

膵島  $\beta$  細胞における小胞体ストレスセンサーIRE1  $\alpha$  の  
阻害剤をもちいた機能解析

佐藤 仁美

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学研究室

(河野 憲二 教授)

平成 29 年 3 月 15 日提出

## 目次

略語 .....	3
序論 .....	4
材料と方法 .....	7
豚島 $\beta$ 細胞 .....	7
細胞培養 .....	7
プラスミドおよびプライマー .....	7
<i>XBPI</i> mRNA のスプライシング .....	7
抗体 .....	8
IRE1 $\alpha$ のリン酸化 .....	8
PDI ファミリーの mRNA 発現量 .....	9
PDI ファミリーのタンパク質発現量 .....	9
インスリン分泌量の測定 .....	10
インスリン合成量 .....	11
インスリン成熟度 .....	11
細胞内 ATP 量の測定 .....	12
結果 .....	13
IRE1 $\alpha$ の阻害剤 4 $\mu$ 8C は IRE1 $\alpha$ の RNase 活性のみを阻害する .....	13
4 $\mu$ 8C による IRE1 $\alpha$ 阻害により PDI ファミリーの発現量が低下する .....	13
IRE1 $\alpha$ 阻害により 2 時間以内でインスリン分泌が抑制される .....	14
IRE1 $\alpha$ 阻害はインスリンの合成および成熟へ影響しない .....	14
IRE1 $\alpha$ 阻害により 5 分以内にインスリン分泌が抑制される .....	15
IRE1 $\alpha$ ノックアウト細胞において 4 $\mu$ 8C はインスリンの分泌を抑制する .....	16
4 $\mu$ 8C はインスリン放出過程において細胞内 ATP 量を減少させる .....	16
考察 .....	18
図表 .....	20
謝辞 .....	46
参考文献 .....	47

## 略語

4  $\mu$  8C : 4-methyl umbelliferone 8-carbaldehyde

ATF6 : activating transcription factor-6

BiP : immunoglobulin heavy chain-binding protein

ER : endoplasmic reticulum

ERAD : ER associated protein degradation

Hsp70 : heat shock protein 70

IRE1  $\alpha$  : inositol-requiring enzyme-1  $\alpha$

MINS : mouse insulinoma

PC : prohormone convertase

PDI : protein disulfide isomerase

PERK : protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase

RIDD : regulated IRE1-dependent decay

## 序論

我々の体内では食事や薬の副作用などで血糖値が上昇する。インスリンは、筋肉や脂肪組織をはじめ全身でのグルコース取り込みを促し、血糖値を下げる作用をもつ唯一のホルモンとして知られている。このインスリンの分泌を担うのが膵島β細胞であり、膵島β細胞の機能低下および細胞死は、恒常的な高血糖、つまり糖尿病を引き起こす。膵島β細胞では、常にインスリン分泌顆粒が蓄えられており、グルコース濃度に応答しインスリンの合成および分泌顆粒からの放出をおこなう (図 1. A)。インスリンは、膵島β細胞において前駆体であるプレプロインスリンとして翻訳され、小胞体内でシグナルペプチドの切断を受けプロインスリンとなる。プロインスリンは、小胞体内でジスルフィド結合を形成し折りたたまれた後ゴルジ体を経由し分泌顆粒に格納され、prohormone convertase (PC) 1/3、PC2 により C ペプチドの切断を受けインスリンへと成熟する (Smeekens SP. et al., 1992) (図 1. B)。また、膵島β細胞はグルコース輸送体である GLUT2 からグルコースを取り込み、ミトコンドリアでの ATP 産生を促すことで、スルホニル尿素受容体 SUR1 および KIR6.2 から構成される ATP 感受性カリウムチャネルを閉じ細胞外へのカリウム流出を止める (Aguilar-Bryan L. et al., 1995; Frances M., 2005)。これにより脱分極が起こることで、電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウムの細胞内流入が促進し、インスリンが分泌顆粒から細胞外へと放出される (Gilon P. et al., 1993) (図 1. C)。

小胞体は、細胞内において分泌タンパク質や膜タンパク質の合成を担っており、インスリンも小胞体膜上で翻訳と共役して合成される(cotranslational translocation)タンパク質である。通常、分泌タンパク質や膜タンパク質は、N 結合型糖鎖や protein disulfide isomerase (PDI) ファミリーによって形成されるジスルフィド結合などの翻訳後修飾を受けながら、シャペロンの助けにより正常に折りたたまれる。正しくフォールディングしたタンパク質はゴルジ体を経由し最終目的地へと運ばれる。しかし、外的内的なストレスにより、小胞体内に送り込まれた新生鎖が、正しく折りたたまれず、構造異常を生じた場合には、生じた構造異常タンパク質は小胞体の品質管理機構 (ER quality control) により小胞体内に留められることが知られている。また、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積すると、凝集体を形成し小胞体の機能を低下させることがわかっており、このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞には小胞体ストレスに対処するため、「小胞体ストレス応答」と呼ばれる機構が備わっている (図 2)。哺乳動物細胞には、主要な小胞体ストレスセンサーとして protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK)、activating transcription factor-6 (ATF6)、および inositol-requiring enzyme-1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) の3つが知られている。これら3つのストレス

センサーは以下に示すようにタンパク質の翻訳抑制、小胞体シャペロンや小胞体関連分解 (ERAD; ER associated protein degradation) 因子の転写誘導などを通じて小胞体ストレスの解消を促す (Ron D. et al., 2007)。PERK は I 型の膜貫通タンパク質であり、通常は Hsp70 ファミリーに属する小胞体シャペロンである immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP)との結合により単量体で存在することでその活性を制御されているが、小胞体ストレス条件下では BiP は構造異常タンパク質へと結合する (Bertolotti A. et al.,2000)。それにより、PERK は多量体形成および自身が細胞質ゾル側にもつキナーゼドメインにより自己リン酸化をおこない、活性化状態となる。活性化した PERK は eIF2  $\alpha$  をリン酸化することで不活性化し mRNA の翻訳抑制を促す (Harding HP. et al., 1999)。ATF6 は II 型の膜タンパク質であり、通常は小胞体内腔側にもつゴルジ体輸送シグナルが BiP の結合により遮蔽されることで小胞体膜上に局在している。そのため、小胞体ストレス条件下で BiP が解離すると、ゴルジ体へと輸送され切断されることで細胞質側ゾルにもつ転写因子を遊離させる (Yoshida H. et al., 1998; Ye J. et al., 2000)。それにより、小胞体シャペロンや他の標的因子の転写を誘導する。IRE1  $\alpha$  は I 型の膜タンパク質であり、細胞質ゾル側にキナーゼドメインおよび RNase ドメインをもつ。PERK と同様、通常は BiP との結合により単量体で存在することでその活性を制御されているが、小胞体ストレス条件下では BiP が解離するため、多量体を形成し自己リン酸化をおこなう (Bertolotti A. et al.,2000; Okamura K. et al., 2000)。それにより RNase ドメインが活性化し、細胞質ゾルで標的因子である *XBPlu* mRNA の特殊スプライシングをおこなう (Yoshida H. et al., 2001; Calfon M. et al., 2002)。スプライシングを受けた *XBPls* mRNA は、活性をもった転写因子として翻訳され、小胞体シャペロンや ERAD 因子の転写を誘導する。また、IRE1  $\alpha$  は regulated IRE1-dependent decay (RIDD) と呼ばれる過程により、膜タンパク質や分泌タンパク質をコードする mRNA を直接切断することで、小胞体でのタンパク質発現を抑制することも報告されている (Hollien J. et al., 2009)。

膵臓では他の組織に比べ PERK や IRE1  $\alpha$  の発現量が多いことが確認されている (Shi Y. et al., 1998; 本研究室新井布美子修士論文参照)。PERK は、膵島  $\beta$  細胞の分化や、低グルコース条件下での翻訳を抑制することでグルコース刺激に応じたタンパク質合成の調節に関与するなど、その機能性を維持するために必須であることが知られている (Zhang W. et al., 2006; Gomez E. et al., 2004)。さらに、PERK のノックアウト (KO) マウスでは、膵島  $\beta$  細胞の細胞死が誘導されることにより糖尿病を発症することが報告されている (Harding HP. et al., 2001)。このように、近年、膵島  $\beta$  細胞の機能低下や細胞死に小胞体ストレスが密接に関与していることが明らかになりつつある (Harding HP. et al., 2002; Back SH. et al., 2012; Hetz C. et al., 2013)。また、当研究室の先

