

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 3 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590553

研究課題名（和文） インスリンシグナルによる小胞体ストレス応答の修飾機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of ER stress response by insulin signaling

研究代表者

稲毛田 清（INAGEDA KIYOSHI）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90281659

研究成果の概要（和文）：

小胞体ストレスにおけるインスリンの影響について検討した。インスリンは小胞体ストレスによる細胞死を抑制し、GRP78 の mRNA と蛋白質レベルを上昇させた。インスリンは PI-3 kinase/AKT 依存的に ATF4 蛋白質レベルを増加させた。インスリンによる ATF4 蛋白質レベルの増加は転写レベルでも、翻訳レベルでもなく、翻訳後レベルでの調節によるものであった。ATF4 ノックダウンによりインスリンによる GRP78 誘導は抑制された。これらの結果よりインスリンは ATF4 を正に調節して小胞体ストレスによる GRP78 誘導を修飾する機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The effect of insulin on endoplasmic reticulum (ER) stress was investigated. Insulin protected cell death induced by ER stress and increased glucose-regulated protein 78 (GRP78) mRNA and protein levels. Insulin also significantly increased activating transcription factor-4 (ATF4) protein level through PI-3 kinase/AKT pathway. The increase of ATF4 protein by insulin was not due to transcriptional or translational up-regulation but to a post-translational mechanism. Knockdown of ATF4 by siRNA significantly inhibited GRP78 induction by insulin. These results indicate that insulin modulated ER stress-induced GRP78 expression occurs via ATF4 up-regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 000
2011 年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
2012 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
年度			
年度			
総 計	3, 000, 000	900, 000	3, 900, 000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：インスリン、小胞体ストレス、GRP78/Bip、ATF4、アポトーシス、神経保護

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質に適切な高次構造を形成させ、その品質管理を行っている細胞内小器官である。細胞にストレスがかかると小胞体に構造異常タンパ

ク質が生じる。小胞体へのストレスに対して細胞には小胞体ストレス応答を備えている。この応答には、翻訳停止、分子シャペロン遺伝子の転写上昇、小胞体関連タンパク質分解の小胞体機能維持に重要な反応と過度のス

トレスを受けた場合におこるアポトーシスが知られている。

インスリンは糖代謝に関わるホルモンであり、その標的細胞においてインスリン抵抗性が生じると糖尿病を発症する。神経細胞は、インスリンによってグルコース取り込みに変化がなく、インスリン非感受性であると考えられてきた。しかし近年、脳にインスリンとその受容体が存在すること、インスリンは血液脳関門を通過しうることが報告されている。脳においてインスリンは、神経細胞生存、シナプス可塑性、学習や記憶など多様な生理作用を示すこともごく最近報告されてきている。

神経変性疾患の発症とインスリンについては、インスリン抵抗性がアルツハイマー発症の危険因子になるといった疫学研究もあり、インスリン抵抗性と神経変性疾患との関連性は興味深い。インスリンは神経細胞の小胞体ストレス応答を修飾して細胞生存するように作用するが、インスリン抵抗性が生じると神経変性が進む可能性が考えられる。

2. 研究の目的

小胞体に構造異常タンパク質が蓄積すると、その毒性を緩和するために小胞体ストレス応答がおこり、ストレスが持続するとアポトーシスを生じる。パーキンソン病やアルツハイマー病など神経変性疾患の病因として構造異常タンパク質の蓄積が考えられており、細胞死を誘発するメカニズムとして小胞体ストレス応答が注目されている。多くの小胞体ストレス応答に関する研究は、小胞膜に存在するカルシウムポンプを阻害するサブシガルジンや新生タンパク質への糖鎖付加を阻害するツニカマイシンなどの小胞体ストレス剤を用いて行われており、小胞体ストレス応答に関わる分子が同定されてきた。しかしホルモンなどによる受容体刺激による小胞体ストレス応答の調節という視点からの研究はほとんどない。予備的な研究によりドーパミン神経細胞のモデルとして用いられている SH-SY5Y 細胞において、サブシガルジンやツニカマイシン処理により誘発されるアポトーシスがインスリンにより抑制されること、小胞体ストレス応答の調節因子である GRP78 (glucose-regulated protein 78) がインスリン刺激によってさらに選択的に誘導されることを見出した。インスリンは選択的に GRP78 誘導を促進することで小胞体ストレス応答誘発アポトーシスを抑制する可能性が考えられ、本研究ではインスリンシグナルによる小胞体ストレス応答の修飾機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス剤による GRP78 遺伝

