

新規レドックス試薬による糖尿病予防の創薬基盤

徳島大学先端酵素学研究所分子生命科学分野

松崎 元紀

【背景と目的】

近年、食の欧米化と高齢化の進展により、日本国内における糖尿病およびその予備群の人口は約 2,000 万人に達し、関連医療費は 1.2 兆円にも上る。糖尿病は、主に膵島 β 細胞の減少に伴う機能不全、すなわち血糖調節の異常によって診断されるが、診断時点では健常時の約半数の β 細胞が失われている。現在の技術ではこの β 細胞を補充することが不可能なため、根本的な治療法の確立は困難である。また、従来の糖尿病初期治療薬であるスルホニルウレア剤はインスリン分泌量の増加を促す一方で、インスリン産生の負荷により β 細胞死を促進する副作用が指摘されている。SGLT-2 阻害薬、 α -グルコシダーゼ阻害薬など比較的 β 細胞への負荷が少ない薬剤も開発されているが、対症療法的である。したがって、新たな作用点で β 細胞の保護に寄与し、予防的に使用できる薬剤の開発が急務である。

β 細胞死の一因として、過剰なインスリン生合成による凝集体形成を介してアポトーシスに至ることが報告されている (Lindholm et al., 2017; Wang and Kaufman, 2016)。この凝集体形成を感知して、細胞応答の中心的役割を担うのが小胞体のストレスセンサー IRE1 である。IRE1 は一回膜貫通型タンパク質であり、内腔ドメインの超分子多量体形成を通じてストレス信号を細胞質に伝達する。通常、程良い IRE1 シグナルはストレスの緩和とアポトーシスの抑制に寄与するが、慢性的なストレス下ではその制御が崩れ、細胞死を引き起こす可能性がある (Chang et al., 2018)。しかし、一過的に形成される超分子多量体の分析手法が確立されておらず、IRE1 によるストレス感知の分子機構、特に IRE1 多量体形成にどのような因子がどの程度作用するか、またその下流にある臨機応変なシグナリング制御の仕組みについては、依然として未解明な点が多い。

本研究は、IRE1 多量体形成およびインスリン産生の効率を左右する細胞内酸化還元 (レドックス) 環境に着目し、インスリン凝集および細胞内レドックスが、多量体形成制御に及ぼす影響を定量的に解析することを目的とした。具体的には、超分子多量体の分析法を開発し、分子レベルの多量体構造解析と細胞レベルのシグナリング解析を行った。これら解析により、IRE1 がどのように細胞内ストレスを感知し、適切なシグナルを伝達するかについて基盤的知見を得た。最終的には糖尿病予防のための創薬基盤を確立することを目指し、レドックスを新たな作用点とすることで、凝集体形成抑制によるストレスの低減と IRE1 シグナル制御に働く低分子試薬の開発を進めた。

【方法と結果】

1. 超分子多量体の分析法開発

IRE1 多量体形成およびその制御を分子レベルで解析するため、IRE1 内腔ドメインのタンパク質試料を調製し、ネイティブ電気泳動法による分析法を確立した。具体的には、大腸菌発現系を用いてリコンビナント IRE1 内腔ドメインを大量発現し、精製した。また、分析には、CBB 色素の添加により表面電荷を中和し、タンパク質の三次構造および四次構造を保持したままの泳動を可能にする、*pseudo clear native* ポリアクリルアミド電気泳動 (*pCN*-PAGE) (Pandhare et al., 2019; Tanikawa et al., 2021) を最適化して用いた。

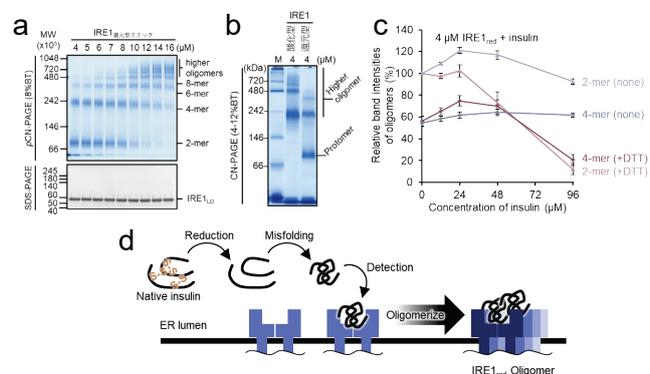


図 1. *pCN*-PAGE を用いた IRE1 内腔ドメインの会合状態解析

- IRE1 内腔ドメインの濃度依存的な会合状態分布の変化。
- 酸化還元状態依存的な会合状態分布の変化。
- インスリン凝集体存在下における二量体および四量体の定量解析。
- IRE1 内腔ドメインによるインスリン凝集体の感知と超分子多量体形成の模式図。

