

第2部 転写因子 SOX6と β -カテニンによる細胞増殖調節機構

2-1 緒言

第1部で、SOX6がインスリン抵抗性マウスの膵 β 細胞において発現抑制されること、PDX1の活性を阻害すること、更にインスリン分泌を抑制することを明らかにした。この結果から、インスリン抵抗性を代償するために膵 β 細胞がインスリン分泌を亢進する機構にSOX6が関与することが示唆された。

一方、代償的インスリン分泌亢進を考える上で、インスリン分泌能の上昇に加えて、膵 β 細胞マスの増加も重要であることが知られている(63)。膵 β 細胞マスは大きく分けて4つのメカニズム(① β 細胞の増殖、②細胞サイズ、③膵臓上皮細胞からの β 細胞新生、④アポトーシス)によって制御されており、正味の膵 β 細胞マスは①+②+③-④と定義することが出来る。4つのメカニズム全て重要なステップであるが、最近のマウスを用いた実験では、膵 β 細胞マスの変動は①の β 細胞自体の増殖によるところが大きいと報告されている(64)。ヒトにおいても、肥満に伴う膵 β 細胞マスの増加は β 細胞の増殖及び新生によると報告されている(63)。そこで、筆者らはSOX6の膵 β 細胞増殖に対する影響を検討した結果、SOX6はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)1をリクルートし β -カテニンの転写活性を阻害することで、細胞増殖を抑制することが分かった。

β -カテニンはWntシグナルの所謂カノニカル経路の中で中心的役割をする分子であり、細胞増殖、細胞分化、組織・器官の発達、アポトーシス等様々な生理

現象を調節する因子である(図 20)。Wnt が作用していないとき、 β -カテニンは Axin、Adenomatous Polyposis Coli(APC)、Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β)等の因子と複合体を形成し、この複合体中で GSK-3 β によって N 末端がリン酸化されている(65)。リン酸化された β -カテニンは β -Transducin Repeat-Containing protein(BTRC)に認識されてユビキチン化を経てプロテオソームで分解されることで、その転写活性化能は抑制されている。一方、Wnt が受容体である Frizzled、Low density lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)5/6 に結合すると、シグナルが Dishevelled(Dvl)に伝えられ、GSK-3 β 依存性の β -カテニンのリン酸化が抑制される。その結果、 β -カテニンは分解を免れて細胞質に蓄積した後、核内に移行し遺伝子発現を誘導することで、様々な生理活性を発揮する。

β -カテニンと SOX ファミリーに属する遺伝子(SOX1、SOX3、SOX9、SOX17)の相互作用は既に複数の報告がなされている(66-68)。SOX1 は C 末端領域で β -カテニンと結合してその転写活性を抑制し、哺乳動物のニューロン細胞の分化を制御している(66)。SOX3、17 も β -カテニンと結合してその活性を抑制し、Xenopus の胚発生を制御されている(67)。更に、SOX9 は T-cell factor(TCF)/Lymphoid enhancer factor(LEF)と拮抗的に β -カテニンと結合し、 β -カテニンのプロテオソーム分解を促進することで、 β -カテニンシグナルを遮断することが知られており、このメカニズムにより、SOX9 は軟骨分化を制御していると言われている(68)。

また、筆者は SOX6 が、 β -カテニンと共にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)に結合することも明らかとした。HDAC はヒストンの N 末端のアセチル化されたリジン

残基からアセチル基を除去する反応を触媒し、ヌクレオソーム構造をコンパクトにすることで遺伝子発現を負に調節する役割を担っている(69)。ヒストン脱アセチル化酵素は、エピジェネティックな遺伝子発現調節の中で重要な役割を担っていることが分かりつつあり、ガン治療のターゲット遺伝子として注目されている。

第 2 部では、**SOX6** が膵 β 細胞の増殖を抑制すること、 β -カテニン、**HDAC1** と複合体を形成し、サイクリン **D1** 等の転写活性を抑制することを示す。

2-2 結果

①SOX6 の細胞増殖抑制効果

SOX6 の細胞増殖に対する影響を検討した。siRNAを用いて膵β細胞由来株化細胞であるINS-1E細胞とNIH-3T3細胞でSOX6の発現を60～70%抑制したところ、細胞増殖が促進されることが分かった(図 21)。更に、MIN6 細胞、HIT-T15 細胞でも同様の結果を得たことから、SOX6 は膵β細胞増殖を負に調節していることが示唆された(図 22)。一方、レトロウイルスを用いてINS-1E細胞、NIH-3T3 細胞とMIN6 細胞にSOX6 を内因性の発現に比べて6～7 倍程度の過剰発現させたところ、細胞増殖が著明に抑制された(図 23)。次に、BrdUを用いてDNA合成を測定したところ、SOX6 過剰発現細胞のDNA合成量が減少していることが分かった(図 24)。また、SOX6 強制発現細胞の形態はコントロール細胞と比較して大きな違いは認められないことも確認した(図 25 上図)。更に、SOX6 強制発現細胞が細胞周期のどの段階で止まっているのか調べるために、Fuluoescence-Activated Cell Sorting(FACS)解析を行った。その結果、SOX6 強制発現細胞はG₀/G₁期の細胞の割合が多く、S期及びG₂期の割合が減少していた(図 25 下図)。これらの結果から、SOX6 はG₁期からS期への細胞周期の移行を妨げることで細胞増殖を抑制することが示唆された。

②SOX6 によるβ-カテニンシグナル抑制

SOX6 過剰発現細胞とコントロール細胞において、G₁期からS期への細胞周期の移行を制御する遺伝子群の発現変動をQRT-PCRを用いて検討した。血清添

加 12 時間後の細胞のRNAを用いてQRT-PCRを行った結果、サイクリンA2、D1、D2、D3、E1、CDK4 の減少、p27 の増加が認められた(図 26)。特にサイクリンD1 の発現が 70%以上と最も顕著に抑制されることが分かった。この結果から、SOX6 はサイクリン遺伝子群の発現を抑制することで、G₁期に細胞を留めておき、細胞増殖を抑制していることが示唆された。

サイクリンD1 は細胞周期がG₁期からS期へ移行する際に、重要な役割を果たすことが知られている。また、サイクリンD1 プロモーターは典型的なTcf/Lef-1 結合サイトを有し、その活性はβ-カテニンの転写活性に依存していることが知られている(70,71)。そこで、サイクリンD1 プロモーターとTOPFLASHプロモーター(TCF/LEF-1 結合配列を持つc-fos遺伝子のプロモーター)の転写活性に対するSOX6 の効果を調べた(72)。この実験では、通常の野生型配列のβ-カテニンに加えてS33Yという変異型のβ-カテニンを使用した。S33Y変異体は、GSK-3βの標的残基である33番目のセリン残基をチロシン残基に変換することでリン酸化とその後のタンパク分解が抑制され、恒常的に強い転写活性を示す、所謂恒常的活性化型の変異体である。図 27Aに示すように、通常のβ-カテニンとS33Yβ-カテニンはTOPFLASH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は抑制されることが分かった。同様に、サイクリンD1 プロモーターを用いた場合も、S33Yβ-カテニンで増加した活性がSOX6 で減少することが分かった(図 27B)。以上から、SOX6 はβ-カテニンの転写活性を抑制することが示唆された。そこで、SOX6 がβ-カテニンに結合するかどうかを、GAL4 DNA結合領域とβ-カテニンの融合タンパクを用いたmammalian two-hybridアッセイを用いて検討したところ、SOX6 は濃度依存的にGAL4 融合β-カテニンによる転写活性