子発現誘導に対するインスリンシグナルの作用機序

哺乳類細胞での小胞体ストレス応答では、ATF6 (activating transcription factor 6) 経路、IRE1 (high inositol-requiring 1) - XBP1 (X-box binding protein) 経路、PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase) - ATF4 (activating transcription factor) 経路が活性化される。GRP78 mRNA は小胞体ストレスにより発現誘導されるが、インスリンシグナルがあるとさらに GRP78 mRNA は増大した。この GRP78 遺伝子発現誘導に対するインスリンシグナルの作用機序を明らかにするために、ヒト神経細胞芽腫 SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。

① 小胞体ストレスにより誘導される遺伝子の mRNA レベル

SH-SY5Y 細胞を小胞体ストレス剤であるサブシガルジンとツニカマイシンを単独、あるいはインスリンと共に暴露し、全 RNA を逆転写して、PCR あるいは real-time PCR で mRNA レベルを測定した。

② 小胞体ストレスにより誘導される遺伝子の蛋白質レベル

SH-SY5Y 細胞を曝露後、Laemmli buffer で可溶化して超音波処理で DNA を断片化した。蛋白質量をそろえて SDS-PAGE を行い、分離された蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜をブロッキング後、特異的的一次抗体を反応させ、洗浄後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を反応させて、化学発光により目的のバンドを検出して定量化した。

③ GRP78 遺伝子のプロモーター活性

SH-SY5Y 細胞の genome DNA を材料にして、GRP78 遺伝子の転写開始点から上流約 3 kb と 132 bp の DNA 断片を PCR で得た。この DNA 断片をレポータープラスミドに組み込んだ。Lipofectamine2000 を用いて、レポータープラスミドとリファレンスプラスミドを細胞に導入した。レポーター活性はデュアルルシフェラーゼアッセイキットを用いて測定した。また、ノックダウンは siRNA を細胞に導入して行った。

④ ATF4 と AKT キナーゼ発現ベクターの構築

ATF4 と AKT キナーゼ cDNA を SH-SY5Y 細胞から RT-PCR で単離し、pcDNA3.1 ベクターに組み込んだ。GFP-ATF4 融合遺伝子は ATF4 の N 末端側に GFP cDNA を挿入した。構成的活性型 AKT キナーゼは N 末端側にミリスチル化付加配列を挿入して作製した。ドミナントネガティブ AKT キナーゼは 179 番目のリジンをメチオニンに置換して作製した。

(2) 小胞体ストレス誘発アポトーシスの測定

アポトーシスの指標として PARP の切断をウ

エスタンプロットで検出した。また caspase 3 の酵素活性を蛍光基質を用いて測定した。

(3) ATF4 mRNA の翻訳効率の測定

ATF4 mRNA 上の開始コドン上流には読み枠の異なる複数の開始コドンがあり、非ストレス下では ATF4 の読み枠はほとんど翻訳されない。しかし全般的に蛋白質の翻訳が停止がおこるストレス下においては ATF4 の読み枠が翻訳されるようになる。ATF4 mRNA 上の開始コドン上流領域に対応する DNA 領域を SH-SY5Y 細胞から PCR にて得て、レポータープラスミドに組み込んだ。レポーター活性で ATF4 mRNA の翻訳効率を評価した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスによる GRP78 遺伝子の発現誘導に対するインスリンの効果
SH-SY5Y 細胞をサブシガルジンやツニカマイシンで 4、8、18 時間処理した後に GRP78 mRNA レベルを RT-PCR で調べたところ、4 時間と 8 時間で約 3 倍上昇した。この GRP78 mRNA レベルはインスリン共存下ではさらに増大した。インスリン単独では GRP78 mRNA レベルは約 2 倍上昇した。GRP78 と同様に GRP94 もサブシガルジンやツニカマイシン処理によりその mRNA レベルは上昇したが、インスリンによる影響はほとんど認められなかった。小胞体ストレス応答において GRP78 や GRP94 などの小胞体ストレスを緩和する小胞体シャペロンの他に、小胞体ストレスによるアポトーシスに關与する GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible gene 153) も誘導される。GADD153 と GADD153 の転写に關与する ATF4 はサブシガルジンやツニカマイシン処理によりその mRNA レベルは上昇したが、インスリンによる影響はほとんど認められなかった。以上の結果からインスリンは小胞体ストレスによる GRP78 mRNA レベルを選択的に上昇させることが考えられた。

(2) インスリンは ATF4 を安定化する
ATF4 蛋白質レベルは eIF2 α のリン酸化を伴う翻訳レベルで調節される。サブシガルジンやツニカマイシン処理による小胞体ストレスにより、eIF2 α のリン酸化レベルは上昇し、ATF4 蛋白質は増加した。インスリンは、小胞体ストレスによる eIF2 α のリン酸化レベルの上昇に影響を与えなかったが、ATF4 蛋白質レベルを顕著に上昇させた。この ATF4 に対するインスリンの効果は、PI-3 キナーゼ阻害剤 LY294002 前処理で消失した。ATF4 の翻訳効率についてレポーターを用いて調べたところ、サブシガルジンやツニカマイシン処理によりその効率は上昇したが、インスリンによる ATF4 の翻訳効率への影響は認められなかった。ATF4 の安定性に対するインスリンの効果について、GFP-ATF4 蛋白質を強制発現させると、そのタンパク質レベルはインスリン

