

図32 SOX6によるサイクリンD1プロモーター上のアセチル化ヒストンH3、H4の減少
 サイクリンD1プロモーター上のHDAC/SOX6/β-カテニン/TCF複合体の模式図
 (A) 5 μgのpCMV-FLAG-SOX6又はpCMVベクターを形質導入したHEK293細胞の抗アセチル化ヒストンH3抗体(左カラム)又は抗アセチル化ヒストンH4抗体(右カラム)を用いたChIP解析結果。免疫沈降のネガティブコントロールにはウサギIgGを使用した。サイクリンD1プロモーターのアンプリコンはQRT-PCRにより定量し、任意の相対値で示した。
 (B) 0.1 μgのサイクリンD1プロモータールシフェラーゼリポータープラスミドと0.01 μgのpRL-TK及びpCMV-β-cateninとpCMV-SOX6を図中に表示の量、形質導入したHEK293細胞の相対ルシフェラーゼ活性。形質導入の24時間後、細胞を図中表示の濃度のScriptaidで16時間処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。相対ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性を海シイタケルシフェラーゼ活性で補正することで算出した。エラーバーは標準誤差(n=3)を示し、*はP<0.01で有意であることを示す。

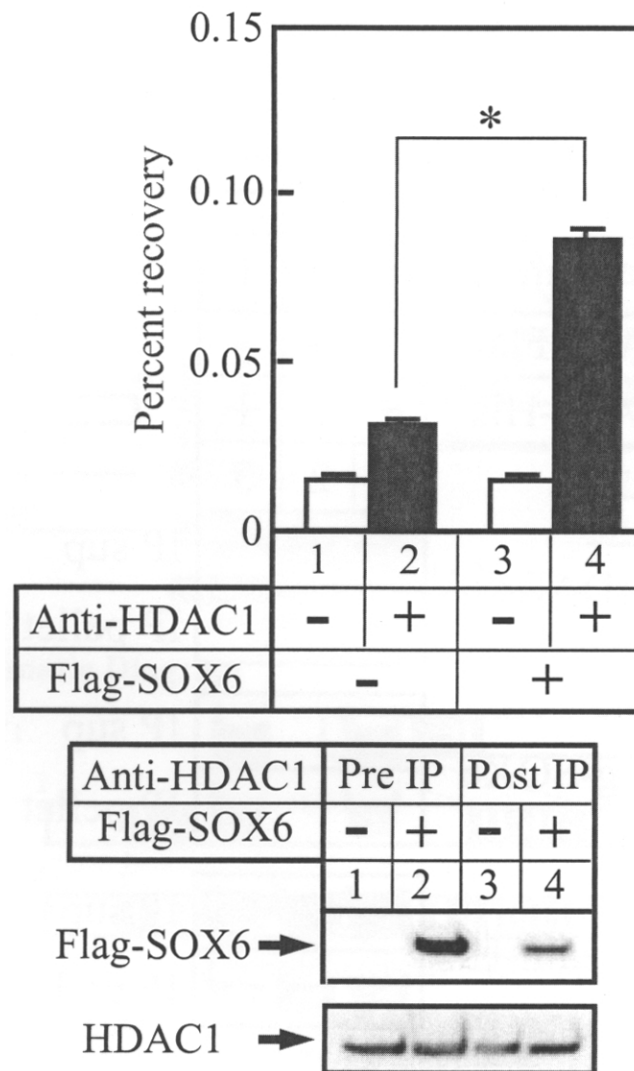


図33 SOX6によるサイクリンD1プロモーター上へのヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 1のリクルート
 1 μ gのpCMV-FLAG-SOX6又はpCMVベクターを形質導入したHEK293細胞の抗HDAC1抗体を用いたChIP解析結果(上図)。下図は免疫沈降前の細胞抽出液 (*Pre IP*) と免疫沈降物 (*Post IP*) の抗HDAC1抗体によるイムノブロット解析結果を示す。免疫沈降のネガティブコントロールにはウサギIgGを使用した。サイクリンD1プロモーターのアンプリコンはQRT-PCRにより定量し、任意の相対値で示した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を示し、*はP<0.01で有意であることを示す。

