

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430090

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答不全による糖尿病発症機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of diabetes development due to dysfunction of unfolded protein response

研究代表者

斉藤 美知子 (Saito, Michiko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・客員准教授

研究者番号：40379558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体で合成され、正しく折りたたまれる。作りそごなったタンパク質が小胞体内に溜まることを小胞体ストレスと呼び、この小胞体ストレスを感知するタンパク質と糖尿病との関連については様々な研究がされているが、いまだに不明な点が多い。哺乳類細胞における小胞体ストレスを感知するタンパク質のひとつ、IRE1 をインスリン産生細胞である膵細胞特異的に欠失させたマウスは、インスリン依存的な糖尿病を引き起こした。この原因の詳細を、IRE1 欠失細胞を株化して解析したところ、インスリンタンパク質の成熟過程にIRE1 が関わっていることがわかった。現在、論文投稿を準備中である。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle where newly synthesized secretory and membrane proteins are folded and assembled. Various stresses cause the accumulation of unfolded proteins in the ER, resulting in dysfunction of the ER. This condition is called ER stress. ER stress sensors are activated in pancreatic cells, and loss of these sensors causes diabetes. Although the function of each sensor has been well studied, their precise roles in animal tissues are largely unknown. To examine this physiological role of the IRE1 (one of the ER stress sensors) in pancreatic cells, we generated pancreatic- α -cell-specific IRE1 conditional KO (CKO) mice and IRE1 $^{-/-}$ CKO insulinoma cell lines. IRE1 $^{-/-}$ CKO mice developed insulin-dependent diabetes. We found that expression of some genes encoding folding enzymes was decreased in the insulinoma cells. From these observations, we concluded that IRE1 was found to be necessary for the folding process of insulin.

研究分野：実験動物学、分子生物学

キーワード：小胞体ストレス 糖尿病 インスリン

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞は、インスリンの合成、分泌に特化した細胞であり、血糖値を制御するのに重要な役割を果たしている。食後高血糖時には、血糖値を降下させるためにβ細胞は細胞内に溜めていたインスリンを分泌し、それと同時にインスリン合成も活性化される。インスリンのような分泌タンパク質や、膜タンパク質のような小胞体を経由して合成されるタンパク質は小胞体で様々な修飾を受けて成熟する。様々な環境要因や遺伝的要因によりタンパク質の折りたたみや修飾が正確に行われないと、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスとよばれる状態に陥って細胞内の恒常性が失われる。これを回避するために、細胞は翻訳抑制、小胞体シャペロンの誘導、小胞体関連分解系による異常タンパク質の分解を含む、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) を引き起こす。ほ乳類細胞の小胞体膜上には代表的なものとして、PERK、IRE1、ATF6 の3つのストレスセンサーが存在し、UPR を制御している。小胞体ストレスを感知すると、PERK は翻訳抑制を、小胞体シャペロンなどの転写誘導を、ATF6 は、BiP などの小胞体シャペロンを転写誘導して、それぞれ小胞体ストレスを緩和する。

現在までに糖尿病と小胞体ストレスの関連性を示す結果は数多く報告されている。特に小胞体ストレスセンサーのひとつ、PERK に関しては糖尿病との関連が強く示唆されている。PERK のノックアウトマウスは膵β細胞死に伴う糖尿病を発症し、PERK の下流である eIF2α のリン酸化部位に変異を持つヘテロノックアウトマウスは、高脂肪食負荷により肥満型の糖尿病を発症し、小胞体機能低下によるインスリン合成の低下が示されている。一方、IRE1α に関しては、単離ランゲルハンス島や膵β細胞株を用いた実験で、インスリンの生合成に関わっていることは示されているが、ノックアウトマウスは胎生致死を示すため、生体レベルにおいて IRE1α の生理機能を解析することは不可能であ

