

氏名(本籍)	貴志明生(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第434号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Sumoylation of Pdx1 Is Associated with Its Nuclear Localization and Insulin Gene Activation (Pdx1蛋白のSUMO-1による修飾はその核内局在とinsulin遺伝子活性化に 関与する)

審査委員	主査 教授	上原正巳
	副査 教授	新井良八
	副査 教授	松浦博

論文内容要旨

【目的】

Pancreatic-Duodenal Homeobox-1 (Pdx1) は胎生期の膵の発生及び膵 β 細胞におけるinsulin遺伝子発現に重要な転写因子であり、本蛋白の核内移行にはリン酸化の関与が知られている。本蛋白のアミノ酸配列から類推される分子量は31kDaであるにも関わらず有核生物では46kDaの蛋白として同定され、この分子量の変化から本蛋白の修飾にリン酸化以外の蛋白修飾の関与が示唆されてきたが詳細は解明されていなかった。

一方、蛋白修飾にsmall ubiquitin-related modifier 1 (SUMO-1) の関与が明らかになってきた。SUMO-1は分子量が約12kDaの蛋白で、転写因子を始めとした多くの蛋白に結合(以下SUMO化と略す)し、その蛋白の核内移行や安定化、標的蛋白の転写活性制御などの役割を担うことが報告されている。

我々はPdx1蛋白の機能調節機構の解明を目的として、Pdx1蛋白の修飾にSUMO化が関与するかどうか、さらにSUMO化がPdx1の細胞内局在や安定化、インスリン遺伝子の転写活性に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。

【方法】

- (1) 膵 β 細胞株の β -TC-6細胞及びnon- β 細胞としてサル線維芽細胞株のCOS-7細胞を用いて検討した。
- (2) Pdx1蛋白のリン酸化による分子量の変化は細胞抽出蛋白をacid phosphataseにて処理し、電気泳動後western blot法にて検討した。
- (3) Pdx1蛋白とSUMO-1蛋白との結合の有無は細胞抽出蛋白を抗SUMO-1抗体にて免疫沈降し、抗Pdx1抗体を用いてwestern blot法を行い検討した。
- (4) SUMO-1のPdx1蛋白に及ぼす影響をRNA interference法(以下SUMO-iRNAと略す)を用いて内因性のSUMO-1発現を抑制することにより観察した。SUMO-iRNAの存在及び非存在下にPdx1蛋白の発現をwestern blot法にて、Pdx1 mRNAの発現をnorthern blot法にて検討した。
- (5) Pdx1蛋白及びSUMO-1蛋白の細胞内局在を免疫組織化学法にて観察した。
- (6) SUMO-1のPdx1蛋白の安定化に及ぼす作用をSUMO-iRNAにて内因性SUMO-1の発現を抑制した条件で、proteasome inhibitor (lactacystin) の存在及び非存在下に検討した。
- (7) Pdx1のinsulin promoterに及ぼす影響をSUMO-iRNAの存在及び非存在下にluciferase assayを用いて検討した。

【結果】

- (1) Pdx1蛋白のアミノ酸配列から類推される分子量は31kDaであるが、 β -TC細胞に内因性に発現するPdx1蛋白の分子量は46kDaであった。培養液中のglucose濃度を変更してもその分子量に変動はなかった。さらにCOS-7細胞に発現させたPdx1蛋白も分子量は46kDaであり、この抽出蛋白をacid phosphataseにて処理をしても31kDaのPdx1蛋白を認めなかった。また両細胞ともにPdx1蛋白を核分画に認めた。
- (2) 細胞抽出蛋白を抗SUMO-1抗体にて免疫沈降し抗Pdx1抗体にて検出すると、核分画に46kDaのPdx1を認めた。
- (3) SUMO-iRNA存在下にてSUMO-1蛋白発現は対照に比し約60%抑制され ($P < 0.05$)、またPdx1蛋白も約80%抑制された ($P < 0.01$)。一方、Pdx1 mRNA発現はSUMO-iRNAの存在にて有意な変化を認めなかった。
- (4) Pdx1蛋白の細胞内局在を検討すると、SUMO-iRNA非存在下でPdx1及びSUMO-1蛋白は核内に共発現していたが、SUMO-iRNA存在下ではPdx1及びSUMO-1蛋白の核内発現は共に減少した。
- (5) SUMO-iRNA及びlactacystinを細胞に孵置すると、約34kDaに新たなPdx1蛋白の発現を認めた。
- (6) ラットinsulin遺伝子 I のpromoterを用いてluciferase activityを測定するとSUMO-iRNA存在下にて、非存在下に比し有意に活性は低下した。

【考察】

Pdx1蛋白はSUMO-1蛋白と結合しリン酸化以外にSUMO-1による修飾を受けることを明らかにした。さらにPdx1蛋白の分子量が類推される31kDaではなく46kDaの分子量を示すことはSUMO-1蛋白と結合したためであると考えられた。SUMO化によりPdx1蛋白は核内に局在しinsulin遺伝子のpromoterに結合し、その活性を上昇させることが示唆された。またSUMO化されないPdx1蛋白はproteasomeにて速やかに分解されることが考えられ、SUMO化がPdx1蛋白の安定化に重要であると考えられた。

【結語】

SUMO-1のPdx1蛋白における修飾はPdx1蛋白の核内局在や安定化、さらにPdx1によるinsulin遺伝子の転写調節に関与すると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、膵の発生及びinsulin遺伝子発現に重要な転写因子であるPancreatic-Duodenal Homeobox-1(Pdx1)蛋白の機能調節機構の解明を目的として、small ubiquitin-related modifier 1(SUMO-1)による修飾に注目し種々の検討を行った。その結果、Pdx1蛋白はSUMO-1蛋白と結合(以下SUMO化と略す)することを明らかにした。SUMO化によりPdx1蛋白は核内に局在しinsulin遺伝子のpromoterに作用し、その活性を上昇させることが示唆された。さらに、SUMO化がPdx1蛋白の安定化に重要であると考えられた。

本研究はPdx1蛋白の機能調節機構に、SUMO-1による修飾が関与することを初めて実証し、示唆に富むものである。従って、博士(医学)授与に値するものと判定した。

なお、最終試験は平成15年2月5日に実施し、合格と判定した。