行研究により、マウスの膵臓、特にランゲルハンス島では生理的条件下で IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路が活性化していることが明らかになった (Iwawaki T. et al., 2004; 本研究室新井布美子修士論文参照)。さらに、膵島  $\beta$  細胞特異的に IRE1  $\alpha$  を欠損させたコンディショナルノックアウト (cKO) マウスでは、生後 12 週齢から血糖値の上昇、20 週齢では血中インスリン濃度の低下、すなわち糖尿病様症状が観察された。このとき、膵島の大きさには差が認められなかったことから、膵島  $\beta$  細胞の機能低下によりインスリン分泌量が低下したことが考えられた。そこで、当研究室では、Cre-loxP システムにより IRE1  $\alpha$  の主要機能を担う RNase ドメインを欠損させることができる膵島  $\beta$  細胞株を樹立し、IRE1  $\alpha$  の詳細な機能解析をおこなった。その結果、IRE1  $\alpha$  KO 細胞ではインスリン分泌量の低下および PDI ファミリーの発現量低下が確認された。このことから、IRE1  $\alpha$  が PDI ファミリーの転写誘導を介しプロインスリンのジスルフィド結合形成を促すことで、その折り畳み能を維持していることが明らかになった (Tsuchiya Y. et al., 2016; Tsuchiya Y. et al., 投稿準備中)。しかし、これまでの過去の研究はすべて IRE1  $\alpha$  をノックアウトした後、一週間から数週間経過してから解析されたものであり、酸化ストレス応答や他の小胞体ストレス応答経路である ATF6 や PERK 経路の代償的活性化などが確認されており (Hassler JR. et al., 2015)、インスリン分泌過程における IRE1  $\alpha$  の直接的な働きを解析できていない。そこで、本研究では IRE1  $\alpha$  の機能阻害による影響をいち早く解析するため、IRE1  $\alpha$  の RNase ドメイン特異的阻害剤を用いることにした。

4-methyl umbelliferone 8-carbaldehyde ( $4 \mu$  8C) は、IRE1  $\alpha$  の RNase ドメイン特異的阻害剤として同定された小分子化合物である (Cross BC. et al., 2012) (図 3. A)。IRE1  $\alpha$  はその活性化の過程から、ヌクレオチド結合ポケット、ダイマー形成により生じる疎水性ポケットおよび RNase 活性部位の 3 箇所が阻害剤結合部位の候補として考えられていたが (Korennykh AV. et al., 2011; Wiseman RL. et al., 2010)、 $4 \mu$  8C は IRE1  $\alpha$  の RNase 活性部位である K907 に共有結合し、その可動性を制限することで RNase 活性を阻害することが確認された (Cross BC. et al., 2012) (図 3. B)。また、もう 1 つの阻害剤として  $4 \mu$  8C と同様サリチルアルデヒドを有する STF-083010 も用いることとした (図 3. A)。

本研究は、これら IRE1  $\alpha$  の RNase 特異的阻害剤を用いて、これまでの IRE1  $\alpha$  の遺伝子破壊では明らかにすることができなかった膵島  $\beta$  細胞における IRE1  $\alpha$  の機能を解析する目的でおこなった。

## 材料と方法

### 膵島β細胞

本研究では、Cre-loxP システムにより小胞体ストレスセンサーIRE1αのRNaseドメインをノックアウトすることができるマウスインスリノーマ (MIN6 (*Irel* α<sup>fl/fl</sup>)) 細胞を野生型の膵島β細胞としてもちいた。また、アデノウイルス感染により Cre を発現させた細胞 (MIN6 (*Irel* α<sup>ΔR/ΔR</sup>)) を IRE1α ノックアウト (KO) 細胞とし、コントロールにはアデノウイルスにより GFP を発現させた細胞をもちいた。本研究にもちいた MIN6 は、膵島β細胞における IRE1α の機能を解析するため当研究室の土屋雄一氏により樹立された (Tsuchiya Y. et al., 2016)。

### 細胞培養

膵島β細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養し、培地は DMEM (4.5 g/l glucose、ナカライ) をもちいた。培地には 15% FBS、55 μM 2-mercaptoethanol、100 U/ml penicillin および 100 μg/ml streptomycin を添加した。

### プラスミドおよびプライマー

XBPI のスプライシングを確認する際のコントロールとして、当研究室の増田尚代氏が構築した以下のプラスミドをもちいた。

pcDNA3.1(+) mXBPI unspliced form および pcDNA3.1(+) mXBPI spliced form

また、RT-PCR あるいは qRT-PCR には以下のプライマーをもちいた。

<RT-PCR>

5'- GAGAACCAGGAGTTAAGAACACG-3' および

5'- GAAGATGTTCTGGGGAGGTGAC-3'

<qRT-PCR>

PDI; 5'-ACCTGCTGGTGGAGTTCTATG-3' および 5'-CGGCAGCTTTGGCATACT-3'

PDIR; 5'-AAGTGCGAGGCCACATTG-3' および

5'-TGTTCTCGAACTCTGATGGGTA-3'

ERp46; 5'-CTGCAGACACTGAACGAGGA-3' および

5'-TCATACAACCCCTGTTTGAGC-3'

β-actin; 5'-ATGGATGACGATATCGCT-3' および 5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3'

### XBPI mRNA のスプライシング

膵島β細胞を 4.0 x 10<sup>6</sup> cells/well で 6-well プレートに播種し上記の DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、DMSO あるいは図に示した濃度での 4

$\mu$  8C 処理を 5 時間おこない、続く 1 時間は引き続き DMSO あるいは  $4 \mu$  8C で処理すると同時に 1 mM DTT で処理した。その後、RNAiso Plus (TaKaRa) をもちいて RNA 抽出をおこない、上記のプライマーにより RT-PCR をおこなった。PCR 産物は 5% のアクリルアミドゲルおよび 1x TBE をもちいて電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色し LAS 4000 (GE Healthcare) で検出した。(図 1. A および図 11)

膵島  $\beta$  細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer (115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM HEPES, 2 mg/ml BSA) で 3 回洗浄し、低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO あるいは  $64 \mu$  M  $4 \mu$  8C を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に培地交換し図に示した時間培養した後、各サンプルから RNA を抽出し上記のプライマーをもちいて RT-PCR をおこなった。PCR 産物は 7.5% アクリルアミドゲルおよび 1x TBE をもちいて電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色し Gel Doc XR+ (BIO RAD) で検出した。(図 10. A)

## 抗体

### <一次抗体>

rabbit 抗 IRE1  $\alpha$  (14C10) 抗体 (Cell Signaling Technology) (Signal Enhancer HIKARI (ナカライ) で 1000 倍希釈)

mouse 抗 PDI (M5/3H-1) 抗体 (当研究室において都留秋雄博士が作製) (5 % BSA/TBST で 1000 倍希釈)

mouse 抗 PDIR (B-9) 抗体 (Santa Cruz) (5 % BSA/TBST で 100 倍希釈)

rabbit 抗  $\beta$ -Actin (13E5) 抗体 (Cell Signaling Technology) (5 % BSA/TBST で 1000 倍希釈)

### <二次抗体>

goat 抗 Rabbit IgG-HRP (MBL)

goat 抗 Mouse IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch)

## IRE1 $\alpha$ のリン酸化

膵島  $\beta$  細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、DMSO あるいは  $64 \mu$  M  $4 \mu$  8C 処理を 5.5 時間おこない、続く 30 分間は引き続き DMSO あるいは  $64 \mu$  M  $4 \mu$  8C で処理すると同時に 3 mM DTT で処理した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0 % Triton X-100, 0.5 % DOC, 0.1 % SDS, 50 mM Tris (pH8.0), 1 % protease inhibitor cocktail (ナカライ),  $10 \mu$  M MG132, 1 mM PMSF) を加えライセートを調整し、

Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質定量をおこなった。ライセートに 4x sample buffer を加え 5 % 2-mercaptoethanol での処理および 98°C、10 分間の熱変性処理をおこなった。サンプルは、100  $\mu$  M MnCl<sub>2</sub> および 12.5  $\mu$  M Phos-tag を含む 4.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルおよび running buffer (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1 % SDS) をもちいて電気泳動により分離し、blotting buffer (Anode I ; 300 mM Tris、Anode II ; 25 mM Tris、Cathode; 25 mM Tris、40 mM 6-amino-capronicacid) をもちいて Immobilon-P PVDF (Millipore) に転写した。5 % skim milk/TBST で室温、1 時間あるいはそれ以上のブロッキングをおこない、一次抗体は 4°C で一晩反応させ、二次抗体は室温で 1 時間反応させた後、Clarity Western ECL Substrate (BIO RAD) および LAS4000 (GE Healthcare) により IRE1  $\alpha$  を検出した。

