Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBPβ in pancreatic β cells

Takai, Tomoko

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2018-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7243号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007243

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBPβ in pancreatic β cells

カゼインキナーゼ 2 は膵 β 細胞で C/EBPβ をリン酸化する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌内科学
（指導教員：小川渉教授（教授）

高井智子

＜目的＞

2 型糖尿病の進展において、小胞体ストレスによる膵 β 細胞のアポトーシスは重要である。膵 β 細胞は、インスリン合成のため発達した小胞体を持つが、肥満に伴うインスリン抵抗性や高血糖に対応するためインスリン合成が増大し、正常に立体構造がつくられなかったタンパク(unfolded protein)は蓄積し、小胞体ストレスが増大することで、膵 β 細胞量はアポトーシスにより減少する。

私たちの研究室では CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family に属す転写因子である C/EBPβ に注目している。C/EBPβ は小胞体ストレスによって誘導され、膵 β 細胞に蓄積し、分子シャペロンである GRP78 の誘導を抑制しさらに小胞体ストレスを悪化させ膵 β 細胞を減少させることを明らかにした。また、2 型糖尿病のモデルマウスである db/db マウス、小胞体ストレスによる糖尿病のモデルマウスである Akita マウスの膵 β 細胞でも C/EBPβ の発現は亢進している。膵細胞特異的 C/EBPβ トランスジェニックマウスでは、C/EBPβ の発現量依存性に膵 β 細胞量は減少した。このため C/EBPβ を減少させることが 2 型糖尿病の治療につながると考えている。膵 β 細胞では、小胞体ストレス、酸化ストレスなどにより、AMPK 活性は低下していることが報告されているが、私たちは C/EBPβ 発現量は AMPK 活性と負に制御されていることを明らかにした。AMPK の活性を改善することで、C/EBPβ の蓄積は減少し、耐糖能が改善することも過去に示した。

C/EBPβ は以前にリン酸化により安定性が増すという報告がある。また、転写因子はリン酸化により活性が調節されているという報告があり、今回私たちは、2 型糖尿病の病態に重要であると考えられる小胞体ストレス下、AMPK 抑制下での C/EBPβ の新規リン酸化部位、その上流キナーゼについて検索した。

<方法>

マウス膵 β 細胞株である Min6 細胞に C/EBPβ を発現させ、質量解析を用いて C/EBPβ リン酸化部位の検索を行った。その部分アラニン置換体を作成し、安定性を検討した。また、大腸菌で GST-C/EBPβ を作成し、in vitro での上流キナーゼ検索を行った。

<結果>

Min6 細胞に HA-C/EBPβ と Dominant Negative 型 AMPK(DN-AMPK)を発現させ、質量解析により、リン酸化部位を検索した。その結果、AMPK 抑制下では C/EBPβ の 222 番目のセリン(S222)がマススペクトルピーク比で約 10 倍リン酸化していた。次に、S222 をアラニンに置換した変異体 S222A-C/EBPβ を作成し、AMPK 抑制化での安定性を比較した。野生型 C/EBPβ は AMPK 抑制下で発現量が増加するが、S222A-C/EBPβ では増加しなかった。また、Min6 細胞に、野生型 C/EBPβ, S222A-C/EBPβ を発現させ、シクロヘキサミド処理し、タンパクの安定性を比較したところ、S222A -C/EBPβ は減少しやすく、HEK293 細胞に発現させたものでは、ユビキチン化も亢進した。以上のことから、S222 のリン酸化は C/EBPβ が安定して発現する上で重要であると考えられた。

次に、小胞体ストレス下で検討した。野生型 C/EBPβ はタプシガルジンによる小胞体ストレス負荷により発現量は増加するが、S222A では増加しなかった。以上のことから、小胞体ストレス下でも、S222 のリン酸化は安定性に重要であると考えられた。

C/EBPβ は、ロイシンジッパーという特徴的な DNA 結合領域を持っている。小胞体ストレスにより誘導される転写因子である CHOP や ATF4 などもこの構造をもち、bZip protein と呼ばれる。CK2 はロイシンジッパーに結合し、これらをリン酸化するという報告がある。また、S222 周囲のアミノ酸配列より CK2 が S222 の直接のキナーゼであることが考えられた。

次に Min6 細胞内での C/EBPβ と CK2 の局在を免疫染色にて検討した。CK2 はキナーゼ活性を持つ CK2α と活性調節を行う CK2β が 2 個ずつ結合した、4 量体で構成されている。CK2α、CK2β とも Min6 細胞内では C/EBPβ と核で共局在した。また、HEK293 細胞に C/EBPβ、HA-CK2β を発現させ共免疫沈降を行ったところ、C/EBPβ と HA-CK2β は結合していた。

次に、in vitro での C/EBPβ と CK2 の反応を検討した。GST-C/EBPβ と CK2 を反応させたところ、GST-C/EBPβ と CK2α、CK2β は直接結合した。また、photag-gel にて、C/EBPβ は CK2 により直接リン酸化されることが示された。

