

## プロリン異性化酵素 Pin1 を介した塩分感受性キナーゼ活性と 尿管細管塩分再吸収の制御機構解明

浅野 知一郎

広島大学大学院医歯薬保健学研究院

**概要 [背景]** 塩分感受性キナーゼ(SIK)は、高塩分食によって発現が増加するキナーゼであるが、その活性制御については未だ、十分な解明がなされていない。尿管細管においては、SIK が、PP2A を介して Na,K-ATPase の脱リン酸化を誘導する機序が知られている。また、 $\beta$  細胞においては、SIK はインスリン分泌の制御に関与している。本研究では、プロリン異性化酵素 Pin1 が SIK に結合することを見出し、それによる制御について検討した。また、尿管細管における役割は現在、解明中であり、本報告書では  $\beta$  細胞における機能について述べる。

**[方法]** 我々は、Pin1 と結合するタンパクを網羅的に探索する中で、SIK を見出した。SIK と Pin1 の結合は、293 細胞における過剰発現の系のほか、MIN6 細胞等を用いて内因性の結合を検討した。また、Pin1 が結合することによる SIK の活性への影響に関しては、培養細胞の他、*in vitro* の系でも検討した。さらに、 $\beta$  細胞特異的 Pin1 KO ( $\beta$ Pin1 KO) マウスを複製し、SIK を介したインスリン分泌への影響についても解明した。

**[結果]** 糖負荷試験を行ったところ、 $\beta$  細胞特異的 Pin1 KO ( $\beta$ Pin1 KO) マウスは耐糖能異常を示し、インスリン分泌量もコントロールマウスと比較して低値であることが判明した。さらに、単離膵島を調整し、グルコースや KCl 刺激を行ったところ、Pin1 欠損によりインスリン分泌量は低下した。SIK2 は p35 をリン酸化することで分解を促進し、結果的にカルシウム流入・インスリン分泌を促進することが報告されている。そこで、カルシウム流入量を測定したところ、Pin1 欠損によりカルシウム流入は低下した。

**[結論]** Pin1 は SIK に結合することで、キナーゼ活性を上昇させ、カルシウム流入を促進することでインスリン分泌を亢進させることが明らかになった。

### 1. 研究目的

近年、わが国を含めた世界中で、メタボリックシンドロームの患者数の増加が大きな問題となっている。糖・脂質代謝異常患者の増加に加え、世界保健機関(WHO)の調査によると2008年に25歳以上の3人に1人が高血圧である深刻な状況が推測されている。高血圧の大半は本態性であるが、日本人の高血圧には過剰の塩分摂取が関与しているケースが多いとされる。体内の塩分量は、食事からの摂取量と腎からの排泄量によって概ね規定されている。興味深いことに、マウスに高塩分食を負荷すると、塩分感受性キナーゼ(SIK)の発現量が上昇することが知られている。尿管細管では、SIK は PP2A を介して Na,K-ATPase

の脱リン酸化を誘導する機序が知られている。それに加え、SIK1はCRTCをリン酸化し、CRTCの細胞内分布の変化を介して、Na,K-ATPaseの発現量を規定する $\beta$ サブユニット遺伝子(*atp1b1*)の転写調節にも関わっている。すなわち、SIKはNa,K-ATPaseの活性と発現量の両面から、尿管細管からの塩分再吸収調節の鍵となる役割を果たしている。

一方、メタボリックシンドロームでは、インスリン分泌の亢進もその病態の成立に関与している。 $\beta$ 細胞では、SIKはp35をリン酸化することで分解を促進し、結果的にカルシウム流入・インスリン分泌を促進することが報告されている。そこで、本研究課題では、SIKの制御にPin1がどのような役割を果たしているかについて、まず検討を進めた。さらに、

その SIK 活性の制御によって、腎尿細管や  $\beta$  細胞が受ける機能変化について検討を進めた。腎尿細管については実験が進行中であるので、本原稿では  $\beta$  細胞における役割について述べる。

## 2. 研究方法

### 2.1 膵 $\beta$ 細胞特異的 Pin1 KO マウス ( $\beta$ Pin1 KO マウス) の作成

我々は、Pin1 flox マウスを既に作成していたが、膵  $\beta$  細胞特異的に Pin1 遺伝子を欠失させるために、インスリンプロモーター下に Cre を含んだマウス (MIP-Cre) を理化学研究所から得て、交配を行った。一方、Pin1 flox マウスはコントロールとして用いた。

### 2.2 プラスミドの作成と遺伝子発現

ヒト Pin1 cDNA は S-tag を取り付けて、SIK2 の cDNA には FLAG tag を取り付けて、それぞれ、pcDNA3.1 vector に挿入した。SIK2 のキナーゼ活性測定用に、GST-p35 を作成し、大腸菌で過剰発現した後、グルタチオンビーズで精製した。