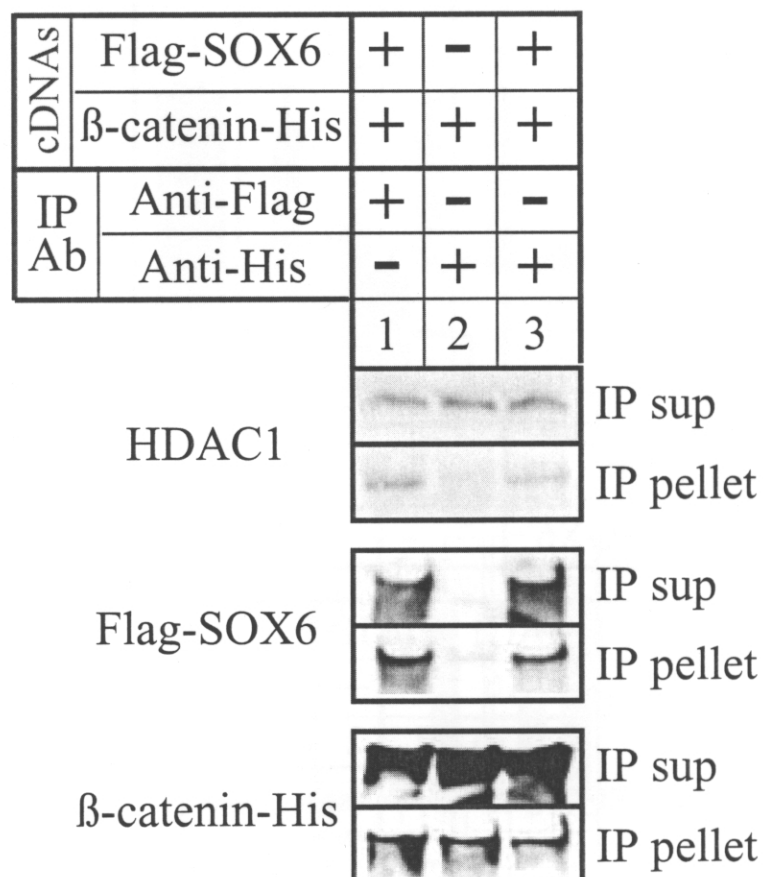
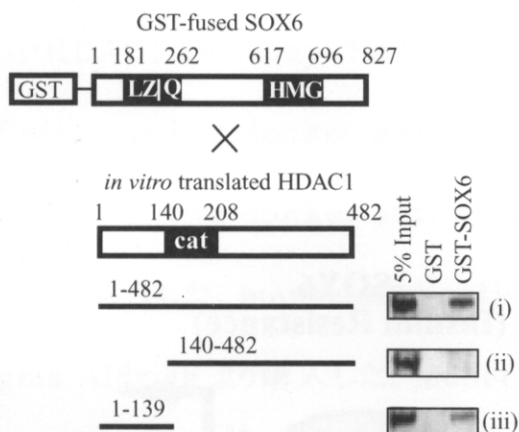
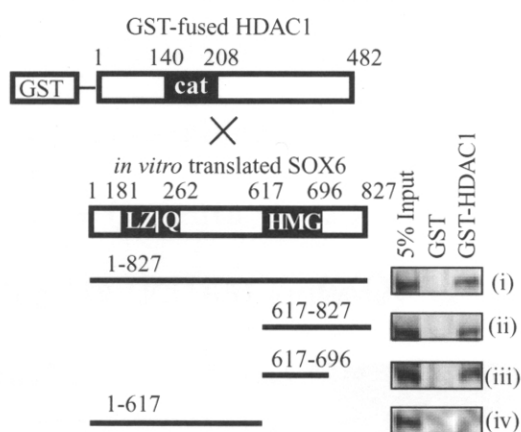


図34 HEK293細胞におけるHDAC1/SOX6/ β -カテニン複合体形成
 HEK293細胞 (5×10^5 個/T-25フラスコ) に、 $1 \mu\text{g}$ のpCMV-FLAG-SOX6、
 pCMV- β -catenin-Hisを形質導入した。2日後、細胞を回収し、抗ヒスチジン抗体
 若しくは、抗FLAG抗体で免疫沈降した。免疫沈降物をSDS-PAGE展開した後、
 抗HDAC1抗体抗(上図)、FLAG抗体(中図)又は、抗ヒスチジン抗体(下図)で
 イムノプロット解析を行った。

A. GST-SOX6 Pulldown



B. GST-HDAC1 Pulldown



C. Schematic Diagram

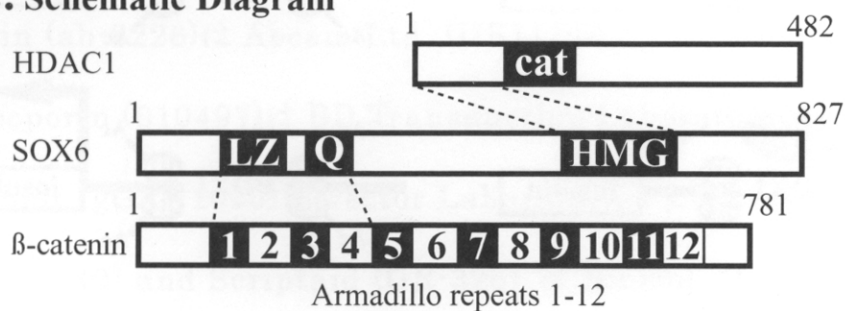


図35 SOX6とHDAC1の相互作用

(A) GST融合SOX6と*in vitro*翻訳HDAC1及びその変異体の結合
 (B) GST融合HDAC1と*in vitro*翻訳SOX6及びその変異体の結合
 グルタチオンビーズと結合したGSTタンパク又はGST融合タンパクと³⁵S標識した*in vitro*翻訳タンパクを室温で1時間、混合した。
 数回洗浄した後、ビーズに結合した*in vitro*翻訳タンパクと5%のinputをSDS-PAGEで展開し、FUJIX BAS2000 (富士フィルム) で解析した。
 (C) HDAC1/SOX6/β-カテニン複合体の結合模式図