#### PDI ファミリーの mRNA 発現量

膵島  $\beta$  細胞を  $3.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、翌日 DMSO あるいは 64  $\mu$  M 4 $\mu$  8C を含む培地に培地交換をおこなった。その 2 日後にも同様の操作をおこない、さらに 2 日後、RNAiso Plus (TaKaRa) をもちいて RNA を抽出し、LightCycler480 (Roche) および PDI、PDIR、ERp44 あるいは  $\beta$ -actin のプライマーをもちいて qRT-PCR をおこなった。

#### PDI ファミリーのタンパク質発現量

膵島  $\beta$  細胞を  $3.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、翌日 DMSO あるいは 64  $\mu$  M 4 $\mu$  8C を含む培地に培地交換をおこなった。その 2 日後にも同様の操作をおこない、さらに 2 日後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、lysis buffer (2 % SDS、100 mM Tris-HCl (pH6.8)、1 % protease inhibitor cocktail (ナカライ)、10  $\mu$  M MG132、1 mM PMSF) を加えライセートを調整し、Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質定量をおこなった。ライセートに 4x sample buffer を加え 10% 2-mercaptoethanol での処理および 98°C、10 分間の熱変性処理をおこなった。サンプルは NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen) および NuPAGE MES SDS running buffer (50 mM MES、50 mM Tris、0.1 % SDS、1 mM EDTA) をもちいて電気泳動により分離し、blotting buffer (Anode I ; 300 mM Tris、Anode II ; 25 mM Tris、Cathode; 25 mM Tris、40 mM 6-amino-capronicacid) をもちいて Immobilon-P PVDF (Millipore) に転写した。5 % skim milk/TBST で室温、1 時間あるいはそれ以上のブロッキングをおこない、一次抗体は 4°C で一晩反応させ、二次抗体は室温で 1 時間反応させた後、Clarity Western ECL Substrate (BIO RAD) および LAS4000 (GE Healthcare) により PDI、PDIR および  $\beta$ -actin を検出した。

## インスリン分泌量の測定

膵島  $\beta$  細胞を  $8.0 \times 10^6$  cells/6 cm dish で播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer (115 mM NaCl、5.9 mM KCl、1.2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、25 mM  $\text{NaHCO}_3$ 、10 mM HEPES、2 mg/ml BSA) で 3 回洗浄し、DMSO、64  $\mu\text{M}$  4  $\mu\text{M}$  8C あるいは 150  $\mu\text{M}$  STF-083010 を含む低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO、64  $\mu\text{M}$  4  $\mu\text{M}$  8C あるいは 150  $\mu\text{M}$  STF-083010 を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に培地交換し、図に示した時間において一部培地を回収した。その培地に含まれるインスリンを ELISA キット (レビスインスリン-マウス T、シバヤギ) により測定し、培地全体に含まれる総インスリン量を計算した。また、最終時点における培地を回収後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、lysis buffer (2% SDS、100 mM Tris-HCl (pH6.8)、1% protease inhibitor cocktail (ナカライ)、1 mM PMSF) を加えライセートを調整した。このライセートで Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク質量をおこない、総タンパク質量を計算した。これらの値をもちいて、総タンパク質量における培地中の総インスリン量を求め、インスリン分泌量とした。(図 6)

膵島  $\beta$  細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer で 3 回洗浄し、低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO あるいは 64  $\mu\text{M}$  4  $\mu\text{M}$  8C を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に培地交換し、図に示した時間において一部培地を回収した。以降、上記と同様の手順によりインスリン分泌量を求めた。(図 8)

8 週齢のマウス (C57BL/6Jcl、オス) から膵島を単離し、40-50 islets/well で 6-well トランズウェルに播種し、15% FBS、55  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol、100 U/ml penicillin および 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin を添加した DMEM (1g/l glucose、Gibco) で培養した。翌日、KRBH buffer で 3 回洗浄し、低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO あるいは 64  $\mu\text{M}$  4  $\mu\text{M}$  8C を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に培地交換し、図に示した時間において培地の回収および交換をおこなった。以降、上記と同様の手順によりインスリン分泌量を求めた。(図 9)

アデノウイルス未処理の野生型、GFP コントロールあるいは IRE1  $\alpha$  KO の膵島  $\beta$  細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer で 3 回洗浄し、低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO あるいは 64  $\mu\text{M}$  4  $\mu\text{M}$  8C を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に培地交換し、図に示した時間において一部培地を回収した。以降、上記と同様の手順によりインスリン分泌量を求めた。(図 12)

膵島β細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer で 3 回洗浄し、低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  および 60 mM KCl を含む低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) に培地交換し、図に示した時間において一部培地を回収した。以降、上記と同様の手順によりインスリン分泌量を求めた。(図 13)

### インスリン合成量

膵島β細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、低グルコース (1.67 mM glucose/KRBH) 条件下でのインスリン合成量を調べるために、KRBH buffer (115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM HEPES, 2 mg/ml BSA) で 3 回洗浄し、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  を含む低グルコース培地で 1 時間培養した後、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  および  $110 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys を含む低グルコース培地に培地交換し 30 分間のパルスをおこなった。また、高グルコース (16.7 mM glucose/KRBH) 条件下でのインスリン合成量を調べるために、KRBH buffer で 3 回洗浄し、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  を含む低グルコース培地で 2 時間培養した後、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  および  $110 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys を含む高グルコース培地に培地交換し 30 分間のパルスをおこなった。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、lysis buffer (2 % SDS, 100 mM Tris-HCl (pH6.8), 1 % protease inhibitor cocktail (ナカライ),  $10 \mu\text{M}$  MG132, 1 mM PMSF) を加えライセートを調整し、Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質定量をおこなった。ライセートに 4x sample buffer を加え 10% 2-mercaptoethanol での処理および  $98^\circ\text{C}$ 、10 分間の熱変性処理をおこなった。サンプルは NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen) および NuPAGE MES SDS running buffer (50 mM MES, 50 mM Tris, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA) をもちいて電気泳動により分離した。ゲルを乾燥させ、IP プレートに密着させた後、BAS2500 (FujiFilm) により放射活性を検出した。

### インスリン成熟度

膵島β細胞を  $4.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer (115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM HEPES, 2 mg/ml BSA) で 3 回洗浄し、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  を含む低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した後、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  および  $110 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に

培地交換し 15 分間のパルスをおこなった。その後、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  のみを含む高グルコース培地に培地交換し、図に示した時間でチェイスをおこなった。細胞は、PBS で 2 回洗浄し、lysis buffer (2 % SDS、100 mM Tris-HCl (pH6.8)、1 % protease inhibitor cocktail (ナカライ)、 $10 \mu\text{M}$  MG132、1 mM PMSF) を加えライセートを調整し、Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質定量をおこなった。ライセートに 4x sample buffer を加え 10% 2-mercaptoethanol での処理および  $98^\circ\text{C}$ 、10 分間の熱変性処理をおこなった。サンプルは NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen) および NuPAGE MES SDS running buffer (50 mM MES、50 mM Tris、0.1 % SDS、1 mM EDTA) をもちいて電気泳動により分離した。ゲルを乾燥させ、IP プレートに密着させた後、BAS2500 (FujiFilm) により放射活性を検出した。

#### 細胞内 ATP 量の測定

膵島  $\beta$  細胞を  $2.0 \times 10^6$  cells/well で 6-well プレートに播種し DMEM 培地で培養し、3 日後に培地交換をおこなった。翌日、KRBH buffer (115 mM NaCl、5.9 mM KCl、1.2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、25 mM  $\text{NaHCO}_3$ 、10 mM HEPES、2 mg/ml BSA) で 3 回洗浄し、低グルコース培地 (1.67 mM glucose/KRBH) で 2 時間培養した。その後、DMSO あるいは  $64 \mu\text{M}$   $4 \mu\text{M}$   $8\text{C}$  を含む高グルコース培地 (16.7 mM glucose/KRBH) に培地交換し、図に示した時間培養した後、細胞を KRBH buffer で 2 回洗浄し、Passive Lysis Buffer (Promega) を加えライセートを調整し、Pierce BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク質定量をおこない、また『細胞の』ATP 測定試薬 (TOYO INK) および TriStar<sup>2</sup> LB942 (Berthold) によりライセート中の ATP を測定した。

