

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791043

研究課題名（和文） 膵β細胞におけるオートファジー標的分子の同定・解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of molecular targets of autophagy in β cell

研究代表者

内田 豊義（Uchida Toyoyoshi）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90465055

研究成果の概要（和文）：

膵β細胞特異的オートファジー不全マウスと野生型マウスの膵島内に新規発現・増加しているタンパク質を比較検討し、ERp57(PDIA3)を同定した。ERp57発現増加の意義を解析するためにテトラサイクリン誘導性Atg7 ノックダウン(KD)INS-1細胞(ラットインスリノーマ細胞株)を作製し、この細胞においてもERp57の発現の増加を確認できた。siRNAを用いてERp57を抑制したAtg7KDINS-1細胞のSubG1解析を行ったところ、アポトーシスの増加がみられた。これらの結果よりERp57はオートファジー不全に伴う膵β細胞障害に保護的に作用していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To comprehensively find molecular targets of autophagy in β cell, we compared protein expression profile in islets from pancreatic β-cell specific autophagy deficient mice (*Atg7<sup>Δβ-cell</sup>*) and control mice (*Atg7<sup>fl/fl</sup>*). We identified ERp57 (PDIA3) significantly increased in *Atg7<sup>Δβ-cell</sup>* islets. To investigate the role of ERp57 in autophagy deficient β cells, we generated tetracycline-inducible *Atg7* knock-down (*Atg7KD*) rat insulinoma INS-1 cells. Then, we additively reduced ERp57 in using siRNA in both INS-1 cells to investigate cell viabilities by sub-G1 analysis. The suppression of ERp57 caused to increase sub-G1 population in *Atg7KD* INS-1 cells. These data suggested that ERp57 might be induced by autophagy deficiency in β cells and ERp57 had protective effects on autophagy deficient β cells against apoptotic cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：オートファジー, 膵β細胞, プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景  
肥満などに伴うインスリン抵抗性の増大に

対して、膵β細胞は代償的にその機能を増加させ、血糖値が正常に保たれる。糖尿病では

この機構に、代償不全が認められる。我々はこの代償不全のメカニズムにオートファジーが関与する可能性に着目し研究を行ってきた。膵β細胞特異的オートファジー欠損マウス (Atg7<sup>Δβ-cell</sup>) は、ブドウ糖応答性インスリン分泌低下による著しい耐糖能障害を呈し、膵β細胞の形態学的にユビキチン化タンパク質の蓄積やミトコンドリアの膨大、小胞体の拡張とともに膵β細胞のアポトーシス増加および増殖能の低下を認めた(Ebato C, et al., Cell Metab 2008)。これらの結果から、オートファジーは膵β細胞形態・機能維持に重要な働きをしていることが明らかとなった。2型糖尿病患者の膵β細胞においてオートファジー不全が示唆されており、オートファジーの標的分子の同定は2型糖尿病における膵β細胞機能不全の病態解明に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究はその研究をさらに進展させ、膵β細胞においてオートファジー特異的に分解されるタンパク質をプロテオミクスの手法により同定し、機能解析を行う。

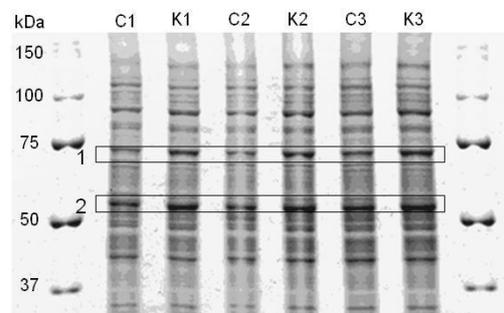
## 3. 研究の方法

Atg7<sup>Δβ-cell</sup> マウス及びコントロールとして Atg7<sup>fl/fl</sup> マウスの単離膵島各 10μg を用いて 1次元電気泳動(5-15%separate gel, 4%stacking gel) を各々行った。得られたゲルを銀染色 (GE HealthCare, Silver Staining kit, Protein) した。BioRad GS-800 Calibrated Densitometer, PDQuest ver7.1 に取り込んだ後、両群の出現 blot の位置・濃度を比較し、Atg7<sup>Δβ-cell</sup> マウスに発現量の増加している上位 8 個の blot を切り出し、質量分析法(高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ESI 法、LTQ-Orbitrap) にて含まれるタンパク質を同定する。同時に機能解

析を *in vitro* の実験系で行うために代表的な膵β細胞系の培養細胞である INS-1 832/13 細胞を用いて Atg7 ノックダウン INS-1 細胞 (Atg7KD)を作成する。Atg7KD においてコントロール INS-1 細胞と比較し、発現増加の再現性が確認された候補分子を siRNA にて発現抑制し、細胞機能への影響を検討する。

## 4. 研究成果

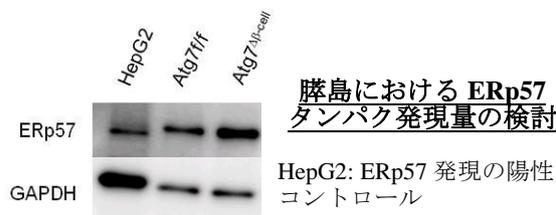
Atg7<sup>Δβ-cell</sup> と Atg7<sup>fl/fl</sup> マウスの膵島内に新規発現・増加しているタンパク質を 1次元電気泳動にて比較検討し、50,75kDa 付近で発現量の差を認めた(下図)。



### 1次元電気泳動 (銀染色)

C1-3:Atg7<sup>fl/fl</sup>膵島、K1-3:Atg7<sup>Δβ-cell</sup>膵島を示す。50 (図中2)、75 (図中1)kDa 付近で発現量の差を認めた