を抑制することが分かった(図 27C)。この結果、SOX6 は β -カテニンと結合することで、その転写活性を抑制していることが示唆された。

③SOX6 のロイシンジッパー/ポリ(Q)(LZ/Q)領域と β -カテニンのアルマジロリピート 1-4 の相互作用

次に、 β -カテニンとSOX6 が *in vitro* で直接結合することをGST-プルダウンアッセイを用いて証明した。大腸菌発現GST融合SOX6 タンパクに³⁵S標識した β -カテニンの各種デリーション変異体が結合するかどうかを調べた結果、 β -カテニンのアルマジロリピート 1-4 の領域にSOX6 が結合することが分かった(図 28A (iv))。逆に、当該領域を欠失した β -カテニン変異体はSOX6 との結合能を失っていた(図 28A (v))。 β -カテニンの中央部には 12 個のアルマジロ領域と呼ばれる機能領域が存在する。アルマジロ領域はTCF、*axin*、APC、 α -カテニン、E-カドヘリン等の数多くのタンパク質と相互作用することが知られている(73)。同様の手法を用いて、GST融合 β -カテニンタンパクにSOX6 の各種デリーション変異体が結合するかどうかを検討した。その結果、SOX6 の β -カテニンとの結合領域はロイシンジッパー/ポリ(Q)(LZ/Q)領域であることが分かった(図 28B)。また、LZ/Q領域を欠いたSOX6 変異体(Δ LZ/Q)は β -カテニンと結合することが出来ないことも示された(図 28B (v))。一方、 Δ LZ/QはS33Y β -カテニンにより活性化されたサイクリンD1 プロモーター活性を抑制しないことが分かった(図 29A 上図 レーン 2 と 6)。これらの結果から、SOX6 と β -カテニンの直接結合が、SOX6 の β -カテニン転写抑制効果に重要であることが示唆された。なお、全長SOX6 と Δ LZ/Qが同程度発現していることをイムノブロットで確認した(図 29A 下図)。

次に、*in vivo* で N 末端 FLAG 融合 SOX6(FLAG-SOX6)と内因性 β -カテニンが結合することを免疫沈降法により確認した。FLAG-SOX6 発現ベクターを形質導入した HEK293 細胞の溶解液を用いて、抗 β -カテニン抗体又は抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。それぞれの免疫沈降物を SDS-PAGE で展開した後、抗 FLAG 抗体又は抗 β -カテニン抗体でイムノブロットを実施したところ、抗 β -カテニン抗体の免疫沈降物中に FLAG-SOX6 が検出され(図 29B 上図)、逆に抗 FLAG 抗体免疫沈降物中に β -カテニンを検出した(図 29B 下図)。この結果は、FLAG-SOX6 と β -カテニンが HEK293 細胞中で複合体を形成していることを示している。以上から、SOX6 の LZ/Q 領域と β -カテニンのアルマジロリピート 1-4 の相互作用が SOX6 の β -カテニン転写活性抑制に重要であることが示唆された。

④SOX6 の β -カテニンの安定性に対する影響

β -カテニンと相互作用する SOX ファミリーに属する遺伝子として SOX1、SOX3、SOX9、SOX17 が知られている(66-68)。その中で、SOX9 と β -カテニンに関する研究が最も進んでおり、現在以下のような作用メカニズムが提唱されている。

SOX9 は TCF と拮抗的に、SOX9/ β -カテニン複合体を形成し、形成された複合体はプロテオソーム移行が促進され、速やかにタンパク分解される。このような仕組みで、 β -カテニンのタンパク量が減少することで、 β -カテニンシグナルが減弱するとされている。

そこで、SOX6 も SOX9 同様、 β -カテニンタンパクの安定性に影響を及ぼすか調べた。始めに、SOX6 も TCF と競合的に β -カテニンと結合するかを、GST-プルダウンアッセイを利用した *in vitro* 結合実験で検討した。既報通り大腸菌発現

SOX9 タンパク存在下では、TCF と β -カテニンの結合が阻害される(図 30A レーン 3 と 5)のに対して、SOX6 は TCF と β -カテニンの結合には全く影響を及ぼさなかった(図 30A レーン 3 と 4)。更に、細胞内の β -カテニンタンパクの安定性をイムノブロットティングで検討したところ、既報通り SOX9 と β -カテニンタンパクの分解はプロテオソーム阻害剤である MGC132 の添加によって抑制された(図 30B レーン 6 と 12)。一方、SOX6 を強制発現しても、 β -カテニンタンパク量は全く変化が見られなかった(図 30B レーン 2、3 と 4)。SOX6 は TCF と拮抗することなく β -カテニンと結合し、形成された SOX6/ β -カテニン複合体の分解も認められないことから、SOX6 は SOX9 とは異なる作用機序で β -カテニン活性を抑制していることが示唆された。この違いは、SOX6 と SOX9 の β -カテニン結合部位の違いによると考えられる。SOX9 の結合部位は、TCF と同じアルマジロリピート 4-10 であるため、TCF と競合して β -カテニンに結合する。一方、SOX6 はアルマジロリピート 1-4 に結合するため、TCF との拮抗は生じないと考えられる(68)。更に、図 30B で示したイムノブロットティング実験で用いた細胞のサイクリン D1 プロモーター活性を測定したところ、SOX9 によるサイクリン D1 プロモーター活性の抑制は MGC132 添加によりキャンセルされたが(図 30C レーン 2 と 6、8 と 12)、SOX6 の抑制効果は MGC132 添加細胞でも維持されていた(図 30C レーン 2 と 4、8 と 10)。この結果からも、SOX6 の β -カテニン活性阻害はプロテオソームによるタンパク分解とは異なる機序であることが確認された。

⑤SOX6 の β -カテニンを介したサイクリン D1 プロモーターへの結合

図 30 の結果から、SOX6 と β -カテニンの複合体が細胞内で安定に存在してい

ることが分かった。次に、SOX6/ β -カテニン複合体が β -カテニン標的遺伝子のプロモーター上に存在しているかを、クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを用いて調べた。N 末端 FLAG タグを付加した SOX6(FLAG-SOX6)を強制発現した HEK293 細胞に対して、抗 FLAG 抗体を用いて ChIP アッセイを行った結果、FLAG-SOX6 がサイクリン D1 プロモーター上に存在することが分かった(図 31A 上図 レーン 2 と 4)。一方、抗 β -カテニン抗体による ChIP アッセイを行ったところ、サイクリン D1 プロモーター上の β -カテニン量は変化しなかった(図 31A 上図 レーン 6 と 8)。この結果から、SOX6 はサイクリン D1 プロモーター上の β -カテニンの量に影響しないことが分かった。次に、内因性 β -カテニンタンパクを siRNA を用いてノックダウンしたところ、サイクリン D1 プロモーター上の SOX6 量が減少することが分かった(図 31B 上図 レーン 2 と 4)。この結果から、SOX6 のサイクリン D1 プロモーターへの結合には β -カテニンが必要であることが示唆された。なお、図 31 下図のイムノブロットは、免疫沈降により FLAG-SOX6、 β -カテニンが回収されていることを示す。図 31 の結果、two-hybrid アッセイによるプロモーター配列非依存的な SOX6 の β -カテニン活性の抑制(図 27C)、及び SOX6 と β -カテニンが直接結合すること(図 28)から、SOX6 は β -カテニンを介してサイクリン D1 プロモーターに結合すると考えられる。

⑥SOX6 のヒストンアセチル化抑制効果

クロマチンタンパクであるヒストンのアセチル化は遺伝子発現制御に重要な役割をすることが知られている。そこで、SOX6 の β -カテニン転写活性抑制効果にヒストンアセチル化が関与するかを調べた。FLAG-SOX6 強制発現細胞とコントロー

ル細胞の、サイクリン D1 プロモーター上のヒストン H3、H4 のアセチル化の程度を比較したところ、SOX6 強制発現細胞ではアセチル化 H3、H4 が減少することが分かった(図 32A レーン 2 と 4、8 と 10)。一方、SOX6 により減少したアセチル化 H3、H4 は、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の阻害剤であるスクリプタイドを添加することで、元のレベルへ回復することが分かった(図 32A レーン 4 と 6、10 と 12)。更に、スクリプタイド添加により SOX6 強制発現で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(図 32B レーン 2、3 と 5)。以上の結果から、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おこし、転写活性を抑制していると考えられた。