## 結果

### IRE1 $\alpha$ の阻害剤 4 $\mu$ 8C は IRE1 $\alpha$ の RNase 活性のみを阻害する

IRE1 $\alpha$  の RNase ドメイン阻害剤 4 $\mu$ 8C が、IRE1 $\alpha$  の RNase 活性をどの程度阻害するのかについて、*XBPI* mRNA のスプライシングを定量することにより調べた。*XBPI* mRNA のスプライシングの程度は、*XBPIu* および *XBPIs* の総量あたりに占める *XBPIs* の割合で見ることとした。膵島 $\beta$ 細胞においては、通常培養条件下においても *XBPI* のスプライシングが 15%の割合で起こっていたが、64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8C で 6 時間処理すると、そのスプライシングが約 2%にまで抑えられた。また、1 mM DTT を添加し細胞に強制的にストレスを与えたところ、4 $\mu$ 8C 未処理の細胞では、*XBPI* mRNA のスプライシングが 67%にまで上昇したが、64  $\mu$ M の 4 $\mu$ 8C 処理をした細胞では、ストレスにより誘導される *XBPI* mRNA のスプライシングは 19%のほぼ対照レベルまでしか上昇せず、ストレス条件下においても 64 $\mu$ M の濃度で 4 $\mu$ 8C が IRE1 $\alpha$  の RNase 活性をほぼ完全に抑えていることがわかった (図 4. A および B の lane 1 と 4)。以降、4 $\mu$ 8C は 64 $\mu$ M で使用することとした。次に、IRE1 $\alpha$  の RNase ドメイン阻害剤である 4 $\mu$ 8C による IRE1 $\alpha$  の RNase 活性阻害が、IRE1 $\alpha$  のもう一つの機能であるキナーゼ活性を阻害することによるものではないのかを調べた。4 $\mu$ 8C 未処理の膵島 $\beta$ 細胞において、3 mM DTT でストレスを与えたところ、IRE1 $\alpha$  がリン酸化していることが確認された。また、4 $\mu$ 8C 処理をした細胞においても同様に、ストレス条件下において IRE1 $\alpha$  のリン酸化が促進されることがわかった (図 4. C)。これらの結果から、4 $\mu$ 8C が IRE1 $\alpha$  の RNase 活性のみを阻害する IRE1 $\alpha$  阻害剤として機能することが確認された。

### 4 $\mu$ 8C による IRE1 $\alpha$ 阻害により PDI ファミリーの発現量が低下する

先行研究により、IRE1 $\alpha$  の RNase ドメインを欠損させた IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞において小胞体内でジスルフィド結合の形成を担う PDI ファミリーの発現量低下が確認されていた。しかし、これまでの研究では IRE1 $\alpha$  のノックアウトを行うために、Cre recombinase をもつアデノウイルスの感染により行っていたため、細胞を長期間培養する必要があり、その解析まで 1 週間以上かかっていた。もっと短時間で IRE1 $\alpha$  の活性を阻害し、同様な結果が得られるかどうかを調べることは重要である。そのため、4 $\mu$ 8C による IRE1 $\alpha$  の RNase 活性阻害でも IRE1 $\alpha$  ノックアウトと同様な結果が得られるかどうか検討した。まず、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞において発現量低下が確認されている PDI、PDIR および ERp44 について、膵島 $\beta$ 細胞を 4 $\mu$ 8C により処理した時間と mRNA 発現量の関係を調べた。その結果、PDI、PDIR および ERp44 すべてにおいて、mRNA 発現量は 4 $\mu$ 8C 処理後 2 日目には低下することが明らかになった (図 5. A)。次に、PDI および PDIR について、膵島 $\beta$ 細胞を 4 $\mu$ 8C により処理した時

間とタンパク質発現量の変化を調べた。その結果、PDI では  $4\mu\text{8C}$  処理後 4 日目、PDIR では  $4\mu\text{8C}$  処理後 2 日目にはタンパク質発現量が低下する傾向にあることがわかった (図 5. B および C)。これらの結果は、 $4\mu\text{8C}$  をもちいることで、ノックアウトよりも早い時期に IRE1 $\alpha$  阻害による影響を調べられることを示している。すなわち、 $4\mu\text{8C}$  を利用することでより直接的な IRE1 $\alpha$  の機能解析が可能になることが考えられた。

#### IRE1 $\alpha$ 阻害により 2 時間以内でインスリン分泌が抑制される

上の結果から、 $4\mu\text{8C}$  での IRE1 $\alpha$  阻害による PDI ファミリーのタンパク質発現量低下までは数日を要することがわかった。しかし、 $4\mu\text{8C}$  処理により IRE1 $\alpha$  の RNase 活性は 6 時間以内ですでに阻害されていることも示された。そのため、私は、IRE1 $\alpha$  が膵島  $\beta$  細胞において PDI ファミリーを介さない経路で他の役割を担っているなら、IRE1 $\alpha$  の活性阻害から PDI ファミリーの発現量低下が認められるまでも、膵島  $\beta$  細胞の機能に何らかの影響が見られるのではないかと考えた。そこで、IRE1 $\alpha$  阻害が、膵島  $\beta$  細胞の重要な機能である高グルコース刺激に応じたインスリンの分泌に影響するのかを調べた。その結果、 $4\mu\text{8C}$  未処理の細胞では、低グルコース (1.67 mM) から高グルコース (16.7 mM) 条件に変えると、時間経過 (2 時間から 8 時間) に比例してインスリン分泌量が上昇することがわかった (図 6. A)。すなわち、膵島  $\beta$  細胞が高グルコースに応答しインスリン分泌を促進していることが示された。一方、 $4\mu\text{8C}$  処理をした細胞では、インスリン分泌が 95% 以上抑えられていることが明らかになった (図 6. A および B)。さらに、 $4\mu\text{8C}$  と同じく IRE1 $\alpha$  の RNase ドメイン特異的阻害剤として知られる STF-083010 による処理においても同様の結果が得られた (図 6. C)。2 時間以内に阻害剤が機能しインスリン分泌をほぼ完全に阻害しているというこの結果は、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化により転写因子 XBP1s の下流の遺伝子の発現変化により誘導されるという当初の仮説では説明しにくい。このことは、次の 2 つの可能性を示唆している。(1) IRE1 $\alpha$  がインスリンの合成および成熟、あるいはインスリンの放出過程で未知の作用を有しており、その IRE1 $\alpha$  の機能が阻害されたことによりインスリンの分泌量が低下した、あるいは、(2) 用いた阻害剤が報告されている以外の 2 次的な作用点をもっている。これらを明らかにするために、まず (1) の可能性について検証した。

#### IRE1 $\alpha$ 阻害はインスリンの合成および成熟へ影響しない

まず、IRE1 $\alpha$  阻害によるインスリンの合成および成熟への影響を調べた。インスリンの合成は、膵島  $\beta$  細胞を DMSO あるいは  $4\mu\text{8C}$ 、および [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys を含む低グルコース培地あるいは高グルコース培地で 30 分間パルス標識し、その間に合成された総タンパク質あたりのプロインスリンおよびインスリンの総量を比較することで確

認した。その結果、 $4\mu\text{8C}$  未処理の細胞では、低グルコース培地に比べ高グルコース培地で培養された細胞においてインスリン合成量が僅かに上昇することが明らかになった。また、 $4\mu\text{8C}$  処理をした細胞においても同様の結果が得られた (図 7. A および B)。この結果から、膵島  $\beta$  細胞において、高グルコース刺激により新たに合成される総タンパク質に占める総インスリン量の割合は、IRE1  $\alpha$  阻害により変化しないことが示された。また、インスリンの成熟は、膵島  $\beta$  細胞を DMSO あるいは  $4\mu\text{8C}$ 、および [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys を含む高グルコース培地で 15 分間パルス標識した後、 [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys を除いた培地で 30、60、120 分間チェイスをおこない、各時間における培地中および細胞内の総インスリン量に占めるインスリンの割合を比較することで確認した。その結果、 $4\mu\text{8C}$  未処理の細胞では、時間が経過するにつれインスリンの成熟が進んでいることが確認された。また、 $4\mu\text{8C}$  処理をした細胞においても同様の結果が得られた (図 7. C および D)。この結果から、膵島  $\beta$  細胞において、IRE1  $\alpha$  阻害は高グルコース条件下でのインスリンの成熟に影響しないことが示された。これらの結果から、私は、IRE1  $\alpha$  阻害後数時間で起こるインスリン分泌量の低下は、インスリンの合成および成熟が阻害されることによるものではないと考えた。

