

# 博 士 論 文

転写因子 SOX6 の膵  $\beta$  細胞における機能に関する研究

井 口 晴 久

# 目次

緒言	1
要旨	2
第 1 部 転写因子 SOX6 と PDX1 によるインスリン分泌調節機構	
1-1 緒言	7
1-2 結果	10
1-3 考察	20
1-4 図表	23
1-5 実験手法	57
第 2 部 転写因子 SOX6 と $\beta$ -カテニンによる細胞増殖調節機構	
2-1 緒言	66
2-2 結果	69
2-3 考察	77
2-4 図表	81
2-5 実験手法	99
結語	106
引用文献	107
謝辞	118

## 緒言

2 型糖尿病はインスリン抵抗性の増悪が発症の起点となるが、欧米人における 2 型糖尿病と日本人における 2 型糖尿病は、インスリン分泌の程度に違いがあることが知られている(1)。インスリンは、糖代謝以外にもタンパク合成や中性脂肪分解の抑制、細胞増殖の促進などの様々な生理作用を有しているが、インスリン抵抗性は、糖代謝に直接関係する作用(肝臓糖産生の抑制、骨格筋と脂肪組織における糖取り込みの促進など)が、血中に存在するインスリン量から期待されるだけ得られない状態を指す。欧米の 2 型糖尿病患者は高度のインスリン抵抗性の肥満患者が多く、高インスリン値を示しながら、インスリン抵抗性を代償し切れずに発症するケースが多い。一方、日本人の 2 型糖尿病患者の平均 **Body Mass Index(BMI)** は 24 程度とされており、極度の肥満でなくても、内臓脂肪の若干の増加、加齢などによる軽度のインスリン抵抗性状態に陥っただけで発症している(1)。これは、欧米人に比べ日本人のインスリン分泌能が低いことに起因する。日本人では、糖負荷試験におけるインスリン値が最大でも  $50 \mu \text{U/mL}$  未満にも関わらず、糖尿病を発症する患者が多く見られる(1)。ゆえに、日本人の糖尿病治療を考える上で、インスリン抵抗性を代償するに足るだけのインスリン量を膵  $\beta$  細胞から分泌させることは重要な課題である。しかしながら、代償的インスリン分泌増加のメカニズムは、必ずしも十分明らかとなっているとは言えない。そこで、筆者は上述した膵  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌増加の分子メカニズムを解明することを目的として、本研究に着手した。

## 要旨

インスリン分泌が増加した膵β細胞はインスリン分泌能が活性化されているだけでなく、増殖能を強化して細胞数を増加していると言われている。このように細胞の機能を変化させるには、遺伝子の発現パターンを多様に変動させる必要があると考え、膵β細胞に発現する転写因子の中に代償的インスリン分泌増加に関与する因子があると予想した。始めに、代償的インスリン分泌増加が起きている膵ラ氏島と通常の膵ラ氏島の遺伝子発現プロファイルと比較して、発現量が変化する転写因子の選抜を試みた。すなわち、高脂肪食負荷マウスと通常食マウスそれぞれから膵ラ氏島を摘出し、両者の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法と QRT-PCR 法を組み合わせ、比較解析した。高脂肪食負荷マウスはインスリン抵抗性が惹起され、通常食マウスに比べてインスリン分泌が増加するモデルマウスである。その結果、両者の発現量に2倍以上の差のある転写因子を17個見出した。次に、選抜した17個の転写因子がインスリン分泌を制御するか調べるために、MIN6細胞(マウス膵β細胞由来培養細胞)にレトロウイルスを用いて該転写因子を強制発現した。その結果、代償的インスリン分泌増加時に発現減少する転写因子である

**Sex-determining region Y-box containing gene 6(SOX6)**がインスリン分泌を負に調節することを見出した。

**SOX6** のインスリン分泌抑制メカニズムを解析するために、グルコース依存性インスリン分泌のキーステップである細胞内 **ATP** 合成及びインスリン含量に対する **SOX6** の影響を検討した。その結果、**SOX6** は細胞内 **ATP/ADP** 比を減少させると共に、細胞内インスリン含量も減少させることが明らかとなった。そこで、**SOX6** 強制



発現 MIN6 細胞とコントロール MIN6 細胞において ATP 合成に關与する遺伝子群及びインスリン遺伝子の発現量を比較したところ、酸化的リン酸化酵素群の一部と、インスリン遺伝子の発現量が、SOX6 強制発現 MIN6 細胞において約 50% 減少していることが分かった。そこで、SOX6 の転写抑制メカニズムをラットインスリン遺伝子のプロモーターを用いて解析したところ、MIN6 細胞において SOX6 はインスリンプロモーター転写活性を抑制することが分かった。更に、非膵  $\beta$  細胞である BHK21 細胞においても、Pancreatic-duodenal homeobox factor-1(PDX1)と E47 を共発現することで活性化されたインスリンプロモーターが SOX6 によって抑制された。次に、SOX6 が PDX1 か E47 どちらの転写活性を阻害しているかを、mammalian two-hybrid アッセイを用いて検討した結果、SOX6 は GAL4 融合 PDX1 の転写活性を抑制したのに対して、GAL4 融合 E47 の転写活性には影響しなかった。そこで、以降は SOX6 と PDX1 に注目して更に解析を進めた。

SOX6 と PDX1 の間の相互作用を GST プルダウンアッセイにより調べた結果、PDX1 の N 末端が SOX6 の HMG 領域と結合することが分かった。更に、クロマチン免疫沈降法を用いることで、SOX6 と PDX1 が細胞内においても結合し、インスリンプロモーター上に共存していることを確認した。以上の結果から、SOX6 は転写因子 PDX1 と結合しその転写活性を抑制することによって、インスリンプロモーター活性を抑制していることが示された。

SOX6 のインスリン分泌抑制メカニズムの解析結果から、SOX6 が PDX1 のレプレッサーとして働くこと、酸化的リン酸化酵素群の一部及びインスリン遺伝子の発現を抑制することで、細胞内 ATP/ADP 比、インスリン含量を減少させることが示された。一方、代償的インスリン分泌増加のメカニズムにおいて、インスリン分泌能の増強に

加えて、膵  $\beta$  細胞の細胞増殖活性の上昇も重要である。そこで、SOX6 の膵  $\beta$  細胞増殖に対する影響を検討した結果、SOX6 強制発現細胞の細胞増殖が著明に抑制されることが分かった。逆に、siRNA を用いて膵  $\beta$  細胞由来細胞である INS-1E 細胞の SOX6 の発現を抑制したところ、細胞増殖が促進された。そこで、筆者は SOX6 の膵  $\beta$  細胞増殖抑制メカニズムの解析に取り組んだ。

まず、SOX6 強制発現細胞のFACS解析を行った結果、SOX6 はG1 期からS期への移行を妨げていることが分かった。次に、SOX6 強制発現細胞とコントロール細胞において、G<sub>1</sub>期からS期への移行を制御する遺伝子群の発現変動をQRT-PCR法を用いて検討した。その結果、SOX6 強制発現NIH-3T3 細胞において、サイクリンD1、D2、D3、E1 の減少が認められた。特に、サイクリンD1 の発現抑制は顕著であり、70%以上抑制されることが分かった。これらサイクリン遺伝子群は  $\beta$ -カテニンという転写活性化因子により転写制御されることが知られている。そこで、筆者は SOX6 と  $\beta$ -カテニンの関係に着目して以降の解析を進めた。

サイクリン D1 プロモーター活性に対する SOX6 と  $\beta$ -カテニンの影響を調べたところ、 $\beta$ -カテニンはサイクリン D1 プロモーター活性を増加させるが、SOX6 を共発現させると増加した活性が減少することが分かった。続いて、SOX6 と  $\beta$ -カテニンのサイクリン D1 プロモーター上の結合様式をクロマチン免疫沈降法を用いて検証した結果、SOX6 は  $\beta$ -カテニンを介してサイクリン D1 プロモーターに結合し、その転写活性を抑制していると考えられた。

更に、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の阻害剤の一種であるスクリプタイドを培地中に添加することで、SOX6 強制発現により減少したサイクリン D1 プロモーター活性が回復することが分かった。このことから、SOX6 は HDAC をサイクリン D1 プロモ

ーター上にリクルートすることでヒストンの脱アセチル化を引き起こし、その転写活性を抑制していることが示唆された。次に、SOX6 がどの HDAC 分子種をサイクリン D1 プロモーター上へリクルートするかをクロマチン免疫沈降法を用いて調べたところ、HDAC1 が SOX6 を強制発現することによりサイクリン D1 プロモーターへリクルートされることが分かった。更に、 $\beta$ -カテニン、SOX6、HDAC1 の3者が複合体を形成しているかを免疫沈降法を用いて検討した結果、SOX6 を橋渡し役とする  $\beta$ -カテニン／SOX6／HDAC1 の3者の複合体が細胞内で形成されていることが分かった。

SOX6 による膵  $\beta$  細胞増殖抑制メカニズムの解析結果から、SOX6 は  $\beta$ -カテニン転写複合体に HDAC1 をリクルートすることでその転写活性を阻害し、サイクリン D1 等の細胞周期を調節する遺伝子群の転写を抑制することが分かった。

本研究成果から、SOX6 は膵  $\beta$  細胞の細胞増殖とインスリン分泌の両方を抑制する機能を持った転写因子であること、インスリン分泌亢進状態の膵  $\beta$  細胞において発現が減少することが分かった。このことから、SOX6 がインスリン抵抗性を代償するためのインスリン分泌増加メカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。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  $\beta$  細胞において SOX6 はブレーキ役として働きインスリン分泌量を適正に調節しているが、インスリン分泌を亢進させる必要が生じた場合は、膵  $\beta$  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分泌、細胞増殖を活性化し、インスリン需要に応えていると考えられる。

日本人の糖尿病患者は、欧米人のような極度の肥満患者は少なく、軽度の肥満やインスリン抵抗性にインスリン分泌不足が重なっていることが多い。日本人の糖尿病治療には、軽度のインスリン抵抗性を代償するために十分なインスリン量を膵  $\beta$

細胞に分泌させることは、効果的な手段であると考えられる。本研究から、代償的インスリン分泌亢進の分子メカニズムの1つとして SOX6 発現減少による PDX1、 $\beta$ -カテニンの活性化が示唆された。今後、PDX1、 $\beta$ -カテニンを活性化する低分子化合物が得られれば、日本人に向けた 2 型糖尿病治療薬となる可能性があると考え  
る。

# 第 1 部 転写因子 SOX6 と PDX1 によるインスリン分泌調節機構

## 1-1 緒言

血糖維持のためには、適切な膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌調節が重要である。現在、インスリン分泌の機序で主要な経路と考えられているのが、ATP感受性カリウムチャンネル( $K_{ATP}$ チャンネル)を介する経路である(図 1)。グルコースは、糖輸送トランスポーターであるグルコーストランスポーター2(Glut2)を介して、細胞外から細胞内へ取り込まれ、解糖系、TCA回路、酸化的リン酸化により代謝され、ATPが産生される。このグルコース代謝でATP産生が亢進する一方で、生理的グルコース濃度条件下では細胞内ADP量はほとんど変化しない。その結果、細胞内ATP/ADP比が上昇し、それを細胞膜上に局在する $K_{ATP}$ チャンネルが感知し、チャンネルを閉鎖する。それにより膜電位が上昇して脱分極を起こし、電位依存型カルシウムチャンネル(VDCC)が開口、細胞内へカルシウムイオンが流入する。流入したカルシウムイオンがインスリン分泌顆粒を刺激し、細胞膜への融合を促すことで、顆粒中のインスリンが細胞外へと分泌される(2)。

インスリン分泌は様々な転写因子により制御されていることが知られており、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌不全が主な病態であるMaturity-onset diabetes of the young(MODY)と呼ばれる若年性糖尿病は、Hepatocyte Nuclear Factor(HNF)-4  $\alpha$  遺伝子(MODY1)、HNF-1  $\alpha$  遺伝子(MODY3)、Pancreatic-duodenal homeobox factor-1(PDX1)遺伝子(MODY4)、HNF-1

$\beta$  遺伝子(MODY5)等の転写因子の変異により発症する(2-5)。しかしながら、インスリン抵抗性を代償するためのインスリン分泌亢進の過程におけるこれら転写因子の役割は十分解明されておらず、別の転写因子の関与も考えられる。そこで、筆者はインスリン分泌亢進が起きた膵ランゲルハンス氏(ラ氏)島と通常の膵ラ氏島の発現プロファイル解析とインスリン分泌アッセイ等の各種機能解析を組み合わせることで、発現変動遺伝子の1つであるSex-determining region Y-box 6(SOX6)という転写因子がPDX1の活性を抑制することで、インスリン分泌を負に調節することを見出した。

SOX6 は HMG box という DNA 結合領域を共通して保有する SOX 転写因子ファミリーの一員である。SOX ファミリーは 20 以上の相同遺伝子から成り、構造上の特徴から 8 つのサブグループ(A-H)に分類されており、SOX6 は SOX5、13 と共にグループ D に属している。グループ D は他のファミリーと異なり、ポリ Q ドメインやロイシンジッパードメインといったタンパク-タンパク相互作用に関わる機能ドメインを有している(6,7)。また、SOX6 は SOX5 と協調して軟骨の分化マーカー遺伝子である Col2a1 遺伝子の発現を亢進し軟骨の分化に働くことや、心筋の発達に関与することが知られていたが、膵  $\beta$  細胞における役割は報告されていなかった(8-10)。

一方、PDX1 は N 末端に転写活性化領域を、中央に DNA 結合領域であるホメオドメインを有する全長 284 アミノ酸からなる転写因子である。ホメオドメインを介してインスリン遺伝子のプロモーター上にある A ボックス(A/T リッチドメイン)と呼ばれる配列に結合することが知られている(11)。インスリンプロモーター上には E ボックスと呼ばれる配列も存在し、E12、E47 が結合し、PDX1 と協調して転写活性を

促進する。PDX1 の N 末端は p300 という転写コファクターをリクルートすることが知られており、興味深いことに高グルコース時に p300 のリクルートが増加する(12)。また、個体レベルの解析から PDX1 は膵ラ氏島の  $\beta$  細胞に発現しており、インスリン、IGF-1 シグナルと共に、膵臓の発生に重要であることが報告されている(13)。ホモ欠損マウスは膵臓の形成不全が認められるのに対して、ヘテロ欠損マウスや変異マウスは耐糖能異常を呈する(14-16)。このように、PDX1 の膵  $\beta$  細胞機能における重要性は明らかであるが、インスリン抵抗性によるインスリン分泌亢進における役割は不明であった。

第 1 部では、SOX6 が高脂肪食負荷マウス、*ob/ob* マウスの膵  $\beta$  細胞で発現減少し、インスリン及び酸化的リン酸化酵素の発現を抑制することでインスリン分泌を抑制することを明らかとした。更に、SOX6 が PDX1 の転写活性を抑制するメカニズムを明らかとした。

## 1-2 結果

### ①膵β細胞における転写因子 SOX6 の発現制御

筆者はインスリン抵抗性を代償するためにインスリン分泌が増加したモデルマウスとして、9週間の高脂肪食負荷をかけた C57BL/6J マウスを作製した。高脂肪食負荷(High Fat Diet : HFD)マウスと通常食負荷(Normal Chow Diet : NCD)マウスの随時摂食時のインスリン値、血糖値、及び体重を比較すると共に、腹腔内投与グルコース負荷試験を行った(図 2)。その結果、HFD マウスはインスリン抵抗性、高インスリン血症を呈するモデルマウスであることが確認された。

アフメトリックス社MOE430 を用いたHFDマウスとNCDマウス由来の膵ラ氏島のDNAチップ解析結果とBeta Cell Biology Consortium (<http://www.cbil.upenn.edu/EPConDB/index.shtml>)という公共データベースの膵β細胞発現遺伝子情報から、59個の転写因子が膵β細胞に発現することが分かった。これらの転写因子についてHFDマウスとNCDマウスの膵ラ氏島における発現変動をQRT-PCRにより調べたところ、2倍以上の発現変動が認められた転写因子が17個あった(表 1)。次に、選抜した17個の転写因子をレトロウイルスを用いて過剰発現させたマウスインスリノーマMIN6細胞のインスリン分泌量をコントロールのMIN6細胞と比較した(図 3)。その結果、転写因子SOX6を過剰発現させたMIN6細胞における16.7mMグルコース処理群のインスリン分泌量がコントロール細胞に比べて約60%減少していた。このことから、転写因子SOX6がグルコース依存性インスリン分泌を抑制することが分かった。