により上昇した。コントロールの GFP 蛋白質単独を強制発現させた場合には、インスリンは影響しなかった。以上の結果からインスリンは、PI-3 キナーゼを介して ATF4 蛋白質を安定化させることが考えられた。

(3) インスリンは ATF4 依存的に GRP78 プロモーター活性を上昇させる

GRP78 遺伝子のプロモーター領域には小胞体ストレス応答配列と ATF4 の認識配列が存在する。GRP78 遺伝子のプロモーター活性についてレポーターアッセイで調べてみると、GRP78 遺伝子のプロモーター活性はサブシガルジンやツニカマイシン処理により上昇し、インスリンによりさらに上昇した。このインスリンによる GRP78 遺伝子のプロモーター活性は ATF4 をノックダウンする消失したことから、インスリンは ATF4 依存的に GRP78 遺伝子のプロモーター活性を上昇させることが考えられた。予想に反して ATF4 の認識配列非存在下においてもインスリンによる GRP78 遺伝子のプロモーター活性の増強は認められたが、小胞体ストレス応答配列の存在は必要であった。この ATF4 による GRP78 遺伝子のプロモーター活性上昇のメカニズムとして、他の因子を介した間接的な作用の可能性、あるいは ATF4 が直接的に未同定の配列に結合する可能性が考えられた。この点について今後、ChIP アッセイやプロモーターへの点変異導入などの解析を行うことで明らかになると考えられる。

(4) インスリンシグナルによる ATF4 蛋白質の安定化に AKT キナーゼが關与する
小胞体ストレス剤処理では活性型を示す AKT キナーゼのリン酸化は検出されなかったが、インスリン共刺激では AKT キナーゼのリン酸化は検出された。構成的活性型 AKT キナーゼ遺伝子を強制発現させると、ATF4 蛋白質レベルを増加させた。また GRP78 遺伝子プロモーター活性をインスリン非依存的に上昇させ、この上昇は ATF4 ノックダウンにより消失した。ドミナントネガティブ AKT キナーゼではこのような効果はなかった。これらの結果から、インスリンシグナルによる小胞体ストレス応答の修飾機構の機序として、PI-3 キナーゼ・AKT キナーゼ活性化に依存した ATF4 蛋白質の安定化により GRP78 誘導促進されると考えられた。今後、AKT キナーゼによる ATF4 蛋白質の安定化について検討する予定である。

(5) インスリンシグナルによる GRP78 蛋白質レベルの上昇とアポトーシス抑制
サブシガルジンやツニカマイシン処理により PARP の切断と caspase-3 の活性は増加したが、インスリンは濃度依存的にこれらの増加を抑制した。一方で、インスリンは GRP78 の蛋白質レベルを増加させた。インスリンは GRP78 の蛋白質レベルを正に調節して小胞体ストレスによるアポトーシスを抑制するこ

とが考えられた。インスリンの他に、IGF-I により GRP78 プロモーター活性の上昇や GRP78 タンパク質の増加が認められたが、EGF ではそのような効果はなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Iwatsuki M, Inageda K, Matsuoka M. Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 251:209-16, 2011 査読有
2. Inageda K. Insulin modulates induction of glucose-regulated protein 78 during endoplasmic reticulum stress via augmentation of ATF4 expression in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 584:3649-54. 2010 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 稲毛田清、松岡雅人 HeLa 細胞におけるトリプチルスズ曝露によるインターロイキン-8(IL-8)誘導 第7回臨床ストレス応答学会大会、2012 年 11 月 24 日 (東京)
2. 稲毛田清、松岡雅人 HeLa 細胞におけるトリプチルスズ曝露によるインターロイキン-8(IL-8)誘導 第82回日本衛生学会総会、2012 年 3 月 25 日 (京都)
3. 稲毛田清 SH-SY5Y 細胞における小胞体ストレス応答に対するインスリンの効果 第10回生命科学研究会、2011 年 6 月 25 日 (高崎)
4. 稲毛田清 SH-SY5Y 細胞におけるインスリンによる小胞体ストレス応答の修飾 第81回日本衛生学会総会、2011 年 3 月 28 日 (東京)
5. 稲毛田清 ヒト神経芽細胞腫細胞におけるインスリンによる小胞体ストレス応答の修飾—ATF4 を介する GRP78 誘導 第5回臨床ストレス応答学会大会、2010 年 11 月 19 日 (徳島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲毛田 清 (INAGEDA KIYOSHI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90281659