#### IRE1 $\alpha$ 阻害により 5 分以内にインスリン分泌が抑制される

次に、IRE1  $\alpha$  阻害によるインスリン放出への影響を調べた。マウス個体やマウスから単離した膵島では、高グルコース刺激後 5~15 分でインスリンが分泌されることが知られている。そこで、膵島  $\beta$  細胞が高グルコース刺激により新たに合成し放出するインスリンの影響を抑え、細胞内にすでに蓄えられたインスリン分泌顆粒からの放出によるインスリン分泌量を調べるため、DMSO あるいは  $4\mu\text{8C}$  を含む高グルコース培地で膵島  $\beta$  細胞を短時間刺激した時のインスリン分泌量を調べた。その結果、 $4\mu\text{8C}$  未処理の細胞では、低グルコース条件下に比べ、高グルコース条件下においてインスリン分泌量が一過的に上昇することが確認された。しかし、 $4\mu\text{8C}$  処理をした細胞では、5 分の時点でその分泌量が 85%抑えられており、それ以降もインスリン分泌は抑制されたままであることが明らかになった (図 8)。さらに、マウスから単離した膵島においても、同様の結果が得られた (図 9)。先述のように、IRE1  $\alpha$  が *XBPI* mRNA のスプライシングを介し膵島  $\beta$  細胞内で何らかの機能を担っているとすると、その後 *XBPI*s による転写誘導や目的タンパク質の発現、さらにはインスリン分泌に影響するまでが 5 分以内に進むとは考え難い。そこで、(2) の可能性について検証した。図 8 の実験と同じ条件において *XBPI* mRNA のスプライシング状況を確認することで、このとき膵島  $\beta$  細胞では IRE1  $\alpha$  の活性および  $4\mu\text{8C}$  による阻害状況がどのようになっているのかを調べた。その結果、 $4\mu\text{8C}$  未処理の細胞では、高グルコース刺激後 15 分から 30 分で *XBPI* mRNA のスプライシングがピークに達し、その後低下していく

ことが明らかになった。しかし、 $4\mu\text{8C}$  処理をした細胞では、*XBPI* mRNA のスプライシングのピークは見られず、高グルコース刺激および  $4\mu\text{8C}$  添加後 10 分を過ぎたあたりから徐々に低下することが明らかになった (図 10. A および B)。この結果により、 $4\mu\text{8C}$  が IRE1 $\alpha$  を瞬時に阻害していることが示された。しかし、それと同時に 5 分の時点では *XBPI* mRNA のスプライシングに  $4\mu\text{8C}$  による影響が現れていないことがわかった。これらの結果から、IRE1 $\alpha$  が *XBPI* のスプライシングを介さずにインスリン分泌に関与している可能性、すなわち  $4\mu\text{8C}$  がこれまでに報告されていない副作用をもっているという (2) の可能性があることが示唆された。

#### IRE1 $\alpha$ ノックアウト細胞において $4\mu\text{8C}$ はインスリンの分泌を抑制する

そこで、私は、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞における  $4\mu\text{8C}$  の影響を調べた。まず、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞で IRE1 $\alpha$  が RNase 活性をもたないことを確認するため、アデノウイルス未処理の細胞、あるいはアデノウイルス感染により GFP あるいは Cre を発現させた細胞において、図 4. A の実験同様、 $4\mu\text{8C}$  処理をした後 DTT によりストレスを与え *XBPI* mRNA のスプライシング状況を調べた。その結果、アデノウイルス未処理の細胞および GFP コントロールの細胞では、図 4. A の実験同様、ストレスを与えた場合に *XBPI* mRNA のスプライシングが亢進し、 $4\mu\text{8C}$  処理によりそのスプライシングが抑えられていることが確認された。また、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞では、 $4\mu\text{8C}$  の有無にかかわらず、ストレスを与えた場合においても *XBPI* mRNA のスプライシングが抑えられていることが確認された (図 11)。この結果から、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞では、間違いなく IRE1 $\alpha$  が RNase 活性を失っていることが確認された。次に、 $4\mu\text{8C}$  が副作用をもつかどうかを調べるため、この IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞をもちいて、図 6. A と同様の実験をおこなった。その結果、アデノウイルス未処理の細胞および GFP コントロールの細胞では、図 6. A 同様、高グルコース刺激によりインスリン分泌が促進されていることが確認された (図 12. A および B)。また、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞では、そのインスリン分泌量が 50%以上低下していることが確認された (図 12. C)。しかし、IRE1 $\alpha$  ノックアウト細胞を  $4\mu\text{8C}$  処理すると、さらにその分泌量が 75%抑えられることが明らかになった (図 12. D および E)。これらの結果より、 $4\mu\text{8C}$  処理による膵島  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌量の低下は IRE1 $\alpha$  の RNase 活性阻害に非依存的であること、すなわち  $4\mu\text{8C}$  には重大な副作用があることが示唆された。それでは、 $4\mu\text{8C}$  はどのようにしてインスリンの放出を抑制しているのだろうか。

#### $4\mu\text{8C}$ はインスリン放出過程において細胞内 ATP 量を減少させる

$4\mu\text{8C}$  が、先述の膵島  $\beta$  細胞のインスリン放出過程のうち、どの段階を阻害してい

るのかを調べた。まず、細胞内からのカリウム流出を阻害しインスリン分泌を促進するため、60 mM KClにより低グルコース培地で培養されている膵島β細胞を刺激し、その分泌が4 μ 8C 処理により抑えられるのかどうかを調べた。その結果、4 μ 8C 未処理の細胞では、KClによる刺激に応じてインスリン分泌が促進されることが確認された。また、4 μ 8C 処理をした細胞においても、同様の結果が得られた (図 13)。この結果から、4 μ 8C 処理をした場合でも、膵島β細胞のインスリン放出過程のうち、ATP感受性カリウムチャネル以降は機能することが示唆された。次に、4 μ 8C 処理が細胞内 ATP 量に影響しているのかを調べるため、膵島β細胞を DMSO あるいは4 μ 8C を含む高グルコース培地により刺激し細胞内 ATP 量を測定した。その結果、高グルコース刺激後5分の時点において、4 μ 8C 未処理の細胞に比べ、4 μ 8C 処理をした細胞では細胞内 ATP 量が減少することが確認された (図 14)。