った。

そこで、IRE1α の活性ドメインである RNase ドメインを loxP 配列で挟んだ IRE1α flox マウスを作製した。このマウスに Insulin プロモーター下で Cre タンパク質を発現する Ins-Cre マウスを掛け合わせることによって、膵β細胞のみ特異的に IRE1α を欠失させたコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを得た。この CKO マウスは週齢をおうごとに徐々に血糖値が上昇し、糖尿病様症状を示すことがわかった。

2. 研究の目的

糖尿病は膵β細胞障害によるインスリン分泌の低下、もしくはインスリン抵抗性により発症する。近年、構造異常タンパク質の蓄積により小胞体内の恒常性が損なわれる、いわゆる「小胞体ストレス」とよばれる現象が糖尿病における膵β細胞の機能障害、細胞死に重要な役割を果たしているといわれている。膵β細胞では生理的に常に小胞体ストレス状態を感知するセンサータンパク質が活性化しており、細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることが最近の研究で明らかになりつつある。この機能維持と細胞死とのバランス調整や小胞体ストレスから糖尿病へ進行する経路は未だ不明な点が多い。本研究ではこの小胞体ストレスセンサーの活性化と糖尿病との関連を解明するため、小胞体ストレスセンサーのコンディショナルノックアウトマウス、および遺伝子改変膵β細胞株の樹立を用い、その機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 個体の解析

小胞体ストレスセンサーのノックアウトマウスを作製する。膵β細胞特異的に IRE1α の RNase ドメインを欠失したコンディショナルノックアウトマウス (CKO) は、ヘテロノックアウトマウス (IRE1α^{+/+}) との掛け合わせにより、IRE1α^{lox/+} というアレルを持たせ、Cre タンパク質で片アレルのみ組換えを起こすだけでノックアウトマウス

となるようにする。このマウスの表現型を、血糖値、耐糖能、インスリン分泌能、インスリン抵抗性などの観点から解析する。また、種々の週齢でマウス膵臓の切片を作製し、ランゲルハンス島の形態の観察、面積、数の測定など、組織学的解析を行う。膵β細胞内の小胞体や分泌顆粒など細胞内オルガネラの形態については、電子顕微鏡を用いて観察を行う。次にCKO マウス、およびコントロールマウスからランゲルハンス島を採取し、インスリン遺伝子、小胞体ストレス関連遺伝子、インスリン分泌に関わる因子、タンパクの folding に関わる因子などの転写レベル、タンパクレベルで変化があるかどうかを確認する。

(2) 遺伝子改変膵β細胞株の樹立

詳細な解析を行うために、ノックアウト細胞の樹立を行う。まず、IRE1α CKO マウスと、膵β細胞でSV40 LargeT antigen を発現するトランスジェニックマウスと掛け合わせる。このマウスが8-10 週になったところで、腫瘍化したランゲルハンス島を分離し細胞を株化する。株化した細胞に、Cre を発現するアデノウィルスを感染させて、IRE1α RNase ドメインを除去した細胞を取得する。

(3) 樹立した細胞を用いての解析

インスリンは翻訳後、小胞体から分泌顆粒に至る間にプロインスリンからインスリンに成熟する。また、血中のグルコース濃度が高くなると、β細胞内にたまっているインスリンを放出すると同時にmRNAの転写も誘導される。これらの過程のうちどこにIRE1αが関わっているのかを、樹立した細胞株を用いて詳しく解析する。

細胞株を低グルコースおよび高グルコースにより処理し、Insulin1、2遺伝子や小胞体ストレス関連遺伝子の転写がどう変化しているのかを、定量的PCRにより調べる。さらに、放射性同位元素 (³⁵S) を取り込ませることによってIRE1αがインスリンタンパク質合成へ与える影響をみる。またシクロヘキシミドを加えて新たなタンパク質合成を止め、インスリンの成熟が正しく