### 2.3 細胞培養

293 細胞は 10% FCS を含む DMEM 中で、一方、MIN6 細胞は 15% FCS を含む DMEM 中で培養を行った。これらの細胞は、上記のプラスミドによるタンパクの過剰発現の他、Pin1 shRNA とそのコントロールである LacZ shRNA を含むアデノウイルスを感染させる実験にも用いた。

### 2.4 免疫染色

マウスの膵臓の切片をパラフィンで包埋した後、200  $\mu$ m の薄さで切り出して用いた。これらを、抗グルカゴン、抗インスリン抗体で染色し、 $\alpha$  細胞と  $\beta$  細胞の判別に用いた。また、細胞増殖は抗 Ki67 抗体による染色、アポトーシスの細胞量は TUNEL 染色を行って判定を行った。

### 2.5 Western blotting 及び免疫沈降

細胞あるいはマウスの臓器から抽出されたタンパクを SDS-PAGE した後、PVDF 膜に転写を行った。3% BSA でブロッキングを行った後に、各種の抗体と incubate を行った。PBS で結合していない抗体を除去した後に、ECL を用いて蛍光発光による検出を行った。免疫沈降には、細胞を、triton を含む buffer で可溶化した後に、各種の抗体と incubate し、Protein G beads によって沈降させた。

### 2.6 インスリンアッセイ

$\beta$ Pin1 KO マウス及び、コントロールの Pin1 flox マウスから、膵島を分離し、RPMI1640 培地で一晚、培養した。その後、3 mM あるいは 20 mM グルコースを含む HKR buffer で 30 分、incubate し、培養液を採取した。培養液中に含まれるインスリン量は、Elisa kit によって測定した。

### 2.7 SIK2 のキナーゼ活性測定

FLAG tag を取り付けた SIK2 を単独で、あるいは、S-tag を取り付けた Pin1 と共に、293T 細胞に発現させた。その後、細胞を可溶化し、抗 FLAG tag 抗体を取り付けたビーズで精製し、GST-p35 タンパクと ATP と共に、混合した。15 分後に、DB buffer を加えて反応を停止させた後、SDS-PAGE から抗リン酸化 p35 抗体による Western blotting を行うことで、SIK2 のキナーゼ活性を測定した。

## 3. 研究結果

### 3.1 膵ランゲルハンス島内の Pin1 量とインスリン分泌能

8 週齢のマウスに 60% 高脂肪食を 20 週間投与した後、膵ランゲルハンス島を分離し、Pin1 タンパク量を検討したところ、約 3 倍の増加が認められた (**Fig. 1A**)。また、レプチン遺伝子異常による肥満を呈する ob/ob マウスについても、正常マウスと比較したところ、Pin1 タンパク量は 2.7 倍に増加していることが示された (**Fig. 1B**)。次に、 $\beta$  細胞における Pin1 の役割を解明するために、 $\beta$ Pin1 KO マウス及び、コントロールの Pin1 flox マウスを用いての検討を行った。まず、Cre 自体が、インスリン分泌や  $\beta$  細胞量に影響しないことを確認するために、C57BL/6J マウスと Pin1 flox マウスの間で耐糖能やインスリン反応性に差が無いことを示した (**Fig. 1C, D**)。さらに、 $\beta$  細胞量やグルコース反応性のインスリン量にも、C57BL/6J マウスと Pin1 flox マウスの間では差を認めなかった (**Fig. 1E, F**)。これらの結果は、Cre 自体は、膵  $\beta$  細胞に影響を与えないことを示している。

まず、我々は、 $\beta$ Pin1 KO マウスにおいて、Pin1 の欠失が膵ランゲルハンス島に特異的であり、他の臓器では Pin1 発現量に差が生じていないことを確認した (**Fig. 2A, B**)。また、膵ランゲルハンス島内では、Pin1 の欠失している細胞は、抗インスリン抗体で染色される細胞に限られており、抗グルカゴン抗体で陽性に染色される  $\alpha$  細胞には Pin1 の発現が認められた (**Fig. 2C, D**)。