⑦SOX6 による HDAC1 のサイクリン D1 プロモーター上へのリクルート

HDAC はヒトで現在までに 18 種類見つかっており、4 つのファミリーに分類される。クラス I と II はそれぞれ酵母で知られている Rpd3 と Hda1 との構造上の相同性に基づいて分類されている。クラス III は NAD 依存性の脱アセチル化酵素活性を持ち、他のクラスとの相同性は低い。また、クラス IV はクラス I と相同性のある HDAC11 のみが属する(74,75)。SOX6 が HDAC 分子をサイクリン D1 プロモーター上へリクルートするかを ChIP アッセイを用いて調べたところ、SOX6 過剰発現により HDAC1 のサイクリン D1 プロモーターへのリクルートが促進されることが分かった(図 33 上図 レーン 2 と 4)。HDAC2 についても同様のアッセイを行ったが、SOX6 によるサイクリン D1 プロモーターへのリクルート促進は認められなかった(データ示さず)。

次に、HDAC1、SOX6、 β -カテニンの 3 者が細胞内で複合体を形成している

かを、免疫沈降実験を用いて検討した。C 末端ヒスチジン融合 β -カテニン(β -カテニン-His)と FLAG-SOX6 を強制発現した HEK293 細胞においては、抗 FLAG 抗体による免疫沈降物中に β -カテニン-His と HDAC1 が観察された(図 34 レーン 1)。同じ細胞を抗ヒスチジン抗体で免疫沈降すると FLAG-SOX6、HDAC1 両者の共沈が観察された(図 34 レーン 3)。この結果から、 β -カテニン、SOX6、HDAC1 が含まれる複合体が形成されていることが示唆された。一方、 β -カテニン-His のみ強制発現した 293 細胞を用いて、抗ヒスチジン抗体で免疫沈降しても、HDAC1 は共沈されなかった(図 34 レーン 2)。すなわち、HDAC1 と β -カテニンの結合には SOX6 が必要であることが分かった。以上の結果から、SOX6 を橋渡し役とした HDAC1 /SOX6/ β -カテニン複合体が細胞内で形成されていることが示された。

次に、HDAC1 と SOX6 の直接結合を、GST-pulldown 実験を用いて検討した。大腸菌発現 GST 融合 SOX6 タンパクに ^{35}S 標識した HDAC1 の各種デリーション変異体が結合するかどうかを調べた結果、HDAC1 の N 末端 139 アミノ酸と SOX6 が結合することが分かった(図 35A)。更に、大腸菌発現 GST 融合 HDAC1 タンパクと ^{35}S 標識 SOX6 で同様の解析を行った結果、SOX6 の HMG 領域と HDAC1 が結合することが分かった(図 35B)。図 28 の結果も併せて考えると、HDAC1 の N 末端と SOX6 の HMG 領域が結合し、SOX6 の LZ/Q 領域が β -カテニンのアルマジロリピート 1-4 と結合していることが分かった(図 35C)。以上の結果から、SOX6 が仲介役となって、HDAC1 を β -カテニン転写複合体にリクルートすることで、 β -カテニンの転写活性が抑制されることが示唆された。

2-3 考察

第2部では、インスリン抵抗性に対する膵 β 細胞の適応機構における重要な現象である細胞増殖に対するSOX6の影響を検討した結果、SOX6は β -カテニンシグナルを抑制することで細胞増殖を抑えることが分かった。

SOXファミリーに属するタンパクが β -カテニンに結合しその転写活性を抑制することは既に知られており、SOX9に関する研究から抑制メカニズムは β -カテニンタンパクの分解促進によると言われていた。ところが、SOX6/ β -カテニン複合体はタンパク分解を受けずに、 β -カテニン標的遺伝子のプロモーター上で安定的に存在し、HDAC1をリクルートすることで標的遺伝子の転写活性を抑制することが分かった。SOX1、SOX17は β -カテニンと結合し、その活性を抑制することは知られているものの、抑制メカニズムは明らかとなっていない(66,67)。これらのSOXタンパクの抑制メカニズムがSOX6タイプか、SOX9タイプなのか、あるいは全く別の機序であるのか興味を持たれる。

第1部で、SOX6はインスリンプロモーター上のヒストンの脱アセチル化を促進することを示したが(図19)、その原因を突き止めるには至らなかった。しかし、第2部でSOX6がHDAC1と直接結合することが明らかとなったので(図35)、インスリンプロモーターにおいてもSOX6はHDAC1をリクルートすることで、転写活性を抑制している可能性が示唆される。今後、クロマチン免疫沈降等の方法で検証していきたい。

本研究で、SOX6のLZ/Q領域と β -カテニンのアルマジロリピート1-4が結合することを示した(図28)。一方、 β -カテニンはLegless-Pygopus (Lgs-Pygo) 複合

体とアルマジロリピート 1-4 を介して結合することで、核内に係留されているとの報告がある(76-78)。SOX6 と Lgs-Pygo 複合体が β -カテニンの同じ領域に結合することから、両者は拮抗的に β -カテニンと結合すると予想される。ところが ChIP アッセイの結果から、SOX6 はサイクリン D1 プロモーター上の β -カテニン量に影響しないことが分かっている(図 31)。すなわち、SOX6 は核内の β -カテニン量には影響しないことを示している。一方、Lgs-Pygo 複合体の β -カテニンの核係留効果はショウジョウバエの細胞やがん細胞で強く見られるものの、293T 細胞では観察されないとの報告もあり(78)、HEK293 細胞では β -カテニンを核に係留するために Lgs-Pygo 複合体以外の別のシステムが存在する可能性がある。未知のシステムを仮定すると、HEK 293 細胞では例え SOX6 が Lgs-Pygo 複合体と拮抗的に β -カテニンと結合したとしても、核内 β -カテニン量に変化は見られないことも説明することが出来る。今後、色々な種類の細胞で β -カテニンの核内係留システムを検討する必要がある。もし細胞の種類によりそのシステムが異なるのであれば、SOX6 の β -カテニン活性抑制メカニズムも、細胞によって異なる可能性がある。

SOX6 が HDAC1 をリクルートすることを示したが、HDAC1 以外にも別の転写抑制因子をリクルートする可能性がある。Murakami らは転写コレプレッサーの 1 種である C terminal-binding protein (CtBP) が SOX6 と結合すると報告している(79)。CtBP の標的タンパク質に対する結合力は NAD⁺と NADH により調節され、NADH の方が 100~1,000 倍結合促進活性が強いことが知られている(80,81)。この結果から、CtBP は細胞内の酸化還元センサーとして働き、様々な遺伝子の転写調節を行っていると考えられている。また、グルコース代謝阻害剤(2-デオキシグルコース)を用いた検討から、NADH/NAD⁺比はグルコース代謝活

性によって変動することが分かっている(82)。更に、グルコース代謝が酸化ストレスを引き起こし、膵 β 細胞からのインスリン分泌、細胞マス維持を障害することも知られており、細胞内酸化還元状態は膵 β 細胞の機能にとって重要な役割を担っていることが示唆されている(83)。このように、CtBP は膵 β 細胞においてグルコース代謝活性や酸化ストレスに対する応答を調節している可能性がある。一方、CtBP は Wnt/ β -カテニンシグナルを制御するとの報告もあり(84)、SOX6 の β -カテニン転写抑制効果に CtBP が関与する可能性もある。膵 β 細胞内の SOX6 と CtBP の相互作用の有無に興味を持たれる。

また、 β -カテニンは TCF 以外にも多くの転写因子に結合し、その転写活性を促進することが知られている。例えば、サイクリン E1 プロモーターにおいては β -カテニンの結合パートナーは LRH-1 であるとの報告がある(35)。本論文にデータは示していないが、SOX6 はサイクリン E1 プロモーター活性も抑制する結果を得ていることから、TCF 以外の結合パートナーの時も SOX6 は β -カテニン活性を抑制すると考えられる。近年、 β -カテニンは Forkhead box O (FoxO) とも結合しその転写活性を促進することが報告された(85)。興味深いことに、酸化ストレス条件下では β -カテニンは TCF よりも FoxO と優先的に結合し、細胞は増殖を停止し休止状態あるいはアポトーシスに向かうと述べられている(85)。もし SOX6 が FoxO/ β -カテニン複合体の転写活性も抑制するとしたら、酸化ストレス状態では、通常の状態とは逆に細胞増殖促進に働くかもしれない。インスリン抵抗性への適応過程で、膵 β 細胞の酸化ストレスは増加することは知られているが、その程度や時期は必ずしも明確になっていない。インスリン抵抗性時の膵 β 細胞の増殖促進における SOX6 の意義を考える上では、酸化ストレスの程度を注意しなければならない。

