

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06410

研究課題名(和文) インスリン分泌における小胞体ストレスセンサーIRE1aの機能とその分子機構の解析

研究課題名(英文) Determine the molecular mechanisms by which IRE1a, an ER stress sensor plays a role in insulin secretion

研究代表者

芝 陽子 (Shiba, Yoko)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：50755866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレスセンサー、IRE1 は、小胞体に折りたたみ不完全なタンパク質が蓄積すると活性化し、シャペロンなどの折りたたみを助ける分子を転写誘導する。私たちはIRE1 の欠損マウスではインスリン分泌が抑制されることを報告したが、その分子機構は不明であった。本研究では培養した膵島細胞を用いて、IRE1 の阻害剤である4 $\mu$ 8Cがどのようにインスリン分泌を阻害しているか調べた。その結果4 $\mu$ 8Cはインスリンのエクソサイトーシス過程を阻害することがわかったが、これはIRE1 以外のものを標的として阻害していることがわかった。本研究は4 $\mu$ 8Cに副作用があるということを示した。

研究成果の概要(英文)：IRE1a is activated by the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum to induce gene transcription of chaperones. 4 $\mu$ 8C, a well-known inhibitor of IRE1a RNase activity, is commonly used to analyze IRE1a function during ER stress in cultured mammalian cells. However, the off-target effects of 4 $\mu$ 8C remain elusive. Pancreatic  $\beta$ -cells synthesize a large amount of insulin in response to high glucose stimulation, and IRE1a plays an important role in insulin secretion from pancreatic beta-cells. To analyze the role of IRE1a in pancreatic beta-cells, we examined insulin secretion after 4 $\mu$ 8C treatment. Unexpectedly, we found 4 $\mu$ 8C blocked the late stage of the insulin secretory process, independent of the IRE1a-XBP1 pathway. Our results indicate that 4 $\mu$ 8C has an off-target effect on insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. These findings inform the researchers in the field that the use of 4 $\mu$ 8C requires the special consideration for the future studies.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン IRE1alpha 小胞体ストレス 分泌

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1)小胞体ストレスセンサー、IRE1 $\alpha$ は、小胞体に折りたたみ不完全なタンパク質が蓄積すると活性化し、シャペロンなどの折りたたみを助ける分子を転写誘導する。

(2)我々の研究室では IRE1  $\alpha$ を膵島で特異的に阻害したマウスでは、膵島および血清中のグルコース濃度の増加、インスリン量の低下が見られ、糖尿病症状を呈することを発見した。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では IRE1  $\alpha$ がインスリンの分泌にどう関与しているか培養細胞系の膵島細胞を用いてその分子機構を解析した

(2)それによって IRE1  $\alpha$ の分泌における新規の機能の解明とともに糖尿病の発症機序の理解にも寄与する。

## 3. 研究の方法

(1)マウスの膵島に SV40 の large T-antigen を導入し、膵島細胞を培養する実験系を確立した。この細胞は高グルコース刺激でインスリンを分泌する。インスリン分泌は ELISA 法によって測定した。また IRE1 の機能を調べるため、IRE1 の RNase 活性阻害剤である 4 $\mu$  8C を用いて IRE1 を阻害した。

(2)どの過程が阻害されているかを調べるため、パルスチェイス実験を行い、インスリンの生合成および成熟過程を調べた。エクソサイトーシス過程については高グルコース後5分という短時間の刺激で培養した膵島細胞およびマウスから採取した膵島の両方を用いて 4 $\mu$  8C によってインスリンの分泌阻害があるかどうか調べた。

(3)4 $\mu$  8C の効果が IRE1 依存性かどうかを調べるため、IRE1 の RNase ドメインを欠損した膵島細胞を用いてインスリン分泌が阻害されるかどうか調べた。

## 4. 研究成果

(1)4 $\mu$  8C がどの濃度で XBP1 のスプライシングを阻害するか調べ、64 $\mu$ M で阻害することが分かった。また培養した膵島細胞を高グルコースで刺激し、インスリン分泌を ELISA 法によって測定したところ、