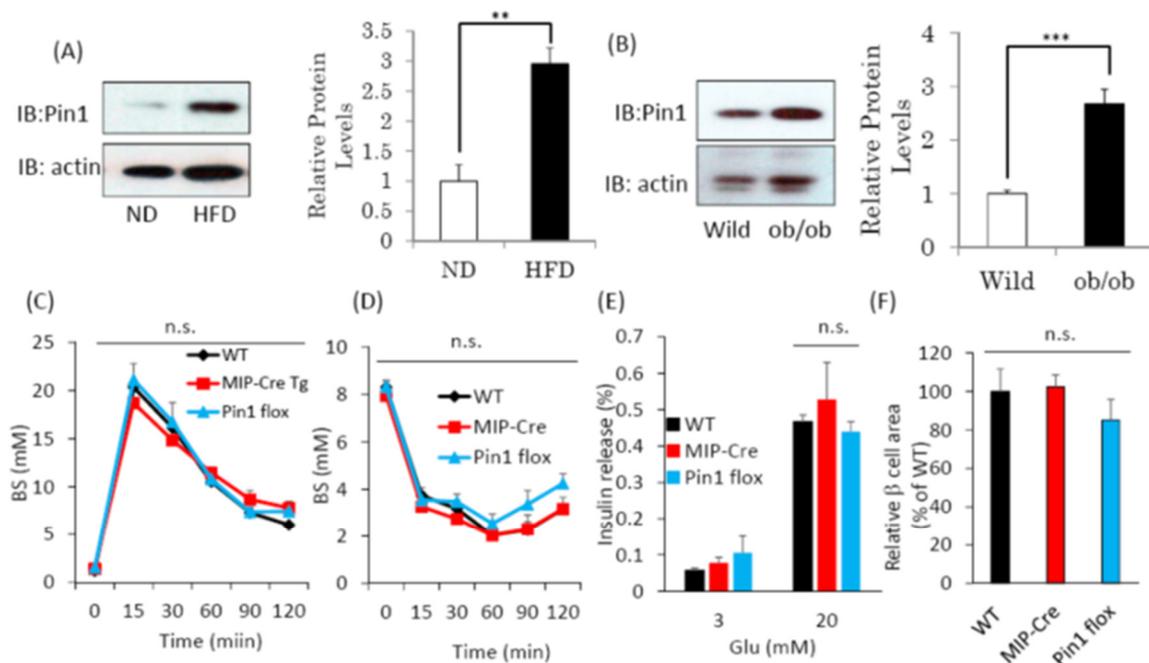


Fig.1 Pin1の発現量は肥満マウスの膵β細胞で増えている。(A) 20週間の普通食あるいは高脂肪食負荷後の膵ランゲルハンス島のPin1量、(B)肥満モデルob/obマウスの膵ランゲルハンス島のPin1量。(C-F)Cre自体は、膵β細胞の機能や耐糖能には影響しない。