また、SOX6は高脂肪食負荷マウスだけでなく、*ob/ob* マウスにおいても mRNA



の発現減少が認められた(図 4A)。この結果から、SOX6 の発現はグルコースあるいはインスリンにより負に制御されていることが示唆された。そこで、血中グルコースとインスリンが急激に変動する絶食マウス及び再摂食マウスの腓ラ氏島における SOX6 の発現を調べたところ、自由摂食マウスと比較して有意な変動は認められなかった(図 4B 左図)。一方、インスリン制御遺伝子の一つである *stearoyl-CoA desaturase 2(SCD2)* の発現は、インスリンが減少する絶食時には減少し、インスリンが上昇する再摂食時には増加した(図 4B 右図)。この結果から、SOX6 の発現は単純にグルコース、インスリン量の変化では制御されておらず、インスリン抵抗性に起因する慢性的な状態変化によって制御されていることが示唆された。

次に、腓ラ氏島と MIN6 細胞の核抽出物中における SOX6 タンパクの発現を抗 SOX6 抗体を用いたイムノブロットで調べたところ、SOX6 タンパクの予想分子量付近にバンドが検出された(図 5A)。更に、免疫組織化学染色により C57BL/6J マウスと *ob/ob* マウスの腓ラ氏島における SOX6 タンパクの発現を調べたところ、QRT-PCR の結果と同様に *ob/ob* マウスにおいて SOX6 タンパク発現細胞の減少が認められた(図 5B)。また、膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子である PDX1 との 2 重蛍光免疫染色の結果、SOX6 は腓ラ氏島の  $\beta$  細胞に発現していることが確認された(図 6)。

## ②SOX6 によるグルコース依存性インスリン分泌抑制

レトロウイルスを用いて SOX6 を過剰発現させた MIN6 細胞と、コントロールの MIN6 細胞のグルコース濃度 5.6mM 及び 16.7mM 時のインスリン分泌量を測定したところ、16.7mM グルコース濃度の SOX6 過剰発現 MIN6 細胞からのインス

リン分泌量がコントロールに比べて 60%程度減少していることが分かった(図 7)。

次に、他の SOX ファミリー遺伝子のインスリン分泌に対する影響を調べるために、SOX2、4、5、8、9、10、13、15、18、30 をレトロウイルスを用いて MIN6 細胞に強制発現した。その結果、SOX6 と同じサブファミリー D に属する SOX5、13 もグルコース依存性インスリン分泌を抑制することが分かった(図 8A)。しかし、SOX5、13 は SOX6 と異なり、高脂肪食負荷マウスの膵ラ氏島においては発現減少が認められなかった(図 8B)。以上から、SOX ファミリーの中では SOX6 がインスリン抵抗性に伴うインスリン分泌亢進に関与していることが示唆された。

更に、内因性 SOX6 のインスリン分泌への寄与を調べる目的で、MIN6 細胞とラットインスリノーマ INS-1E 細胞に SOX6 の siRNA を導入して発現をノックダウンした。その結果、両細胞で SOX6 の mRNA 発現は 50%程度抑制されたが、SOX5、13 の発現は変動が認められなかった(図 9A)。従って、実験に用いた siRNA は SOX6 のみ発現抑制することが確認された。更に mRNA 発現抑制と同様に、SOX6 のタンパク発現も MIN6 細胞、INS-1E 細胞で抑制されていることをイムノブロットングで確認した(図 9B)。この時、16.7mM グルコース時の SOX6 の siRNA 導入細胞からのインスリン分泌が約 1.4 倍増加することが分かった(図 9C)。一方、5.6mM グルコース時のインスリン分泌は SOX6 siRNA 導入細胞とコントロール siRNA 導入細胞で差は認められなかった。以上の結果から、SOX6 はグルコース濃度依存的にインスリン分泌を抑制していることが明らかとなった。

### ③SOX6 による細胞内 ATP 量、インスリン量の減少

SOX6 のインスリン分泌抑制メカニズムを解析するために、グルコース以外の分泌促進剤によるインスリン分泌に対するSOX6 の効果を調べた。使用したインスリン分泌促進剤は  $\alpha$ -ケトイソカプロン酸 ( $\alpha$ -KIC)、トルブタミド (Tolb)、塩化カリウム (KCl) の 3 種類で、それぞれインスリン分泌に対する作用点が異なっている(17)。 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸はロイシンの脱アミノ基体であり、ミトコンドリア内のATP合成を促進することが知られている。トルブタミドはスルホニル尿素剤の一種であり、膜タンパク質であるSUR1 に結合し $K_{ATP}$ チャンネル活性を抑制することで、細胞内ATP濃度非依存的に脱分極を誘発する。また、塩化カリウムを培地中に添加すると、細胞外のカリウムイオン濃度が増加するため、 $K_{ATP}$ チャンネルが閉じ、脱分極が起こることが知られている。

0.3mM トルブタミド及び 20mM 塩化カリウム添加によるインスリン分泌にはSOX6 強制発現は影響しなかったが、10mM  $\alpha$ -ケトイソカプロン酸誘導インスリン分泌は 5.6mM、16.7mM 何れのグルコース濃度においても、SOX6 強制発現により抑制された(図 10)。この結果は、SOX6 がミトコンドリア内の ATP 合成を阻害していることを示唆している。次に、細胞内 ATP 合成および細胞内 ATP/ADP 比に対する SOX6 の影響を検討した。その結果、SOX6 強制発現 MIN6 細胞において、細胞内 ATP 量は 16.7mM グルコース時のみ減少したのに対して、細胞内 ADP 量は変化が認められなかった(図 11)。つまり、SOX6 は 16.7mM グルコース時にのみ細胞内 ATP/ADP 比を 25%程度減少させることが分かった(図 11)。ATP/ADP 比の減少に伴い、グルコース依存性の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も SOX6 により抑制された(図 12)。更に、SOX6 は細胞内インスリン含量も

10%程度減少させることが確認された(図 13A)。以上の結果から、SOX6 はミトコンドリア内の ATP 合成とインスリン合成の両者を抑制していることが示唆された。

#### ④SOX6 による ATP 合成遺伝子、インスリン遺伝子の発現抑制

次に、SOX6 強制発現 MIN6 細胞とコントロール MIN6 細胞における遺伝子発現変動を調べたところ、ATP 合成に関与する遺伝子(OXPHOS)群およびインスリン遺伝子の発現量に違いが認められた。NADH 脱水素酵素複合体サブユニット(複合体 I)、チトクローム bc1 複合体サブユニット(複合体 III)、チトクローム c 酸化酵素複合体サブユニット(複合体 IV)、ATP 合成酵素複合体サブユニット(複合体 V)等の酸化的リン酸化酵素群の一部と、インスリン I、II 遺伝子の発現量が SOX6 強制発現 MIN6 細胞において約 50%減少していることが分かった(表 2 及び図 13B)。SOX6 はこれまで転写活性化因子と考えられていたため、SOX6 が複数の遺伝子群の発現を抑制することは極めて興味深い知見であった。

そこで、SOX6 の転写抑制メカニズムをラットインスリンII遺伝子のプロモーター(開始ATGから -872 塩基対~-176 塩基対)を用いて解析した。当該プロモーターをpGL3-basicプラスミドに挿入し作製したレポータープラスミド(pINS(-872)-luc)とSOX6 発現プラスミド(pCMV-SOX6)を共形質導入した MIN6 細胞のルシフェラーゼ活性を測定したところ、pCMV-SOX6 量依存的に活性が減少することが明らかとなった(図 14A)。更に、ラットインスリンII プロモーター内にある 3 箇所のSOXコンセンサス (5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3') 相同配列を欠失したプロモーターを用いてもSOX6 の活性抑制が確認された(図 14B)。このことは、SOX6 がプロモーター内の非コンセンサス配列に結合し転写抑制する可

能性と、SOX6 が直接のDNA結合を介さずに転写抑制効果を発揮する 2 つの可能性を示唆した。そこで、非膵  $\beta$  細胞系のBHK21 細胞におけるSOX6 のインスリンIIプロモーターに対する抑制効果を調べたところ、PDX1 とE47 を共発現することで活性化されたインスリンIIプロモーターは、SOX6 によってその転写活性が抑制された(図 15A)(18)。つまり、SOX6 はPDX1 又はE47 の転写活性を抑制している可能性が示唆された。そこで、E47 応答配列であるIgH遺伝子のエンハンサー配列をpGL3-basicプラスミドに挿入した $p(\mu E5 + \mu E2 + \mu E3)_4\text{-luc}$ レポータープラスミドを作製し、SOX6 のE47 転写活性への影響を検討した。その結果、E47 により活性化された $p(\mu E5 + \mu E2 + \mu E3)_4\text{-luc}$ のルシフェラーゼ活性は、SOX6 発現ベクターをE47 発現ベクターの 3 倍量共形質導入しても変化が見られなかった(図 15B)。このことから、SOX6 はE47 の転写活性には影響しないことが示唆された。更にこの結果を確かめるために、PDX1 とE47 について転写因子GAL4 のDNA結合領域との融合タンパク(GAL4-PDX1、GAL4-E47)を作製し、GAL4 応答配列を用いたmammalian two-hybrid assay系でSOX6 の転写抑制効果を調べたところ、SOX6 はGAL4 融合PDX1 の転写活性を抑制したのに対して、GAL4 融合E47 の転写活性には影響しなかった(図 15C)。以上の結果から、SOX6 は直接的なDNA結合を介さずに別の転写因子であるPDX1 の転写活性を抑制することで、インスリンIIプロモーター活性を抑制している可能性が示唆された。

#### ⑤SOX6 と PDX1 の直接結合

SOX6 とPDX1 間の相互作用を検討するために大腸菌発現GST融合SOX6タ

ンパクと*in vitro*翻訳した<sup>35</sup>S標識PDX1の各種断片タンパクを用いたGSTプルダウンアッセイを行った。全長PDX1及びホメオドメインとC末端(145 アミノ酸-284 アミノ酸)を欠失したPDX1は、GST融合SOX6と結合したが(図 16A (i)と(iii))、N末端(1 アミノ酸-144 アミノ酸)を欠失したPDX1はSOX6との結合能を失っていた(図 16A (iv))。この結果、PDX1のN末端が、SOX6との結合に必須であることが分かった。一方、大腸菌発現GST融合PDX1タンパクと*in vitro*翻訳した<sup>35</sup>S標識SOX6の各種断片タンパクを用いて同様の解析を行ったところ、SOX6のHMG領域とPDX1が結合することが分かった(図 16B (v))。SOX6のHMG領域とPDX1のN末端領域の結合を模式的に図 16Cに図示する。

次に、PDX1との結合領域であるHMG領域欠失SOX6( $\Delta$ HMG)を作製したところ、HMG領域がSOX6のインスリン分泌抑制に必須であることが分かった(図 17A 上図)。この時の、SOX6と $\Delta$ HMG-SOX6のタンパク発現はイムノブロッティングで図 17A 下図に確認した。同様に、HMG領域の欠失によりSOX6のインスリンプロモーター転写抑制機能も失われることが分かった(図 17B)。更に、SOX6との結合領域であるPDX1のN末端(1 アミノ酸-144 アミノ酸)を強制発現すると、SOX6のインスリン発現抑制効果が解除されることも分かった(図 17C)。これは、PDX1のN末端がdecoyとして働き、SOX6と内因性PDX1との結合を阻むことで、SOX6の転写抑制効果を打ち消した結果であると考えられる。これらの結果から、SOX6のインスリン発現・分泌の調節メカニズムはPDX1に直接結合し、その機能を抑制することであると予測された。

## ⑥SOX6 と PDX1 のインスリンプロモーターへの結合

SOX6 と PDX1 が *in vitro* 系だけでなく細胞内でも結合し、インスリンプロモーター上に局在することをクロマチン免疫沈降法を用いて調べた。クロマチン免疫沈降の結果は QRT-PCR により評価した。図 18 に、インスリンプロモーターを特異的に認識するプライマーの位置を模式的に示す。レトロウイルスを用いて SOX6 を過剰発現させた MIN6 細胞においては、抗 SOX6 抗体による免疫沈降物中のインスリンプロモーター断片量が増加していた。すなわち、インスリンプロモーター上の SOX6 量の増加が観察された(図 18A 上図 レーン 2 と 4)。この結果と対照的に、SOX6 を過剰発現してもインスリンプロモーター上の PDX1 の量は変わらなかった(図 18A 上図 レーン 6 と 8)。つまり、SOX6 は単純に PDX1 のインスリンプロモーターへの結合を妨げることで、その転写活性を抑制しているのではないことが示された。なお、図 18A 下図のイムノブロットに免疫沈降前後の SOX6 タンパクを示す。この結果から、コントロールレトロウイルス感染細胞に対する SOX6 レトロウイルス感染細胞の SOX6 タンパク発現量の比(約 6.5 倍 LumiVisionPRO による定量結果)が抗 SOX6 抗体による免疫沈降の前後で変化していないことが確認された。

MIN6 細胞において、PDX1 がインスリンプロモーターに結合していることはクロマチン免疫沈降法により証明されている(19)。48 時間の PDX1 siRNA 処理によって、インスリンプロモーター上の PDX1 は約 80%減少することが分かった(図 18B 上図 レーン 6 と 8)。この PDX1 の減少に伴い、興味深いことに、インスリンプロモーター上の SOX6 も 60%程度減少することが分かった(図 18B 上図 レーン 2 と 4)。すなわち、SOX6 のインスリンプロモーターへの結合には PDX1 が必要

なのである。この結果と GST プルダウンアッセイの結果から、SOX6 は直接的な DNA 結合ではなく PDX1 との結合を介してインスリンプロモーター上に存在していることが証明された。

#### ⑦SOX6 によるインスリンプロモーター上のアセチル化ヒストンの減少

PDX1 はヒストンアセチル化酵素の一種である p300 をリクルートすることで転写活性化することが知られており、p300 は SOX6 と同様、PDX1 の N 末端に結合することが報告されている(18,20-22)。転写因子が標的遺伝子に結合すると、PCAF や p300 などのコアクチベーターがリクルートされる。コアクチベーターはヒストンアセチル化酵素活性を持っており、周辺のヒストンをアセチル化する。これを引き金としてクロマチンリモデリング因子がリクルートされ、クロマチンリモデリングが誘導されることで、基本転写因子と RNA ポリメラーゼによる転写が開始する。特に転写活性化とよく相関するアセチル化として、ヒストン H3K9 と K14 のアセチル化が知られている(23,24)。

そこで、SOX6 を強制発現した時のインスリンプロモーターのアセチル化ヒストンの量を抗アセチル化ヒストン H3、H4 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によって定量した。既報の通り、MIN6 細胞を 30mM の高濃度グルコースを含む培地で培養すると、インスリンプロモーター上のアセチル化ヒストン H4 量は顕著に増加するが(図 19B レーン 2 と 4)、アセチル化ヒストン H3 量には変化は認められなかった(図 19A レーン 2 と 4)(12,25)。一方、SOX6 過剰発現細胞においては、ヒストン H3、H4 両方のアセチル化が著明に抑制されることが分かった(図 19A と B レーン 2 と 6、4 と 8)。以上の結果から、SOX6 はインスリンプロモーター上の PDX1



に結合し、ヒストンアセチル化を阻害することでインスリンプロモーター活性を抑制している可能性が示唆された。

### 1-3 考察

第 1 部では、SOX6 が膵  $\beta$  細胞で発現しており、その発現は mRNA 及びタンパク共に高脂肪食負荷マウスや *ob/ob* マウスで顕著に減少することを明らかとした。両マウスは、インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症を呈し、膵  $\beta$  細胞マスの増加、インスリン分泌の増加が認められる。一方、SOX6 の mRNA は絶食マウス、再摂食マウスにおいては変動がみられなかったことから、SOX6 の発現制御は急性の血糖値及びインスリン値の変動によるものではないことが示唆された。また、SOX6 は PDX1 の転写活性を抑制することで、グルコース依存性インスリン分泌を抑制することも明らかとした。以上から、SOX6 と PDX1 の量比の変化により、インスリン抵抗性を代償するインスリン分泌亢進が起これと予想される。

SOX ファミリーは DNA 結合領域である HMG ボックスを有する転写因子ファミリーであり、種間で高度に保存されている。SOX タンパクの多くは、同じサブファミリーに属するタンパクと機能面、発現制御面共に類似していることが多く、グループ D に属する SOX5、6、13 は全て膵臓に発現することが知られており(26-28)、発現組織分布は互いによく似ている。また、SOX13 は 1 型糖尿病の原因である自己抗原の 1 つであるとの報告があることから(29,30)、膵臓の中でも膵  $\beta$  細胞における発現が示唆される。一方、SOX5、6、13 は全てグルコース依存性インスリン分泌を抑制することから、膵  $\beta$  細胞における機能も共通していることが分かった。このように発現組織、機能は共通であるにも関わらず、高脂肪食負荷マウス、*ob/ob* マウスの膵  $\beta$  細胞で発現抑制が認められたのは、SOX6 のみであった。