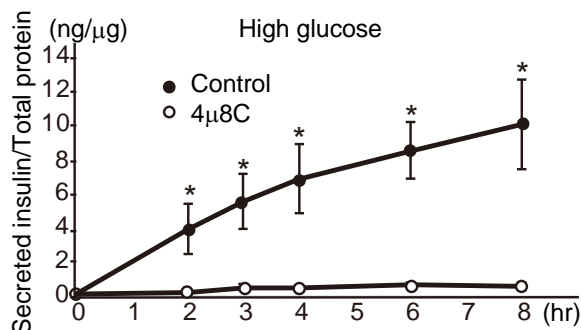


図1. 4 $\mu$  8C は高グルコース刺激による膵島細胞からのインスリン分泌を抑制した。

64 $\mu$ M で二時間以内にインスリン分泌を阻害することが分かった(図1)。

Secretory Alkaline Phosphatase (SEAP)を用いて構成性分泌が阻害されるかどうか調べた。その結果、構成性分泌は阻害されなかったことから、4 $\mu$  8C の効果はインスリンに特異的であることが分かった。

(2)4 $\mu$  8C がインスリン分泌のどの過程を阻害しているか調べるために、[35S]-Met/Cys で新規に合成されたタンパク質をラベルし、インスリンの合成(図2)および成熟(図3)をパルス実験およびパルスチェイス実験によって調べた。その結果インスリンの合成および成熟過程も4 $\mu$  8C によって阻害されていないことが分かった。

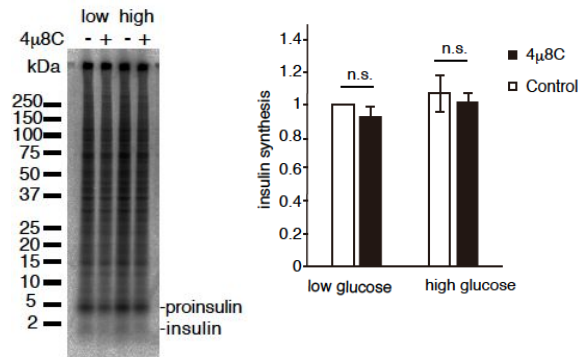


図2 左: タンパク質をラベルして泳動したもの。右:インスリンの量をトータルの泳動したタンパク質量で割ったもの。インスリンの合成量は+/-4 $\mu$ 8C で変化がなかった。

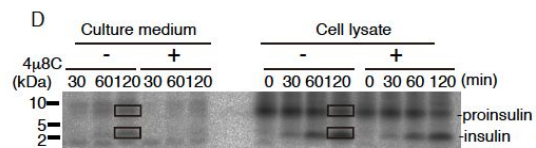


Figure E: Pulse-chase experiment showing insulin maturation (mature insulin / proinsulin + mature insulin) over time (0, 50, 100, 120 min) with and without 4 $\mu$ 8C treatment. No significant differences (n.s.) are observed.

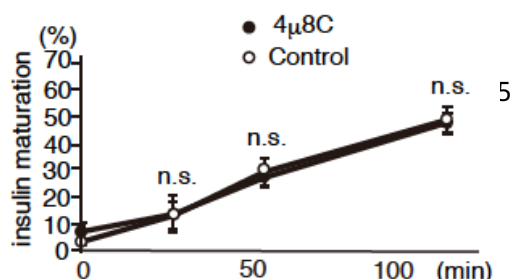


図3. 上。パルスチェイス実験により、インスリンの成熟を調べた。下; 成熟したインスリン量をトータルのインスリン量で割ったもの。成熟するスピードに変化がなかった。

(3)上記の実験でインスリンの生合成および成熟過程は阻害されていなかったことから、4 $\mu$  8Cがインスリンのエクソサイトーシス過程を阻害している可能性がある。これを調べるため、高グルコースで刺激して5分という短時間でインスリン分泌が阻害されないかどうか測定した。その結果、培養した膵島細胞を用いた実験で4 $\mu$  8Cはインスリン分泌を5分で抑制した。この結果を確認するため、マウスから採取した膵島を用いて高グルコース刺激後5分のインスリン分泌を測定したが、やはり4 $\mu$  8Cで分泌が阻害された(図4)。この結果は4 $\mu$  8Cはインスリンのエクソサイトーシス過程を阻害することを示唆する。