IRE1 内腔ドメインを *p*CN-PAGE により分析したところ、複数のバンドが検出され、分子量マーカーとの比較から、二量体を単位として、四量体、六量体、……とより大きな多量体が生じること、すなわち IRE1 内腔ドメインが溶液中で様々な会合状態をとることが示唆された (図 1a)。さらに、IRE1 濃度を増加させると、分子量の小さいバンドは減少し、より大きな分子量のバンドが新たに生じた。これは、濃度依存的に会合状態分布がより高分子側へと変化することを示唆している。また、分子間ジスルフィド結合で結合した IRE1 内腔ドメイン (酸化型) は、分布が大きく変化し、四量体が構成単位となることがわかった (図 1b)。このような IRE1 内腔ドメインとインスリン凝集体を共存させると、凝集体の濃度依存的に、IRE1 の会合状態分布が高分子量側へと変化した (図 1c)。この結果は、インスリン凝集体などのストレス因子の過多に応じて、IRE1 内腔ドメインが会合状態分布を変化させることを示唆している (図 1d)。

2. 細胞内における IRE1 会合状態分布と IRE1 シグナリング強度の相関

IRE1 の多量体化は、その下流の IRE1 自己リン酸化を介したシグナリングの引き金を引くことが知られているが (Hetz and Papa, 2018)、応答の強弱を決める仕組み、すなわち自己リン酸化頻度を調節する分子機構は不明だった。1. からインスリン凝集体のような直接的な細胞毒性をもつ因子だけでなく、IRE1 の発現量も内腔ドメインの会合状態分布を変化させ、この分布が自己リン酸化を調節することが期待された。そこで、一過性発現によりストレスとは無関係に培養細胞内の IRE1 濃度を変化させ、自己リン酸化の度合いが変化するかを検討した。

一過性発現を誘導する際に、プラスミド量を変化させ、IRE1 と自己リン酸化 IRE1 の量をウェスタンブロット (WB) で比較したところ、IRE1 の発現量が多いほど自己リン酸化も増えることがわかった (図 2)。この結果は会合状態分布が自己リン酸化頻度を調節するという仮説を支持している。さらにレドックス環境と自己リン酸化頻度の関係を調べるため、同様の実験を酸化型にならない変異型 IRE1 で行ったところ、野生型 IRE1 と比較して自己リン酸化頻度増加が部分的だった (データ省略)。この結果は、細胞内においても分子間ジスルフィド結合が IRE1 の会合状態分布およびその下流の自己リン酸化の制御に関わることを示唆している。

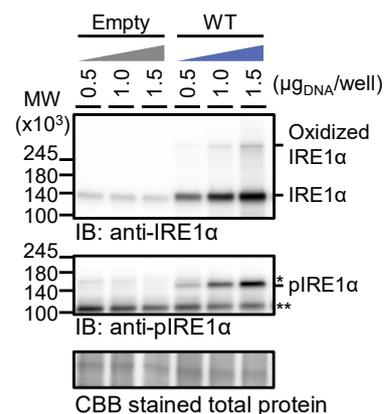


図 2. WB による IRE1 発現量依存的な自己リン酸化の検討

*, **: non-specific band

3. 新規レドックス試薬によるストレス低減の検討

1. および 2. の結果から、凝集体形成の抑制や分子間ジスルフィド結合の切断による酸化型 IRE1 の還元は、統合的に会合状態分布を低分子側に偏らせ、細胞内の IRE1 自己リン酸化頻度を減少されると考えられる。そこで、以前に開発した凝集体形成抑制活性およびジスルフィド結合触媒活性をもつレドックス低分子試薬 (Okada et al., 2019, 2021) と関連する化合物群について、IRE1 内腔ドメインの分子間ジスルフィド結合触媒、および細胞内のストレス低減の効果を持つかを検討した。

化合物群による IRE1 内腔ドメインの分子間ジスルフィド結合触媒効率を SDS-PAGE で検討し、高効率な分子を選抜した (データ省略)。化合物 A および B は、試験管内で凝集体形成抑制活性が検出された (データ省略)。これらの化合物が細胞内のストレス低減を行えるかどうかを、IRE1 下流で調節される BiP の発現量を指標として評価したところ、化合物 A は薬剤的なストレスを有意に低減させた (図 3)。これらの結果から、レドックス低分子試薬が、凝集体形成抑制および IRE1 内腔ドメインという二つの作用点で働き、IRE1 会合状態分布の下流シグナルを調節、ひいては細胞保護に働く可能性が示された。