ところで、Wnt-3a、Wnt-5a がインスリン分泌を促進するとの報告もある(40)。第 1 部で、SOX6 のインスリン分泌抑制効果には PDX1 が重要であることを示したが、第 2 部において Wnt シグナルの中核である β -カテニンの転写活性を SOX6 が抑制することを明らかとした。以上の結果から、SOX6 のインスリン分泌抑制効果にも、 β -カテニンの活性抑制が関与する可能性がある。細胞増殖、インスリン分泌両面から、膵 β 細胞における β -カテニンの役割を解析する必要がある。

本研究は *in vitro* の結果が中心であるため、今後は *in vivo* での膵 β 細胞における SOX6 の機能解析が必須となる。SOX6 膵 β 細胞過剰発現トランスジェニックマウスと通常マウスに高脂肪食負荷を行い、インスリン分泌能や膵 β 細胞増殖を比較解析することが重要と考えられる。もし、SOX6 の発現減少が代償的インスリン分泌増加に必須なイベントであるならば、高脂肪食負荷 SOX6 トランスジェニックマウスは SOX6 が恒常的に発現しており発現減少しないために、インスリン分泌が増加せず通常マウスより早期に高血糖を呈すると予想される。また、糖尿病患者や高インスリン値患者の膵 β 細胞における SOX6 の発現がマウスと同様に変動するかどうか非常に重要である。更には、緒言で述べたように日本人と欧米人のインスリン分泌能には大きな差があるので、人種間の SOX6 発現の比較も行う必要がある。本研究結果がヒトの病態における膵 β 細胞をどこまで反映したものであるのかを、見極めていきたい。

2-4 図表

- 図 20 Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路
- 図 21 SOX6 siRNA による INS-1E(A)、NIH-3T3(B)細胞の増殖促進
- 図 22 SOX6 siRNA による MIN6(A)、HIT-T15(B)細胞の増殖促進
- 図 23 SOX6 による INS-1E(A)、NIH-3T3(B)、MIN6(C)細胞の増殖抑制
- 図 24 SOX6 による DNA 合成の抑制
- 図 25 SOX6 発現細胞の Fluorescence-Activated Cell Sorting(FACS)解析
- 図 26 SOX6 発現細胞における細胞周期関連遺伝子の発現
- 図 27 SOX6 による β -カテニン転写活性の抑制
- 図 28 SOX6 と β -カテニンの相互作用
- 図 29 SOX6 と β -カテニンの機能的相互作用
- 図 30 SOX6 と SOX9 の β -カテニン転写活性抑制機構の違い
- 図 31 サイクリン D1 プロモーター上の SOX6 と β -カテニンの相互作用
- 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
- 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
- 図 34 HEK293 細胞における HDAC1/SOX6/ β -カテニン複合体形成
- 図 35 SOX6 と HDAC1 の相互作用
- 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

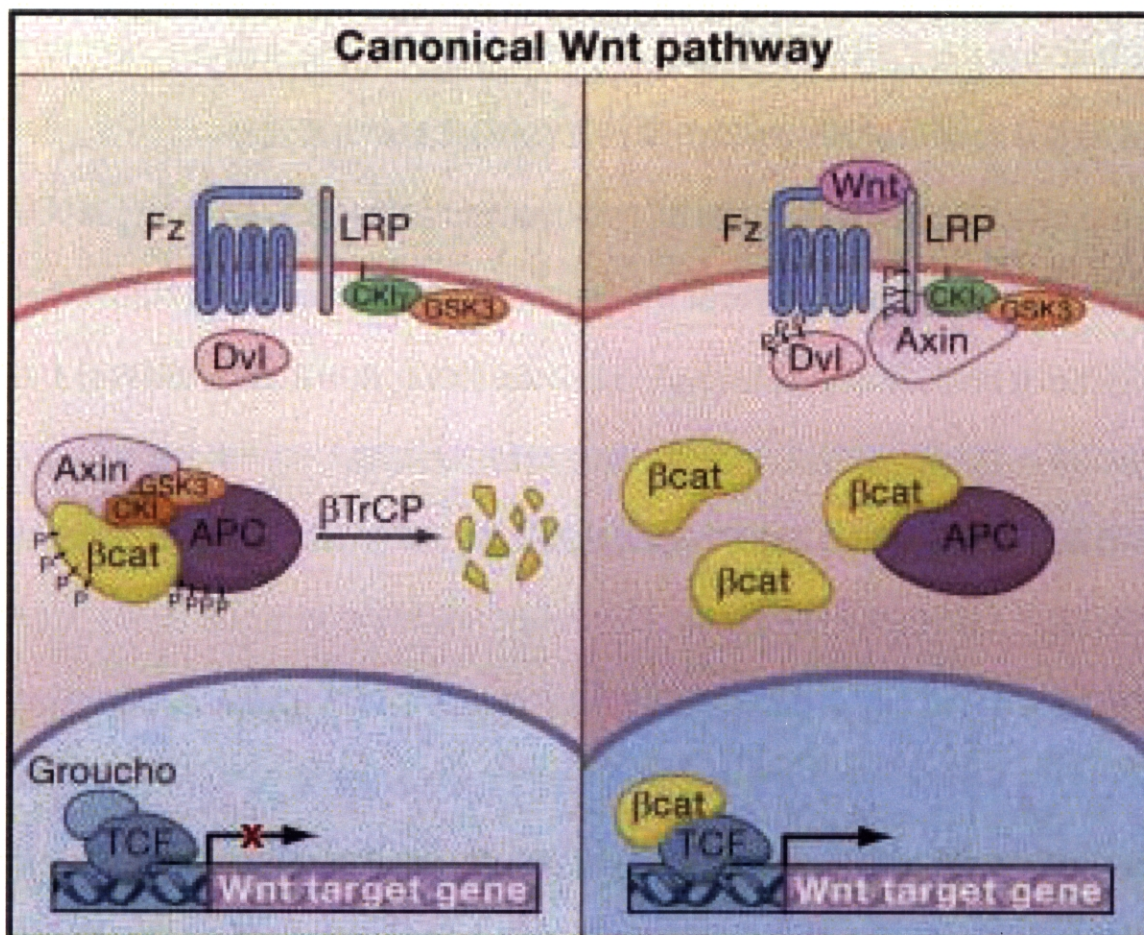


図20 Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路

左図がWntシグナルがオフの状態、右図がWntシグナルがオンの状態を示す。

β Cat: β -カテニン、APC: Adenomatous Polyposis Coli、
GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β 、Dvl: Dishevelled
 β TrCP: β -Transducin repeat-Containing Protein
LRP: Low density lipoprotein Receptor-related Protein
Clevers, H. (2006) *Cell* **127**, 469-468 引用。