行われているか、その速度に差がないかを確認する。分泌に関しては、培地にグルコースを加えることにより、インスリン分泌を正しく行えるかどうか、培地中のインスリン濃度をELISAによって測定する。また、細胞内のインスリン量がどの状態でどれくらい存在するのか、Western blot 解析およびELISA によってプロインスリンとインスリン量を計測する。

この影響が本当にIRE1αの欠失によるものなのか、をIRE1α遺伝子、またはその下流の遺伝子(XBP1)を細胞に遺伝子導入することによって回復するかどうか確認する。

4. 研究成果

(1) 膵β細胞においてIRE1αを欠失したマウスはインスリン依存的な糖尿病を引き起こす

哺乳類細胞における小胞体ストレスセンサーのうちのひとつであるIRE1αの膵β細胞における機能を明らかにするため、膵β細胞特異的にIRE1αを欠失させたマウスの血糖値を測定した。このマウスは、生後16週目あたりから血糖値の上昇が認められた(図1)。これはインスリンを投与すると血糖値が下がることから、インスリン抵抗性のせいではなく、インスリン量の不足によるものであり、糖負荷による解析でもインスリン分泌に低下が見られることがわかった。このインスリン分泌の低下は組織学的解析により、血糖値上昇は膵島の数や面積の減少によるものではないことがわかった。

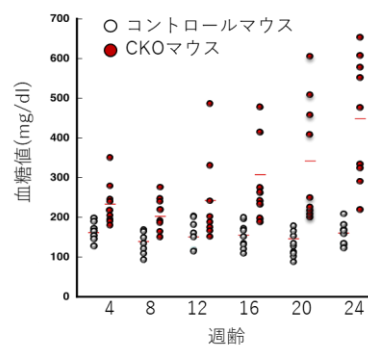


図1 各週齢におけるコントロールマウスとCKOマウスの血糖値

(2) IRE1 α を欠失した膵 β 細胞株は成熟型インスリンタンパク量が減少する

この詳細を調べるために、マウス個体ではなく細胞を用いて解析することとし、IRE1 α RNase ドメインの flox マウスと膵 β 細胞特異的にがん化を起こすマウスを掛け合わせたマウスの膵臓より、IRE1 α RNase flox の遺伝子座を持つ株化 β 細胞を樹立した。この細胞にアデノウイルスを用いて Cre タンパク質を発現させ、IRE1 α RNase ドメインを欠失した細胞を得た。この細胞を用いて解析したところ、糖負荷したときのインスリン分泌が低下しており、これは成熟型インスリンタンパク量自体の低下によるものであった。

(3) IRE1 α を欠失した膵 β 細胞株は PDI ファミリー遺伝子の一部が減少し、インスリンの成熟過程に異常がでる

この原因を探るために、定量的 PCR により、インスリン 1, 2 遺伝子、インスリンにかかわる転写因子、また小胞体関連遺伝子の転写を調べたところ、これらの転写には IRE1 α は関係していないようであった。また、放射性同位元素を取り込ませてプロインスリン、インスリンの翻訳合成をみたところ、IRE1 α は翻訳合成にも関係していないことがわかった。一方、qPCR、タンパク質発現の解析より、フォールディングに関する PDI ファミリーの 5 つの遺伝子の発現が減少していることがわかった。また、IRE1 α を欠失した膵 β 細胞株に IRE1 α 遺伝子を導入することによって、これら PDI ファミリー遺伝子の発現量、インスリン量も回復した。

これらのことから、IRE1 α は、膵 β 細胞において、PDI ファミリーを介したインスリンのフォールディング機能にかかわっており、IRE1 α を欠失することによってインスリンタンパク質の成熟過程に異常が起き、インスリン分泌の低下、糖尿病発症へとつながることが示唆された。

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 6 件)

1. Sato, H., Shiba, Y., Tsuchiya, Y., Saito, M., Kohno, K.

4 μ 8C inhibits insulin secretion independent of IRE1 α RNase activity

Cell Struct Funct., 42(1), 61-70 (2017)

doi: 10.1247/csf.17002. 査読あり

2. Tsuru, A.*, Imai, Y.*, Saito, M.*, and Kohno, K.

Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway.

