回上記遺伝子群から、UniGene、TlDbase等のデータベースに基づき、膵臓、中でも膵島に発現が限局されると考えられる6個の遺伝子 (<i>Tmem59l</i>, <i>Scgn</i>, <i>Gucy2c</i>, <i>Slc29a4</i>, <i>Cdhr1</i>, <i>Celsr2</i>) を選出し、これらをMIN6c4においてKnockdownすることにより、インスリン分泌への影響を検討した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
解析に先立ち、選出した遺伝子の実際の組織別発現パターンをマウス組織でのRT-PCRにより調べた。すると、<i>Celsr2</i>以外の遺伝子は、膵島での特異的な発現が確認できた。次に、選んだ遺伝子それぞれについてshort hairpin RNA (shRNA) を設計し、それらの発現ユニットと薬剤耐性遺伝子を組み込んだLentivirus vectorを作製した。これらをMIN6c4に感染させ、その3日後から薬剤選択を開始し、2-3週間後にKnockdown細胞を得た。これらの細胞で標的mRNAの発現抑制を確認後、グルコース及びK⁺刺激インスリン分泌、インスリン含量を測定した。その結果、<i>Tmem59l</i>, <i>Scgn</i>, <i>Gucy2c</i> Knockdownによりインスリン分泌低下が、<i>Slc29a4</i> Knockdownによる分泌上昇が確認された。一方で、<i>Scgn</i>, <i>Gucy2c</i>, <i>Slc29a4</i>のKnockdownではインスリン含量の低下も見られた。これら3つの遺伝子は、インスリン含量に影響した結果、インスリン分泌に関与した可能性が考えられる。我々はインスリン分泌に特異的に関与する遺伝子として、knockdownによりインスリン含量への影響が見られなかった<i>Tmem59l</i>に着目し、<i>Tmem59l</i>過剰発現MIN6c4細胞のインスリン分泌能、Knockdown細胞におけるGLP-1応答性、TMEM59Lタンパク質のMIN6c4での細胞内局在について解析した。その結果、<i>Tmem59l</i>はインスリン含量やGLP-1シグナルには影響せず、インスリン分泌を正に制御することがわかった。さらにTMEM59Lタンパク質はMIN6c4細胞内でゴルジ体及びインスリン顆粒に局在することが示唆された。	
〔総括(Conclusion)〕	
今回の解析により、以前当研究室が行ったMIN6PrとMIN6c4間での網羅的遺伝子発現解析により得られた遺伝子群の中には、実際にインスリン分泌に関与するものがあることがわかった。このことから、以前の発現解析は、GSIS制御に関わる候補遺伝子のスクリーニング法として、有用であることが示唆された。さらに、我々は今回選んだ遺伝子の中から、インスリン含量には影響を及ぼさずにインスリン分泌を正に制御するものとして<i>Tmem59l</i>に着目した。TMEM59Lタンパク質は膜貫通ドメインを持つことから、細胞膜に局在することが予想されたが、我々の解析により、MIN6c4細胞内ではゴルジ体及びインスリン顆粒に局在することが見出された。これらの知見から、<i>Tmem59l</i>はゴルジ体からのインスリン顆粒形成もしくはインスリン顆粒の細胞膜への輸送等を介して、インスリン開口分泌に関与していることが考えられる。膵β細胞での<i>Tmem59l</i>に関する報告はこれまでなく、今回の知見は<i>Tmem59l</i>がインスリン分泌を制御する新規遺伝子であることを示唆するものである。しかし、今回の知見はあくまでMIN6細胞における<i>in vitro</i>に限ったものであるため、<i>Tmem59l</i>の病態への関与をより深く検討するためには、動物レベルでの解析が必要である。そのため、我々は<i>Tmem59l</i>ノックアウトマウスを現在作製中であり、これを用いて<i>in vivo</i>における<i>Tmem59l</i>の機能解析を今後行っていく予定である。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小林 正樹			
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主査	大阪大学教授	宮崎 純一
	副査	大阪大学教授	原田 彰宏
	副査	大阪大学教授	下村 け-郎.

論文審査の結果の要旨

膵β細胞株MIN6は良好なグルコース応答性インスリン分泌（GSIS）を示すが、これは継代培養を重ねることで低下する。申請者の所属する研究室は、継代後もGSIS低下が見られないサブクローンMIN6 clone 4（MIN6c4）とMIN6親株とで網羅的遺伝子発現解析を行い、継代後も前者で発現が維持されている遺伝子を探索し、報告している。本研究は、この遺伝子群の中から6個の遺伝子（*Tmem59l*, *Scgn*, *Gucy2c*, *Slc29a4*, *Cdhr1*, *Celsr2*）を選び、これらをMIN6c4においてノックダウンさせることによるインスリン分泌への影響を検討した。その結果、*Tmem59l*のノックダウンがインスリン分泌を低下させることを見出した。さらに本研究では、TMEM59Lタンパク質がゴルジ体及びインスリン顆粒上に局在することも示している。*Tmem59l*については、膵β細胞における機能に関する報告はこれまでされていないため、本研究はインスリン分泌制御に関わる新規遺伝子として*Tmem59l*を見出した、という点で学位に値するものと認める。