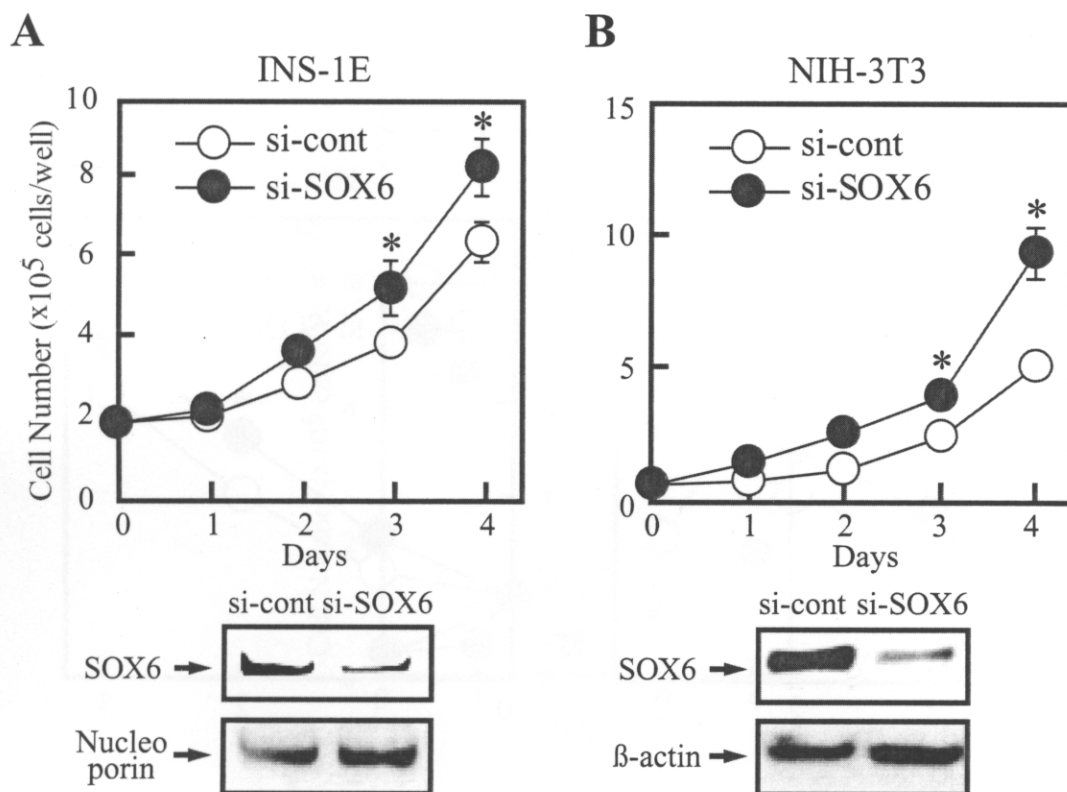


図21 SOX6 siRNAによるINS-1E (A)、NIH-3T3 (B) 細胞の増殖促進
細胞増殖アッセイの前日、SOX6に対するsiRNA (si-SOX6) 又はスクランブルsiRNA (si-cont) を実験手法記載の方法で細胞に形質導入した。
細胞増殖アッセイの開始日 (day0) に、6穴プレートにINS-1E細胞 (A) は 1.8×10^5 個/well、NIH-3T3細胞 (B) は 0.6×10^5 個/well の濃度で播種した。
その後4日間、24時間毎に細胞数を測定したグラフを上図に示す。
2日目に、細胞を回収し抗SOX6抗体、抗nucleoporin抗体又は抗 β -actin抗体を用いてイムノブロットを行った (下図)。
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。

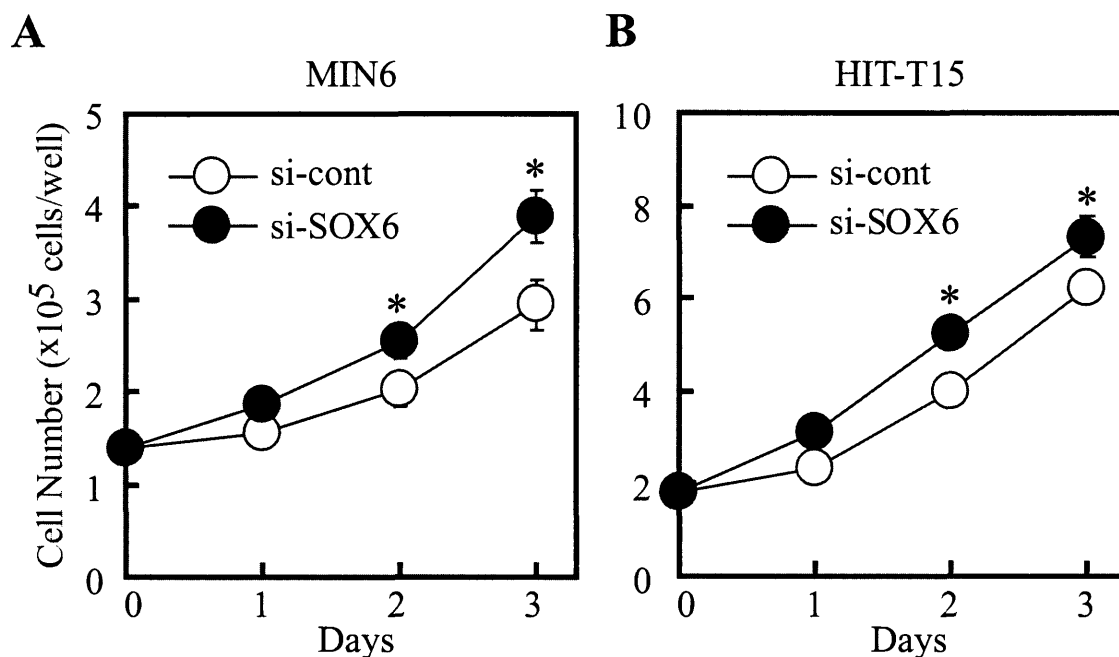


図22 SOX6 siRNAによるMIN6 (A)、HIT-T15 (B) 細胞の増殖促進
細胞増殖アッセイの前日、SOX6に対するsiRNA (si-SOX6) 又はスクランブルsiRNA (si-cont) を実験手法記載の方法で細胞に形質導入した。
細胞増殖アッセイの開始日 (day0) に、6穴プレートにMIN6細胞 (A) は 1.4×10^5 個/well、HIT-T15細胞 (B) は 1.8×10^5 個/wellの濃度で播種した。
その後3日間、24時間毎に細胞数を測定したグラフを示す。
エラーバーは標準誤差 (n=3) を示し、*は $P < 0.01$ で有意であることを示す。

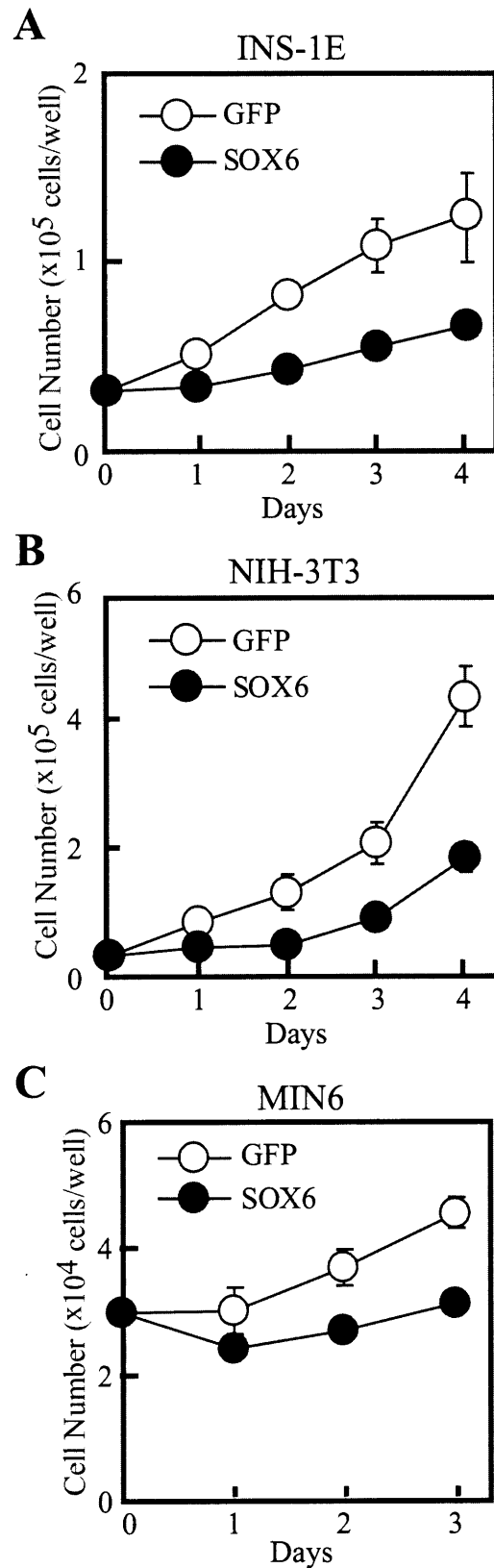


図23 SOX6によるINS-1E (A)、NIH-3T3 (B)、MIN6 (C) 細胞の増殖抑制
 実験手法記載の方法でSOX6又はGFPを含むレトロウイルスを感染させた細胞を、細胞増殖アッセイの開始日 (day0) に、6穴プレートにINS-1E細胞 (A)、NIH-3T3細胞 (B)、MIN6細胞 (C) 共に 0.3×10^5 個/wellの濃度で播種した。その後3、4日間、24時間毎に細胞数を測定したグラフを示す。エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