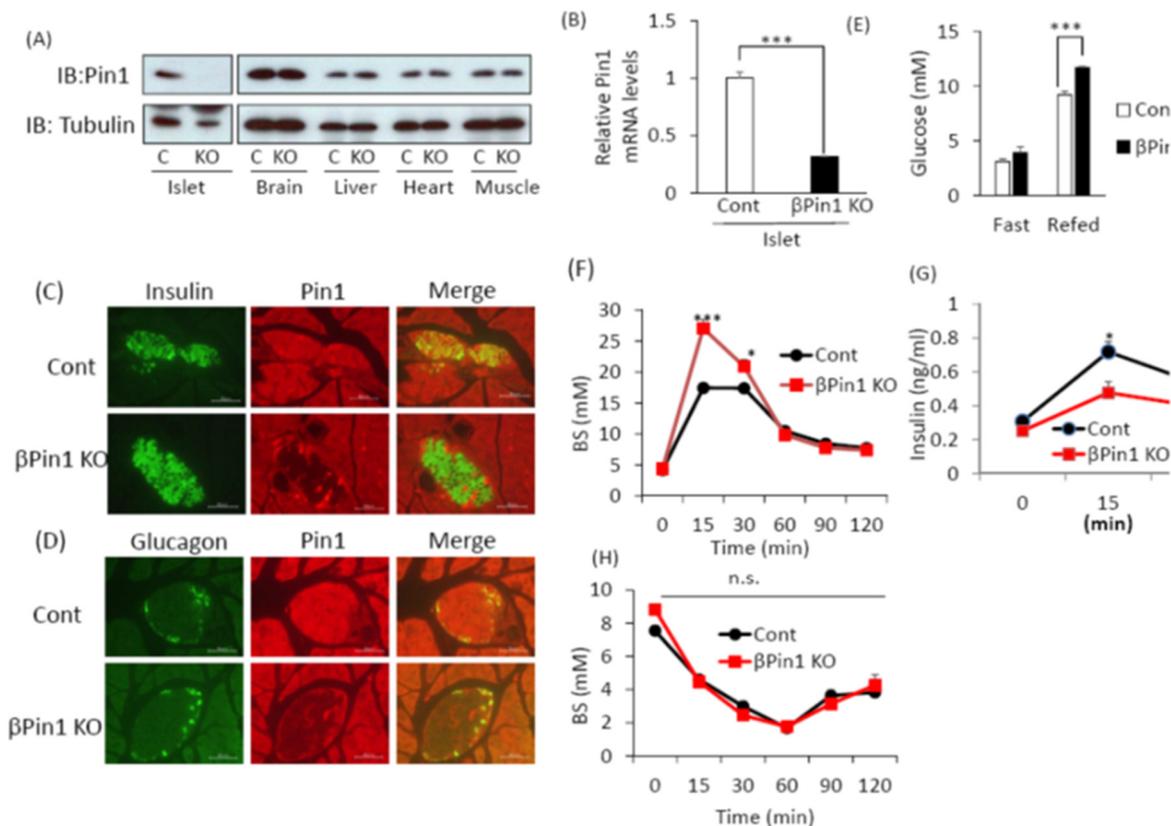


Fig.2 膵β細胞特異的Pin1欠損マウスはインスリン分泌障害から耐糖能異常を生じる。

βPin1 KO マウスとコントロールの Pin1 flox マウスでは、空腹時の血糖には差を認めないものの (Fig. 2E), グルコース負荷試験によって βPin1 KO マウスに耐糖能の低下が認められた (Fig. 2F)。また, グルコース負荷後, 15 分と 30 分後の血液中インスリン濃度が, βPin1 KO マウスでは低下していた (Fig. 2G)。このような耐糖能異常は, 高脂肪高シヨ糖食負荷を 14 週間投与することで, より顕著に認められた (Fig. 2I)。これに対し, インスリン感受性に関しては, 優位な差を認めなかった (Fig. 2H, J)。以上から, βPin1 KO マウスではグルコース依存性のインスリン分泌が低下しており, これによって耐糖能異常が生じていることが示された。

### 3. 2 βPin1 KO マウスでは β 細胞量の減少が認められる

βPin1 KO マウスにおけるインスリン分泌能の低下の原因を調べるために, まず, 膵内の β 細胞の量を調べたところ, βPin1 KO マウスでは β 細胞が占めるスペースが少ないことが判明した (Fig. 3A, B)。ただし, タンパク量あたりのインスリン含量には有意差が無かった (Fig. 3C)。この β

細胞量の差が, 細胞増殖かアポトーシスのどちらの要因に起因するかを調べるために, 抗 Ki67 抗体での染色と TUNEL 染色を行った。抗 Ki67 抗体陽性細胞は, βPin1 KO マウスの膵で減少しており (Fig. 3D), 一方, TUNEL 染色では差を認めなかった (Fig. 3E)。従って, βPin1 KO マウスでは β 細胞の増殖が低下していることが示唆された。また, Ins1, PDX1, GLUT2 や Neuro D などの β 細胞への分化や成熟に関与するとされる mRNA の発現量には変化が無かった (Fig. 3F)。以上から, βPin1 KO マウスでは, β 細胞の増殖能が低下しており, この結果と合致するように, CyclinD1 のタンパク量が約 50%に減少していた (Fig. 3G)。

### 3. 3 Pin1 は高脂肪高シヨ糖食負荷による β 細胞の過形成に必須である

インスリン抵抗性が生じると, 代償的に β 細胞の増殖が誘導されることはよく知られている。そこで, βPin1 KO マウスとコントロールの Pin1 flox マウスに, インスリン抵抗性を惹起させるために, 20 週間の高脂肪高シヨ糖食負荷を行った後に, β 細胞量と, ラングルハンス島内で β 細胞が占