この blot の GC/MS 解析により 4つのタンパク質 Carboxypeptidase E, ERp72, ERp57, ERp59(PDI)を同定し、二次スクリーニングとしてウエスタンブロッティング(WB)を行ったところ、ERp57の発現が Atg7<sup>Δβ-cell</sup> で増加が確認できたが、ERp57以外のタンパク質は発現量に差を認めなかった(下図)。

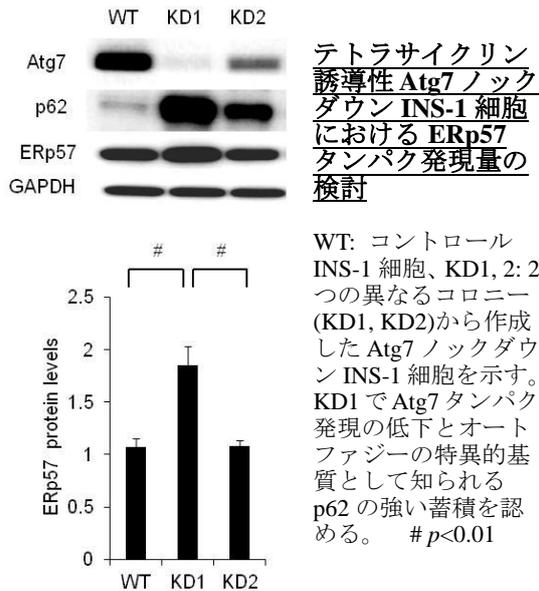


### 膵島における ERp57 タンパク発現量の検討

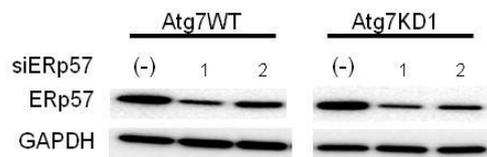
HepG2: ERp57 発現の陽性コントロール

ERp57 は主に小胞体に局在し、糖タンパク質のフォールディングにおいて中心的役割を果たしているジスルフィドイソメラーゼと

して知られていおり、膵臓においては主に膵β細胞内に発現していることが確認された。次にオートファジー不全に伴う膵β細胞におけるERp57発現増加の意義を解析するためにテトラサイクリン誘導性Atg7ノックダウン(Atg7KD1および2)INS-1細胞を作製し、Atg遺伝子のノックダウン効率の良いAtg7KD1 INS-1細胞この細胞においてもERp57の発現の増加を確認できた(下図)。

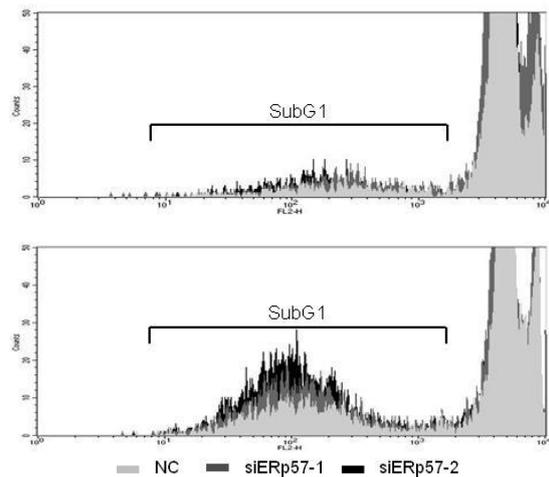


Atg7遺伝子のノックダウン効率の良く、ERp57の発現の増加を確認できたAtg7KD1 INS-1細胞を用いてその後の検討を行った。ERp57は、酸化ストレスや小胞体ストレスに対する細胞保護作用が報告されており、siRNA(Stealth RNAi™; Invitrogen)を用いてERp57を抑制したAtg7 KD INS-1細胞を作成した(下図)。



**Atg7/ERp57ダブルノックダウン細胞の作製**  
siRNA(2つの異なる配列: siERp57-1, -2)を用いたコントロールINS-1細胞(Atg7WT)、Atg7ノックダウンINS-1細胞(Atg7KD1)におけるERp57発現量を示す。

これらの細胞を用いて、まずオートファジー不全膵β細胞におけるERp57の機能に関して、まず細胞生存への影響を検討しました。細胞生存をSubG1分布の変化にて検討したところ、Atg7KD INS-1細胞においてERp57発現量の低下によりアポトーシスの増加がみられた。一方、Atg7野生型INS-1細胞ではERp57の抑制による変化はみられなかった。



上段: コントロールINS-1細胞(Atg7WT)、下段: Atg7ノックダウンINS-1細胞(Atg7KD1)を示す。

これらの結果よりERp57はオートファジー不全に伴う膵β細胞障害に保護的に作用しているといえる。また、小胞体ストレスマーカーの発現は変化していなかった。オートファジー不全状態下の膵β細胞は、小胞体ストレスに対する脆弱性が報告されていることから、ERp57の関連性に関して現在検討中である。

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)

[学会発表] (計2件)

1.山本恵理子、内田豊義、阿部浩子、小宮幸

次、原 朱美、荻原 健、竹田 省、藤谷  
与士夫、綿田裕孝、第 56 回日本糖尿病学  
会、ERp57 はオートファジー不全に伴う膵  
 $\beta$  細胞障害に保護的に作用する、2013 年 5  
月 16～18 日、熊本

2.Eriko Yamamoto, Toyoyoshi Uchida, Hiroko  
Abe, Koji Komiya, Akemi Hara, Takeshi  
Ogihara, Satoru Takeda, Yoshio Fujitani,  
Hirotaka Watada、第 73 回米国糖尿病学会、  
ERp57 protects autophagy deficient beta cells  
from cellular damage、2013 年 6 月 21～25  
日、イリノイ州シカゴ

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

内田 豊義 (Uchida Toyoyoshi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90465055