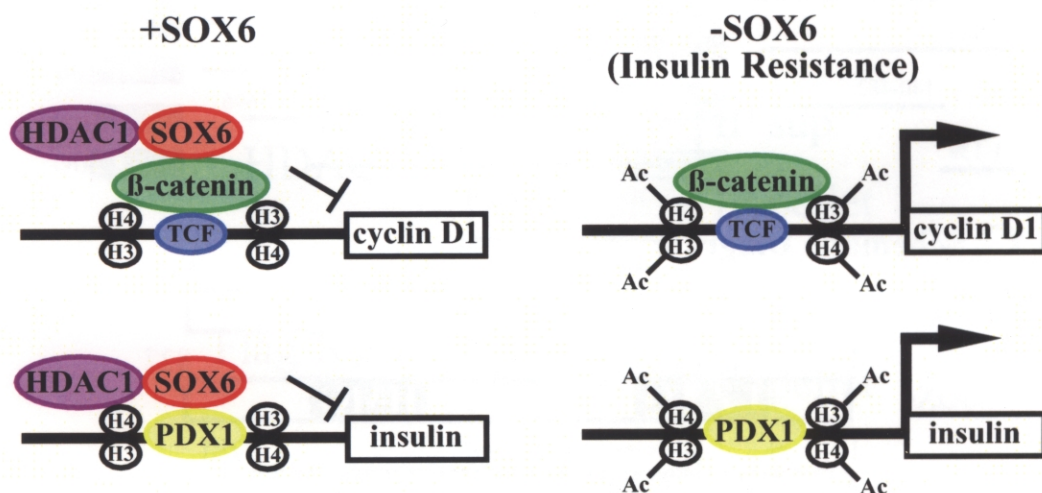


図36 SOX6の発現制御による膵β細胞のインスリン抵抗性適応メカニズム
 SOX6はサイクリンD1プロモーター上ではβ-カテニンと、インスリンプロモーター上ではPDX1と複合体を形成し、HDAC1をリクルートすることでそれら遺伝子を発現抑制する。SOX6の発現が抑制されることで、サイクリンD1、インスリンの発現が上昇し、細胞増殖及びインスリン分泌が亢進する。

2-5 実験手法

①試薬

抗体: Rabbit polyclonal anti- β -catenin antibody (H-102) (sc-7199)、anti-HDAC1 antibody (H51) (sc-7872)、peroxidase-conjugated affinity-purified donkey anti-rabbit IgG、peroxidase-conjugated affinity-purified donkey anti-mouse IgG は Santa Cruz Biotechnology (CA)より購入した。monoclonal anti-Flag M2 (F3165) antibody は Sigma-Aldrich より購入した。monoclonal anti-RGS-His (34610)は Qiagen より購入した。rabbit polyclonal anti-SOX6 (ab-12054)、monoclonal anti- β -actin (ab-8226)は Abcam Ltd. (UK)より購入した。monoclonal anti-nucleoporin (610497)は BD Transduction Laboratories より購入した。control rabbit IgG (I-1000)は Vector Laboratories より購入した。MG132 (ZW8440) and Scriptaid (GR-326) は Biomol より購入した。 β -Galactosidase Staining Kit は Mirus (Madison, WI)より購入した。

②細胞培養

INS-1E細胞、MIN6 細胞は第 1 部実験手法に記載した方法で培養した。NIH-3T3 細胞(マウス胎児由来繊維芽細胞株)は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。293 細胞(ヒト胎児腎臓由来細胞)(HEK293, CRL-1573)はthe American Type Culture Collection (Manassas, VA)から入手した。これらの細胞は 10%非働化FBS、100 units/ml ペニシリン/ストレプト

マイシン 含有DMEM培地で 37℃、5%二酸化炭素濃度下で培養した。

HIT-T15 細胞は大日本住友製薬より入手し、2 %非働化FBS、25 mMグルコース、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン含有DMEM培地で 37℃、5%二酸化炭素濃度下で培養した。

③siRNA 導入と細胞増殖アッセイ

SOX6 に対するsiRNAは第 1 部実験手法に記載の配列を用いた。細胞増殖実験のために、INS-1E、NIH-3T3、MIN6、HIT-T15 細胞をT-25 flaskに 5×10^5 個播き込んだ。翌日、INS-1EとNIH-3T3 細胞にはHVJ envelope Vector Kit GenomONE (Ishihara Sangyo Kaisha) を使って、キット添付のマニュアルに従ってsiRNAを導入した。MIN6 とHIT-T15 細胞はLipofectAMINE PLUS reagentを用いてsiRNA導入を行った。siRNA導入後、細胞を 6 穴プレートに図のレジェンドに記載した細胞数播き込み、24 時間おきに細胞数を計測した。SOX6 の発現はイムノブロットで検出した。ヒト β -カテニンに対するsiRNAはInvitrogenのvalidated Stealth™ RNAi DuoPak (12938-123) を購入して使用した。コントロールにはStealth™ RNAi Negative Control Med GC (12935-300)を使用した。293 細胞をT-25 flaskに 5×10^5 個播き、フラスコ当たり 200 pmolのsiRNAをLipofectAMINE 2000 reagentを用いてトランスフェクションした。48 時間後の細胞をクロマチン免疫沈降実験に使用した。