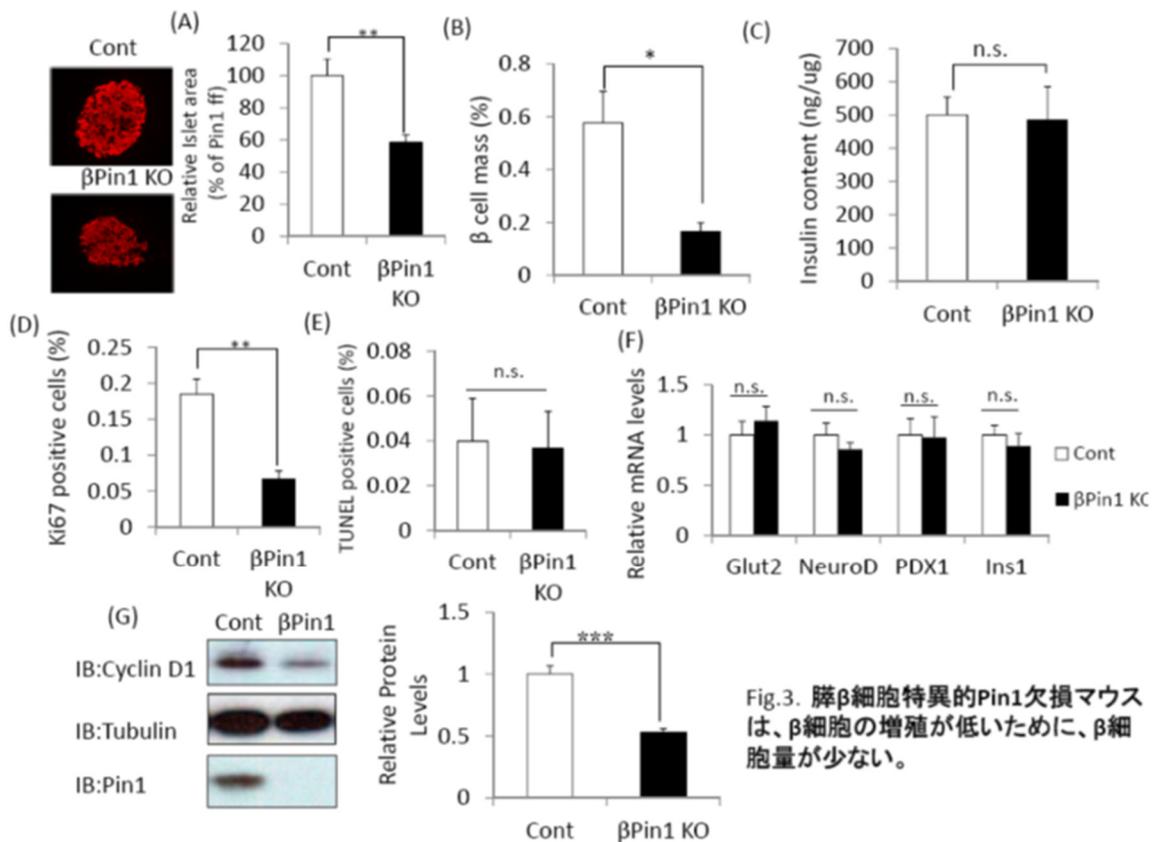


Fig.3. 膵β細胞特異的Pin1欠損マウスは, β細胞の増殖が低いために, β細胞量が少ない。

めている割合を測定した。すると、 $\beta$ Pin1 KO マウスでは  $\beta$  細胞の過形成が抑制されていることが示された (Fig. 4A, B)。また、この原因は、増殖の低下によるもので (Fig. 4C)、アポトーシスの変化によるものではなかった (Fig. 4D)。

### 3. 4 Pin1 はグルコース反応性のインスリン分泌にも重要である

$\beta$  細胞量の変化に加えて、インスリン分泌自体への影響

についても検討を行った。まず、単離したランゲルハンス島に対して、グルコースあるいは KCl による刺激を行ったところ、 $\beta$ Pin1 KO マウスでは、総インスリン含有量に比べて分泌されたインスリン量が低下していることが示された (Fig. 5A, B)。従って、 $\beta$  細胞の増殖以外にも、インスリン分泌機構自体に Pin1 が関与していることが示唆された。高グルコース処理後の細胞内 ATP の増加には、 $\beta$ Pin1 KO マウスと