SOX5,6,13 は全て膵  $\beta$  細胞で発現しているにも関わらず、なぜ SOX6 のみが高イ

ンスリン状態において発現変動するのかは明らかではない。高脂肪食負荷マウスにおける SOX6 特異的な発現制御機構について、今後検討する必要がある。

筆者は、SOX6 の HMG 領域と PDX1 の N 末端が結合することで、ヒストンアセチル化が抑制され、転写活性が阻害されることを示した(図 16、19)。PDX1 の N 末端は p300 と呼ばれるヒストンアセチラーゼの結合部位でもあり、p300 の PDX1 への結合はインスリン遺伝子の発現促進に重要であるとの報告もあることから、SOX6 が p300 と拮抗的に PDX1 と結合している可能性が考えられる(12)。また近年、PDX1 の C 末端に結合し、転写活性を抑制する因子として PDX1 C-terminal Interacting Factor 1(PCIF1)という遺伝子が発見されており、PDX1 転写複合体の分子レベルでの解析が進んでいる(31)。SOX6 により PDX1 転写複合体がどのように変化するのかについて更に解析する必要がある。

SOX6 によるインスリン分泌抑制の原因の一つは PDX1 の転写活性を阻害し、インスリン遺伝子の発現を抑制することであると考えられる。加えて、筆者は SOX6 の過剰発現により細胞内 ATP/ADP 比が減少し、一部の酸化的リン酸化酵素群の発現が抑制されることも見出した(図 11、表 2)。インスリン分泌において細胞内 ATP/ADP 比は重要であることから、酸化的リン酸化酵素の発現抑制も SOX6 によるインスリン分泌抑制の原因の一つと考えられる。インスリン遺伝子同様、酸化的リン酸化酵素も SOX6 と PDX1 の相互作用により発現抑制されているのか、あるいは別のメカニズムで抑制されているのかは現在のところ明らかではない。しかし、興味深いことに、PDX1 の優性抑制変異体をアデノウイルスを用いて強制発現した単離腓ラ氏島は、ミトコンドリアの機能異常を引き起こし、ATP 産生を障害するとの報告がある(32)。酸化的リン酸化はミトコンドリアで行われる反応であるため、

SOX6とPDX1により酸化的リン酸化酵素の発現も調節されている可能性もある。

SOX6 の新たな機能としてインスリン分泌調節という生理作用を明らかとしたことに加えて、分子メカニズムの観点から他の転写因子の活性を抑制する機能を有することを見出した。Hairy and enhancer of split(Hes)、Kruppel-Like Factor(KLF)6、Liver Receptor Homolog(LRH)-1 等の転写因子や核内受容体が、SOX6 のように DNA 結合を介さずに他の転写因子のコファクター的な働きをする例が、近年相次いで報告されている(33-35)。ポストゲノム研究の立場から、解読されたゲノム配列情報を基に、ゲノム上に存在する転写因子の結合コンセンサス配列を検索することによって、その転写因子の下流遺伝子を同定する作業が進んでいる(36,37)。しかし、転写因子の直接の DNA 結合を介さないコファクター機能を発見するには、上述したゲノム配列情報からのアプローチだけでなく、転写因子を発現させることで実際に発現変動する遺伝子を探索することや、網羅的なクロマチン免疫沈降等の実験データに基づく解析が必要である(38)。今後も、新たな転写因子のコファクター機能の発見が期待される。

第1部では、末梢組織のインスリン抵抗性を代償するためのインスリン分泌亢進メカニズムの解析を目指して研究をスタートし、インスリン分泌抑制因子として転写因子 SOX6 を再発見した。第2部では、インスリン分泌増加においてインスリン分泌能の亢進と共に重要である膵β細胞の細胞増殖における SOX6 の役割についての研究成果を述べる。

#### 1-4 図表

表 1 高脂肪食負荷マウスと通常食負荷マウスの膵ラ氏島における 59 転写因子様遺伝子の発現変動

表 2 SOX6 発現 MIN6 細胞における酸化的リン酸化酵素 (OXPHOS) 群の発現

表 3 QRT-PCR プライマー配列表

図 1 膵  $\beta$  細胞のグルコース依存性インスリン分泌の機序

図 2 高脂肪食負荷 (HFD) マウスと通常食負荷 (NCD) マウスの代謝パラメーター

図 3 SOX6 のインスリン分泌の抑制

図 4 SOX6 mRNA の発現変動

図 5 SOX6 タンパクの発現変動

図 6 C57BL/6J マウス膵ラ氏島の抗 SOX6 抗体及び抗 PDX1 抗体による 2 重免疫染色

図 7 SOX6 のグルコース依存性インスリン分泌の抑制

図 8 SOX ファミリーのインスリン分泌に対する影響と発現変動

図 9 SOX6 ノックダウンによるインスリン分泌の亢進

図 10 各種インスリン分泌促進剤の SOX6 発現 MIN6 細胞に対する効果

図 11 SOX6 による細胞内 ATP/ADP 比の抑制

図 12 SOX6 のグルコース依存性細胞内カルシウム濃度上昇の抑制

図 13 SOX6 によるインスリン発現の抑制

図 14 SOX6 によるラットインスリン II プロモーター活性の抑制

図 15 SOX6 による PDX1 転写活性の抑制

図 16 SOX6 と PDX1 の相互作用

図 17 SOX6 と PDX1 の相互作用によるインスリン発現、分泌の抑制

図 18 インスリンプロモーター上の SOX6 と PDX1 の相互作用

図 19 SOX6 によるインスリンプロモーター上のアセチル化ヒストン H3、H4 の減少

表1 高脂肪食負荷マウスと通常食負荷マウスの腭ラ氏島における 59 転写因子様遺伝子の発現変動

高脂肪食負荷マウスと通常食負荷マウスの腭ラ氏島 RNA を用いて、実験手法記載の方法で QRT-PCR を行った。3 列目に、通常食負荷マウスの腭ラ氏島における発現量を 1 とした時の、高脂肪食負荷マウスの腭ラ氏島における発現量を示す。高脂肪食負荷による発現変動の基準は上述の値が、2 以上あるいは 0.5 以下とした。

Gene	Accession No	QRT-PCR
nucleobindin 2	NM_016773	5.24
YY1 associated factor 2	NM_024189	2.54
myocyte enhancer factor 2D	NM_133665	1.43
ecotropic viral integration site 1	NM_007963	1.39
nuclear transcription factor-Y beta	NM_010914	1.25
putative homeodomain transcription factor 2	NM_172992	1.21
Kruppel-like factor 2	NM_008452	1.21
zinc finger protein 354A	NM_009329	1.14
ring finger protein 3	NM_172716	1.12
zinc finger and BTB domain containing 17	NM_009541	1.07
nuclear factor I/X	NM_010906	1.04
zinc finger protein 282	NM_146175	1.04
core binding factor beta	NM_022309	1.03
RIKEN cDNA 1810007M14 gene	XM_358888	1.02
hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	NM_010431	1.01
RIKEN cDNA 5730589K01 gene	NM_023434	1.00
TEA domain family member 1	NM_009346	0.95
X-box binding protein 1	NM_013842	0.94
cDNA sequence BC065123	AK047427	0.90
CCAAT/enhancer binding protein zeta	NM_009882	0.90
similar to KIAA1762 protein	XM_139193	0.90
RIKEN cDNA 6330581L23 gene	NM_146185	0.89
FEV (ETS oncogene family)	NM_153111	0.89
DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 161, expressed	NM_026187	0.86
zinc finger protein 451	NM_133817	0.84
zinc finger protein 74	NM_178384	0.83
Kruppel-like factor 6	NM_011803	0.77

ras responsive element binding protein 1	NM_001013392	0.76
transcription factor Dp 1	NM_009361	0.74
Iroquois related homeobox 1	NM_010573	0.73
heat shock factor 2	NM_008297	0.72
zinc finger protein 191	NM_021559	0.71
zinc finger protein 160	NM_145483	0.69
suppressor of hairy wing homolog 3	NM_153532	0.68
Iroquois related homeobox 2	NM_010574	0.67
zinc finger protein 647	NM_172817	0.66
trinucleotide repeat containing 9	NM_172913	0.66
non-POU-domain-containing, octamer binding protein	NM_023144	0.66
B-cell CLL/lymphoma 11A	NM_016707	0.66
zinc finger and BTB domain containing 20	NM_019778	0.64
zinc finger protein 26	XM_134736	0.59
TG interacting factor	NM_009372	0.56
high mobility group protein B2	AF267733	0.53
zinc finger protein 422	NM_026057	0.53
RAR-related orphan receptor gamma	NM_011281	0.50
GATA binding protein 4	NM_008092	0.50
nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	NM_011629	0.48
basic transcription element binding protein 1	NM_010638	0.44
zinc finger protein 278	NM_019574	0.43
zinc finger protein 202	NM_030713	0.36
zinc finger protein 28	NM_009552	0.34
Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 homolog	NM_021455	0.31
zinc finger protein 30	NM_013705	0.30
forkhead box P1	NM_053202	0.29
deltex 3 homolog	NM_030714	0.29
forkhead box O3	NM_019740	0.24
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	NM_007430	0.23
SRY-box containing gene 6	NM_011445	0.23
nuclear factor I/A	NM_010905	0.22



表 2 SOX6 発現 MIN6 細胞における酸化のリン酸化酵素 (OXPHOS) 群の発現

コントロールのアルカリホスファターゼ (ALP) 又は、SOX6 を含むレトロウイルスを感染させた MIN6 細胞の RNA を用いて、実験手法記載の方法で QRT-PCR を実施した。2 回の実験結果を第 3 列から第 6 列に示す。コントロール細胞における発現量を 1 とし、それに対する SOX6 発現細胞における各遺伝子の発現量を第 3 列、第 5 列に示す。第 4 列、第 6 列に各実験の標準誤差を示す。

Gene	Acc. No.	Experiment 1		Experiment 2	
		SOX6/ALP	S.E.	SOX6/ALP	S.E.
A. Complex I of mitochondrial OXPHOS					
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1	NM_025523	0.45	0.014	0.62	0.015
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3	NM_025348	0.64	0.007	0.59	0.023
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1,7 kDa	AW_060701	0.62	0.014	0.63	0.014
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2	NM_026612	0.64	0.030	0.67	0.010
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 4	NM_026610	0.59	0.007	0.63	0.010
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	XM_131359	0.62	0.013	0.52	0.028
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	NM_153064	0.57	0.013	0.44	0.014
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	NM_029272	0.5	0.006	0.48	0.011
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	NM_144870	0.59	0.014	0.53	0.010
B. Complex III of mitochondrial OXPHOS					
cytochrome c-1	NM_025567	0.46	0.007	0.46	0.022
ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	NM_025650	0.62	0.024	0.64	0.013
C. Complex IV of mitochondrial OXPHOS					
cytochrome c oxidase, subunit Vb	NM_009942	0.66	0.004	0.66	0.023
cytochrome c oxidase, subunit Vib	NM_025628	0.55	0.005	0.64	0.013

D. Complex V of mitochondrial OXPHOS						
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	NM_007506	0.66	0.011	0.49	0.008	
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2	NM_020582	0.44	0.008	0.65	0.010	
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	NM_025983	0.66	0.013	0.47	0.009	
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	NM_138597	0.45	0.004	0.43	0.015	
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e	NM_007507	0.61	0.007	0.53	0.014	

表 3 QRT-PCR プライマー配列表

動物種の記載の無い遺伝子は全てマウスの遺伝子である。配列の上段が forward primer、下段が reverse primer の配列を示す。

Genes	Accession No.	Sequence of forward and reverse primers (5'-3')
acidic ribosomal protein P0 (36B4)	NM_007475	GGCCCTGCACCTCTCGCTTTC TGCCAGGACGCGCTTGT
nucleobindin 2	NM_016773	CTAATCAAAGCAGCTACCGCG CCGCTCGTGTTCCTTCATCAT
YY1 associated factor 2	NM_024189	TGTTCCAAAGAAAACCAAGACCAAGA CCAAATGCTGAGCGCTACTCC
high mobility group protein B2	AF267733	GGTCTGAGCAATCTGCCAAAG TGGCACGGTATGCAGCAAT
zinc finger protein 422	NM_026057	TAGAACAAAGCTGGCCTCGAAC TGTCCTTTGATGCCTGTCAGCC
RAR-related orphan receptor gamma	NM_011281	CAAGACTCATCGACAAGGCCT AGCTTTTCCACATGTTGGCTG
GATA binding protein 4	NM_008092	TCCAGCAATGCCACTAGCA TGCCCATAGTGAGATGACAGC
nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	NM_011629	TTTACCCCTTGGTCTTGCCCCAG TCAACGACTTCTCTCCTTTCCG
basic transcription element binding protein 1	NM_010638	TCCTCCCCATCTTAAAGCCCCAT GCTGGCAAGAGCCCTTTTGTGA

zinc finger protein 278	NM_019574	CATGTTAAACCCACCACGGT TGATGTGAGCATTTCTGGCC
zinc finger protein 202	NM_030713	TCAAGAGCCTGCAGAACCA GCTCAACACTTTCTTCCTCAGCTTC
zinc finger protein 28	NM_009552	CCAGGAGATAAACCGCAACA TTGTCCAGCATCACCTTCCAG
Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 homolog	NM_021455	ATCAGCGCTTTGACCAAGATGC TCGGATGAGGATGCTGAACAC
zinc finger protein 30	NM_013705	AAGAGAAAGGTGGAGCCGAGAT CCCATTATTTCACACGGAGA
forkhead box P1	NM_053202	TGCTTACTTCCGACGCAATG TCGCACAAACACTTGTGGAG
deltex 3 homolog	NM_030714	AACGACATCCACCACAAGACC TCGTCTGTGATACCCCTTGGCT
forkhead box O3	NM_019740	AACGGCTCACTTTGTCCCAGA TTGTGCCGGATGGAGTTCTTC
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	NM_007430	GGTCCAGGCCATCAAGAGTTT GGTTAAAGAGCACGGTCCCTT
SRY-box containing gene 6	NM_011445	AAGGCAGGAGATGCGACAGTT TGAGGTGATGGTGTGGTCGTT
nuclear factor I/A	NM_010905	CCGCCCCGGAAGTTATGTATTC TGAACCATGTGTAGCGGAAGG

SRY-box containing gene 5	NM_011444	TCCACCCCAAAAGCAAG GTGATGCAGGTGATTGCCA
SRY-box containing gene 13	NM_011439	GGCCTTCCCAGACATGCATAA TACGCTTAGGCCTTGGCTTGT
rattus acidic ribosomal protein P0 (36B4)	NM_022402	GACAAATGGCAGCATCTACAG CAACAGTCGGGTAGC
rattus SRY-box containing gene 5	XM_342784	AACAGCCCACCAACCAAAA AGGTGATTTGCCGTCAGAGGT
rattus SRY-box containing gene 6	XM_215016	AAGGCAGGAGATGCGACAGTT TGAGGTGATGGTGGTTCGTT
rattus SRY-box containing gene 13	XM_222636	CATTCCGAAAAGGACCTCATCA TTCCGAGACTCGGAGAAATGG
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 4	NM_026610	CGCTGGACCTATGCAAGATCA AACCCTGCCACAGCTCCTAAA
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3	NM_025348	GAGAGATGACGGGAACATGC TTCACAGGTTCTTCAGCCAGTCCAA
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1	NM_025523	CAATGCCAAACCTAACTGGTTG GGTGAAATCCAGAGGAAGGACTG
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	NM_144870	ATCTGGAGAGGAGCGTTGCAT ATGTCATAGCGTGTCTGTCGG
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2	NM_026612	TGGTGTACATATTTCAGCCCCCG AAAGTGACCCAGCACAGCATC

NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa	AW060701	GAATCCCGTACATCTTAAGCTGT GCAAAACCTTGTGAGCCTGAATCCAC
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	NM_029272	TACTCGGTTGTTCTGGGCTGT TGCGGTACCAAGATCTTCAGCT
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	XM_131359	TACCGCTCCAGTCTCTTCGCTGTT GAAATATCCTGGGCTTCGAGCTAAC
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	NM_153064	ACAATAGAAATCTGGCGAAATAGGAC GGGCTGGGTCTTCCGCAAGT
cytochrome c oxidase, subunit VIb	NM_025628	CAAAAGTCCCCCTTTGACA CATATGCTGAGGTCCCCCTTT
cytochrome c-1	NM_025567	GACCATCGAAACGCATGG CCAGCTTTCGACTCTTCAGGA
cytochrome c oxidase, subunit Vb	NM_009942	TAGTCCCCTCCATCAGCAACA ATCGCTGACTCTCGCCTTTGT
cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1	NM_007748	TCAACGTGTTCTCTCAAGTCGC ATCTTCATAGCCGGTCGGAAG
ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit	NM_025650	AAGAAAGGACGATTAGGCAGCC TGCAAAACCTCTCCAGTGTCCA
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2	NM_020582	CAGCCTACGTGGTTTTTCAGCT AGTTATGCTCGGCCCATGCA
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	NM_025983	AGACCGAGTTCAAAAGCGAACG CCCAGGAGGTGAGGTTGATTT

ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	NM_007506	GCATTGGCACAGTGTTTGGTA GGCGACCATCAAAACAGAAAGAG
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	NM_138597	CGGCCAACCTCATGAATTAC TCATGATGTGTGAAAAGGCA
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e	NM_007507	GCAGCGGAGGAAAAGAAAGAGA AAAAGCAAAGCTCGCTGACG
ras responsive element binding protein 1	XM_354749	TAGCATCGAGAAAGATGCTGGC TTTGCTCTCAGCAGCCTGTCT
Kruppel-like factor 6	NM_011803	AAAGCACATCAGCGCACTCA GCTTTCGGAAAGTGTCTGGTCA
non-POU-domain-containing, octamer binding protein	NM_023144	CAGATGGAACCCCTTGGATTGA CAGGAGGAGTTCCACCAATTG
Iroquois related homeobox 2	NM_010574	TTCACTGGAGTCCCACCTACAGG GCAATTGTGACACCTACTTGCA
cDNA sequence BC065123	AK047427	CCCTGGCCCTCTTTCAGATAGA CCGCTGTCATTGCCATCAA
FEV (ETS oncogene family)	NM_153111	CGCAAGAGCAAGCCTAACATG GAAGTCAAAGCGGTAGGCGTA
Kruppel-like factor 2	NM_008452	ACACCAAAGAGCTCGCACCTAA ATGTGTCGCTTCATGTGCAAG
trinucleotide repeat containing 9	NM_172913	CAAGATGGCGTGTTCATAGC AGCACCATCCGTCATATGGAC

zinc finger protein 647	NM_172817	CCTGATTTCCTGTTGTCTCCTCGC TGAGACAGCAGAACAGCCACA
putative homeodomain transcription factor 2	NM_172992	TGGCTACGAAACTGCTGAAGG AGCCGAAAGGATGACAAACCTG
TG interacting factor	NM_009372	AACCCACAGCTTCACCTCTCACT TCCATGCTGTCTTCATCCTCAG
CCAAT/enhancer binding protein zeta	NM_009882	GCCATTCAATTTGTGGAGCGTT CGTCAGACTCCGGATGATCAT
similar to KIAA1762 protein	XM_139193	CCACCACTTGGAAGCATAGCT AGCAGTCTGGACCACTGTGGTA
heat shock factor 2	NM_008297	TGGAGGAAACCCACACCAA AGTTGTCTCACAAAGCTCGCC
ring finger protein 3	NM_172716	AAGGACACGCAGACATCCAGA TGTGGTTGCGTCAATGAGGTA
TEA domain family member 1	NM_009346	CGCCTTCTTCCTCGTCAAAAT TGCTCACACCATAAAGGCC
RIKEN cDNA 5730589K01 gene	NM_023434	TCAGGAGCCGAGACATTCCAT ATCAGAGTCCAAGGAGATAGG
zinc finger protein 160	NM_145483	CAGTCCCCAACAAAGATACGGC TGATGAGCATTGAGCCAAGAC
core binding factor beta	NM_022309	GCATTAGCACAAACAGGCCTTT TTGCTGTCTTCTTGCCCTCCA



ecotropic viral integration site 1	NM_007963	GTCCAAATTTAATTCGCCACCAG CTGAGATCGAATGTGTGCGTG
X-box binding protein 1	NM_013842	TCCCCAGAAACATCTTCCCCATG TCCAACTTGTCCAGAAATGCCC
Iroquois related homeobox 1	NM_010573	ACCCAACTACAGGCGCTTCTT TGTTGTTGAGCCAGGCTTT
myocyte enhancer factor 2D	NM_133665	ACAGTGTTTCTCCAGGCTTGC TGACATAGCCATTCCCAACG
zinc finger protein 282	NM_146175	TTACACCCTTAGCTTATCCCCTTCG TGTCTCACTCTCCTCAGTTACCACA
hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	NM_010431	TGAAGTGCACCCCTAACAAAGCC TGAATATGGCCCCGTGCAGT
zinc finger protein 354A	NM_009329	TCCTCCCCTCATCTTCACCCCAT TAAAGAGCACGGCCACGTCTT
nuclear transcription factor-Y beta	NM_010914	TGCCATGTCCACTCTAGGCTT TCTCCTTTCATGGCCTCTCTG
zinc finger and BTB domain containing 17	NM_009541	AGCCGTGCCAGTGTGTGATAT TGTTGTGTCATGGTGACGGATGT
zinc finger protein 74	NM_178384	TGGAGCAAGAGGAAAGAGCCCTT TCCCTCGAAAAAAGTTGTCCGTC
zinc finger protein 26	XM_134736	GGCCGCTGTAGAAATTGGAAA TCCAAACCAAGAGATCAGGCTG

suppressor of hairy wing homolog 3	NM_153532	GCAGTTACCGAAAGAGCCGTA TCCACCTTGCTTGCACCAG
RIKEN cDNA 6330581L23 gene	NM_146185	GCCTAGCAGATTTTGCCCAGA GCTTTGGCTCCATTCCCCATTC
zinc finger protein 451	NM_133817	GGCTAATTCGTTTGCATGTGC GCTATTGCTATGTCCATCGGC
B-cell CLL/lymphoma 11A	NM_016707	CCCAAAACAGGAACACATAGCAG GGATTAGAGCTCCGTGTGCAGA
transcription factor Dp 1	NM_009361	TCCATTGGTGGCGTATTTCGT CCATTGCTCAAAATCACTGGCA
zinc finger and BTB domain containing 20	NM_019778	CCCTCATCCACTCGACACATT TCCCCCTTGCAACTGATGTAC
DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 161, expressed	NM_026187	TGCTGATCCCTACTGTGCAGGA CGGAATTTCATTACGCGTTGA
nuclear factor I/X	NM_010906	AGTTTGTGTGCTCTGACGGCT ATCCGATGCTGACAAACCG
RIKEN cDNA 1810007M14 gene	XM_358888	CCCAAACTGTTCAACCCCTA AGCAACGTCAGCCTCATCCTT
InsulinI	NM_008386	TGGGGGTCGGGAATCACTGGT TGGGCCTTAGTTGCAGTAGTT
InsulinII	NM_008387	CTGGCCCCTGCTCTCCTCTGG CTGAAGGTCACCTGCTCCCCG

SCD2	NM_009128	CCCTGAGGCTCTTCCTCATCAT CGCGTGTGTTTCTGAGAACTT
cyclophilin	NM_008907	AAGAAGATCACCAATTTCCGACTGTG GATTACAGGACATTGCGAGCAG
cyclin D1	NM_007631	CCGGTGCATCATTTAATCTGTTAGG TGGTTTGGCAGCTTGCTAGGGAA
cyclin D2	NM_009829	TGGCCCTTTGAGCTTAACTGA GGCAAAACAGGAAGAGTGTCTTAGGT
cyclin D3	NM_001081635	GCCTCCAAGCTGCGCGAAACCAC ACCAGCACCTCCCACTCCCGCAACT
cyclin E1	NM_007633	TCCTGGATGTTGGCTGCTTAGAAT CTATGTCGCACCACTGATAACCTGA
CDK4	NM_009870	GCCTGTGGTGGTTACGCTCTG GGAACATCTCTGTCAAAGATAACAGCC
p27	NM_009875	AAATCTCTTCGGCCCCGGTCAATCAT TCGCTTCTTCCATATCCCCGGCAGT
cyclin A2	NM_009828	TGACACTCTTTCCGAAATCTTACCCT AATTAGAGCATCCTGGCCTACAT

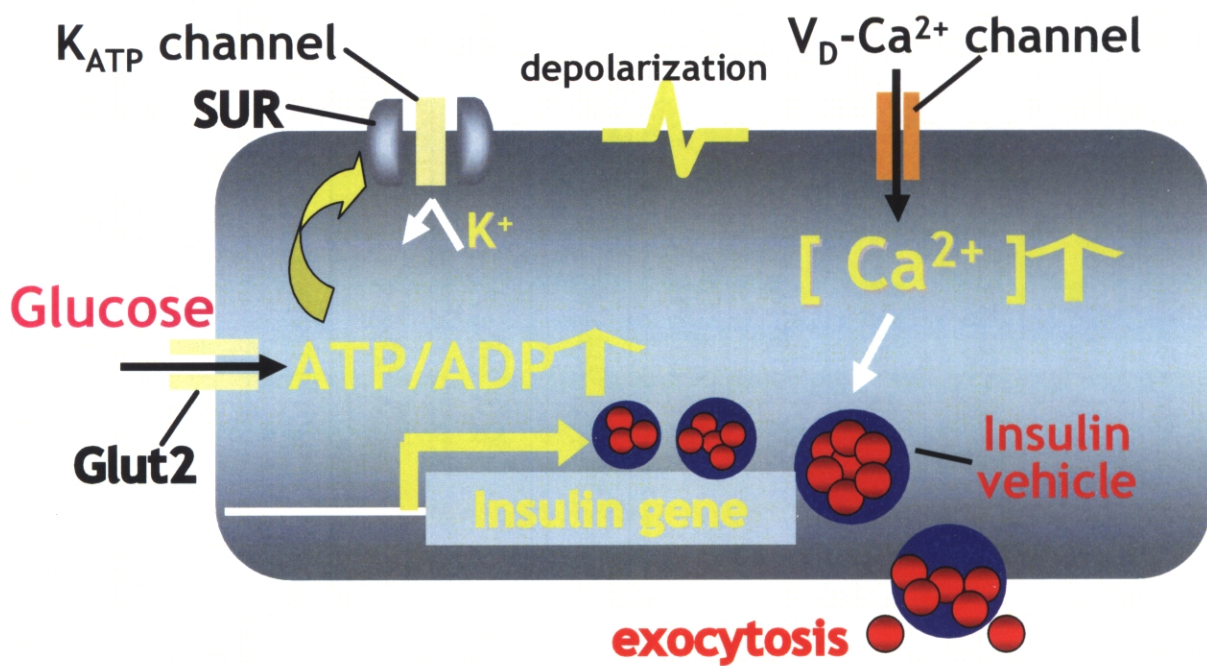


図1 膵β細胞のグルコース依存性インスリン分泌の機序

グルコースはGlut2により細胞内へ取り込まれ、細胞内代謝によるATP上昇を介してK<sub>ATP</sub>チャンネル活性を抑制する。膜電位が上昇してV<sub>D</sub>CCが開口し、細胞内カルシウム濃度が上昇することにより、インスリン分泌が起こる。

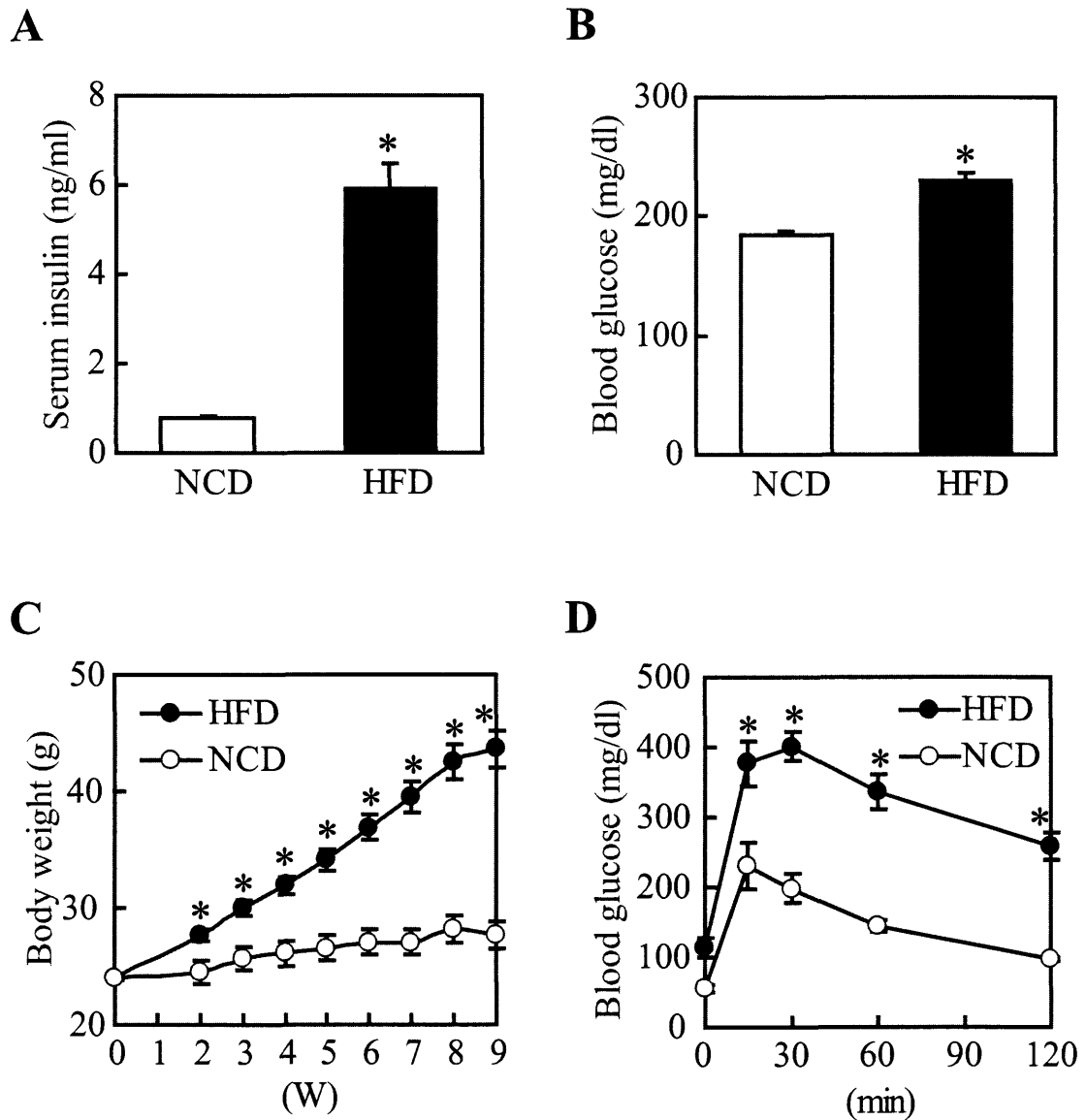


図2 高脂肪食負荷 (HFD) マウスと通常食負荷 (NCD) マウスの代謝パラメーター (A, B) 18週齢C57BL/6Jマウスの随時摂食時の血中インスリン値 (A) と血糖値 (B)。 (C) 体重推移。横軸は高脂肪食負荷開始後の週数を示す。 (D) 腹腔内グルコース投与 (2g/kg) 後の血糖値の経時変化。 エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。 \*はNCDマウスに対して $P<0.01$ で有意であることを示す。

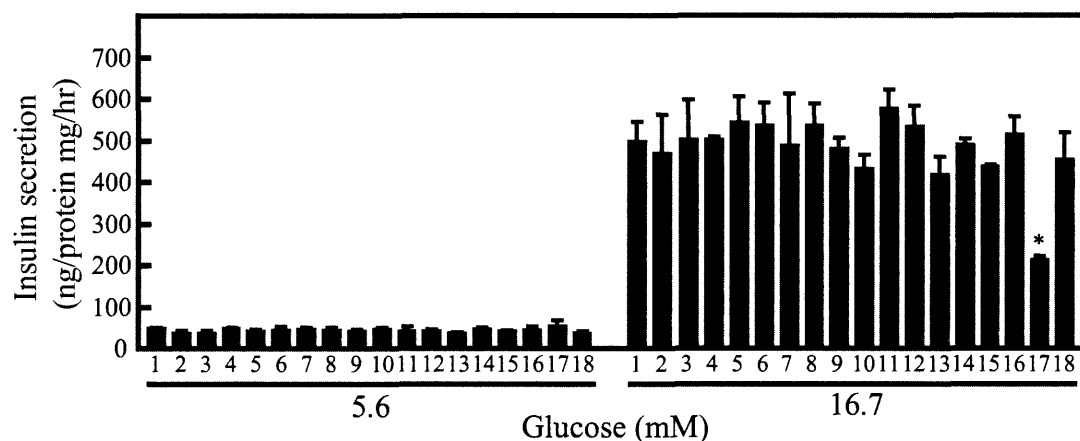


図3 SOX6のインスリン分泌の抑制

MIN6細胞をT25フラスコに $2 \times 10^5$ 個播種した。翌日、実験手法に記載の方法で下記の遺伝子を含むレトロウイルスをMIN6細胞に感染した。