④レトロウイルス感染と細胞増殖、BrdU 取り込み、細胞周期アッセイ

INS-1E、MIN6、NIH-3T3 細胞への SOX6 及び green fluorescent protein (GFP)発現のレトロウイルス感染は第 1 部実験手法に記載の方法で行った。感染翌日から 6 日間、5 $\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンを含む培地で細胞培養を行い、感染細胞の選抜を行った。外来遺伝子のゲノムへの挿入部位の影響を極力減らすために、混合クローンの状態で以下のアッセイを行った。

細胞増殖速度の測定は 6 穴プレートに 0.3×10^5 個の細胞を播種し、24 時間毎に 4 日日間細胞数を測定して行った。

BrdU 取り込み試験は BrdU labeling kit (Roche Applied Science)を用いて実施した。

細胞周期アッセイは 0.1% FBS含有DMEM培地で 30 時間前培養することで、G1 アレストした細胞を用いた。細胞を 0.2% TritonX-100、0.1 mg/ml of RNase A、25 $\mu\text{g/ml}$ ヨウ化プロピディウム含有PBSで懸濁した後、細胞をフローサイトメトリー(FACS Calibur; Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA)に供し、ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME)を用いてG₁、S、G₂/M期にある細胞数を計測した。

⑤ルシフェラーゼアッセイ

24 穴プレートにNIH-3T3 or 293 細胞をウェル当たり 1.0×10^5 個播種し、翌日 FuGENE6™ (Roche)を用いて、ルシフェラーゼリポータープラスミド、発現プラスミド、内標準となる β -ガラクトシダーゼ、海シイタケルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドを形質導入した。各ウェルの形質導入するDNA量は空ベクターを加えるこ

とで、一定にした。形質導入の 20 時間後、細胞を溶解し、第 1 部実験手法に記載の方法で、ホタルルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性若しくは海シイタケルシフェラーゼ活性を測定した。全てのアッセイは 3 連で行い、3 度以上行った。

⑥定量的 RT-PCR

第 1 部実験手法に記載の方法で行った。使用したプライマー配列は第 1 部図表中の表 3 に記載した。

⑦プラスミド

全長マウスSOX6 及び、SOX6(アミノ酸 1-617、181-827、263-827、181-262、617-827、617-696、 Δ LZ/Q (Δ 181-262))の各種デリーション変異体はPCRにより各フラグメントを増幅した後、pcDNA3 ベクターに組み込んで作製した。マウス TCF4 発現ベクター(pcDNA/myc-mTCF4)はBert Vogelstein博士 (The Johns Hopkins Oncology Center)より供与頂いた。マウスサイクリンD1 プロモーター、TOPFLASHプロモーターはJohan Auwerx博士 (CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur)より供与頂いた。マウス β -カテニン発現ベクター(pCMV- β -catenin)はマウス肝臓RNAを鋳型としたRT-PCRにより得られた全長マウス β -カテニン(アミノ酸 1-781)をpcDNA3 ベクターに挿入することで得られた。pCMV- β -catenin(S33Y)は前述したベクターの 33 番目のセリン残基をチロシン残基にQuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて変換することで得られた。マウス β -カテニン(アミノ酸

1-468、1-134、135-300、 Δ 135-387)の各種デリーション変異体はPCRにより各フラグメントを増幅した後、pcDNA3 ベクターに組み込んで作製した。

pCMV- β -catenin-His 及びpCMV- β -catenin(S33Y)-Hisは

pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen)にマウス β -カテニン及び、マウス β -カテニン

(S33Y)を挿入することで得られた。pCMV-Flag-SOX6 及びpCMV-Flag-SOX9

はマウス全長SOX6(アミノ酸 1-827)及び、ヒト全長SOX9(アミノ酸 1-509)を

pCMV-Tag2 (Stratagene)に挿入することで得られた。pBIND- β -cateninは

GAL4 と β -カテニンの融合タンパクを作製する発現ベクターであり、pBIND

(Clontech)にマウス β -カテニンを挿入することで得られた。全長マウスHDAC1 及

び、HDAC1(アミノ酸 1-482、1-139、140-482)の各種デリーション変異体は

pCIneo mouse HDAC1-myc (Christian Seiser博士 University of Vienna)

を鋳型としてPCRにより各フラグメントを増幅した後、pCR2.1 ベクター

(Invitrogen)に組み込んで作製した。PCR反応後シーケンスにより配列確認を行

った。

⑧ *in vitro* 結合アッセイ

GST-pulldownアッセイは第 1 部実験手法に記載の方法で行った。*in vitro*

翻訳タンパクとしてはSOX6、 β -カテニン、HDAC1 の各種デリーション変異体を

使用した。大腸菌発現タンパクとしては全長mSOX6(アミノ酸 1-827)、全長m β -

カテニン(アミノ酸 1-781)、全長mHDAC1(アミノ酸 1-482)のGST融合タンパクを

使用した。*in vitro*競合結合アッセイ用のN末端ヒスチジン融合SOX6 とSOX9 は

pET15b(TaKaRa, Kyoto, Japan)を用いて作製した。Ni²⁺-NTA column

(Qiagen)で精製したタンパクをSDS-PAGEで分子量、純度を確認した後、アッセイに使用した。

⑨免疫沈降実験

免疫沈降に供試する細胞は 20 mM HEPES (pH 7.9), 1% NP-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and 1 µg/ml aprotinin からなるバッファーに溶解した後、22.5-gauge needle に 15 回通すことで、DNA を細断した。該細胞溶解液を毎分 15,000 回転で遠心分離することで得られた細胞溶解液上清と各種抗体とを混合し、4℃、一晚インキュベートした。続いて、2 次抗体と 4℃、1 時間インキュベートした後、プロテイン A アガロースを加えて更に 1 時間インキュベートした。得られたプロテイン A アガロースを 16.7mM トリス塩酸(pH8.1)、167mM NaCl、0.01% SDS、1.1% Triton X-100、1.2mM EDTA からなるバッファーで数回洗浄した後、イムノブロット解析に供した。

