

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目：基礎研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590300
 研究課題名（和文） 転写および翻訳制御による膵β細胞ストレス応答の分子機構
 研究課題名（英文） The molecular mechanisms of transcriptional and translational control of stress responses in pancreatic β cells
 研究代表者
 石原 寿光（ISHIHARA HISAMITSU）
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号：60361086

研究成果の概要：

膵β細胞において翻訳（タンパク合成）抑制因子 4E-BP1 が、ストレス応答のマスター転写因子である ATF4 の活性化によって発現増加することを明らかにした。また、4E-BP1 欠損マウスβ細胞は、小胞体ストレスに対し脆弱になっていることを突き止めた。これらのことから、小胞体ストレス下のβ細胞では、タンパク合成を抑制しておくことが生存にとっては利であり、そのために 4E-BP1 の発現が誘導されるものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：糖尿病・代謝学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖尿病、膵島、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌障害と骨格筋や肝臓でのインスリン抵抗性が複雑に絡み合っており、発症・進展する疾患である。インスリン分泌障害の要因として、β細胞の分泌機能の異常とともにβ細胞量の減少が重要であることが、最近の国内外の研究から明らかとなっている (Rhodes, *Science* 307, 380-384, 2005)。膵β細胞は、インスリンを分泌するために特化された細胞であり、多量のインスリンを合成している。このため、プロインスリンから成熟インスリン分子への変換の場である小胞体に対する負荷、すなわち小胞体ストレスが、通常から高い状態に

ある。そして、小胞体ストレスが2型糖尿病の病態形成に重要な役割をはたしている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

膵β細胞のこのような特殊性から、β細胞におけるストレス応答は、これまで主に NIH3T3 や HeLa 細胞で研究されてきたものと異なる特徴がある可能性が考えられる。そこで、本研究課題では、β細胞における小胞体ストレスおよび酸化ストレス応答の特徴を分子レベルで明らかにすることを目的とする。具体的には、ストレスを負荷された際の遺伝子からメッセンジャーRNA (mRNA) への転写お

よび mRNA からのタンパクへの翻訳の調節機構の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) mRNA発現の網羅的解析: 膵β細胞株 MIN6 と NIH3T3 細胞を小胞体ストレス誘導物質ツニカマイシンあるいは酸化ストレス誘導物質過酸化水素存在下で培養し、総RNAを抽出後、Affymetrix社のDNA microarrayによりmRNAの発現変化を解析する。

(2) タンパク発現の網羅的解析: 解析は、Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) と飛行時間型質量分析法 (Time of Flight Mass Spectrometry: ToF-MS) を組み合わせた SELDI-ToF-MS 法に基づく Ciphergen 社 Protein Chip Systemを用いる。ストレス刺激により発現量の変わるタンパクピークを見出す。

(3) 翻訳制御 Eif4E/4E-BP1 系の役割の解析: (1) (2) と並行して、すでにβ細胞で特徴的にストレス下の発現増強が認められる翻訳抑制因子 4E-BP1 の役割について以下の様な方法で検討する。

① 4E-BP1 発現調節機構の解析: すでにクローニングした約 10kbpのマウス *Eif4ebp1* 遺伝子プロモーターから様々な長さの断片を調製し、ルシフェラーゼ・レポーターcDNAに接続して、プロモーター活性へのストレス惹起物質の影響を検討することにより、ストレス応答部位を決定する。

② *Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスを用いた検討: *in vivo* における小胞体ストレス下での 4E-BP1 の役割を検討するため、*Wfs1* 遺伝子破壊マウスと *Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスを交配し、*Eif4ebp1*・*Wfs1* 遺伝子二重破壊マウスを作製した。また、異常インスリン分子の小胞体での蓄積のため重症の糖尿病を発症する Akitaマウスと *Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスを交配し、4E-BP1 が欠損した Akitaマウスを作製した。個体の耐糖能を随時血糖測定および経口糖負荷試験により評価し、さらに膵島の容積、膵インスリン含量を検討する。また、単離膵島を用い、アポトーシス・細胞周期・細胞増殖の制御分子の発現を検討する。