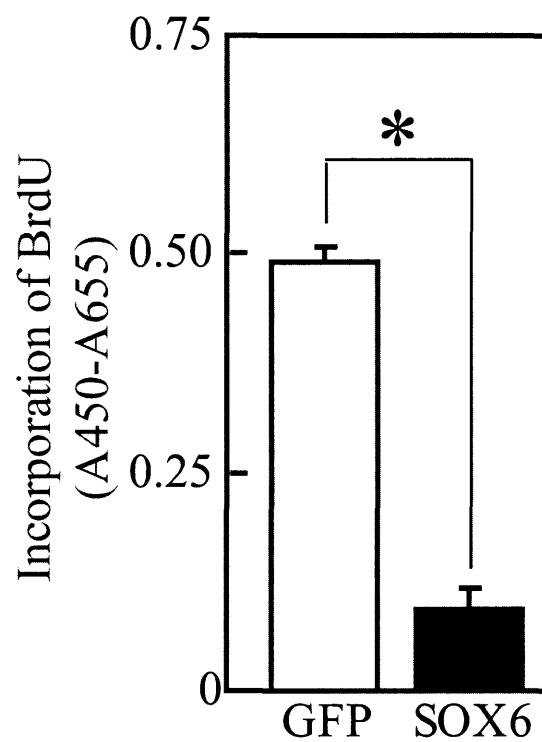


図24 SOX6によるDNA合成の抑制

実験手法記載の方法でSOX6又はGFPを含むレトロウイルスを感染させた NIH-3T3細胞のDNA合成量をBrdUrd labeling kit (Roche Applied Science) を用いて測定した。

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。

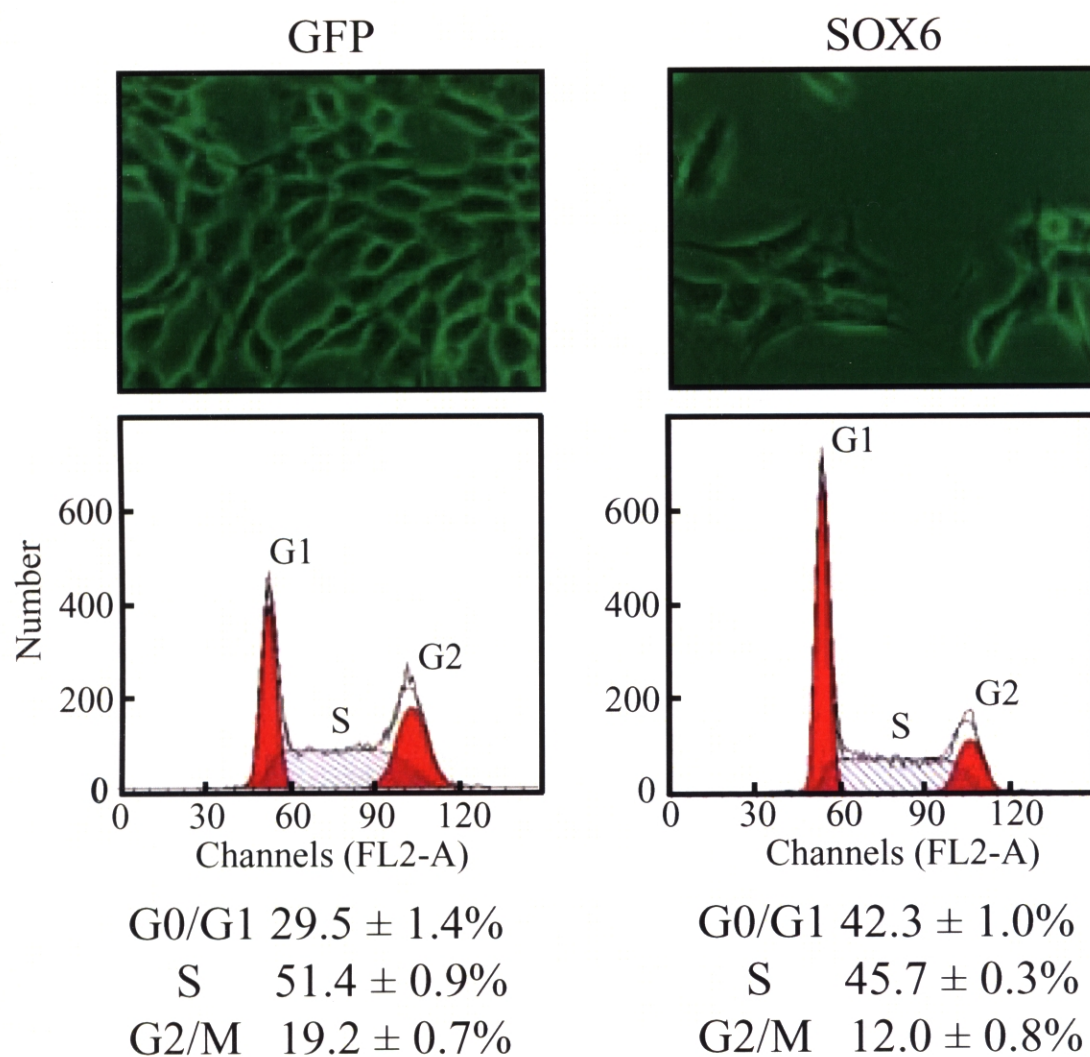


図25 SOX6発現細胞のFluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) 解析
 実験手法記載の方法でSOX6又はGFPを含むレトロウイルスを感染させた
 NIH-3T3細胞の写真(上図)とFACS解析結果(下図)を示す。

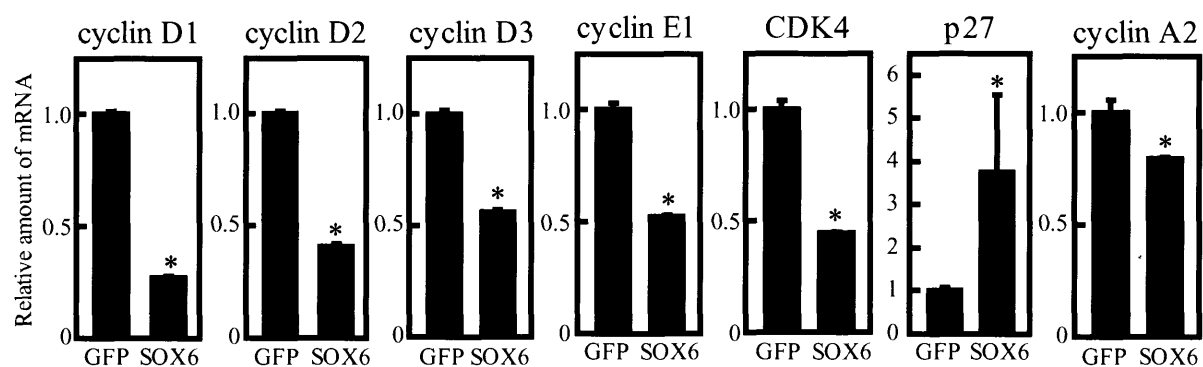


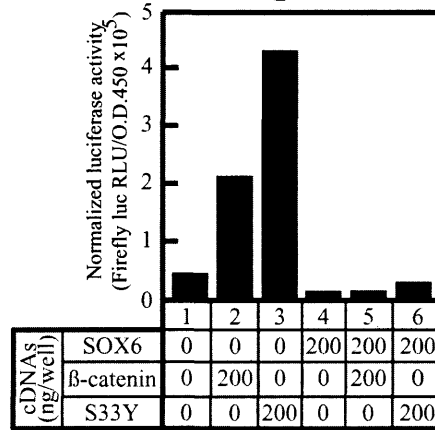
図26 SOX6発現細胞における細胞周期関連遺伝子の発現

実験手法記載の方法でSOX6又はGFPを含むレトロウイルスを感染させたNIH-3T3細胞に、12時間の血清処理を行った後、RNAを調製しQRT-PCRを行った。

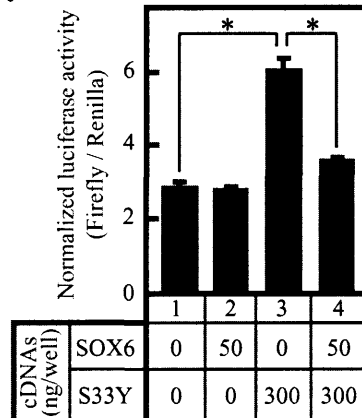
マウスサイクロフィリン遺伝子の発現量を内標準とした。縦軸はGFP発現細胞の各遺伝子の発現を1として表示した。