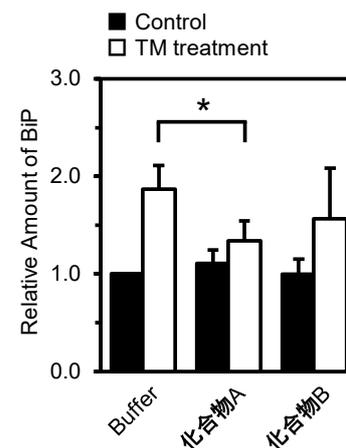


図 3. 分子シャペロン発現量を指標としたレドックス低分子試薬のストレス低減活性の評価

*: Control 群 (DMSO 処理) と化合物 A 処理群について、Welch の t 検定を行った。 $p = 0.046$; Hedges' $g = 1.9$ 。

【考察】

本研究から、 β 細胞のような分泌タンパク質の生合成を担う細胞において、IRE1 が会合状態分布の変動によってストレス因子量を統合的にシグナリングへと反映する分子機構の一旦が明らかになった。また、小胞体分子シャペロンと類似の活性を持つレドックス低分子試薬が、細胞内のストレスと IRE1 会合状態分布の両方を調節しうることを示唆された。低分子試薬に関する結果は、分子シャペロンの増加が β 細胞の状況を改善させること (Cadavez et al., 2014)、および分子間ジスルフィド結合を介して IRE1 のシグナリング調節を行うこと (Eletto et al., 2016) とよく一致している。2型糖尿病が進行する過程では、IRE1 や分子シャペロンによって調節されるストレス低減の仕組みが、高すぎるインスリン生合成の需要のために破綻すると考えられるが、本研究で開発するような薬剤は、細胞レベルでも分子シャペロンの働きを補完あるいは代替することが示唆され、 β 細胞保護に寄与しうる。今後より詳細な作用機構の解明や個体レベルの調査を行うことで、レドックスを新たな作用点とした糖尿病予防のための創薬基盤となることが期待される。

【謝辞】

二年間にわたる貴財団の助成に深謝申し上げます。また、共同研究者である東北大学 稲葉謙次教授 (現九州大学)、奥村正樹准教授、徳島大学 齋尾智英教授を始めとして、研究遂行にご支援頂いた全ての方に御礼申し上げます。

【参考文献】

- Cadavez, L., Montane, J., Alcarraz-Vizán, G., Visa, M., Vidal-Fàbrega, L., Servitja, J.M., and Novials, A. (2014). Chaperones Ameliorate Beta Cell Dysfunction Associated with Human Islet Amyloid Polypeptide Overexpression. *PLoS One* 9, e101797.
- Chang, T.-K., Lawrence, D.A., Lu, M., Tan, J., Harnoss, J.M., Marsters, S.A., Liu, P., Sandoval, W., Martin, S.E., and Ashkenazi, A. (2018). Coordination between Two Branches of the Unfolded Protein Response Determines Apoptotic Cell Fate. *Mol. Cell* 71, 629-636.e5.
- Eletto, D.D., Eletto, D.D., Boyle, S., and Argon, Y. (2016). PDIA6 regulates insulin secretion by selectively inhibiting the RIDD activity of IRE1. *FASEB J.* 30, 653-665.
- Hetz, C., and Papa, F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* 69, 169-181.
- Jang, I., Pottekat, A., Poothong, J., Yong, J., Lagunas-Acosta, J., Charbono, A., Chen, Z., Scheuner, D.L., Liu, M., Itkin-Ansari, P., et al. (2019). PDIA1/P4HB is required for efficient proinsulin maturation and β cell health in response to diet induced obesity. *Elife* 8.
- Lindholm, D., Korhonen, L., Eriksson, O., and Kōks, S. (2017). Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 48.
- Okada, S., Matsusaki, M., Arai, K., Hidaka, Y., Inaba, K., Okumura, M., and Muraoka, T. (2019). Coupling effects of thiol and urea-type groups for promotion of oxidative protein folding. *Chem. Commun.* 55, 759-762.
- Okada, S., Matsusaki, M., Okumura, M., and Muraoka, T. (2021). Conjugate of Thiol and Guanidyl Units with Oligoethylene Glycol Linkage for Manipulation of Oxidative Protein Folding. *Molecules* 26, 879.
- Pandhare, A., Stuebler, A.G., Pirayesh, E., and Jansen, M. (2019). A modified clear-native polyacrylamide gel electrophoresis technique to investigate the oligomeric state of MBP-5-HT3A-intracellular domain chimeras. *Protein Expr. Purif.* 153, 45-52.
- Tanikawa, Y., Kanemura, S., Ito, D., Lin, Y., Matsusaki, M., Kuroki, K., Yamaguchi, H., Maenaka, K., Lee, Y.-H., Inaba, K., et al. (2021). Ca²⁺ Regulates ERp57-Calnexin Complex Formation. *Molecules* 26, 2853.
- Tsuchiya, Y., Saito, M., Kadokura, H., Miyazaki, J.-I., Tashiro, F., Imagawa, Y., Iwawaki, T., and Kohno, K. (2018). IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells. *J. Cell Biol.* 217, 1287-1301.
- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529, 326-335.