

膵β細胞における小胞体ストレス応答分子の機能解析

群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット

岩脇 隆夫

1. はじめに

生き物がタンパク質を量的にも質的にも正しく作り出すことは生命活動においてとても重要なことである。このタンパク質は生物を構成する細胞内で mRNA の塩基配列情報をもとにリボソーム上でアミノ酸配列に変換されながら産生される。一般に量的な管理はその合成量と分解量とのバランスで調節されており、一方の質的な管理は分子シャペロンの働きによりなされている。はじめタンパク質は1次的につながったポリペプチド鎖の状態で作られるが、大抵の場合は合成されただけでは適切な構造をとることができず機能しないので、ほとんどのタンパク質は分子シャペロンの力を借りて機能的な構造を作り上げる。また分子シャペロンは一度成熟したタンパク質の品質管理にも働く。例えば生物または細胞が高温環境下に曝された場合、多くのタンパク質が熱変性を起こすが、このとき HSP70 などの分子シャペロン遺伝子が活性化されて、タンパク質の異常構造化を防止するように働く。HSP70 の働きにより品質を管理されるのは細胞質中のタンパク質であるが、タンパク質の全てが細胞質内で機能するのではなく、細胞外へ分泌されるものや細胞膜表面で機能するものも存在する。われわれのような高等真核生物では分泌タンパク質として抗体やホルモン、消化酵素などを作っているし、膜タンパク質として様々な受容体や接着分子を作っている。これら分泌タンパク質や膜タンパク質の合成や品質管理の少なくとも一部は小胞体とよばれる細胞膜で覆われた細胞内小器官で行われる。ゆえに小胞体内にも分子シャペロンが存在し、小胞体内に品質的に未熟なまたは異常なタンパク質が多く出現すると熱ショック時の HSP70 と同様に多くの小胞体分子シャペロンは発現誘導される。本研究のテーマに小胞体ストレスという言葉があるが、これは品質的に未熟なまたは異常なタンパク質のせいで小胞体に負荷がかかっている状態をいう。

細胞質中の分子シャペロンでも小胞体中の分子シャペロンでも遺伝子レベルでの発現誘導は核内で生じる。このことは小胞体内でのタンパク質の異常を感知し、核へと情報伝達する仕組みの存在を示しており、高等真核生物では IRE1、PERK、および ATF6 がその情報伝達に重要な機能を果たす。IRE1 は酵母菌からヒトに至るまで高度に保存された小胞体局在の I 型膜貫通タンパク質で、その小胞体内腔領域により小胞体ストレスを感知すると、二量体化・自己リン酸化を経て細胞質領域に持つ自身の RNase 能を活性化させる。これにより特異的な mRNA 基質（酵母菌の場合は HAC1、動物の場合は XBP1）のスプライソソーム非依存的なスプライシングを引き起こす。PERK は IRE1 と同じく小胞体局在の I 型膜貫通タンパク質であるが、その存在は酵母などの下等真核生物では知られていない。PERK がその小胞体内腔領域により小胞体ストレスを感知すると、多量体化を経て細胞質領域に持つ自身のキナーゼ能を活性化させ、自己リン酸化と共に eIF2 α のリン酸化も促進する。また、そのリン酸化を介した eIF2 α の不活性化は ATF4 の発現を促進する。ATF6 は小胞体に局在するが、IRE1 や PERK とは逆に II 型膜貫通タンパク質として存在する。そして、この ATF6 も酵母等の下等真核生物では見つかっていない。ATF6 はその小胞体内腔領域により小胞体ストレスを感知すると、ゴルジ体に移行し S1P や S2P とよばれるプロテアーゼによるプロセッシングを受ける。IRE1 により生じるスプライシング型の XBP1 や HAC1、PERK により発現誘導される ATF4、および ATF6 のプロセッシングで生じる約 50kDa 切断断片は転写因子として機能し小胞体分子シャペロン遺伝子の活性化を促す^{1,2)}。

小胞体ストレスの研究は酵母菌を用いて始まったが、前述した通り、小胞体ストレス応答分子はわれわれヒトに至る進化の過程で多様な発達を遂げており、きっとこれら分子には生物個体としての重要な生理機能があると考えられている。ゆえに現在までにノックアウトマウスなどを用いた研究も行われており、いくつかの生体機能レベルでの重要な知見が報告されている。例えば、ATF6 は全身で発現しており、ATF6 α と ATF6 β のダブルノックアウトマウスは胎生 8 日目まで死に至る³⁾。また、IRE1 α や XBP1 もやはり全身で発現しており、これらのノックアウトマウスは胎生 12 日目頃から死にはじめる^{4,5)}。これらのことから ATF6、IRE1、および XBP1 がマウス発生過程で重要な役割を持つことがわかる。さらに XBP1 では特異的な組織や細胞でのノックアウトマウスの解析が進んでおり、XBP1 が膵臓と唾液腺の消化酵素外分泌能や肝臓での脂質合成能に必要なことが報告されている^{6,7)}。一方、PERK も全身で発現が見られるが、膵臓では高レベルの発現状態で活性化状態である。そのノックアウトマウスは胎生致死とはならないが、生後早い時期に重篤な膵臓機能障害を引き起こし、血糖値調節や消化に異常を呈する⁸⁾。われわれはこれまでの研究で IRE1 α の活性を評価でき