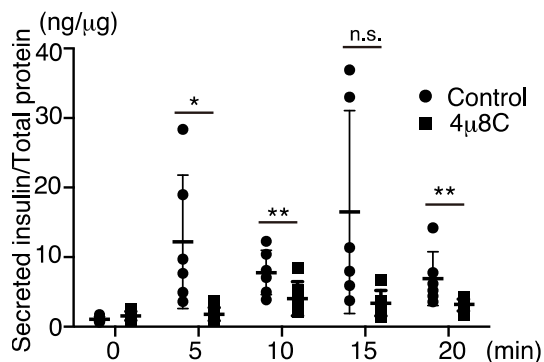
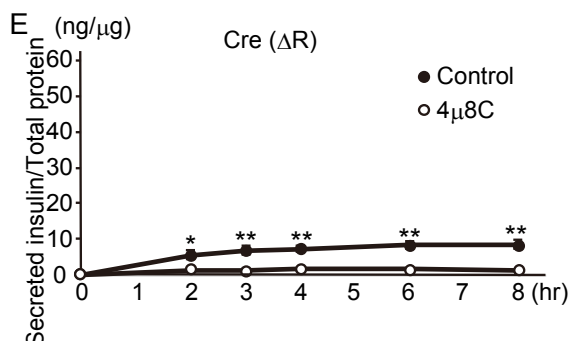


図4. マウス膵島において4 $\mu$  8Cは5分でインスリンの分泌を阻害した。

(4)しかしながら、IRE1は小胞体に存在するタンパク質であることから、4 $\mu$  8CはIRE1以外のタンパク質を阻害してインスリンのエクソサイトーシスを阻害している可能性がある。4 $\mu$  8CがIRE1を介さずにインスリン分泌を阻害できるかどうか調べるため、IRE1のRNaseドメインを欠損させた膵島細胞を用いてインスリン分泌を測定したところ、IRE1のRNaseドメイン欠損だけでもインスリン分泌阻害が50%程度見られるが、4 $\mu$  8Cによってさらに分泌が抑制されることがわかった(図5)。このことは4 $\mu$  8CがIRE1のRNaseドメインがなくてもインスリン分泌を阻害する



ことを意味する。

図5. 4 $\mu$  8CはIRE1のRNaseドメインを欠損させた膵島細胞(R)においてインスリン分泌を阻害した。

(5)本研究では4 $\mu$  8CはIRE1以外のものを標的としてインスリンのエクソサイトーシスを阻害していることが明らかとなった。4 $\mu$  8CはIRE1の阻害剤として広く使われており、4 $\mu$  8Cに副作用があるということは知られていなかったため、今後の小胞体ストレスおよび糖尿病研究に重要な知見を与えた。

(6)HasslerらはIRE1のRNaseドメインの変異体を発現させるとインスリンの発現が阻害されるという報告をしており<sup>1</sup>、4 $\mu$  8Cではインスリンの生合成や成熟過程に影響がなかったという本研究結果と異なる。しかしながら、Hasslerらは変異体を72時間発現させており、4 $\mu$  8C処理後数時間以内にインスリンの生合成および成熟を調べている私たちのやり方とは異なる。4 $\mu$  8CはIRE1を短時間で阻害できることから、IRE1によって転写誘導される下流因子の影響から切り離れた影響を見ることができると考えられ、4 $\mu$  8Cを72時間など、長時間処理した場合にインスリンの生合成に影響が出る可能性はある。阻害剤は短時間でIRE1を阻害できることから、IRE1の転写誘導とは異なる影響を調べるときに有用であると考えられ、今後より特異的なIRE1の阻害剤の開発が待たれる。

1. Hassler, J.R., Scheuner, D.L., Wang, S., Han, J., Kodali, V.K., Li, P., Nguyen, J., George, J.S., Davis, C., Wu, S.P., *et al.* (2015). The IRE1 $\alpha$ /XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of beta Cells. *PLoS Biol* 13, e1002277.

## 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 1 件)

Hitomi Sato, Yoko Shiba\*, Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, and Kenji Kohno\*, 4 $\mu$ 8C inhibits insulin secretion independent of IRE1 $\alpha$  RNase activity, *Cell Structure and Function*, accepted, 2017, 査読あり,

\*Corresponding Author

〔学会発表〕（計 2 件）

Hitomi Sato, Yoko Shiba, Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito and Kenji Kohno, 膵島 β 細胞のインスリン産生における IRE1α の機能解析, 第 10 回小胞体ストレス研究会, 淡路夢舞台国際会議場, 平成 27 年 11 月 29 日～30 日ポスター(11 月 29 日)、口頭発表(11 月 30 日)

佐藤仁美、芝陽子、土屋雄一、斉藤美知子、河野憲二, 膵島 β 細胞における阻害剤をもちいた IRE1α の機能解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都女子大学, 平成 29 年 3 月 17 日～21 日, 口頭発表(3 月 18 日)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

芝 陽子 (SHIBA, Yoko)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：50755866