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。

A. TCF/Lef-luc (pTOPFLASH)



B. Cyclin D1-luc



C. Gal4-luc (pG5luc)

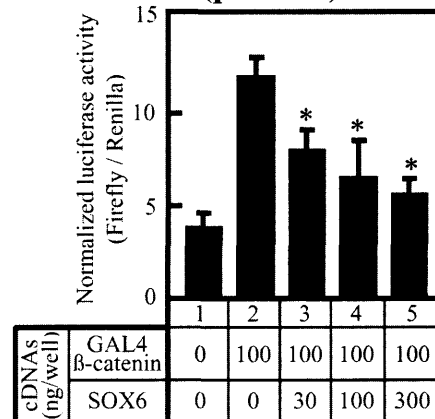


図27 SOX6によるβ-カテニン転写活性の抑制

(A) 0.1 μgのTOPFLASHルシフェラーゼリポータープラスミドと0.01 μgのpCMV/β及びpCMV-SOX6、pCMV-β-catenin、pCMV-β-catenin (S33Y) を図中に表示の量、形質導入したNIH-3T3細胞の相対ルシフェラーゼ活性。

(B) 0.1 μgのcyclin D1プロモータールシフェラーゼリポータープラスミド (Cyclin D1-luc) と0.01 μgのpRL-TK及びpCMV-SOX6とpCMV-β-catenin (S33Y) 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。

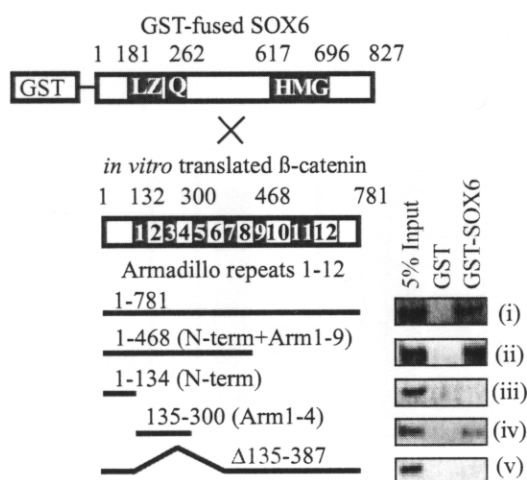
(C) 0.1 μgのpG5lucと0.01 μgのpRL-TK及びpBIND-β-cateninとpCMV-SOX6を図中に表示の量、形質導入したHEK293細胞の相対ルシフェラーゼ活性。

形質導入から20時間後の細胞を用いて、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β-ガラクトシダーゼ又は、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。

A. GST-SOX6 Pulldown



B. GST-β-catenin Pulldown

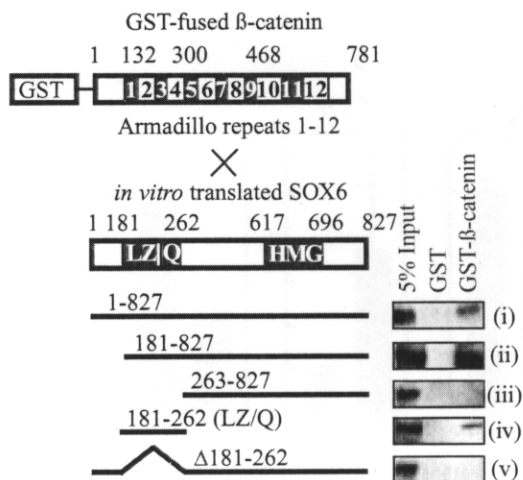


図28 SOX6とβ-カテニンの相互作用

(A) GST融合SOX6と*in vitro*翻訳β-カテニン及びその変異体の結合

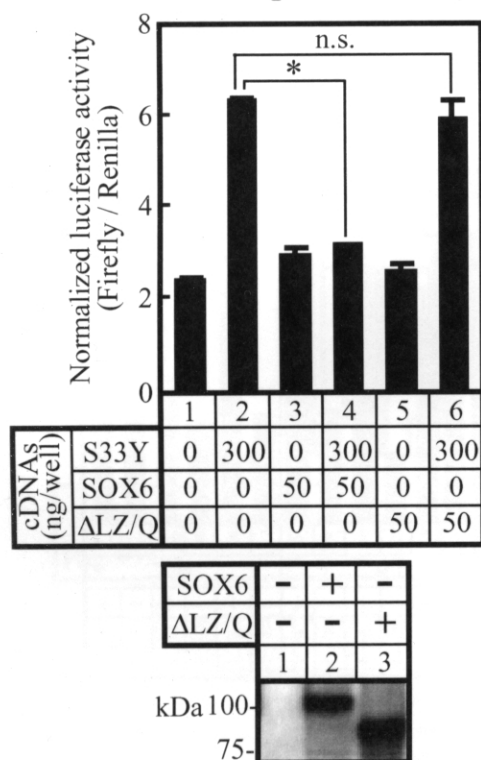
(B) GST融合β-カテニンと*in vitro*翻訳SOX6及びその変異体の結合

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。

A. Luciferase Reporter Assay



B. Immunoprecipitation

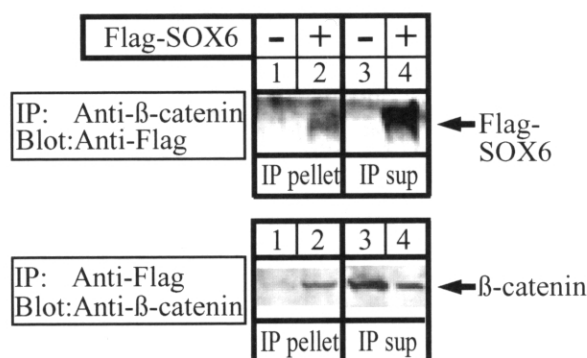


図29 SOX6とβ-カテニンの機能的相互作用

(A) 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 (S33Y)、pCMV-SOX6、pCMV-SOX6 (ΔLZ/Q)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。形質導入から20時間後の細胞を用いて、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。n. s. は有意差が無いことを示す。

(B) β-カテニンとFLAG融合SOX6の免疫沈降。HEK293細胞 (5×10⁵個/T-25フラスコ) に、1 μgのpCMV-FLAG-SOX6又はpCMVプラスミドを形質導入した。2日後、細胞を回収し、抗β-カテニン抗体若しくは、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FLAG抗体 (上図) 又は、抗β-カテニン抗体 (下図) でイムノブロット解析を行った。