4. 研究成果

(1) MIN6 細胞と NIH3T3 繊維芽細胞を小胞体ストレス誘導物質ツニカマイシン存在下で培養し、mRNA の発現変化を解析した結果、新たな小胞体ストレス応答分子を複数個同定した。そのうちの新規 2 遺伝子については、遺伝子産物である当該タンパクに対する抗体を作成した。その遺伝子をクローニングし、ストレス応答機構について検討し、小胞体センサーである ATF6 の関与などが示唆された。

また、酸化ストレス誘導剤であるヒ素に MIN6 細胞を暴露した際に、JNK の活性化が起こり、小胞体ストレス応答と共通の応答経路である Integrated Stress Response (ISR) 経路を修飾することを明らかにした。

(2) MIN6 細胞をツニカマイシン存在下で培養し、その抽出液を SELDI-ToF-MS 法にて解析したところ、小胞体ストレス特異的に発現量を変化させるタンパクを複数同定した。

(3) ① 4E-BP1 の発現が、ATF4 の過剰発現で誘導され、ATF4 ノックアウトマウス由来線維芽細胞で消失することから、ATF4 を介する転写誘導によるものであることを明らかにした。さらに、*Eif4ebp1* 遺伝子イントロンに 2 つの C/EBP-ATF composite site を見出し、ChIP assay によりこの部位へ ATF4 が結合することを確認した。我々は最近、酸化ストレスを惹起する砒素によっても程度は軽い、4E-BP1 の発現誘導が起こることを確認している。これらの解析から、翻訳抑制因子 4E-BP1 は、integrated stress response によって ATF4 を介して誘導される分子であることが明らかとなった。4E-BP1 は安定なタンパクであり、ATF4 の活性化が終わった後も細胞内に蓄積されて翻訳抑制効果を発揮すると考えられる。このことから、従来から知られる eIF2 α のリン酸化は ISR の早期の翻訳抑制を、4E-BP1 は後期の翻訳抑制を担っていると考えられる (図 1)。

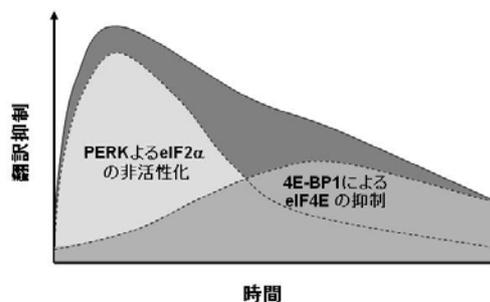


図 1 ストレス下の翻訳抑制

次に小胞体ストレスに対する 4E-BP1 発現誘導の細胞種による違いを検討するため、MIN6 細胞以外の 11 種類の培養細胞をタブシガルギンに暴露しウエスタンブロット法で検討したところ、11 種類すべての細胞でほとんど 4E-BP1 タンパクの発現変化を認めなかった。mRNA の発現についても real-time RT-PCR 法で検討したが、その発現誘導は、MIN6 細胞における誘導に比べてかなり少なく、遺伝子転写過程に違いがあることが示唆された。*Eif4ebp1* 遺伝子の解析から、イントロン 1 内の ATF4 結合部位を介した ATF4 による制御が細胞種によって、異なることが示唆された。

②まず、ストレス下での 4E-BP1 誘導の生

体での意義を解析するため、*Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスとインスリノーマを発症する IT6 マウスを交配して、*Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスにおいてインスリノーマを作らせ、4E-BP1 を欠損する膵β細胞株を樹立した。4E-BP1 欠損β細胞は、小胞体ストレスに暴露した際のタンパク質合成の抑制が不十分であるとともに、生存能の低下を示した。これらの結果から、4E-BP1 は、小胞体ストレスに暴露された細胞のタンパク質合成を抑制し、細胞に対する負荷を軽減するとともに、細胞死を防ぐ役割を担っていると考えられた。