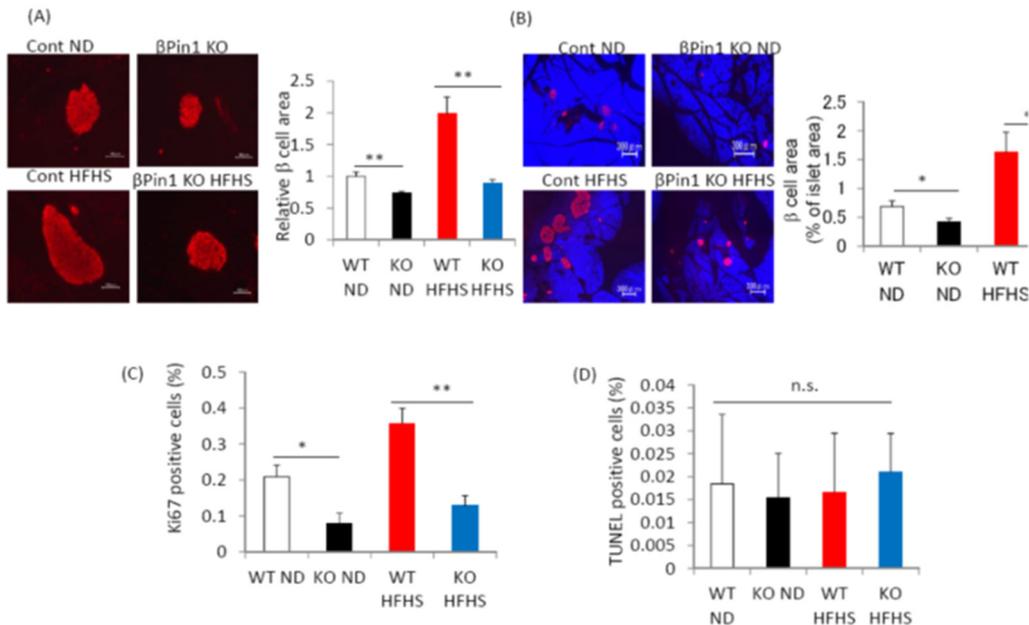


Fig.4 膵 $\beta$ 細胞におけるPin1はインスリン抵抗性状態時の、 $\beta$ 細胞サイズの増加に必須である。

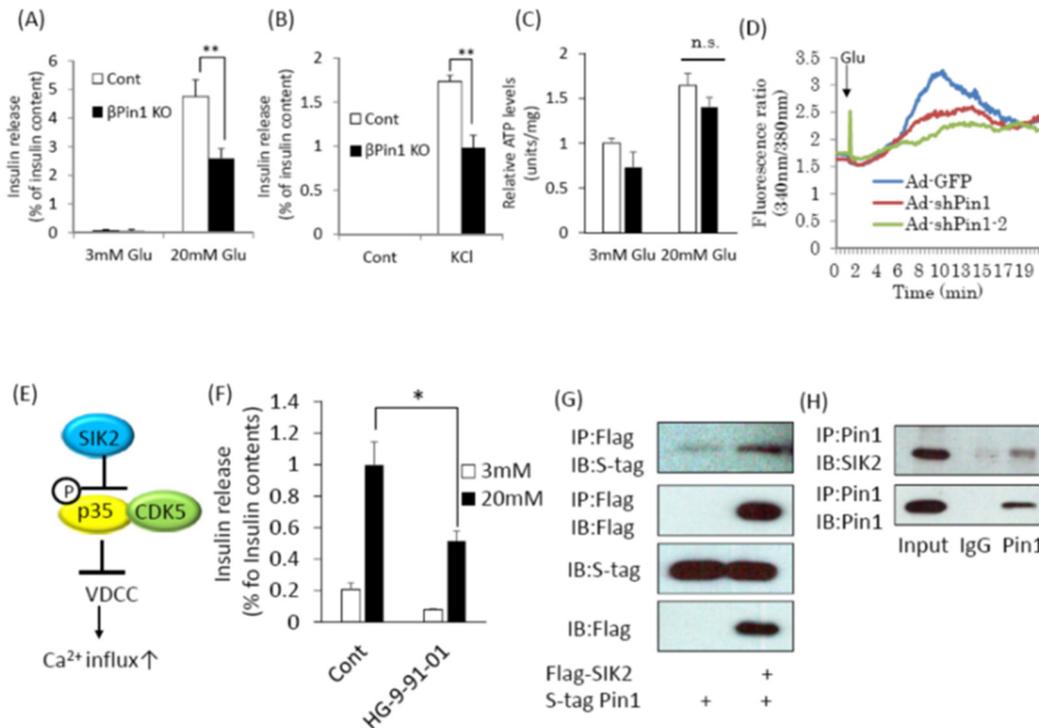


Fig.5 膵 $\beta$ 細胞におけるPin1は、SIK2を介してインスリン分泌の促進に関与する。

コントロールの Pin1 flox マウスには差がなかった (Fig. 5C)。一方, Min6 細胞の Pin1 を shRNA のアデノウイルスで発現を抑制すると, グルコース反応性の  $Ca^{++}$  上昇が抑制されることが判明した (Fig. 5D)。

### 3. 5 塩分感受性キナーゼ(SIK)2 が Pin1 と結合する

ATP 濃度の上昇から, 細胞内の  $Ca^{++}$  濃度の上昇を導くタンパクとして, SIK2 が知られている。SIK2 は p35 をリン酸化し, 分解を促進することで, CDK5 による voltage-dependent calcium channel (VDCC) を抑制することが知られている。実際, 単離ランゲルハンス島に SIK 阻害薬を処理すると, グルコース反応性のインスリン分泌の低下が認められる (Fig. 5E)。従って, 我々は, SIK2-CDK5-VDCC 経路への Pin1 の関与を考え, 各タンパクへの結合を検討したところ, Pin1 は SIK2 と結合することが判明した。この結合は, 過剰発現の系のみならず (Fig. 5F), Min6 細胞における内因性の結合も認められた (Fig. 5G)。結合部位としては, Pin1 内では, WW ドメインが関与しており (Fig. 6A), 一方, SIK2 内では S179 と T420 の 2 箇所モチーフを介していることが判明した (Fig. 6B, C)。

### 3. 6 塩分感受性キナーゼ(SIK)2 は Pin1 と結合すると活性され, p35 の分解から細胞内 $Ca^{++}$ の上昇をもたらす

SIK2 は p35 の S91 をリン酸化することが知られており, S91 がリン酸化されることでユビキチン化によって分解される。実際, S91 を Alanine に置換するとリン酸化されない (Fig. 7A)。in vitro の系で, SIK2 による p35 のリン酸化は, 同時に Pin1 を添加することで顕著に促進された (Fig. 7B)。次に, 293 細胞に p35 と Pin1 を同時に発現させると, p35 のタンパク量は顕著に減少した (Fig. 7C)。さらに, SIK2 によるリン酸化部位 S91 を Alanine に変異させた p35 を発現させた場合には, Pin1 による減少は認められなくなった (Fig. 7D)。また, Pin1 をノックダウンすると, p35 のタンパク量は増加した (Fig. 7E)。βPin1 KO マウスからのランゲルハンス島でも, p35 のタンパク量の増加が検出された (Fig. 7F)。最後に, CDK5 阻害薬の効果を検討したところ, 50 μM でインスリン分泌を抑制することが示された (Fig. 7G)。以上から, SIK2 の活性は, Pin1 が結合することで上昇し, p35 の分解促進から細胞内  $Ca^{++}$  の上昇を介して, インスリ