Sci. Rep., 6, 24217 (2016)

doi: 10.1038/srep24217.

* Equally contributed. 査読あり

3. Fujimuro, T., Matsui, T., Nitanda, Y., Matta, T., Sakumura, Y., Saito, M., Kohno, K., Nakahata, Y. and Bessho, Y.

Hes7 3'UTR is required for somite segmentation function.

Sci. Rep., 4, 6462 (2014)

doi: 10.1038/srep06462 査読あり

[学会発表] (計 17 件)

1. 土屋雄一、斉藤美知子、門倉広、芝陽子、宮崎純一、岩脇隆夫、河野憲二

「膵臓 β 細胞における IRE1 α 経路の生理的活性化はプロインスリンの酸化的折りたたみ酵素の発現維持に働く」

第 39 回日本分子生物学会年会 (2016.11.30-12.2) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2. Masaaki Koike, Satomi Nukada, Reina Yamada, Takashi Akanuma, Michiko Saito, Masahito Ikawa and Kenji Kohno

Studies on physiological meanings of diphthamide in eEF

Nascent Chain Biology (2016.9.1-3)

Fuji lake Hotel (Yamanashi, Japan)

3. 土屋雄一、坂元慧、斉藤美知子、河野憲二
Hanging Drop 法による膵臓 β 細胞株を用いた
pseudoislet の作製
第 68 回日本細胞生物学会大会(2016.6.15-17)
京都テルサ (京都府京都市)

4. 土屋雄一、斉藤美知子、宮崎純一、岩脇隆夫、
河野憲二
膵臓 β 細胞での IRE1 α の小胞体プロテオスタシ
スにおける役割
第 38 回日本分子生物学会年会(2015.12.1-4) 神
戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

5. Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, Jun-ichi Miyazaki,
Takao Iwawaki, and Kenji Kohno
Physiological activation of IRE1 α upregulates a
subset of insulin folding enzymes in pancreatic β
cells.
Keystone Symposia “Diabetes: New Insights into
Mechanism of Disease and Therapeutic Strategies
(T2)” (2015.10.25-29)
Westin Miyako Kyoto (Kyoto, Japan)

6. 土屋雄一、斉藤美知子、宮崎純一、岩脇隆夫、
河野憲二
膵臓 β 細胞における IRE1 α の小胞体プロテオス
タシスにおける役割
第 67 回日本細胞生物学会大会 (2015.6.30-7.2)
タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

7. 斉藤美知子、土屋雄一、岩脇隆夫、森和俊、宮
崎純一、河野憲二
小胞体ストレス応答不全による糖尿病発症機構
の解明
第 37 回日本分子生物学会年会(2014.11.25-27)
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

8. 土屋雄一、斉藤美知子、岩脇隆夫、宮崎純一、
河野憲二

インスリン産生細胞における小胞体ストレスセ
ンサーIRE1 α の生理的役割
第 66 回日本細胞生物学会大会 (2014.6.11-13)
奈良県新公会堂 東大寺総合文化センター (奈
良県奈良市)

[その他]

奈良先端科学技術大学院大学 動物細胞工学研
究室 (河野研)

<http://bsw3.naist.jp/kouno/>

動物細胞工学研究室は 2017 年 3 月 31 日に閉室
となりましたが、研究内容や成果につきましては
当面の期間、アーカイブとして公開します。
そのため、掲載内容は情報が古くなっているこ
ともありますが、ご了承ください。また、予告
なく本ウェブサイトの公開を中止する場合があ
ります。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 美知子 (Saito Michiko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエン
ス研究科・客員准教授

研究者番号 : 40379558

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

土屋 雄一 (Tsuchiya Yuichi)