次に、Akita マウスあるいは WFS1KO マウスと 4E-BP1 KO マウスを交配して 2 重変異マウスを作製し、解析した。Akita マウスおよび WFS1KO いずれにおいても、4E-BP1 の欠損が耐糖能障害を悪化させることが観察された。そして、この耐糖能障害の悪化は、膵β細胞障害が増悪することによることも明らかとなった。小胞体ストレス下のβ細胞では、タンパク質合成を抑制しておくことが、長期的な生存にとっては有利であり、その役割の少なくとも一部を 4E-BP1 が担っているものと考えられた。

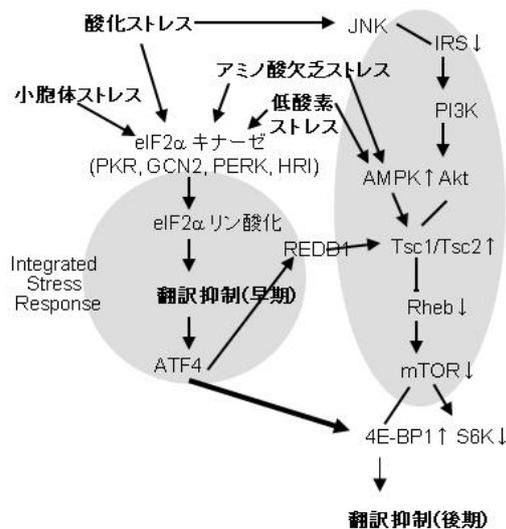


図2 ストレス応答と PI3K/Akt/mTOR 経路の連関
タンパク質合成制御には、PI3K/Akt/mTOR のシグナル経路が重要である。本研究において、ATF4 による 4E-BP1 の転写制御経路を明らかにすることにより、ストレス応答系とタンパク質合成系が連動していることが明らかとなった (図2)。

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 8 件)

1. Tokita A, Ishigaki Y, Okimoto H, Hasegawa H, Koiwa Y, Kato M, Ishihara H, Hinokio Y,

Katagiri H, Kanai H, Oka Y. Carotid arterial elasticity is a sensitive atherosclerosis value reflecting visceral fat accumulation in obese subjects. *Atherosclerosis* in press. 査読有

2. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Niiijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y. Regulation of Pancreatic β cell Mass by Neuronal Signals from the Liver. *Science* 322, 1250- 1254, 2008. 査読有
3. Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, Oka Y. ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic β cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 7, 269-276, 2008. 査読有
4. Kimura T, Kaneko Y, Yamada S, Ishihara H, Senda T, Iwamatsu A, Niki I. The GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 controls endocytosis of secretory membrane in insulin secreting cell lines. *J Cell Sci* 121, 3092-3098, 2008. 査読有
5. Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sata Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda, H., Sawamura, T., Oka, Y. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 118, 75-83, 2008. 査読有
6. Kato T, Ishiwata M, Yamada K, Kasahara T, Kakiuchi C, Iwamoto K, Kawamura K, Ishihara H, Oka Y. Behavioral and gene expression analyses of *Wfs1* knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci Res* 61, 143-158, 2008. 査読有
7. Nishio M, Tsurudome M, Ishihara H, Ito M, Ito Y. The conserved carboxyl terminus of human parainfluenza virus type 2 V protein plays an important role in virus growth. *Virology* 362, 85-98, 2007. 査読有
8. Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Sasano H, Nakauchi H, Oka Y, Katagiri H. Bone marrow (BM) transplantation promotes β-cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization. *Endocrinology* 148, 2006-2015, 2007. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. 石原寿光。膵β細胞量調節とストレス応答。第43回糖尿病学の進歩、2009年2月20日、松本市
2. Ishihara H. Essential role of translational control in β cell survival under stress conditions. Asia Islet Biology & Incretin Symposium, 2008年10月18日、Incheon, Korea.
3. 石原寿光、山口賢、薄井正寛、富永竜、岡芳知。膵β細胞量の調節における