るイメージング技術を開発し⁹⁾、IRE1 α が膵臓や胎盤で活性化状態にあることを見出した。本研究ではIRE1 α もPERKと同様に膵臓で重要な機能を有していると考え、IRE1 α のコンディショナルノックアウトマウスの作製し、その解析を行った。ちなみに試験管内の解析であるが、IRE1 α が膵臓ランゲルハンス島 β 細胞でのインスリン産生に関わることは示されている¹⁰⁾。

2. 方法と結果

マウス IRE1 α 遺伝子は 22 個のエクソンから成り立っており、20 と 21 番目のエクソンは IRE1 α の機能に重要な RNase ドメイン部分をコードしている。われわれはこれら 20 と 21 番目のエクソンを Cre 組換え酵素依存的に除去できる遺伝子組換えマウスを作製した。前述した通り、通常の IRE1 α ノックアウトマウスは胎生致死となるが、ここでの研究とは別に IRE1 α ノックアウトマウスの胎生致死の原因を究明する解析過程で、われわれは発生過程の胎盤での IRE1 α の重要性を見出し、胚体外の IRE1 α を正常に発現させられれば、生存可能な IRE1 α ノックアウトマウスを作出できることがわかった。胚体外組織では IRE1 α を正常に発現さし、それ以外の組織では IRE1 α を破壊するのに、われわれは Mox2^{+cre} マウスを用いた。Mox2^{+cre} マウスは Cre 組換え酵素を胚体外組織では発現しないが、それ以外の組織では発現する。実際、実験用マウスを得るために、われわれは Mox2^{+cre}; IRE1 α ^{+AR} マウス (オス) と Mox2^{+cre}; IRE1 α ^{Δ Neo/ Δ Neo} マウス (メス) の交配を行い、生まれてくる Mox2^{+cre}; IRE1 α ^{Δ Neo/ Δ AR} マウスを IRE1 α ノックアウトマウスとして、Mox2^{+cre}; IRE1 α ^{Δ Neo/ Δ AR} マウスをコントロールマウスとして用いた。それぞれはメンデルの法則に従って 25% の確率で得られた。

膵臓機能に障害が生じる PERK ノックアウトマウスは誕生から数週間後に血糖値の上昇と成長遅延が見られるので、われわれは作出した IRE1 α ノックアウトマウスに対して 4 から 16 週齢までの間で毎週一度の頻度で自由摂食時血糖値と体重の測定を行った。その結果、IRE1 α ノックアウトマウスはコントロールマウスに対してオスでもメスでも約 1 割体重が軽く、僅かではあるが、高血糖値傾向を示した。マウスが 20 週齢に達したとき解剖によって膵臓の大きさを比較してみたところ、IRE1 α ノックアウトマウスのはコントロールマウスのもに対して小さく、オスでは生重量で約半分に、メスでは 7 割になっていた。取り出した膵臓を組織学的に調べると、ヘマトキシリン・エオシン染色切片からは IRE1 α ノックアウトマウスの腺房組織での空胞化が目立った。加えて TUNEL 解析も行ったが、ここからは IRE1 α ノックアウトマウスとコントロールマウスとの間で有意な差は検出できなかった。現在、どの成長段階から膵臓の小型化や腺房組織の空胞化が起こるのか調査中である。また、膵臓腺房組織で合成・分泌される消化酵素のひとつアミラーゼ量も全膵臓単位で腺房組織での空胞化が目立つ 20 週齢で IRE1 α ノックアウトマウスのはコントロールマウスのもので比較してみたが、有意な差は検出できなかった。先に述べた通り、自由摂食時 IRE1 α ノックアウトマウスは高血糖値傾向を示した。そこで糖負荷に対して IRE1 α ノックアウトマウスの血糖値と血中インスリン濃度がどのように変動するのか? コントロールマウスと比較してみた。血糖値に関し、IRE1 α ノックアウトマウスはコントロールマウスに対してオスでもメスでも糖負荷後のピークは 100mg/dl ほど高く、糖負荷後 2 時間の範囲で見限り、その差はほとんど変わらなかった。血中インスリン濃度に関しても IRE1 α ノックアウトマウスはコントロールマウスに対してオスでもメスでも糖負荷後のピークは 3~4 割低かった。そこでインスリン量を全膵臓単位で IRE1 α ノックアウトマウスのはコントロールマウスのもので比較してみたが、有意な差は検出できなかった。今回の研究でやはり IRE1 α も膵臓の機能に必要な分子であることがわかったが、その作用メカニズムや活性化の機構はまだ全くはっきりしない。今後は IRE1 α ノックアウトマウスだけでなく、XBP1 の遺伝子改変マウスも作製・解析し、IRE1 α と XBP1 が膵臓で機能する仕組みを分子生物学的に明らかにしていきたいと考えている。