感染2日後、MIN6細胞をトリプシン処理した後、24穴プレートに $5 \times 10^4$ 個/wellの濃度で再播種した。更にその2日後、実験手法に記載の方法で1時間、5.6若しくは16.7mM グルコース処理した時のインスリン分泌量を測定した。

レーン1:alkaline phosphatase(コントロール)、レーン2:nucleobindin2、  
 レーン3:YY1 associated factor 2、レーン4:RAR-related orphan receptor gamma、  
 レーン5:GATA binding protein 4、  
 レーン6:nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1  
 レーン7:basic transcription element binding protein 1  
 レーン8:zinc finger protein 278、レーン9:zinc finger protein 202、  
 レーン10:zinc finger protein 28、  
 レーン11:Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 homolog、  
 レーン12:zinc finger protein 30、レーン13:forkhead box P1、  
 レーン14:deltex 3 homolog、レーン15:forkhead box O3、  
 レーン16:nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1  
 レーン17:SRY-box containing gene 6(SOX6)、レーン18:nuclear factor 1/A  
 エラーバーは標準誤差(n=3)を示す。

\*はコントロール(レーン1)に対して $P < 0.01$ で有意であることを示す。

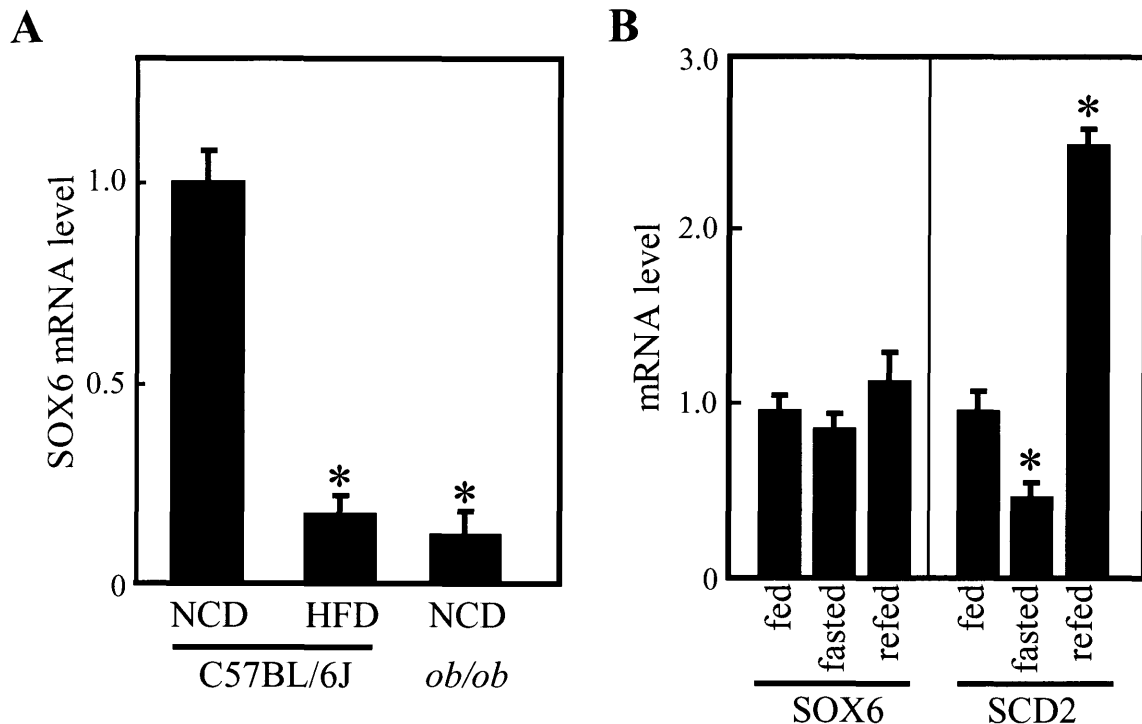


図4 SOX6 mRNAの発現変動

(A) 通常食負荷 (NCD) C57BL/6Jマウス、高脂肪食負荷 (HFD) C57BL/6Jマウス、通常食負荷 *ob/ob* マウスの臍ラ氏島のSOX6 mRNAの相対値。NCD C57BL/6JマウスとHFD C57BL/6Jマウスは8週齢から9週間それぞれの食事負荷をかけたオスマウスを用いた。*ob/ob*マウスは8週齢のオスを用いた。

NCD C57BL/6JマウスのSOX6 mRNA量を1として表記した。

(B) 絶食、再摂食による臍ラ氏島のSOX6、stearoyl-CoA desaturase2 (SCD2) mRNAの発現変動。8週齢のオスC57BL/6Jマウスを自由摂食群 (fed)、絶食群 (fasted: 24時間の絶食)、再摂食群 (refed: 24時間の絶食後、1時間の再摂食) の3群に分けた。SOX6、SCD2各遺伝子の発現量を自由摂食群のmRNA量を1として表記した。臍ラ氏島のtotal RNAを調製し、QRT-PCRによる定量を行った。マウス36B4遺伝子 (NM\_007475) をQRT-PCRの標準とした。エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

\*はNCD C57BL/6J又はfedマウスに対してP<0.01で有意であることを示す。

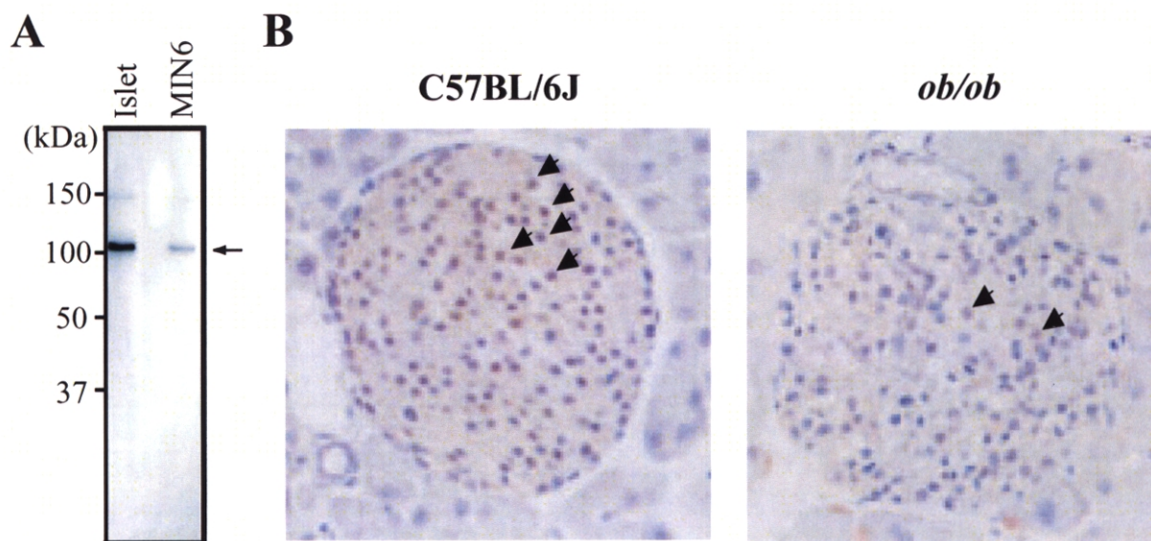


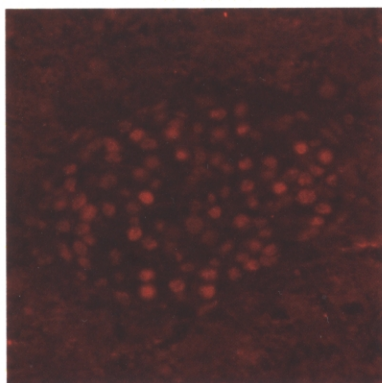
図5 SOX6タンパクの発現変動

(A) C57BL/6Jマウスの膵ラ氏島とMIN6細胞の核抽出物のイムノブロット解析。  
文献(55、57)記載の方法で調製した核抽出物(20  $\mu$ g/レーン)をSDS-PAGEにより  
展開した後、抗SOX6抗体を用いてイムノブロット解析を行った。  
矢印がSOX6のバンドを示す。

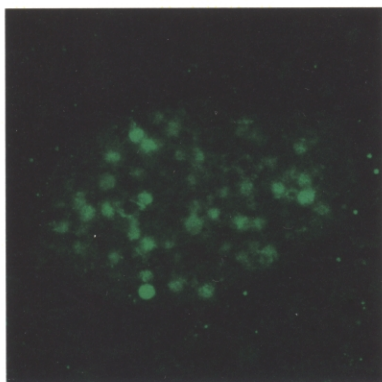
(B) C57BL/6Jマウスと*ob/ob*マウスの膵ラ氏島の免疫組織化学染色。  
実験手法に記載の方法で調製した膵ラ氏島のパラフィン切片を抗SOX6抗体を  
用いて免疫組織化学染色した。矢印がSOX6発現細胞を示す。



### SOX6



### PDX1



### SOX6/PDX1

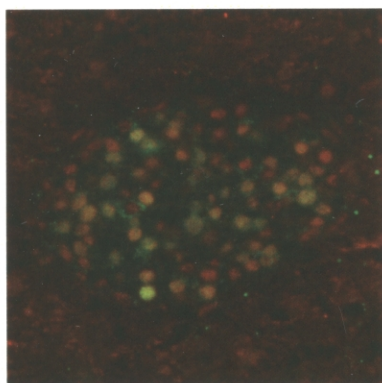


図6 C57BL/6Jマウス膵ラ氏島の抗SOX6抗体及び抗PDX1抗体による2重免疫染色  
上図: 抗SOX6抗体を用いた結果。赤色がSOX6発現細胞を示す。  
中図: 抗PDX1抗体を用いた結果。緑色がPDX1発現細胞を示す。  
下図: 抗SOX6抗体の結果と抗PDX1抗体の結果の重ね合わせ。  
黄色がSOX6とPDX1の両方が発現している細胞を示す。

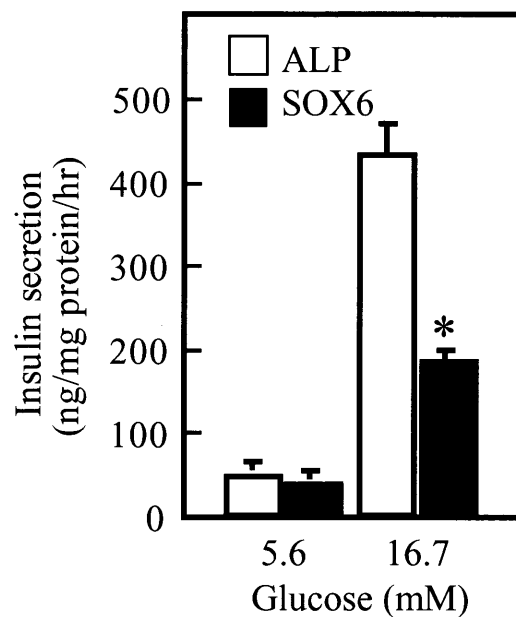


図7 SOX6のグルコース依存性インスリン分泌の抑制

MIN6細胞をT25フラスコに $2 \times 10^5$ 個播種した。翌日、実験手法に記載の方法でSOX6又はアルカリホスファターゼ (ALP) を含むレトロウイルスをMIN6細胞に感染した。感染2日後、MIN6細胞をトリプシン処理した後、24穴プレートに $5 \times 10^4$ 個/wellの濃度で再播種した。

更にその2日後、実験手法に記載の方法で1時間、5.6若しくは16.7mMグルコースで処理した時のインスリン分泌量を測定した。

エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

\*はコントロール (ALP) に対して $P < 0.01$ で有意であることを示す。

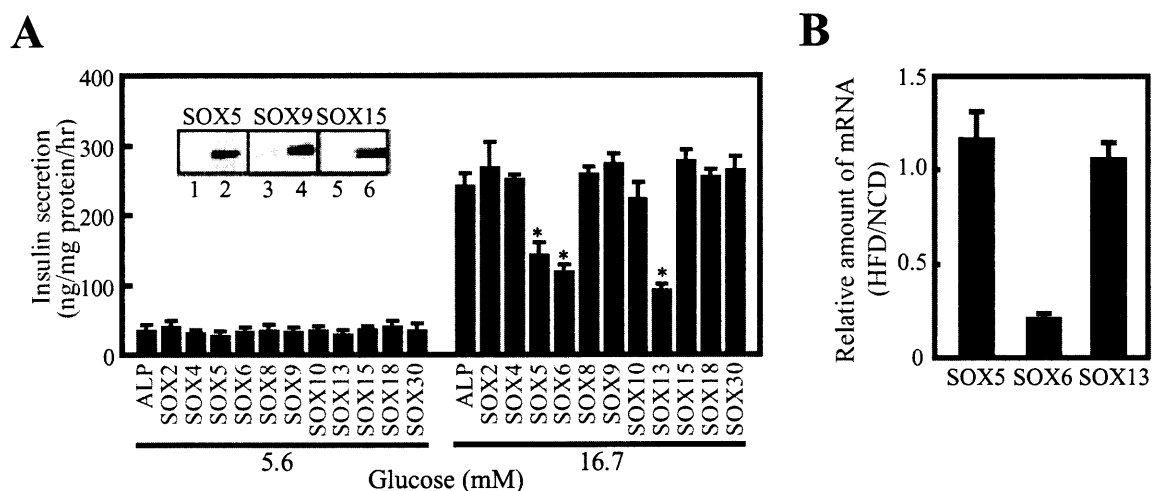


図8 SOXファミリーのインスリン分泌に対する影響と発現変動

(A) SOXファミリーのインスリン分泌に対する影響

図3のレジェンドに記載の方法で横軸に記載した遺伝子を含むレトロウイルスを感染したMIN6細胞のインスリン分泌量を測定した。

グラフ中にSOX5, 9, 15のイムノブロット解析結果を示す。

レーン1, 3, 5はALP発現MIN6細胞、レーン2はSOX5発現MIN6細胞、

レーン4はSOX9発現MIN6細胞、レーン6はSOX15発現MIN6細胞の細胞抽出液。

(B) 高脂肪食負荷 (HFD) マウスと通常食負荷 (NCD) マウスの膵ラ氏島におけるSOX5, 6, 13の発現比較

縦軸はHFDマウス膵ラ氏島の発現とNCDマウス膵ラ氏島の発現の比を表す。

エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

\*はコントロール (ALP) に対してP<0.01で有意であることを示す。

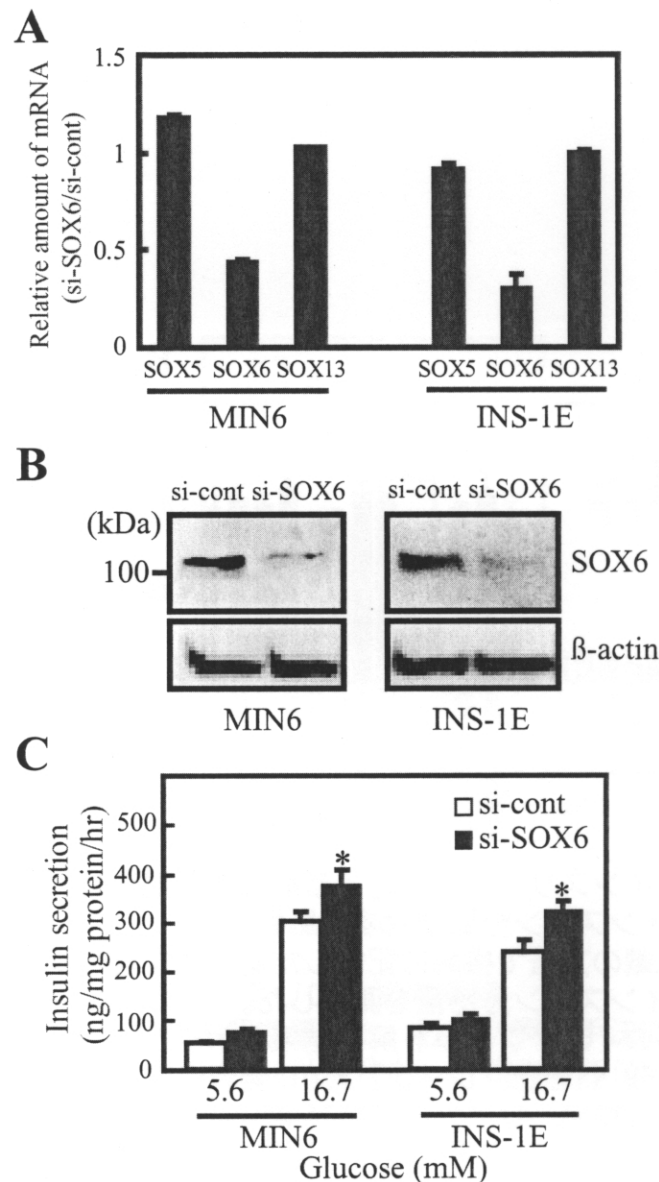


図9 SOX6ノックダウンによるインスリン分泌の亢進  
 実験手法に記載の方法でSOX6に対するsiRNA (si-SOX6) とスクランブルsiRNA (si-cont) をMIN6、INS-1E細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション2日後に、total RNA回収、細胞抽出液調製、インスリン分泌測定を実施した。  
 (A) si-SOX6を導入した細胞とsi-contを導入した細胞におけるSOX5, 6, 13のmRNA量の比較。(B) si-SOX6を導入した細胞とsi-contを導入した細胞におけるSOX6とβ-actinタンパクの発現。(C) si-SOX6を導入した細胞とsi-contを導入した細胞の5.6、16.7mMグルコース時のインスリン分泌量。エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。  
 \*はコントロール (si-cont) に対してP<0.05で有意であることを示す。