- mRNA 翻訳制御の役割。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008 年 5 月 24 日、東京
4. 山口賢、石原寿光、田村明、山田高弘、富永竜、宗像佑一郎、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知。翻訳抑制因子 4E-BP1 は、慢性的な小胞体ストレス下の膵β細胞において翻訳抑制を介して細胞を保護する。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008 年 5 月 24 日、東京
 5. 富永竜、石原寿光、山田高弘、山口賢、宗像佑一郎、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知。膵β細胞における小胞体ストレス応答と酸化ストレス応答の特徴。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会。2008 年 5 月 24 日、東京
 6. 佐竹千尋、石原寿光、田村明、山田高弘、山口賢、富永竜、宗像佑一郎、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知。翻訳抑制因子 4E-BP1 は小胞体ストレス応答転写因子 ATF4 の直接のターゲットである。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008 年 5 月 24 日、東京
 7. 石原寿光、山田高弘、山口賢、富永竜、宗像佑一郎、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知。膵β細胞小胞体ストレス応答における翻訳抑制因子 4E-BP1 の役割第 81 回日本内分泌学会学術集会、2008 年 5 月 16 日、青森市
 8. 石原寿光。2 型糖尿病の発症における膵β細胞障害。第 42 回糖尿病学の進歩、2008 年 2 月 15 日、高松市
 9. Yamaguchi S、Ishihara H、Oka Y。Transcription factor TFII-I binds to WFS1 protein and dissociates in response to endoplasmic reticulum stress. The 67th scientific sessions of American Diabetes Association、2007 年 6 月 23 日、Chicago
 10. 薄井正寛、佐竹千尋、石原寿光、田村明、山田高弘、山口賢、富永竜、宗像佑一郎、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知。膵β細胞における小胞体ストレスによる翻訳抑制因子 4E-BP1 発現誘導機構。第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日、仙台市
 11. 山口賢、石原寿光、田村明、山田高弘、佐竹千尋、薄井正寛、富永竜、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知。翻訳抑制因子 4E-BP1 の欠損は小胞体ストレスによる膵β細胞障害を悪化させる。第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 25 日、仙台市
 12. 宗像佑一郎、石原寿光、田村明、山田高弘、山口賢、佐竹千尋、薄井正寛、富永竜、檜尾好徳、荻原健英、片桐秀樹、岡芳知。膵β細胞特異的小胞体ストレス応答の検討。第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 25 日、仙台市
 13. Ishihara H. An essential role of the translational suppressor 4E-BP1 in pancreatic β cell survival under ER stress. 日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 25 日、仙台市
- [図書] (計 1 件)
- WFS1 Protein (wolframin): Emerging Link between the Emotional Brain and Endocrine Pancreas. Koks and Vasar ed. Research Signpost. 2009.
- Chapter 2. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Tanizawa Y, Oka Y. Progressive β cell loss and defective stimulus-secretion coupling in the Wfs1tm1/Yoka mouse, a model of Wolfram syndrome.
- Chapter 3. Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, Oka Y. Role of endoplasmic reticulum stress in pancreatic β cell loss in WFS1-deficient mice.
- [その他]
- http://www.hosp.tohoku.ac.jp/gakujyutu/g05_tounyou.html
- <http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/dmet/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA HISAMITSU)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：60361086
 - (2) 研究分担者

山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)
東北大学・国際高等融合領域研究所・助教
研究者番号：70451614 (2007)
 - (3) 連携研究者

山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)
東北大学・国際高等融合領域研究所・助教
研究者番号：70451614 (2008)