⑩イムノブロット解析

SDS-8% PAGEゲルを用いて解析した。抗体は抗SOX6、抗β-アクチン、抗ヌクレオポリン、抗β-カテニン、抗ヒスチジン抗体、抗FLAG抗体、抗HDAC1抗体を一次抗体として使用した。二次抗体には、horseradish peroxidase-conjugated, affinity-purified donkey anti-mouse IgGと anti-rabbit IgGを 1:3,000 希釈して使用した。結合した抗体はECL-PlusR systemを用いた化学蛍光発光法により検出した。蛍光画像はLAS-3000 (Fuji Film Inc.)を用いて取得した。

⑪クロマチン免疫沈降実験

第 1 部実験手法記載の方法で行った。使用した抗体は抗アセチル化ヒストン H3 抗体、抗アセチル化ヒストン H4 抗体、抗 β -カテニン抗体、抗 FLAG 抗体であり、検出に用いたプライマー配列はヒトサイクリン D1 プロモーター (5'-CCGACTGGTCAAGGTAGGAA-3'、5'-CCAAGGGGGTAACCCTAAAA-3')である。

結語

本研究結果から、SOX6 がインスリン抵抗性を代償するための膵 β 細胞からのインスリン分泌増加機構の一端を担っている可能性が示唆された。すなわち、インスリン感受性臓器へ十分にインスリンが供給されている糖代謝が正常な状態では、膵 β 細胞において SOX6 はブレーキとして働くことでインスリン分泌量を適正に調節しているが、インスリン抵抗性に適応するためにインスリン分泌増加が必要となった場合は、膵 β 細胞は SOX6 の発現を抑制して、言わばブレーキを外すことでインスリン感受性臓器のインスリン需要に応えていると考えられる(図 36)。

図 36 に示すとおり、SOX6 は転写因子 PDX1 及び β -カテニンの転写活性を調節することで、膵 β 細胞の細胞増殖能とインスリン分泌能の両方を制御していることが分かった。一般的に細胞増殖と分化は、一方が促進されればもう一方は抑制される、相反する関係と考えられているため(86)、分化した膵 β 細胞が獲得する形質であるインスリン分泌と細胞増殖を同じ方向に調節することは一見矛盾するように思われる。しかし近年、Dor, Y.らは膵 β 細胞の増加に関して幹細胞からの分化よりも成熟膵 β 細胞の分裂の方が寄与が大きいことを報告している(64)。このように、膵 β 細胞が分化形質を保ちながら細胞増殖する場合、細胞増殖とインスリン分泌両方を制御する SOX6 の果たす役割は大きいと思われる。今後、SOX6 の高脂肪食による発現抑制機構や *in vivo* での SOX6 の機能解析を行うことで、更に代償的インスリン分泌亢進メカニズムに迫りたい。このメカニズムの全貌を解明することが、2 型糖尿病の治療に繋がると信じる。

引用文献

1. Kawamori, R. (1998) *Diabetes Res Clin Pract* 40 Suppl, S35-42
2. Nagashima, K., and Inagaki, Y. (2007) *Saishinnigaku* 62, 101-106
3. Hani, E. H., Stoffers, D. A., Chevre, J. C., Durand, E., Stanojevic, V., Dina, C., Habener, J. F., and Froguel, P. (1999) *J Clin Invest* 104, R41-48
4. Macfarlane, W. M., Frayling, T. M., Ellard, S., Evans, J. C., Allen, L. I., Bulman, M. P., Ayres, S., Shepherd, M., Clark, P., Millward, A., Demaine, A., Wilkin, T., Docherty, K., and Hattersley, A. T. (1999) *J Clin Invest* 104, R33-39
5. Stoffers, D. A., Ferrer, J., Clarke, W. L., and Habener, J. F. (1997) *Nat Genet* 17, 138-139
6. Wegner, M. (1999) *Nucleic Acids Res* 27, 1409-1420
7. Schepers, G. E., Teasdale, R. D., and Koopman, P. (2002) *Dev Cell* 3, 167-170
8. Lefebvre, V., Li, P., and de Crombrughe, B. (1998) *Embo J* 17, 5718-5733
9. Cohen-Barak, O., Yi, Z., Hagiwara, N., Monzen, K., Komuro, I., and Brilliant, M. H. (2003) *Nucleic Acids Res* 31, 5941-5948
10. Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., and Lefebvre, V. (2001) *Dev Cell* 1,