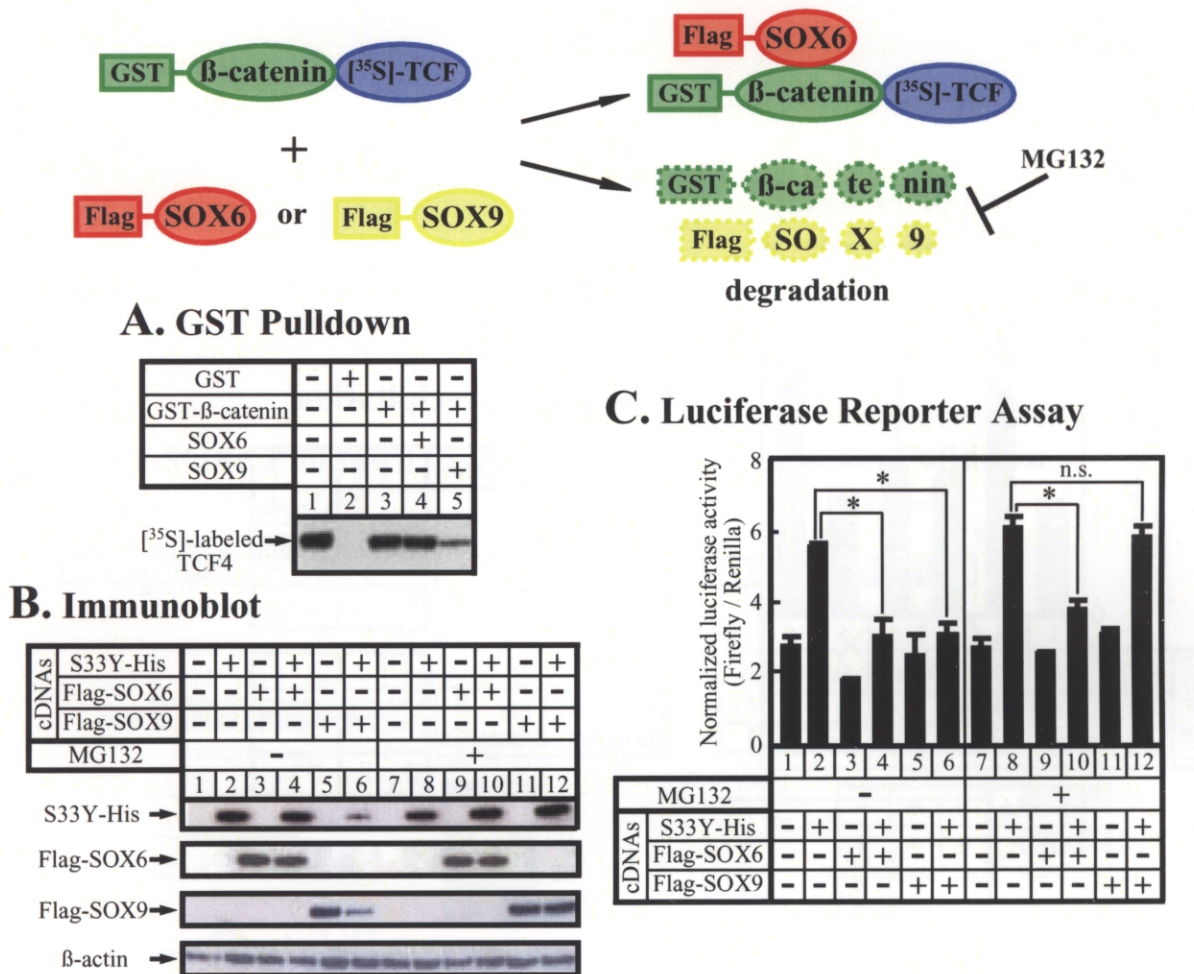


図30 SOX6とSOX9のβ-カテニン転写活性抑制機構の違い

SOX6とSOX9のβ-カテニン転写活性抑制機構を模式的に示す。SOX6はβ-カテニンと安定的に複合体を形成するが、SOX9はβ-カテニンの分解を促進する。

(A) SOX9によるβ-カテニン/TCF4複合体形成の阻害。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TCF4を大腸菌発現ヒスチジン融合SOX6 (レーン4)、又は大腸菌発現ヒスチジン融合SOX9 (レーン5) 存在下で、室温、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TCF4と5%のinput (レーン1) をSDS-PAGEで展開し、FUJIX BAS2000 (富士フィルム) で解析した。

(BとC) 0.2 μgのpCMV-β-catenin (S33Y) と0.2 μgのpCMV-FLAG-SOX6又はpCMV-FLAG-SOX9を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0.05 μgのpRL-TKと共にHEK293細胞に形質導入した。形質導入後、0.3 μMのMG132 (プロテオソーム阻害剤) 処理又は0.1%DMSO処理を行った。16時間後、細胞を回収し、抗ヒスチジン抗体又は抗FLAG抗体でイムノプロット解析 (B) とルシフェラーゼ活性測定 (C) を行った。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。

n. s. は有意差が無いことを示す。

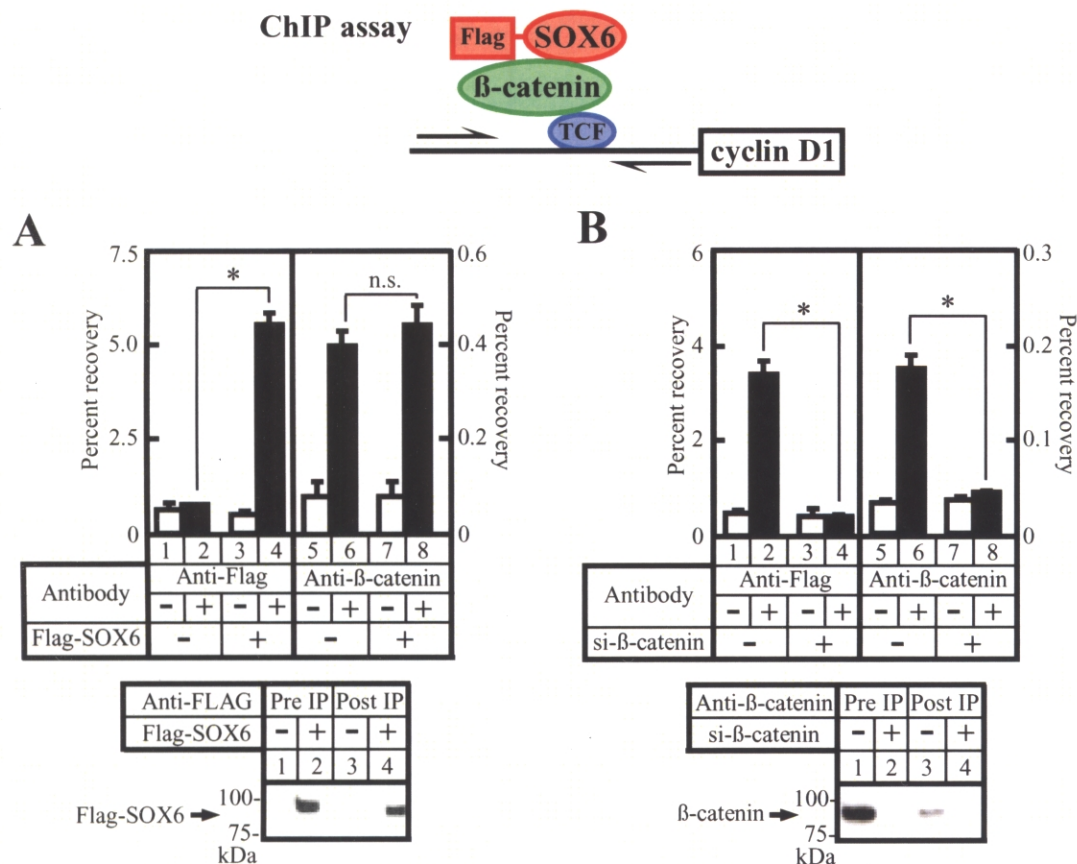


図31 サイクリンD1プロモーター上のSOX6とβ-カテニンの相互作用
 サイクリンD1プロモーター上のSOX6/β-カテニン/TCF複合体の模式図
 (A) 5 μgのpCMV-FLAG-SOX6又はpCMVベクターを形質導入したHEK293細胞の抗FLAG抗体(左カラム)又は抗β-カテニン抗体(右カラム)を用いたChIP解析結果(上図)。下図は免疫沈降前の細胞抽出液(*Pre IP*)と免疫沈降物(*Post IP*)の抗FLAG抗体によるイムノブロット解析結果を示す。
 (B) β-カテニンに対するsiRNA (si-β-catenin +) 又はコントロールsiRNA (-) を形質導入したFLAG-SOX6発現HEK293細胞の抗FLAG抗体(左カラム)又は抗β-カテニン抗体(右カラム)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β-カテニン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。n. s. は有意差無しを示す。