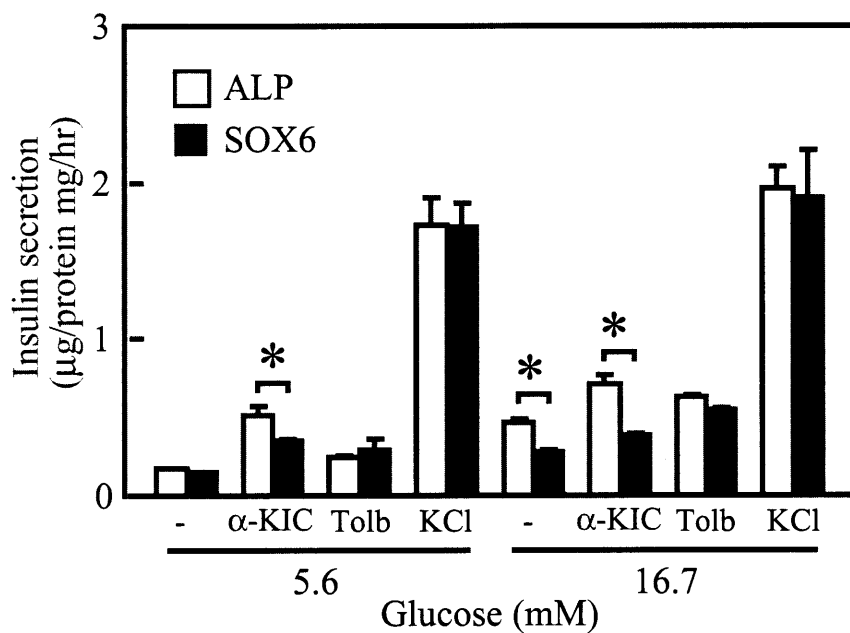


図10 各種インスリン分泌促進剤のSOX6発現MIN6細胞に対する効果  
 SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染させたMIN6細胞の  
 10mM  $\alpha$ -ケトイソカプロン酸 ( $\alpha$ -KIC)、0.3mM トルブタミド (Tolb)、  
 20mM 塩化カリウム刺激によるインスリン分泌量を測定した。  
 エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。  
 \*はコントロール (ALP) に対してP<0.01で有意であることを示す。

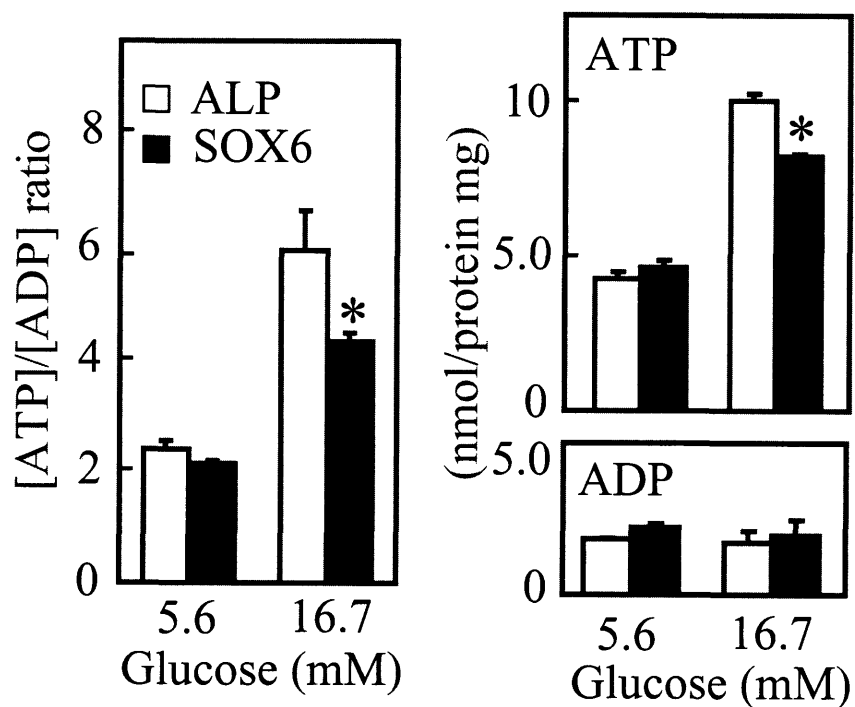


図11 SOX6による細胞内ATP/ADP比の抑制

SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染させたMIN6細胞を1mMグルコースを含むKRBHバッファーで37℃、30分間ブレインキュベートした。次いで、5.6又は16.7mMグルコース含有KRBHバッファーでインキュベートした後、実験手法に記載の方法で細胞内のATP、ADPを定量し、ATP/ADP比を算出した。

エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

\*はコントロール (ALP) に対してP<0.01で有意であることを示す。

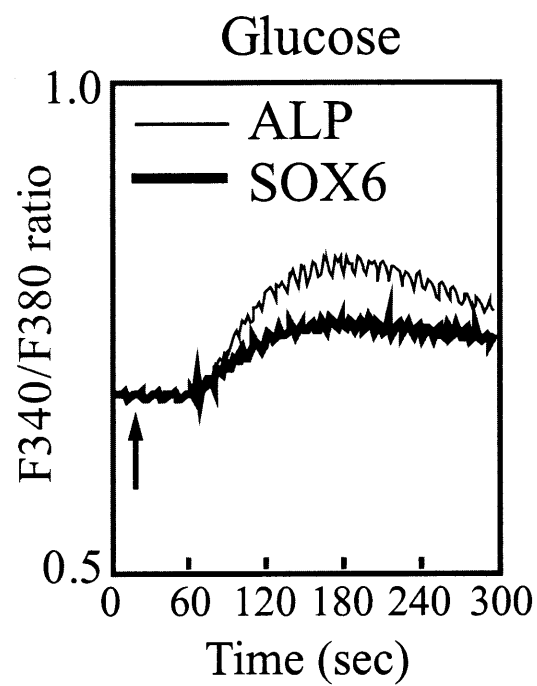


図12 SOX6のグルコース依存性細胞内カルシウム濃度上昇の抑制  
実験手法に記載の方法で、SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染させたMIN6細胞の細胞内カルシウム濃度を測定した。  
矢印が最終濃度40mMグルコースを添加した時間を示す。

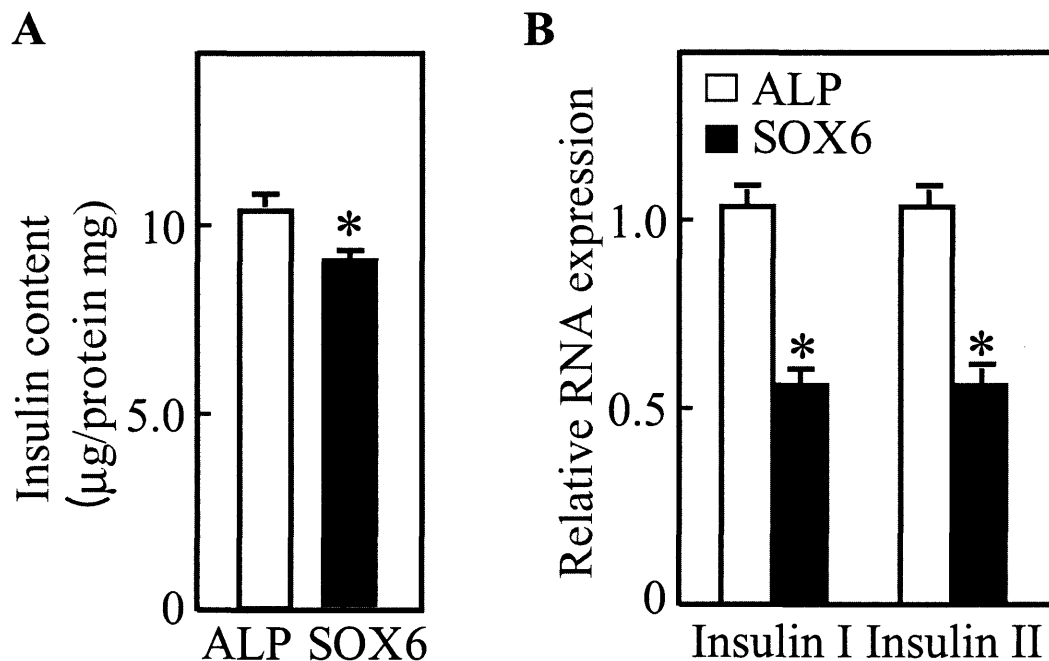


図13 SOX6によるインスリン発現の抑制

(A) SOX6による細胞内インスリン含量の抑制

SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染させたMIN6細胞中のインスリンタンパクを塩酸-エタノール液で抽出し、ELISA法で測定した。

(B) SOX6によるインスリンI, II遺伝子発現の抑制

レトロウイルス感染細胞からRNAを調製し、36B4を標準遺伝子として、QRT-PCRでインスリンI, IIのmRNA定量を行った。

エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

\*はコントロール (ALP) に対して $P < 0.01$ で有意であることを示す。



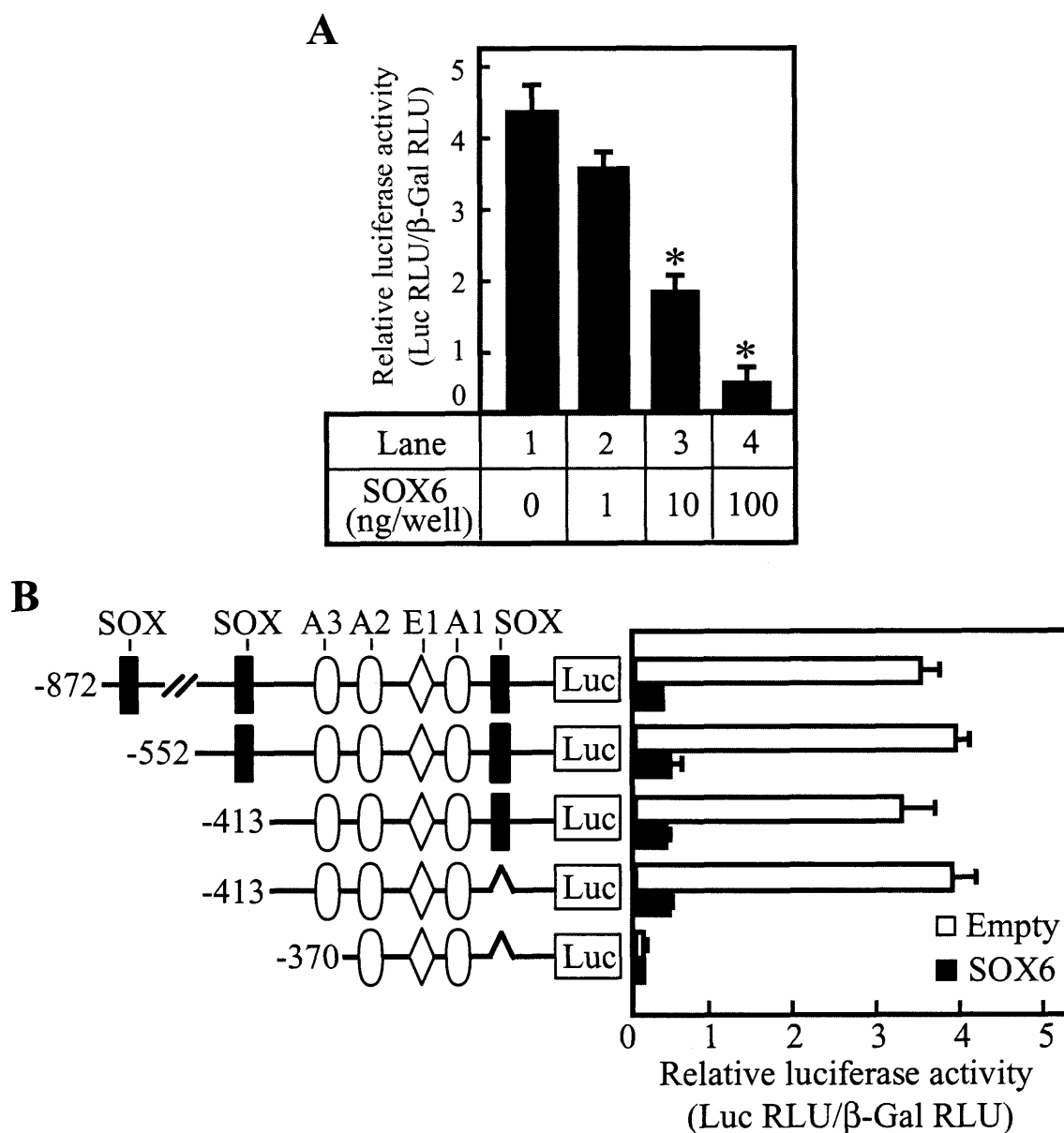


図14 SOX6によるラットインスリンIIプロモーター活性の抑制

(A) 0.1 μgのラットインスリンIIプロモーターを含むレポータープラスミド (pINS (-872)-luc) と0.01 μgの内標準プラスミド (pCMV β) 及び横軸に記載した量の pCMV-SOX6を形質導入したMIN6細胞の相対ルシフェラーゼ活性。

(B) 0.1 μgのpINS (-872)-luc又は、SOXコンセンサス配列を欠失した変異体と 0.01 μgのpCMV β 及び0.1 μgのpCMV-SOX6を形質導入した MIN6細胞の相対ルシフェラーゼ活性。

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β-ガラクトシダ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) を示す。