277-290

11. Kulkarni, R. N., Jhala, U. S., Winnay, J. N., Krajewski, S., Montminy, M., and Kahn, C. R. (2004) *J Clin Invest* 114, 828-836
12. Mosley, A. L., Corbett, J. A., and Ozcan, S. (2004) *Mol Endocrinol*
13. Hui, H., and Perfetti, R. (2002) *Eur J Endocrinol* 146, 129-141
14. Brissova, M., Shiota, M., Nicholson, W. E., Gannon, M., Knobel, S. M., Piston, D. W., Wright, C. V., and Powers, A. C. (2002) *J Biol Chem* 277, 11225-11232
15. Dutta, S., Gannon, M., Peers, B., Wright, C., Bonner-Weir, S., and Montminy, M. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1065-1070
16. Johnson, J. D., Ahmed, N. T., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., Misler, S., Edlund, H., and Polonsky, K. S. (2003) *J Clin Invest* 111, 1147-1160
17. Wollheim, C. B. (2000) *Diabetologia* 43, 265-277
18. Qiu, Y., Guo, M., Huang, S., and Stein, R. (2002) *Mol Cell Biol* 22, 412-420
19. Mosley, A. L., and Ozcan, S. (2004) *J Biol Chem* 279, 54241-54247
20. Petersen, H. V., Peshavaria, M., Pedersen, A. A., Philippe, J., Stein, R., Madsen, O. D., and Serup, P. (1998) *FEBS Lett* 431, 362-366
21. Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., and Montminy, M. R. (1994) *Mol Endocrinol* 8, 1798-1806

22. Peshavaria, M., Henderson, E., Sharma, A., Wright, C. V., and Stein, R. (1997) *Mol Cell Biol* 17, 3987-3996
23. Kouzarides, T. (2007) *Cell* 128, 693-705
24. Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. (2007) *Cell* 128, 707-719
25. Mosley, A. L., and Ozcan, S. (2003) *J Biol Chem* 278, 19660-19666
26. Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Arlt, M. F., Horton, J. P., and Brilliant, M. H. (2001) *Gene* 265, 157-164
27. Hagiwara, N., Klewer, S. E., Samson, R. A., Erickson, D. T., Lyon, M. F., and Brilliant, M. H. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4180-4185
28. Lioubinski, O., Muller, M., Wegner, M., and Sander, M. (2003) *Dev Dyn* 227, 402-408
29. Kasimiotis, H., Myers, M. A., Argentaro, A., Mertin, S., Fida, S., Ferraro, T., Olsson, J., Rowley, M. J., and Harley, V. R. (2000) *Diabetes* 49, 555-561
30. Kasimiotis, H., Fida, S., Rowley, M. J., Mackay, I. R., Zimmet, P. Z., Gleason, S., Rabin, D. U., and Myers, M. A. (2001) *Autoimmunity* 33, 95-101
31. Liu, A., Desai, B. M., and Stoffers, D. A. (2004) *Mol Cell Biol* 24, 4372-4383
32. Gauthier, B. R., Brun, T., Sarret, E. J., Ishihara, H., Schaad, O., Descombes, P., and Wollheim, C. B. (2004) *J Biol Chem*

33. Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004) *Nat Cell Biol* 6, 547-554
34. Slavin, D. A., Koritschoner, N. P., Prieto, C. C., Lopez-Diaz, F. J., Chatton, B., and Bocco, J. L. (2004) *Oncogene* 23, 8196-8205
35. Botrugno, O. A., Fayard, E., Annicotte, J. S., Haby, C., Brennan, T., Wendling, O., Tanaka, T., Kodama, T., Thomas, W., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2004) *Mol Cell* 15, 499-509
36. Kamalakaran, S., Radhakrishnan, S. K., and Beck, W. T. (2005) *J Biol Chem*
37. Zhang, X., Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J. R., Emerson, B., Hogenesch, J. B., Unterman, T., Young, R. A., and Montminy, M. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4459-4464
38. Impey, S., McCorkle, S. R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J. M., Yochum, G. S., Boss, J. M., McWeeney, S., Dunn, J. J., Mandel, G., and Goodman, R. H. (2004) *Cell* 119, 1041-1054
39. Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R. X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., and Sakai, J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100,

40. Fujino, T., Asaba, H., Kang, M. J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D. H., Ioka, R. X., Ono, M., Tomoyori, H., Okubo, M., Murase, T., Kamataki, A., Yamamoto, J., Magoori, K., Takahashi, S., Miyamoto, Y., Oishi, H., Nose, M., Okazaki, M., Usui, S., Imaizumi, K., Yanagisawa, M., Sakai, J., and Yamamoto, T. T. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 229-234
41. Yamamoto, J., Ikeda, Y., Iguchi, H., Fujino, T., Tanaka, T., Asaba, H., Iwasaki, S., Ioka, R. X., Kaneko, I. W., Magoori, K., Takahashi, S., Mori, T., Sakaue, H., Kodama, T., Yanagisawa, M., Yamamoto, T. T., Ito, S., and Sakai, J. (2004) *J Biol Chem* 279, 16954-16962
42. Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., Yamanaka, I., Kiyosawa, H., Yagi, K., Tomaru, Y., Hasegawa, Y., Nogami, A., Schonbach, C., Gojobori, T., Baldarelli, R., Hill, D. P., Bult, C., Hume, D. A., Quackenbush, J., Schriml, L. M., Kanapin, A., Matsuda, H., Batalov, S., Beisel, K. W., Blake, J. A., Bradt, D., Brusic, V., Chothia, C., Corbani, L. E., Cousins, S., Dalla, E., Dragani, T. A., Fletcher, C. F., Forrest, A., Frazer, K. S., Gaasterland, T., Gariboldi, M., Gissi, C., Godzik, A., Gough, J., Grimmond, S., Gustincich, S., Hirokawa, N., Jackson, I. J., Jarvis, E. D., Kanai, A., Kawaji, H., Kawasawa, Y., Kedzierski, R. M.,