3. 考察とまとめ

小胞体ストレスは様々な疾患との関連性が報告されており、小胞体ストレスに関連する分子の *in vivo* での機能は重要なトピックスである。しかし IRE1 α の場合、KO マウスは胎生致死となってしまいうため、成体マウスにおける機能解析は遅れていたが、今回コンディショナル KO の手法を使うことで、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞におけるインスリン分泌で IRE1 α が必須の役割をもつことを示した。

今回の研究では β 細胞中のインスリタンパク質の量は IRE1 α を欠損した場合でもコントロールと同様であった。おそらく IRE1 α 欠損 β 細胞でもインスリンは正常な発現レベルにあると考えられる。ゆえに糖負荷時に IRE1 α ノックアウトマウスで血中インスリン量の上昇レベルが低かったのはインスリン分泌に問題が生じているからかもしれない。インスリンは合成から分泌までの過程で小胞体での正常なフォールディング/S-S 結合などの修飾を施さなければ、品質管理機能に引っかか

り、分泌経路に乗ることはできない。IRE1 α はもしかすると小胞体でのインスリンの成熟過程に、シャペロンやジスルフィドイソメラーゼ等の発現誘導を行うことで、おそらく間接的に、関与しているのかもしれない。一方、IRE1 α のインスリンへの影響として過去の *in vitro* の解析から IRE1 α の抑制は XBP1 には依存せず翻訳レベルでの低インスリン合成を引き起こすこと、インスリン分泌にはほとんど影響しないこと、そして慢性的高グルコース環境下で生じるインスリン mRNA 分解を抑えることを浦野研究グループは報告している。しかし我々の今回の解析ではそれらを支持するような結果は得られなかった。浦野グループらと同様に単離したランゲルハンス島を用いて詳しく実験を行いたいところであるが、今回用いた IRE1 α 欠損マウスは理論上 25%の確率でしか誕生しないため、性別や週齢をそろえたマウスからのランゲルハンス島の単離は難しい。そこで将来的に我々はランゲルハンス島 β 細胞特異的に IRE1 α を欠損させたマウスを作製し、ランゲルハンス島 β 細胞における IRE1 α のインスリン生合成に関する機能をより特化したカタチで解析を進める必要がある。一方、XBP1 コンディショナルノックアウトマウスの解析では膵臓ランゲルハンス島の形態やインスリンおよびグルカゴンの発現量に異常は見られなかったことや XBP1 $^{+/-}$ マウスは高血糖傾向にあることが報告されている。しかし、インスリン生合成や分泌、血糖値調節という点で IRE1 α や XBP1 がどのように機能しているのか未だにはっきりしない。つまり、IRE1 α や XBP1 は同一経路上で機能するのか？独立に機能するのか？わかっていない。これらの問題に対して、我々は XBP1 の活性型を発現させたマウスの作製が重要になると考えている。このマウスと IRE1 α および XBP1 それぞれのノックアウトマウスとの交配でインスリン生合成や分泌、および血糖値調節などの表現型解析を行えば、これらの問題における IRE1 α と XBP1 の機能的関連性についてより有用な手がかりを得ることができると考えている。

4. 発表論文、参考文献など

- 1) Ron D, Walter P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-29, 2007.
- 2) Malhotra JD, Kaufman RJ: The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18: 716-31, 2007.
- 3) Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K: Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell* 13: 365-76, 2007.
- 4) Reimold AM, Etkin A, Clauss I, Perkins A, Friend DS, Zhang J, Horton HF, Scott A, Orkin SH, Byrne MC, Grusby MJ, Glimcher LH: An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev* 14: 152-7, 2000.
- 5) Zhang K, Wong HN, Song B, Miller CN, Scheuner D, Kaufman RJ: The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* 115: 268-81, 2005.
- 6) Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH: XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J* 24: 4368-80, 2005.
- 7) Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH: Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320:1492-6, 2008.
- 8) Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D: Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk* $^{-/-}$ mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7: 1153-63, 2001.
- 9) Iwawaki T, Akai R, Kohno K, Miura M: A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* 10: 98-102, 2004.
- 10) Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, Rossini AA, Urano F: Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4: 245-54, 2006.