\*はレーン1に対してP<0.01で有意であることを示す。

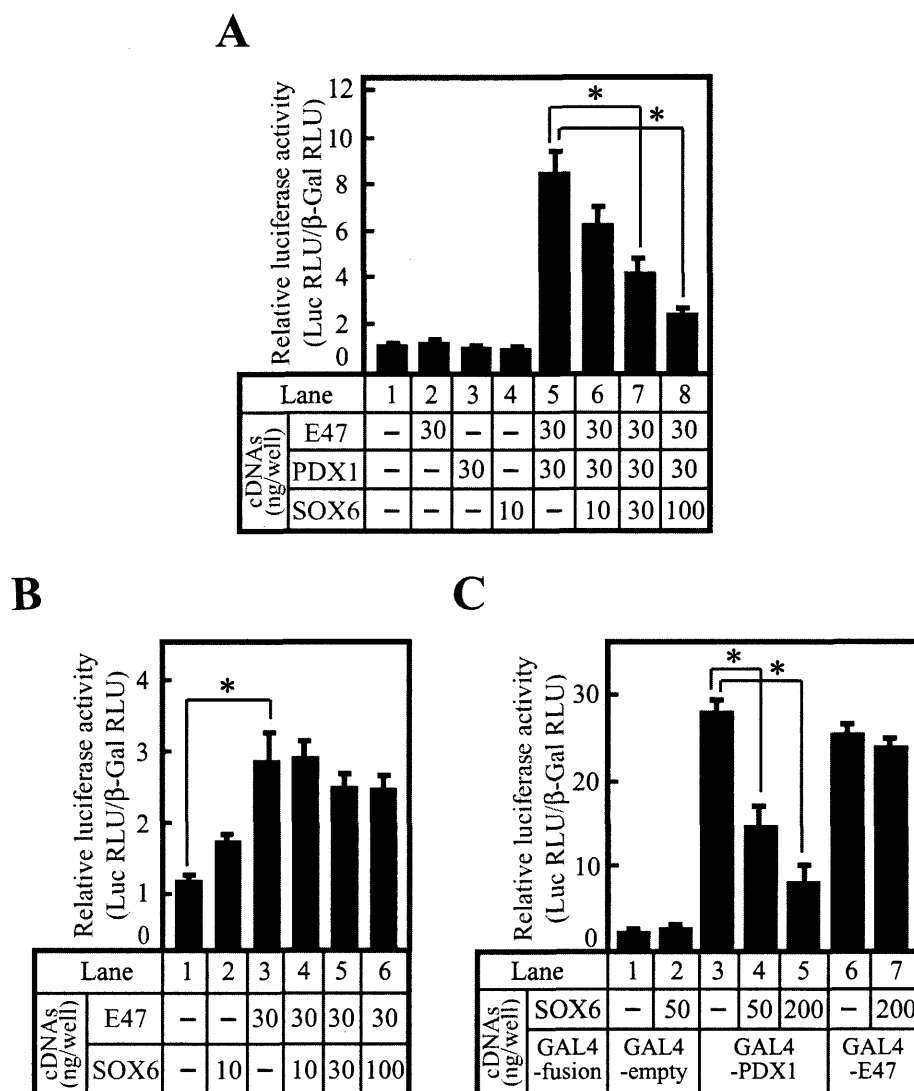


図15 SOX6によるPDX1転写活性の抑制

(A) 0.1  $\mu$ gのpINS(-872)-lucと0.01  $\mu$ gのpCMV  $\beta$  及び横軸に記載した量のpCMV-E47、pCMV-PDX1、pCMV-SOX6を形質導入したBHK21細胞の相対ルシフェラーゼ活性。

(B) 0.1  $\mu$ gのE47応答配列を含むレポータープラスミド (p( $\mu$ E5+ $\mu$ E2+ $\mu$ E3)<sub>4</sub>-luc) と0.05  $\mu$ gのpCMV  $\beta$  及び横軸に記載した量のpCMV-E47、pCMV-SOX6を形質導入したHEK293細胞の相対ルシフェラーゼ活性。

(C) 0.1  $\mu$ gのGAL4応答配列を含むレポータープラスミド (pG5luc) と0.02  $\mu$ gのpCMV  $\beta$  及び0.02  $\mu$ gのGAL4融合タンパク発現プラスミド (pBIND-PDX1、pBIND-E47) と横軸に記載した量のpCMV-SOX6を形質導入したMIN6細胞の相対ルシフェラーゼ活性。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 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で補正することにより算出した。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。

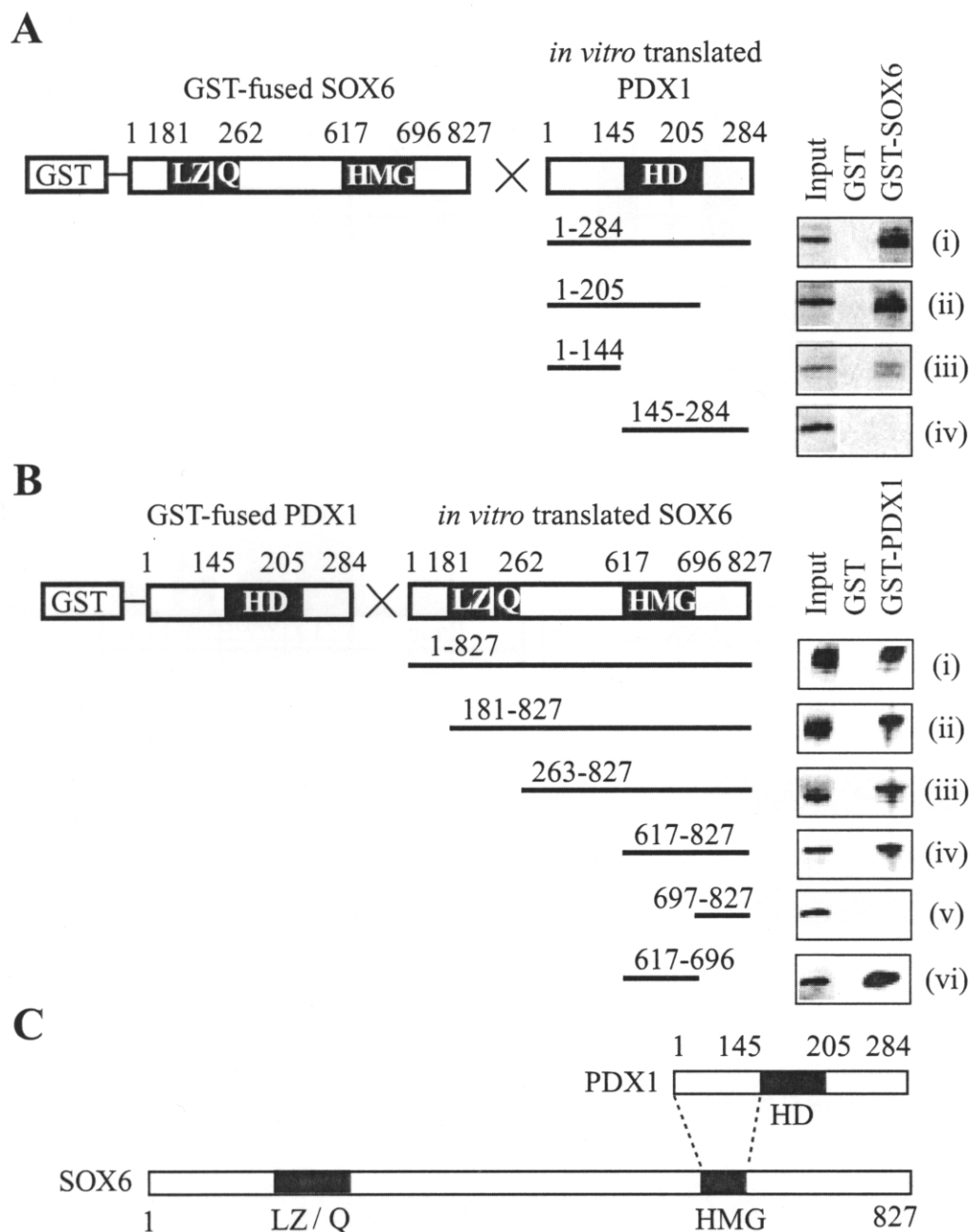


図16 SOX6とPDX1の相互作用

(A) GST融合SOX6と*in vitro*翻訳PDX1及びその変異体の結合  
 (B) GST融合PDX1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  
<sup>35</sup>S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) SOX6とPDX1の結合模式図

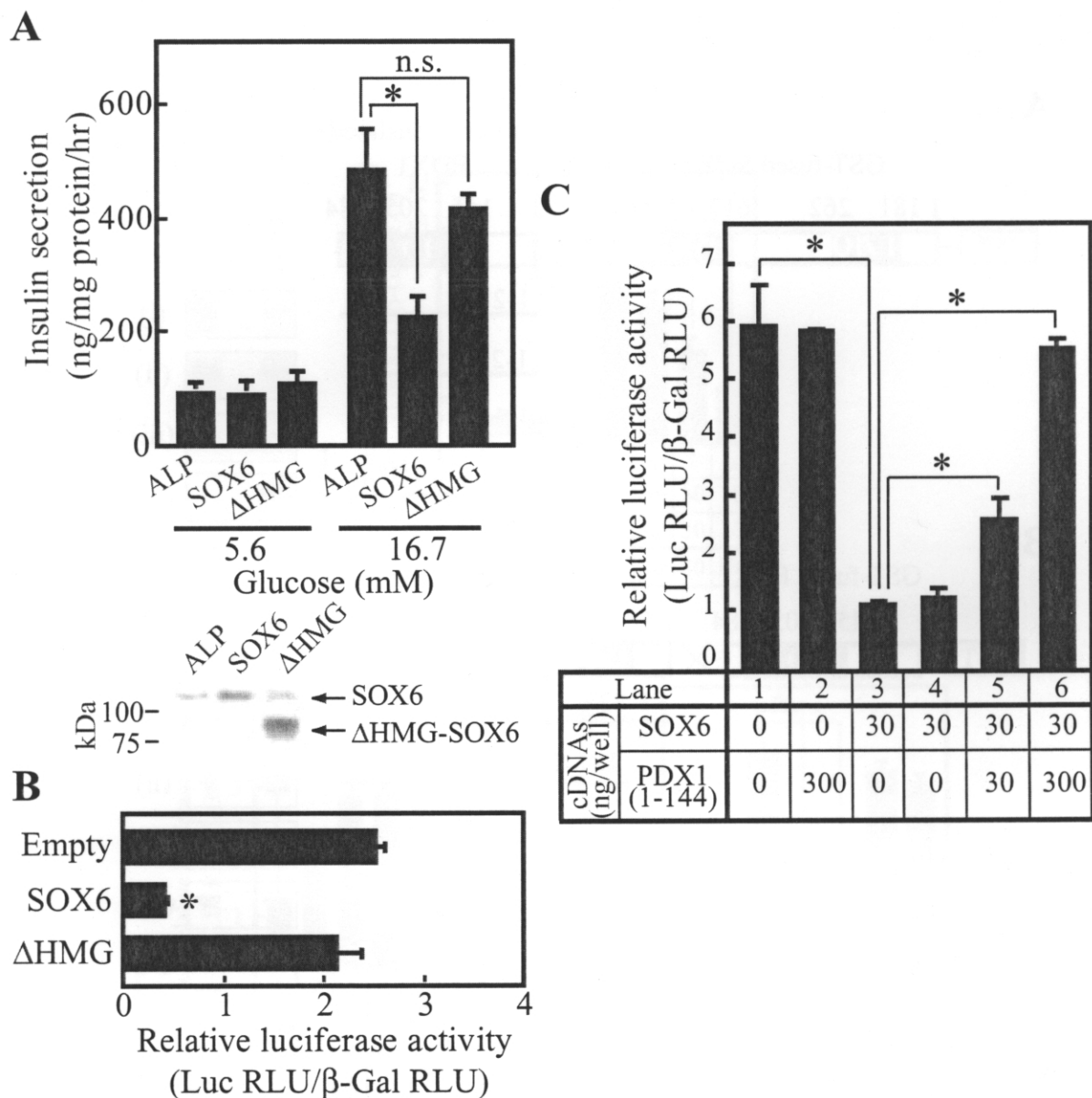


図17 SOX6とPDX1の相互作用によるインスリン発現、分泌の抑制

(A) HMG領域欠失SOX6 ( $\Delta$ HMG) のインスリン分泌に対する効果

5.6又は16.7mMグルコース濃度で、SOX6、 $\Delta$ HMG又はALPを含むレトロウイルスを感染させたMIN6細胞からのインスリン分泌量を測定した(上図)。

インスリン分泌測定に使用した細胞の抽出液を、 $\Delta$ HMGも認識する抗SOX6抗体(ab-12054)を用いてイムノブロット解析行った(下図)。

(B) HMG領域欠失SOX6 ( $\Delta$ HMG) のインスリン発現に対する効果

0.1  $\mu$ gのpINS(-872)-lucと0.01  $\mu$ gのpCMV  $\beta$ 及びpCMV-SOX6又はpCMV- $\Delta$ HMGを形質導入したMIN6細胞の相対ルシフェラーゼ活性を示す。

(C) PDX1 N末端(PDX1 1-144)のインスリン発現に対する効果

0.1  $\mu$ gのpINS(-872)-lucと0.01  $\mu$ gのpCMV  $\beta$ 及び横軸に記載した量のpCMV-SOX6、pCMV-PDX1(1-144)を形質導入したMIN6細胞の相対ルシフェラーゼ活性を示す。

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 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性で補正することにより算出した。

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。

n. s. は有意差無しを示す。

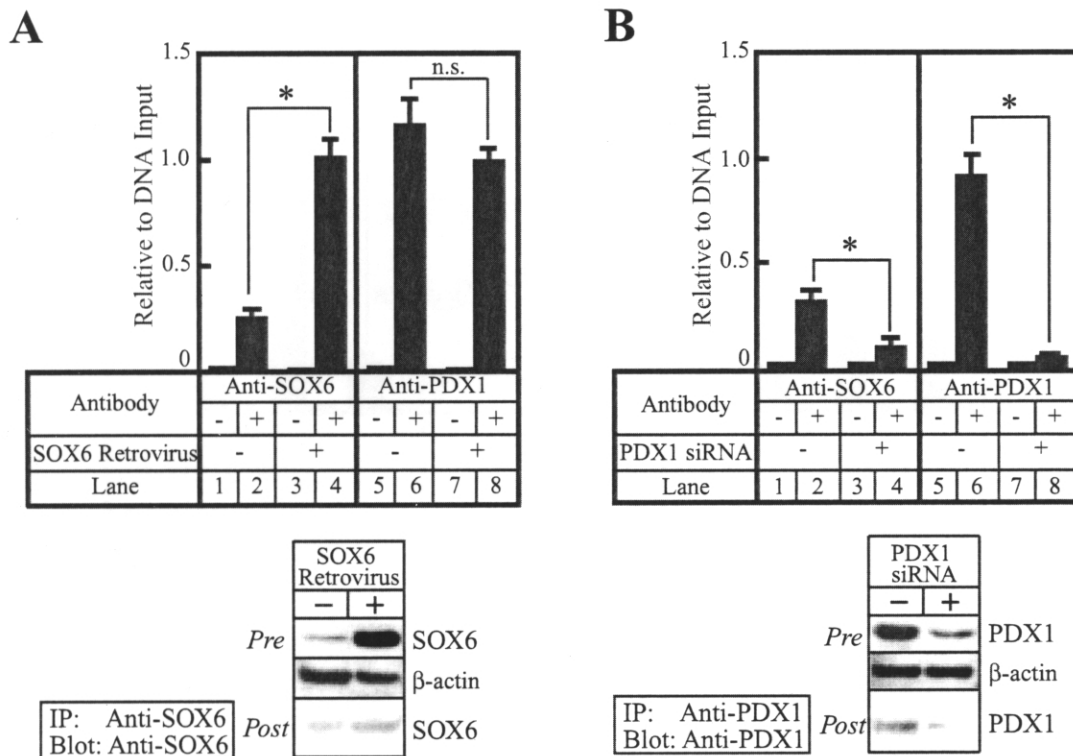
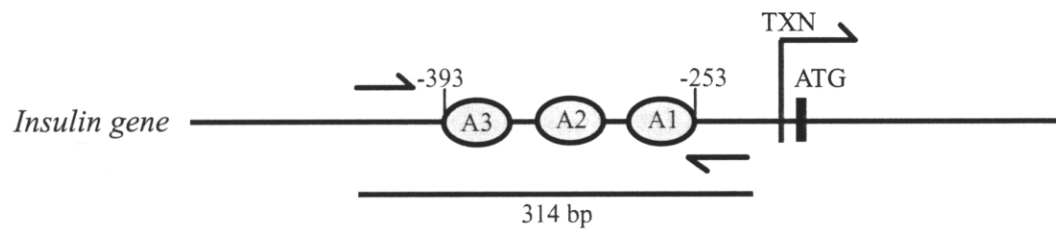


図18 インスリンプロモーター上のSOX6とPDX1の相互作用

インスリンプロモーターの模式図。プロモーター上の数字は転写開始点からの塩基数を示す。矢印は、クロマチン免疫沈降実験 (ChIP) に用いたプライマーの位置を示す。アンプリコンのサイズは314bpである。

(A) SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染したMIN6細胞の抗SOX6抗体又は抗PDX1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) と免疫沈降物 (Post) の抗SOX6抗体によるイムノブロット解析結果を示す。