- King, B. L., Konagaya, A., Kurochkin, I. V., Lee, Y., Lenhard, B.,
Lyons, P. A., Maglott, D. R., Maltais, L., Marchionni, L.,
McKenzie, L., Miki, H., Nagashima, T., Numata, K., Okido, T.,
Pavan, W. J., Pertea, G., Pesole, G., Petrovsky, N., Pillai, R.,
Pontius, J. U., Qi, D., Ramachandran, S., Ravasi, T., Reed, J. C.,
Reed, D. J., Reid, J., Ring, B. Z., Ringwald, M., Sandelin, A.,
Schneider, C., Semple, C. A., Setou, M., Shimada, K., Sultana, R.,
Takenaka, Y., Taylor, M. S., Teasdale, R. D., Tomita, M., Verardo,
R., Wagner, L., Wahlestedt, C., Wang, Y., Watanabe, Y., Wells, C.,
Wilming, L. G., Wynshaw-Boris, A., Yanagisawa, M., Yang, I.,
Yang, L., Yuan, Z., Zavolan, M., Zhu, Y., Zimmer, A., Carninci, P.,
Hayatsu, N., Hirozane-Kishikawa, T., Konno, H., Nakamura, M.,
Sakazume, N., Sato, K., Shiraki, T., Waki, K., Kawai, J., Aizawa,
K., Arakawa, T., Fukuda, S., Hara, A., Hashizume, W., Imotani,
K., Ishii, Y., Itoh, M., Kagawa, I., Miyazaki, A., Sakai, K., Sasaki,
D., Shibata, K., Shinagawa, A., Yasunishi, A., Yoshino, M.,
Waterston, R., Lander, E. S., Rogers, J., Birney, E., and
Hayashizaki, Y. (2002) *Nature* 420, 563-573
43. Kawai, J., and Hayashizaki, Y. (2003) *Genome Res* 13, 1488-1495
44. Kawai, J., Shinagawa, A., Shibata, K., Yoshino, M., Itoh, M., Ishii,
Y., Arakawa, T., Hara, A., Fukunishi, Y., Konno, H., Adachi, J.,
Fukuda, S., Aizawa, K., Izawa, M., Nishi, K., Kiyosawa, H.,

- Kondo, S., Yamanaka, I., Saito, T., Okazaki, Y., Gojobori, T., Bono, H., Kasukawa, T., Saito, R., Kadota, K., Matsuda, H., Ashburner, M., Batalov, S., Casavant, T., Fleischmann, W., Gaasterland, T., Gissi, C., King, B., Kochiwa, H., Kuehl, P., Lewis, S., Matsuo, Y., Nikaido, I., Pesole, G., Quackenbush, J., Schriml, L. M., Staubli, F., Suzuki, R., Tomita, M., Wagner, L., Washio, T., Sakai, K., Okido, T., Furuno, M., Aono, H., Baldarelli, R., Barsh, G., Blake, J., Boffelli, D., Bojunga, N., Carninci, P., de Bonaldo, M. F., Brownstein, M. J., Bult, C., Fletcher, C., Fujita, M., Gariboldi, M., Gustincich, S., Hill, D., Hofmann, M., Hume, D. A., Kamiya, M., Lee, N. H., Lyons, P., Marchionni, L., Mashima, J., Mazzarelli, J., Mombaerts, P., Nordone, P., Ring, B., Ringwald, M., Rodriguez, I., Sakamoto, N., Sasaki, H., Sato, K., Schonbach, C., Seya, T., Shibata, Y., Storch, K. F., Suzuki, H., Toyo-oka, K., Wang, K. H., Weitz, C., Whittaker, C., Wilming, L., Wynshaw-Boris, A., Yoshida, K., Hasegawa, Y., Kawaji, H., Kohtsuki, S., and Hayashizaki, Y. (2001) *Nature* 409, 685-690
45. Carninci, P., and Hayashizaki, Y. (1999) *Methods Enzymol* 303, 19-44
46. Kitamura, T. (1998) *Int J Hematol* 67, 351-359
47. Okita, K., Yang, Q., Yamagata, K., Hangenfeldt, K. A., Miyagawa, J., Kajimoto, Y., Nakajima, H., Namba, M., Wollheim, C. B.,