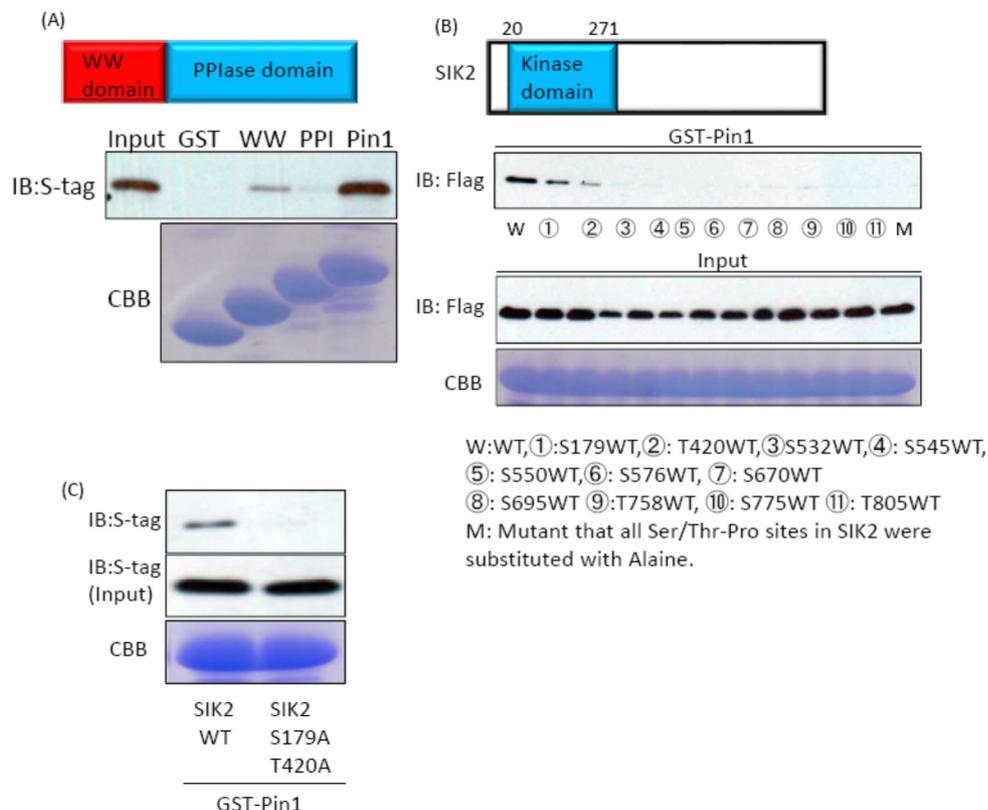


Fig.6 Pin1はWWドメインを、SIK2はS179とT420の2箇所結合する。

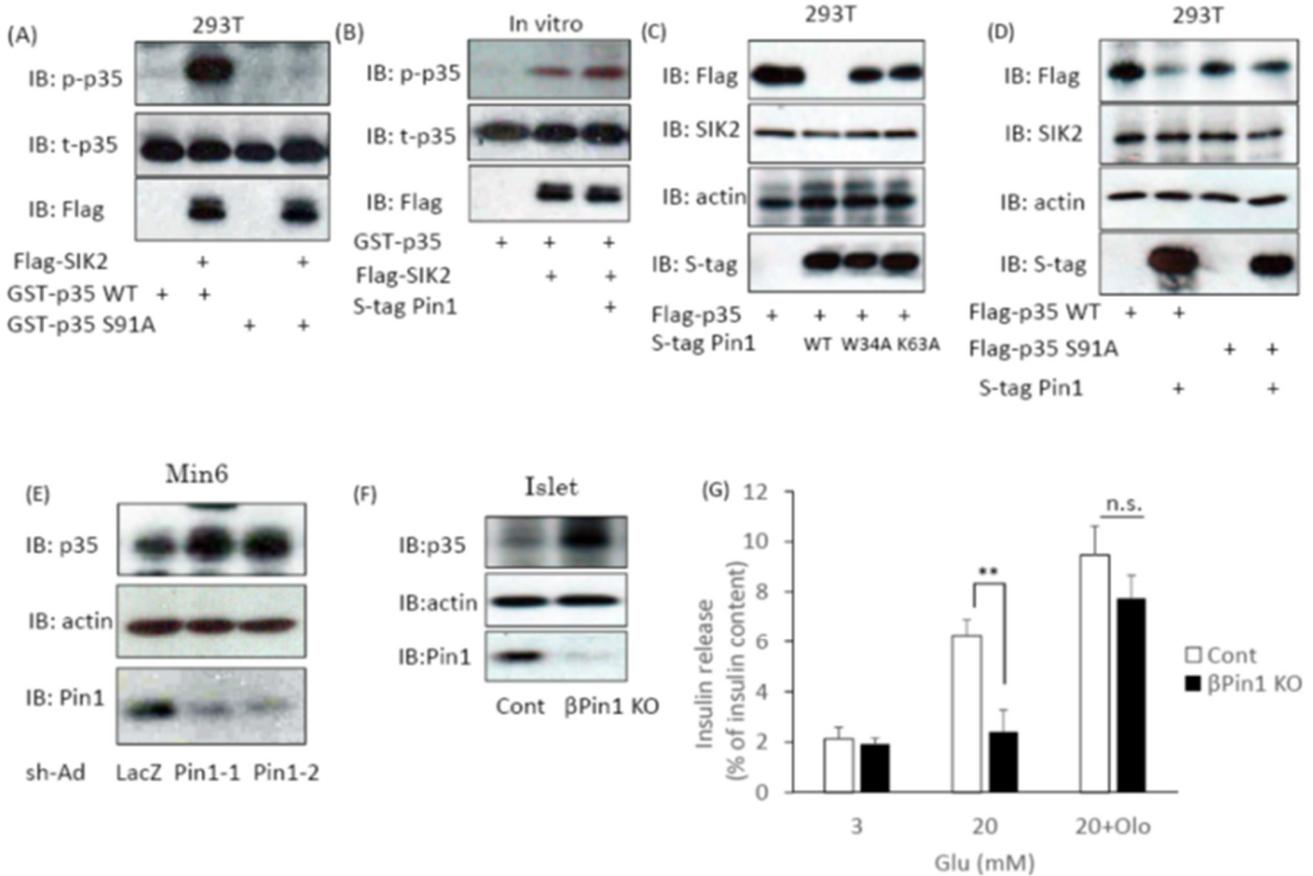


Fig.7 SIK2はPin1と結合することで活性化され、p35のリン酸化を誘導し、インスリン分泌を亢進させる。

ン分泌に関与していることが結論付けられた。

#### 4. 結論

プロリン異性化酵素 Pin1 は pSer/pThr-Pro を含む配列に結合し、プロリンのシス-トランス異性化を行うことにより、標的蛋白の機能を調節している。現在までに、我々は Pin1 が IRS-1 や AMPK に結合することで、糖・脂質代謝調節に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。しかしながら、膵 β 細胞における Pin1 の役割は未だ明らかにされていなかった。興味深いことに、2型糖尿病モデルマウスの膵島における Pin1 の発現量は有意に増加しており、βPin1 KO マウスでは、肥満時の代償的な β 細胞の肥大化が認められなかった。以上より、Pin1 は β 細胞の増殖とインスリン分泌の両方に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Fig. 8)。

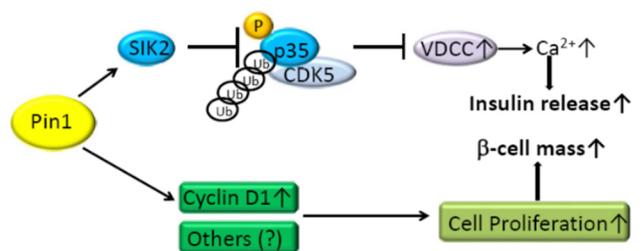


Fig.8 SIK2はPin1と結合することで、インスリン分泌を促進させる。

本研究では、インスリン分泌に重要な働きをしている塩分感受性キナーゼ SIK に Pin1 が結合することを新規に見出した。SIK は、インスリン分泌のみならず、腎尿細管における塩分再吸収にも重要な役割を果たしている。また、脂肪細胞の分化にも SIK が関与している。今回、β 細胞におけ

る塩分感受性キナーゼ SIK と Pin1 の関係を明らかにしたが、今後、尿細管における役割についても研究を進めている段階である。

#### 5. 掲載された論文

Journal of Biological Chemistry M117.780726. doi: 10.1074/jbc. M117. 780726

## The Prolyl Isomerase Pin1 Increases $\beta$ Cell Proliferation and Enhances Insulin Secretion

Tomoichiro Asano

Hiroshima University

### Summary

The prolyl isomerase Pin1 binds to the phosphorylated Ser/Thr-Pro motif of target proteins and enhances their cis-trans conversion. This report is the first to show that Pin1 expression in pancreatic  $\beta$  cells is markedly elevated by high-fat diet feeding and in