(B) PDX1に対するsiRNA (PDX1 siRNA) を形質導入したMIN6細胞の抗SOX6抗体又は抗PDX1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) と免疫沈降物 (Post) の抗PDX1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。インスリン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。

n. s. は有意差無しを示す。

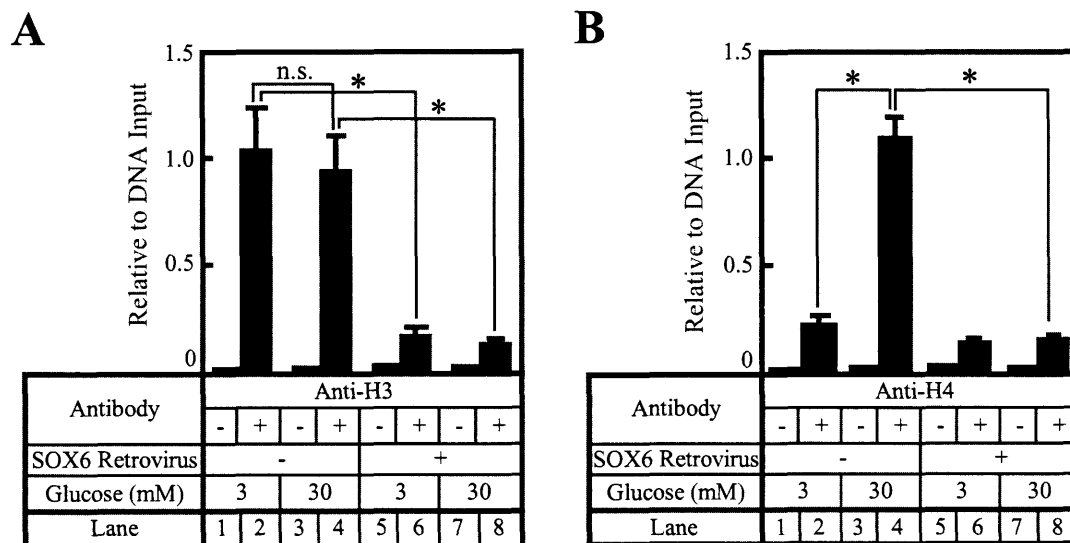


図19 SOX6によるインスリンプロモーター上のアセチル化ヒストンH3、H4の減少  
 (A) SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染したMIN6細胞の抗アセチル化H3抗体 (Anti-H3) を用いたChIP解析結果を示す。細胞は、3又は30mMグルコースを含むDMEM培地で16時間処理した後、ChIP解析に用いた。  
 (B) SOX6又はALPを含むレトロウイルスを感染したMIN6細胞の抗アセチル化H4抗体 (Anti-H4) を用いたChIP解析結果を示す。細胞は、3又は30mMグルコースを含むDMEM培地で16時間処理した後、ChIP解析に用いた。  
 免疫沈降のネガティブコントロールにはウサギIgGを使用した。インスリン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。n. s. は有意差無しを示す。

## 1-5 実験手法

### ①試薬

ルシフェラーゼアッセイ・・・pGL3-basic は Promega より購入して使用した。

RNA 調製・・・RNeasy kit は Qiagen より購入して使用した。

クロマチン免疫沈降・・・immunoprecipitation assay kit は Upstate Biotechnology より購入して使用した。

抗体・・・goat polyclonal anti-PDX1 (sc-14664)、goat polyclonal anti-SOX6 (sc-17332)、rabbit polyclonal anti-SOX5 (sc-20091)、rabbit polyclonal anti-SOX9 (sc-20095)、peroxidase-conjugated affinity-purified donkey anti-rabbit IgG、peroxidase-conjugated affinity-purified donkey anti-goat IgG は Santa Cruz より購入した。rabbit polyclonal anti-SOX6 (ab-12054)、rabbit polyclonal anti- $\beta$  actin (ab-8226)は Abcam Ltd.より購入した。rabbit polyclonal anti-PDX1 (KR059)は TransGenic Inc.より購入した。Alexa Fluor 488 anti-guinea pig IgG、Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG、Zenon Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG labeling kit は Molecular Probes より購入した。Chicken polyclonal anti-SOX15 (AB-9180)は Chemicon International より購入した。Control rabbit IgG (I-1000)は Vector Laboratories より購入した。

### ②動物、飼料、腓ラ氏島調製方法

Charles River から購入した C57BL/6J マウスと *ob/ob* マウスを、室温 26.5℃、

湿度 35%、12 時間の明暗周期(明期;09:00–21:00、暗期;21:00-09:00)で飼育した。普通食には CE-2(日本クレア)を用い、高脂肪食には文献(39)記載の方法で作製した飼料を用いた。9 週間、上記の飼料を自由摂食条件で飼育した後、腩ラ氏島細胞を標準的なコラゲナーゼ法を用いて単離した(39,40)。

### ③定量的 RT-PCR、マイクロアレイ

文献(39,41)記載の方法に従って行った。定量的 RT-PCR は 384well プレートで ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System(Applied Biosystems)を用いて行った。プライマー配列は表 3 に記載する。DNA マイクロアレイは Affymetrix Genechip MOE430-A、MOE430-B を用いて行った。

### ④免疫組織化学

単離したマウス膵臓組織を 10%ホルマリンで室温、20 時間固定した後、アルコール脱水を行い、パラフィンに包埋した。標本の抗原性を賦活化するために 121℃、15 分間オートクレーブした。切片を 2,000 倍希釈した抗 SOX6 抗体(ab-12054)で 4℃、16 時間インキュベートした。続いて、Simple Stain MAX-PO (Multi) reagent (ニチレイ)と 3,3'-diaminodenzidine (同仁化学)を用いて発色を行った。なお、カウンター染色は hematoxylin で行った。二重免疫染色を行う場合は、凍結切片を 0.2% Triton X-100 を用いて 4℃、20 分間 permeabilize した後、2,000 倍希釈した Zenon Alexa Fluor 594 でラベルした抗 SOX6 抗体(ab-12054)と、抗 PDX-1 抗体(KR059)でインキュベートした。抗 PDX-1 抗体(KR059)の発色は Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG で行った。蛍光の検出は



共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview FV500 (オリンパス)を用いた。

#### ⑤プラスミド

以下の遺伝子の cDNA はインビトロジェンより購入した。

nucleobindin 2 (クローン ID 3371745)、RAR-related orphan receptor gamma (クローン ID 4489193)、zinc finger protein 278 (クローン ID4857537)、Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 homolog (クローン ID3866131)、forkhead box O3 (クローン ID4111403)、nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (クローン ID4637694)、nuclear factor I/A (クローン ID4270934)、SOX2 (クローン ID2823424)、SOX8 (クローン ID4937883)、SOX9 (クローン ID4299305)、SOX10 (クローン ID3635492)、SOX13 (クローン ID3493465)、SOX15 (クローン ID3447385)、SOX18 (クローン ID3967084)、SOX30 (クローン ID5172577)、E47 (クローン ID2631291)

以下の遺伝子の cDNA は K.K. ダナフォームより購入した。

zinc finger protein 28 (理研マウス cDNA クローン ID 2700045L05)、zinc finger protein 30 (理研マウス cDNA クローン ID 3110018N02) RIKEN mouse cDNA clones は理研 Genome Exploration Research Group が文献 (42-45)及び <http://genome.gsc.riken.go.jp> に示す full-length technologies を用いて作製したものであり、複製、販売は株式会社ダナフォームが行っている。

以下の遺伝子の cDNA はマウス膝ラ氏島 cDNA から PCR によりクローニング

し、配列確認を行った。

YY1 associated factor 2、GATA binding protein 4、nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1、basic transcription element binding protein 1、zinc finger protein 202、forkhead box P1、deltex 3 homolog、SOX4、SOX5、SOX6

レトロウイルス用発現ベクターは東京大学 北村俊雄教授より供与頂いた pMX ベクターを用いて作製した(46)。pCMV-PDX1 は大阪大学 山縣和也教授より供与頂いた(47)。PDX1(アミノ酸 1-205、1-144、145-284)と SOX6(アミノ酸 181-827、263-827、617-827、697-827、617-696)の各種デリーション変異体及び全長 E47 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-ΔHMG-SOX6 は HMG 領域(アミノ酸 563-827)を *ApaI* 処理にて pCMV-SOX6 から抜き取ることで作製した。pBIND-PDX1 と pBIND-E47 は pBIND(Promega)に各遺伝子の全長配列を挿入して作製した。

#### ⑥リポータープラスミド

pINS(-872)-luc はラットインスリン II プロモーターの-872~-176 に相当する領域を pGL3-basic の *KpnI*-*SmaI* サイトへ挿入して作製した(48)。

pINS(-552)-luc と pINS(-413)-luc は pINS(-872)-luc の 5'末端を欠失した変異体であり、3'末端は共通である。pINS(-413mut)-luc は SOX の結合コンセンサス配列(-248~-242)を pINS(-413)-luc から削除した変異体であり、

pINS(-370mut)-luc は pINS(-413mut)-luc の 5'末端を-370 にした変異体であ

る。作製に使用したプライマー配列は

-872(5'-TATAGGTACCCCCAACCACTCCAA-3')、

-176R(5'-TATACCCGGGGGTTACTGAATCC-3')、

-552(5'-TATAGGTACCTGTGAAACAACAGTTCAAGGG-3')、

-413(5'-TATAGGTACCTTCATCAGGCCACCCAGGAG-3')である。

p(μE5+μE2+μE3)<sub>4</sub>-lucはマウスIgHプロモーター由来のE47 応答配列である(5'-ACACCTGCAGCAGCTGGCAGGAAGCAGGTCATGTGGCA-3')をタンデムに 4 個連結したレポータープラスミドである(49)。合成DNAをアニーリングした後、pGL3-basicのMluI-BglIIサイトへ挿入した。全てのプラスミドはDNAシーケンシングにより確認した。また、GAL4 結合サイトを持つレポータープラスミドであるpG5lucはPromegaから購入した。

#### ⑦細胞培養とレトロウイルス感染

MIN6 細胞(マウス膵 β 細胞由来細胞)(50)と INS-1E 細胞(ラット膵 β 細胞由来細胞)(51,52)はそれぞれ、大阪大学 宮崎純一教授と University Medical Center at Switzerland Pierre Maechler 教授から供与頂いた。MIN6 細胞は 25 mM グルコース、5.5 μM β-メルカプトエタノール、100 units/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、15%FBS を含む DMEM 培地中で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。INS-1E 細胞は 11.6 mM グルコース、10mM Hepes pH7.4、1mM ピルビン酸ナトリウム、50μM β-メルカプトエタノール、2mM グルタミン、100 units/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、5% FBS を含む RPMI1640 培地中で 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。レトロウ

ウイルス感染は文献(41,46,53)記載の方法に従った。HEK293、BHK21 細胞は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターから供与して頂き、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、10%FBS を含む DMEM 培地中で 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

#### ⑧一過性形質導入

MIN6、HEK293、BHK21 細胞を 24 穴プレートに 1 ウェル当たり、 $5 \times 10^4$  個の細胞を播種した。翌日、リポフェクトアミンプラス試薬(Invitrogen)を用いて、レポータープラスミドと各種発現ベクター及び内部標準プラスミドである pRL-TK と pCMVβ を上記細胞に形質導入した(41,54-56)。なお、1 ウェルあたりの DNA 量は空ベクターを添加することで 0.2~0.7 µg / ウェルに合わせた。翌日、細胞を細胞溶解液(Promega)で溶解し、該細胞溶解液のホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ活性を Promega、BD Biosciences 社のキットを用いて測定した。

#### ⑨siRNA 導入

マウス、ラット SOX6 特異的な siRNA として括弧内に示す、開始 ATG から 2249 番目-2267 番目の塩基配列に相当する配列を用いた (5'-UGAGGUGAUGGUGUGCACCAUCACCUCAdTdT-3' と 5'-UGAGGUGAUGGUGUGGUCGdTdT-3')。ネガティブコントロールにはダーマコン社の siCONTROL nontargeting siRNA2 を用いた。PDX1 siRNA はアンビオン社 ID No.155849 を購入して使用した。siRNA 導入はリポフェクタミン

プラスを用いて行った(54,55,57)。

#### ⑩インスリン分泌量、細胞内インスリン量、細胞内 ATP 量、細胞内カルシウムイオン濃度の測定

グルコースやそれ以外の分泌促進剤に対するインスリン分泌量を測定する際には、経代数 16~35 回の MIN6 細胞と経代数 54~95 回の INS-1E 細胞を使用した(50,58)。測定前に 2 度 PBS で洗浄してから、グルコース不含の KRBH バッファー(129 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 5.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES, pH 7.4. Bovine serum albumin (0.1%))で 37℃、30 分間プレインキュベートした。そしてグルコース不含の KRBH バッファーで細胞を洗浄した後、各分泌促進剤を含む KRBH バッファーで 1 時間インキュベートした。その後、プレートを氷上に置くことでインキュベーションをストップさせ、上清を回収しインスリン分泌測定用サンプルとした。細胞内インスリンは 0.4M HCl / 74% EtOH で 4℃, overnight で抽出した(40)。分泌インスリン、細胞内インスリン量共にシバヤギ社製ラットインスリン ELISA キットを用いて測定した。MIN6 細胞の ATP、ADP 量は ATP assay system (東洋紡ネット)を用いて測定した(40,59)。細胞内カルシウムイオン濃度は、2μM fura-2/AM(同仁化学)を 10mM グルコース含有 KRBH バッファー中で室温、1 時間かけてロードした MIN6 細胞を用いて測定した。上記溶液を除去した後、Functional Drug Screening System 6000(浜松ホトニクス)を用いて 340 と 380nm で励起した時の 510nm の発光量の比を測定した(60)。

#### ⑪クロマチン免疫沈降

Upstate社のImmunoprecipitation assay kitを用いた。2×10<sup>6</sup>個のMIN6細胞を37℃、15分間1%のホルムアルデヒド溶液で固定した。次いで、プロテアーゼインヒビターを含むPBSで2回洗浄した後、細胞を回収し0.5mLの細胞溶解液(50 mM Tris-HCl at pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS)に懸濁した。そして、氷上でSonifier Cell Disrupter Model Micro-150 (GENEQ inc., Montreal, QC)を用いて30秒間のパルスを10回かけることで、細胞を破壊した。遠心分離により、上清を回収し以降の免疫沈降実験のサンプルとした。まず、非特異的結合を抑制するためにサンプルをプロテインAセファロースと鮭精子DNAで4℃、1時間プレインキュベートした。遠心分離により得られた上清を抗体(anti-PDX1、anti-SOX6、anti-acetyl Histone H3 and H4)若しくはコントロールウサギIgGと4℃、オーバーナイトでインキュベートを行った。次いで、プロテインAセファロースを添加し、4℃、1時間インキュベートした。キット添付のマニュアルに従ってセファロースを洗浄した後、250μLの溶出液(1% SDS and 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>)で室温、15分間の溶出を2度行った。その後、クロスリンクをはずすために、20uLの5M NaClと1uLの10mg/mL RNaseAを添加し、65℃、6時間保温した。最後に1.5uLの10 μg/μLプロテインナーゼKで処理してから、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行うことで、DNAを精製した。こうして得られたDNAを鋳型としてQRT-PCRを実施した。免疫沈降サンプルの定量値は、免疫沈降処理していないDNA(Input DNA)に対する相対比として評価した。QRT-PCRにもちいたプライマー配列は、マウスインスリンプロモーター(5'-GGAACTGTGAAACAGTCCAAGG-3'、5'-GTCGTGGAGTCTACTGGT

GTC-3')である。

## ⑫GST-pull down アッセイ

全長mPDX1(アミノ酸 1-284)、全長mSOX6(アミノ酸 1-827)のGST融合遺伝子のコンストラクトはpGEX-4T-2(Amersham Biosciences)を用いて作製し、大腸菌BL21 に形質転換した後、IPTGにより発現誘導することで、各種融合タンパクを得た(41,61)。 $[^{35}\text{S}]$ -ラベルの*in vitro*発現タンパクは、T7 プロモーター制御下に各種遺伝子断片を挿入したpcDNA3 を鋳型として、T<sub>N</sub>T Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega)と L- $[^{35}\text{S}]$  methionine (1000 Ci/mmol; Amersham Bioscience)を用いて作製した。GST若しくはGST融合タンパクと $[^{35}\text{S}]$ -ラベル*in vitro*発現タンパクを2時間、4℃でインキュベートした後、T<sub>N</sub>T Quick Coupled Transcription/Translation system添付のバッファーで5回洗浄した後、SDS-PAGEを行いイメージングアナライザー(BAS2000)を用いて画像解析を行った。

## ⑬イムノブロット解析

各ウェル当たり同一タンパク量をSDS-PAGEで展開した後、イムノブロット解析に供した。1次抗体には抗SOX5抗体(1/1,000希釈)、抗SOX6抗体(ab-12054)(1/1,000希釈)、抗SOX9抗体(1/1,000希釈)、抗SOX15抗体(1/1,000希釈)、抗PDX1抗体(ab-14664)(1/500希釈)、抗 $\beta$ -actin抗体(1/5,000希釈)を用いた。検出試薬はECL-PLUSシステム(GEヘルスケア)を使用し、定量はLumiVisionPRO(タイテック)を使用した(55,57,62)。