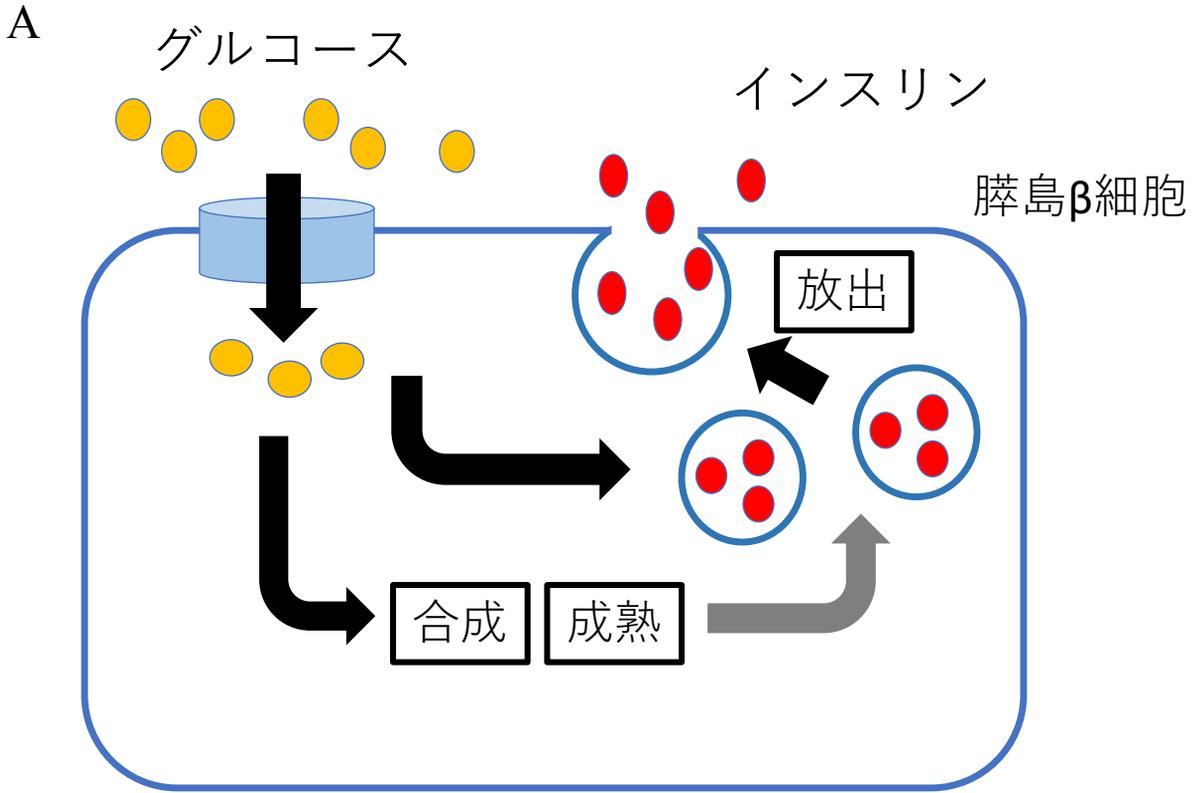
## 考察

本研究において、IRE1 $\alpha$ のRNaseドメイン特異的阻害剤4 $\mu$ 8Cは、膵島 $\beta$ 細胞において効率的にIRE1 $\alpha$ の活性阻害をおこなうだけでなく、IRE1 $\alpha$ -XBP1経路非依存的にインスリンの分泌を阻害することが明らかになった。それぞれ、以下の結果に基づくものである。まず、4 $\mu$ 8Cが膵島 $\beta$ 細胞において効率的にIRE1 $\alpha$ の活性を阻害する点については、1) 4 $\mu$ 8C処理により15分以内に*XBPI* mRNAのスプライシングが阻害されたこと(図10. AおよびB)、2) 4 $\mu$ 8C処理により、IRE1 $\alpha$  KOと同様のPDIファミリー発現量低下が4日以内に確認されたことによる。先述のように、先行研究においてはIRE1 KOから解析までに2-3週間以上要していたため、4 $\mu$ 8CによるIRE1 $\alpha$ の機能阻害は極めて短時間でなされたこととなる。それにより、これまで明らかにされていないIRE1 $\alpha$ の機能を見出すことができる可能性が示唆された。次に、IRE1 $\alpha$ -XBP1経路非依存的にインスリンの分泌を阻害する点については、1) 4 $\mu$ 8C処理による*XBPI* mRNAのスプライシングへの影響が現れる前にインスリン分泌が抑制されたこと、2) IRE1 $\alpha$  KO細胞においても4 $\mu$ 8C処理によりインスリン分泌が抑制されたことによる。4 $\mu$ 8Cによる*XBPI* mRNAのスプライシングの阻害は数分で起きていることが予想されるが、4 $\mu$ 8C未処理および4 $\mu$ 8C処理において*XBPIs*の発現量の差は5分の時点では認められず、この間にIRE1 $\alpha$ 阻害による影響が細胞に現れる可能性は低いと考えられる。それでは、なぜ4 $\mu$ 8C処理により膵島 $\beta$ 細胞およびマウスから単離した膵島の両方において、5分以内にインスリンの分泌が抑えられたのだろうか。これについては、2つの可能性が考えられた。1つ目はIRE1 $\alpha$ の*XBPI* mRNAのスプライシング以外の機能、RIDDあるいは未だ知られていない機能がインスリン分泌に働いている可能性、2つ目に4 $\mu$ 8CがIRE1 $\alpha$ を介さずに細胞に作用している可能性である。そこで、IRE1 $\alpha$  KO細胞に4 $\mu$ 8C処理をすることでその影響を調べたところ、KO細胞は野生型に比べインスリンの分泌量を低下させるが、4 $\mu$ 8C処理によりさらにその分泌量を著しく低下させることが確認された(図12. E)。この結果は、4 $\mu$ 8CがIRE1 $\alpha$ のRNaseドメイン以外に作用することを強く示した。

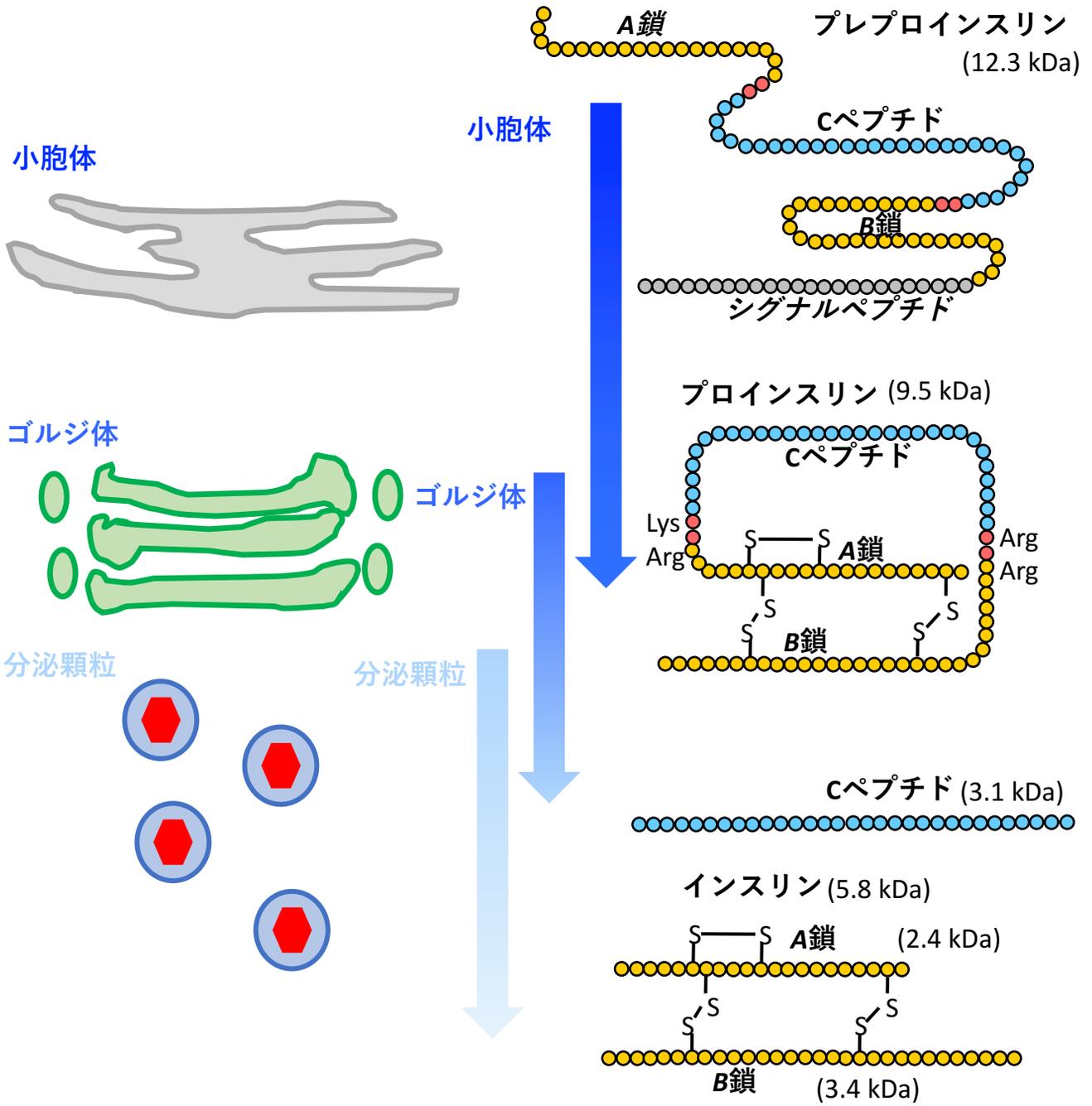
IRE1 $\alpha$ はその機能の多様性から、糖尿病だけでなくがん治療においても注目されている(Mimura N. et al., 2012; Ming J. et al., 2015)。4 $\mu$ 8Cと共通する構造をもつIRE1 $\alpha$ 阻害剤STF-083010は、タモキシフェン抵抗性の乳がん細胞においてタモキシフェン感受性を回復させ、また、マウスではタモキシフェンとSTF-083010との同時処理によりがんの進行を緩めたと報告されている(Ming J. et al., 2015)。しかし、STF-083010は4 $\mu$ 8Cと同様、処理後5分以内にインスリン分泌量を低下させる(data not shown)ことから、副作用としてインスリン分泌を阻害する可能性が予想される。また、4 $\mu$ 8CやSTF-083010以外にもこれら阻害剤と共通構造をもつ化合物がIRE1 $\alpha$ 阻害剤と