ob/ob mice. To elucidate the role of Pin1 in pancreatic  $\beta$  cells, we generated  $\beta$  cell-specific Pin1 KO ( $\beta$ Pin1 KO) mice. These mutant mice showed exacerbation of glucose intolerance but had normal insulin sensitivity. We identified two independent factors underlying impaired insulin secretion in the  $\beta$ Pin1 KO mice. Pin1 enhanced pancreatic  $\beta$  cells proliferation, as indicated by a reduced  $\beta$ -cell mass in  $\beta$ Pin1 KO mice compared with control mice. Moreover, a diet high in fat and sucrose failed to increase pancreatic  $\beta$  cell growth in the  $\beta$ Pin1 KO mice, an observation to which up-regulation of the cell cycle protein cyclin D appeared to contribute. The other role of Pin1 was to activate the insulin secretory step. Pin1 KO  $\beta$  cells showed impairments in glucose- and KCl-induced elevation of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and insulin secretion. We also identified salt inducible kinase 2 (SIK2) as a Pin1-binding protein that affected the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and found Pin1 to enhance SIK2 kinase activity, resulting in a decrease in p35 protein, a negative regulator of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Taken together, our observations demonstrate critical roles of Pin1 in pancreatic  $\beta$  cells and that Pin1 both promotes  $\beta$  cell proliferation and activates insulin secretion.