＜考察＞

今回の論文では、C/EBPβ の蓄積に重要である DN-AMPK 下、小胞体ストレス下で C/EBPβ の新規リン酸化部位について検討した。その結果 S222 がリン酸化部位として同定され、S222A-C/EBPβ は安定性が低下した。また、CK2 は C/EBPβ を直接リン酸化することを示した。CK2 はこれまでに小胞体ストレスシグナルに作用する報告が多数あり、アポトーシスを防ぐ効果を持つ。CHOP や ATF4 をリン酸化し転写活性を抑制することや、XBP-1 の splicing を促進しシャペロンを増加させることが報告されている。以上のことより、CK2 の活性の制御は、2 型糖尿病における C/EBPβ の蓄積、膵 β 細胞量減の病態において、重要な役割を持つことが予想される。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2788 号	氏 名	高井 智子
論文題目 Title of Dissertation	Casein kinase 2 phosphorylates and stabilizes C/EBPβ in pancreatic β cells カゼインキナーゼ 2 は膵 β 細胞で C/EBPβ をリン酸化する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 石田 達郎 副 査 Vice-examiner 飯島 一誠 副 査 Vice-examiner 鈴木 聡		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【目的】

2 型糖尿病では、小胞体ストレスによる膵 β 細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしている。膵 β 細胞では、肥満に伴うインスリン抵抗性や高血糖に対応するためインスリン合成が増大し、正常に立体構造がつくられなかったタンパク(unfolded protein)が蓄積し、小胞体ストレスが増大することにより膵 β 細胞はアポトーシスに陥る。

著者らは、過去に CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family に属す転写因子である C/EBP β の発現量が AMPK 活性により負に制御され、AMPK の活性を改善することで C/EBP β の蓄積は減少し耐糖能が改善することを明らかにした。これらの事実に基づいて、C/EBP β を減少させることが 2 型糖尿病の治療につながるという仮説をたてた。

C/EBP β はリン酸化により安定性が増すと報告されていることから、本論文では、2 型糖尿病の病態に重要であると考えられる小胞体ストレス下、AMPK 抑制下での C/EBP β の新規リン酸化部位、その上流キナーゼについて検索した。

【方法】

マウス膵 β 細胞株である Min6 細胞に C/EBP β を発現させ、質量解析を用いて C/EBP β リン酸化部位の検索を行った。その部分アラニン置換体を作成し、安定性を検討した。また、大腸菌で GST-C/EBP β を作成し、in vitro での上流キナーゼを検索した。

【結果】

Min6 細胞に HA-C/EBP β と Dominant Negative 型 AMPK を発現させ、質量解析により、リン酸化部位を検索した。その結果、AMPK 抑制下では C/EBP β の 222 番目のセリン(S222)がマススペクトルピーク比で約 10 倍リン酸化していた。次に、S222 をアラニンに置換した変異体 S222A-C/EBP β を作成し、AMPK 抑制下での安定性を比較した。野生型 C/EBP β は AMPK 抑制下で発現量が増加するが、S222A-C/EBP β では増加しなかった。また、Min6 細胞に、野生型 C/EBP β, S222A-C/EBP β を発現させ、シクロヘキサミド処理し、タンパクの安定性を比較したところ、S222A -C/EBP β は減少しやすく、HEK293 細胞に発現させたものでは、ユビキチン化も亢進した。以上のことから、S222 のリン酸化は C/EBP β が安定して発現する上で重要であると考えられた。

野生型 C/EBPβ はタプシガルジンによる小胞体ストレス負荷により発現量は増加するが、S222A では増加しなかった。以上のことから、小胞体ストレス下でも S222 のリン酸化は安定性に重要であると考えられた。

C/EBPβ は、DNA 結合領域であるロイシンジッパー構造を持っている。小胞体ストレスにより誘導される転写因子である CHOP や ATF4 などもこの構造をもち、bZip protein と呼ばれる。Casein kinase 2(CK2)はロイシンジッパーに結合し、これらをリン酸化するという報告がある。以上より、S222 周囲のアミノ酸配列より CK2 が S222 の直接のキナーゼであることが示された。

Min6 細胞内での C/EBPβ と CK2 の局在を免疫染色にて検討した。CK2 はキナーゼ活性を持つ CK2α と活性調節を行う CK2β が 2 個ずつ結合した、4 量体で構成されている。CK2α、CK2β ともMin6 細胞内では C/EBPβ と核で共局在した。また、HEK293 細胞に C/EBPβ、HA-CK2β を発現させ共免疫沈降を行ったところ、C/EBPβ と HA-CK2β は結合していた。

次に、in vitro での C/EBPβ と CK2 の反応を検討した。GST-C/EBPβ と CK2 を反応させたところ、GST-C/EBPβ と CK2α、CK2β は直接結合した。また、photag-gel にて、C/EBPβ は CK2 により直接リン酸化されることが明らかとなった。

【結論】

C/EBPβ の蓄積に重要である AMPK 抑制下、小胞体ストレス下では、C/EBPβ の S222 が新規リン酸化部位として同定され、CK2 が C/EBPβ を直接リン酸化することが証明された。

これまでに多くの研究において、CK2 が小胞体ストレスシグナルに関与すると報告されているが、本論文の知見により、CK2 が C/EBPβ を直接リン酸化することが証明された。すなわち、CK2 の活性を制御することは、2 型糖尿病における C/EBPβ の蓄積、膵 β 細胞量減少において重要な役割を持つことが示唆され、糖尿病の進行に関わる膵 β 細胞量の減少の機序を示したという意味で本研究は意義深いものである。したがって、本研究者は、博士（医学）を得る資格があると認める。