して利用されており (Mimura N. et al., 2012; Zhang L. et al., 2014; Maly DJ. et al., 2014)、場合によっては IRE1 $\alpha$  の機能阻害によらない結果から誤った解釈を導く可能性もあると考えられる。そこで、4  $\mu$  8C が副作用としてどのようにインスリン分泌を阻害している可能性があるのかについて調べた。4  $\mu$  8C が数分でインスリン分泌を抑えていたことから、副作用としてはインスリンの放出過程に影響していることが予想された。現在、糖尿病や低血糖症治療薬としては、インスリン分泌の促進および抑制の両方において、ATP 感受性カリウムチャンネルに作用する薬剤がよく知られている (Zhang CL. et al., 2009; Matsuda M. et al., 2002; Grill V. et al., 2009)。そのため、本研究においてもまず、4  $\mu$  8C 存在下で ATP 感受性カリウムチャンネル以降の過程が機能するのかを調べたところ、KCl 処理によりインスリン分泌は促進されておりカリウムチャンネル以降は機能していることが確認された。これは、4  $\mu$  8C が ATP 感受性カリウムチャンネルより前の段階でインスリンの放出を妨げている可能性を示している。また、4  $\mu$  8C 処理により高グルコース処理後 5 分の時点で、4  $\mu$  8C 未処理に比べ細胞内 ATP 量が低下していることが確認された。4  $\mu$  8C 未処理の細胞において、高グルコース処理後に細胞内 ATP 量の上昇が見られていない点については条件を検討する必要があるが、少なくとも 4  $\mu$  8C 処理により細胞内 ATP 量が減少する傾向は認められたと考える。このことから、4  $\mu$  8C は ATP 産生の阻害あるいは ATP 分解を促進するなどの働きをすることにより、膵島  $\beta$  細胞が ATP 感受性カリウムチャンネルを介して脱分極を起こすのを妨げ、インスリンの放出を阻害している可能性が考えられた。

今回、4  $\mu$  8C が IRE1 $\alpha$  の RNase 特異的阻害剤ではなく、副作用として膵島  $\beta$  細胞からのインスリン放出を阻害することが新たにわかった。また、先行研究により IRE1 $\alpha$  や XBP1 のノックダウンおよびノックアウトによりインスリンの合成や成熟が阻害されることが報告されている (Lipson KL. et al., 2006; Lee AH. et al., 2011; Tsuchiya Y. et al., 2016)。これらのことは、4  $\mu$  8C が膵島  $\beta$  細胞において IRE1 $\alpha$  阻害剤およびその副作用の両方でインスリン分泌を強力に阻害しうることを示している。さらに、本研究により 4  $\mu$  8C 処理により構成性分泌は阻害されないという結果も得られた (data not shown)。以上のことから、4  $\mu$  8C は、膵島  $\beta$  細胞においては IRE1 $\alpha$ -XBP1 非依存的に調節性分泌である高グルコース刺激に応じたインスリン分泌を阻害するが、他の細胞においても同様に調節性分泌を阻害する可能性があることが考えられる。また、先述のように 4  $\mu$  8C だけでなく、STF-083010 にも同様の副作用があると予想されるため、この現象はこれら 2 つの阻害剤と同様サリチルアルデヒドを含む阻害剤において共通の問題となることも考えられる。そのため、今後新たに IRE1 $\alpha$  をターゲットとした阻害剤や糖尿病やがんなどの治療薬をスクリーニングする場合は、副作用としてインスリン分泌をはじめとする調節性分泌を担う細胞へ影響を与えないかどうかを確認すべきである。



B



C

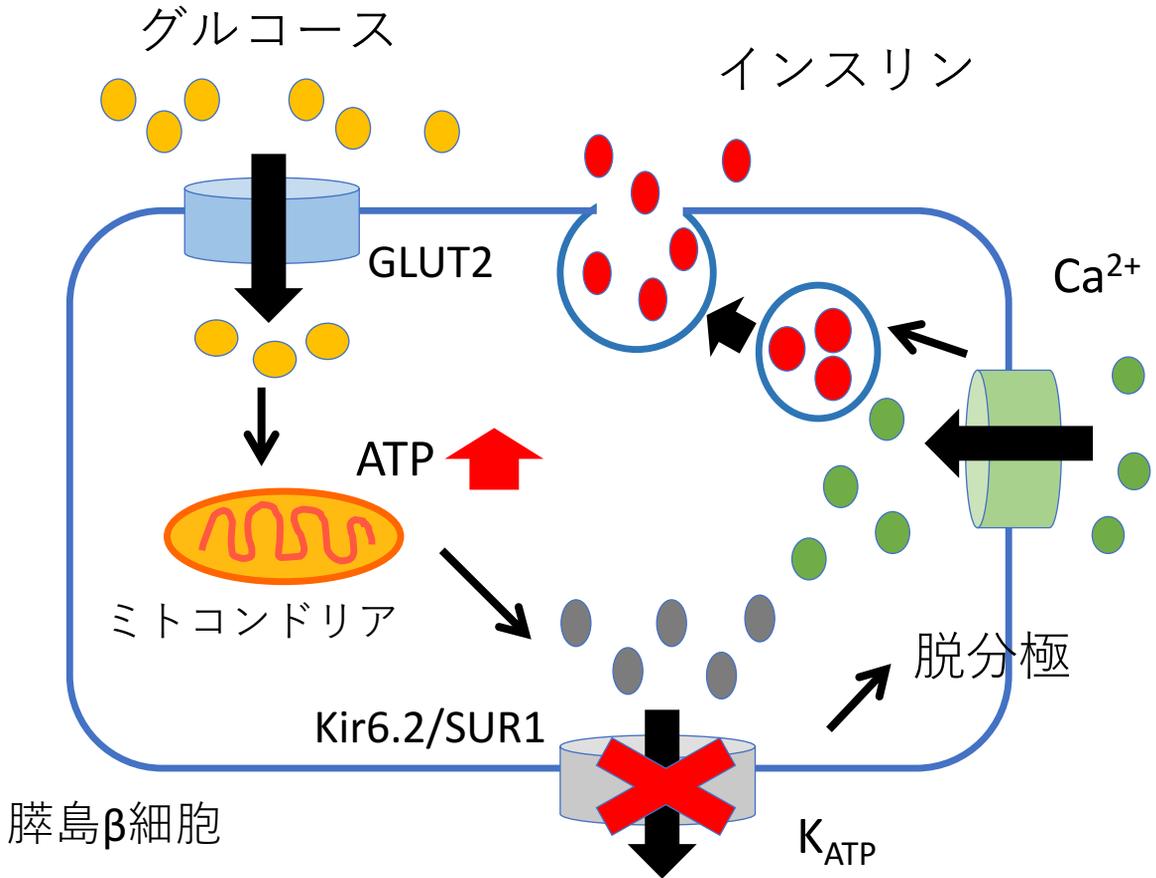


図1. 膵島β細胞におけるインスリン分泌 (詳細は本文参照)