- Hanafusa, T., and Matsuzawa, Y. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 263, 566-569
48. Hwung, Y. P., Gu, Y. Z., and Tsai, M. J. (1990) *Mol Cell Biol* 10, 1784-1788
49. Libermann, T. A., and Baltimore, D. (1993) *Mol Cell Biol* 13, 5957-5969
50. Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990) *Endocrinology* 127, 126-132
51. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992) *Endocrinology* 130, 167-178
52. Janjic, D., Maechler, P., Sekine, N., Bartley, C., Annen, A. S., and Wolheim, C. B. (1999) *Biochem Pharmacol* 57, 639-648
53. Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000) *Gene Ther* 7, 1063-1066
54. Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) *Mol Cell* 1, 47-57
55. Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) *Cell* 85, 1037-1046
56. Sakai, J., Rawson, R. B., Espenshade, P. J., Cheng, D., Seegmiller, A. C., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998) *Mol Cell* 2,

57. Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998)
J Biol Chem 273, 5785-5793
58. Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B.,
and Maechler, P. (2004) *Endocrinology* 145, 667-678
59. Detimary, P., Van den Berghe, G., and Henquin, J. C. (1996) *J*
Biol Chem 271, 20559-20565
60. Ikeda, Y., Iguchi, H., Nakata, M., Ioka, R. X., Tanaka, T., Iwasaki,
S., Magoori, K., Takayasu, S., Yamamoto, T. T., Kodama, T., Yada,
T., Sakurai, T., Yanagisawa, M., and Sakai, J. (2005) *Biochem*
Biophys Res Commun 333, 778-786
61. Ikeda, Y., Yamamoto, J., Okamura, M., Fujino, T., Takahashi, S.,
Takeuchi, K., Osborne, T. F., Yamamoto, T. T., Ito, S., and Sakai, J.
(2001) *J Biol Chem* 276, 34259-34269.
62. Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S., and
Goldstein, J. L. (1997) *J Biol Chem* 272, 20213-20221
63. Rhodes, C. J. (2005) *Science* 307, 380-384.
64. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2004)
Nature 429, 41-46
65. Yamashina, K., and Kikuchi, A. (2004) *Tanpakushitsu Kakusan*
Koso 49, 1421-1427
66. Kan, L., Israsena, N., Zhang, Z., Hu, M., Zhao, L. R., Jalali, A.,

- Sahni, V., and Kessler, J. A. (2004) *Dev Biol* 269, 580-594
67. Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W., and Varmus, H. E. (1999) *Mol Cell* 4, 487-498
 68. Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R., McCrea, P. D., and de Crombrughe, B. (2004) *Genes Dev* 18, 1072-1087
 69. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003) *Biochem J* 370, 737-749
 70. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522-5527
 71. Tetsu, O., and McCormick, F. (1999) *Nature* 398, 422-426
 72. Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997) *Science* 275, 1784-1787
 73. Coates, J. C. (2003) *Trends Cell Biol* 13, 463-471
 74. Ayer, D. E. (1999) *Trends Cell Biol* 9, 193-198
 75. Johnstone, R. W. (2002) *Nat Rev Drug Discov* 1, 287-299
 76. Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S., and Basler, K. (2002) *Cell* 109, 47-60.

77. Thompson, B., Townsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Musisi, H., and Bienz, M. (2002) *Nat Cell Biol* 4, 367-373.
78. Townsley, F. M., Cliffe, A., and Bienz, M. (2004) *Nat Cell Biol* 6, 626-633.
79. Murakami, A., Ishida, S., Thurlow, J., Revest, J. M., and Dickson, C. (2001) *Nucleic Acids Res* 29, 3347-3355
80. Zhang, Q., Piston, D. W., and Goodman, R. H. (2002) *Science* 295, 1895-1897
81. Chinnadurai, G. (2007) *Int J Biochem Cell Biol*
82. Zhang, Q., Wang, S. Y., Fleuriel, C., Leprince, D., Rocheleau, J. V., Piston, D. W., and Goodman, R. H. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 829-833
83. Fridlyand, L. E., and Philipson, L. H. (2004) *Diabetes* 53, 1942-1948
84. Fang, M., Li, J., Blauwkamp, T., Bhambhani, C., Campbell, N., and Cadigan, K. M. (2006) *Embo J* 25, 2735-2745
85. Essers, M. A., de Vries-Smits, L. M., Barker, N., Polderman, P. E., Burgering, B. M., and Korswagen, H. C. (2005) *Science* 308, 1181-1184
86. Ogata, T., and Kojima, I. (2002) *Nippon Rinsho* 60 Suppl 7, 347-353

謝辞

本研究遂行の機会を与えて下さると共に、終始適切なご指導を賜りました、東京大学先端科学技術研究センター システム生物医学ラボラトリー システム医学領域/代謝・内分泌システム分野 酒井寿郎 教授、大日本住友製薬株式会社 薬理研究所 薬理第4研究部 平松隆司 部長に厚くお礼申し上げます。本研究にご協力頂きました、池田勸夫 博士、岡村将史 博士、田中十志也 博士、浦島康代 様、大口裕人 博士、高安忍 博士、小嶋智明 博士、岩崎聡 様、大橋瑠子 博士、姜淑英 博士、長谷川剛 博士、井岡亮一 博士、馬群健太 博士、寿見考一 博士、前島崇司 博士、内田あおい 様、稲垣洋介 博士、竹内美恵 様、内藤眞 教授、Timothy F. Osborne 教授、柳沢正史 教授、山本徳男 教授、児玉龍彦 教授に深く感謝致します。

本論文を作成する機会を与えてくださると共に、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学教室 新井洋由 教授に心よりお礼申し上げます。