- A. グルコース刺激によるインスリン分泌
- B. インスリンの合成および成熟
- C. グルコース刺激によるインスリン放出

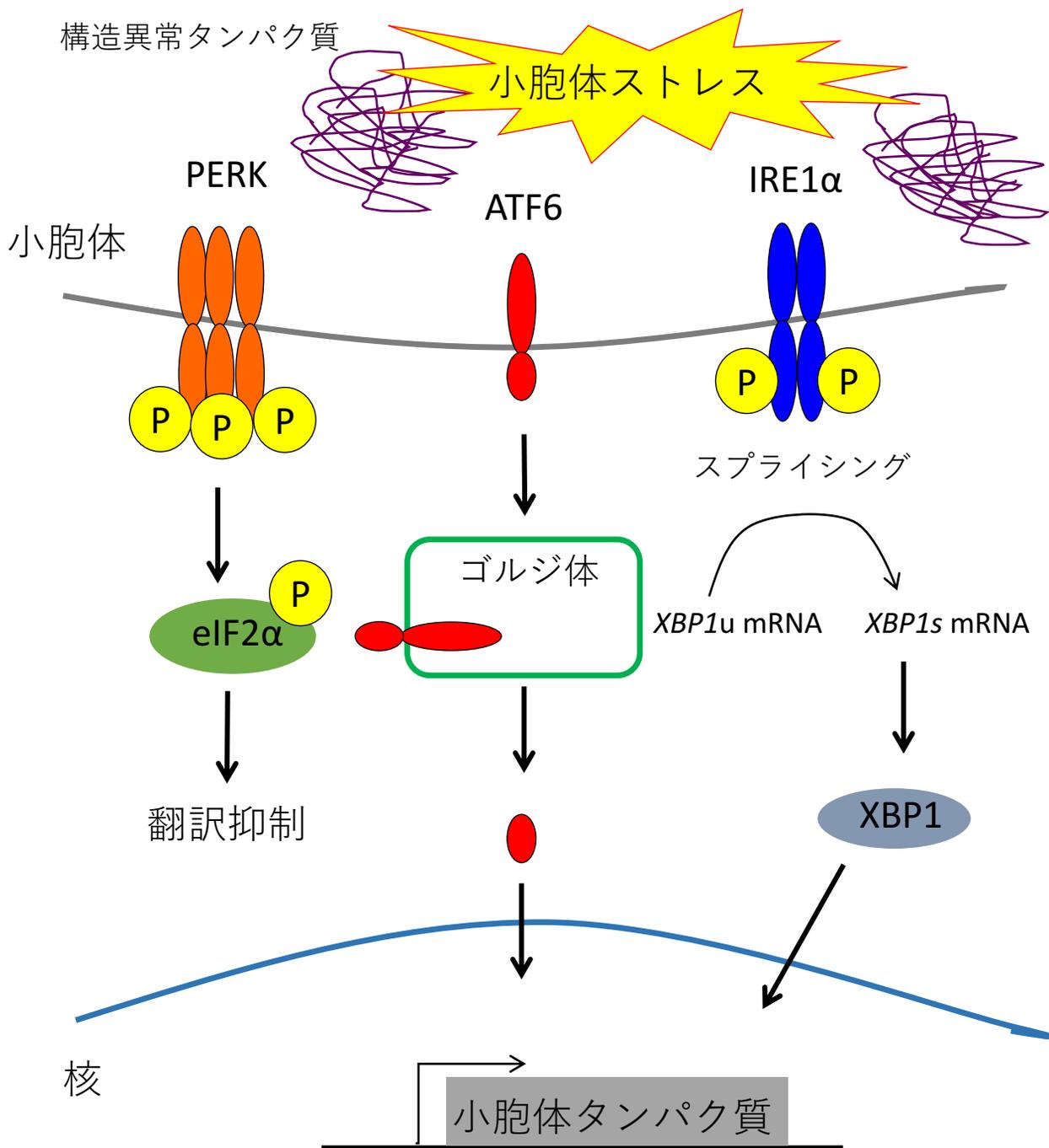
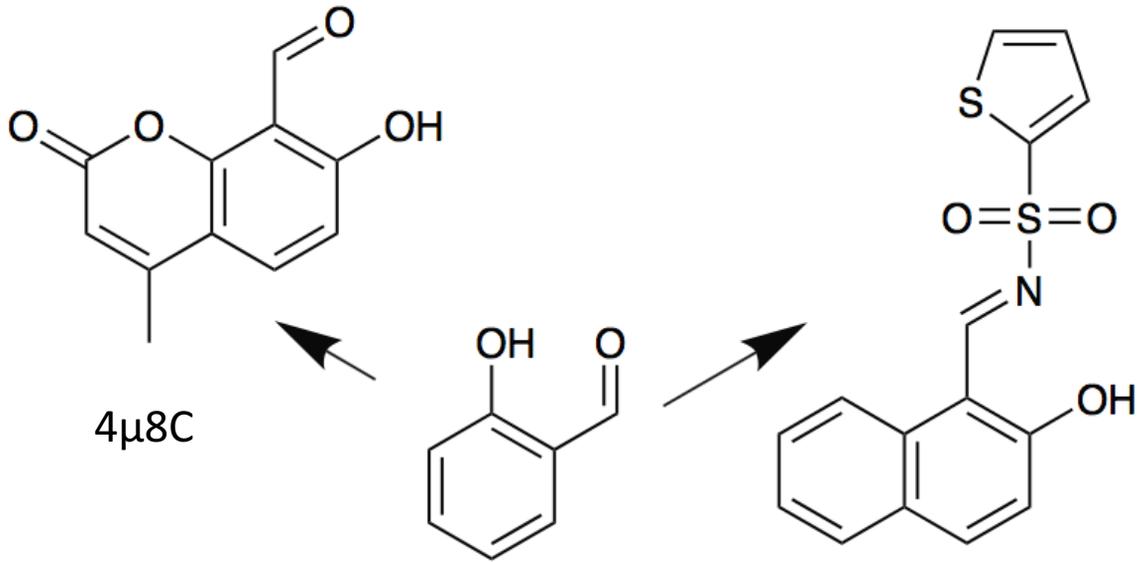


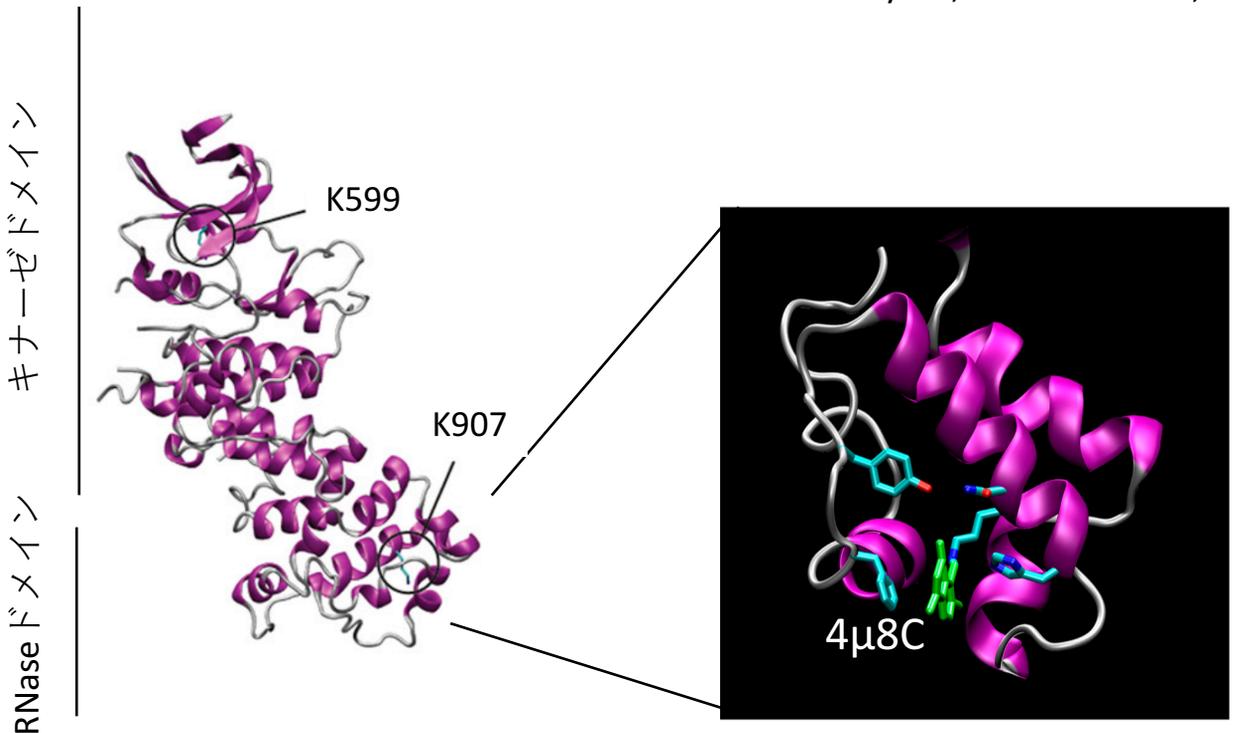
図2. 動物細胞における小胞体ストレス応答  
本文参照

A



Maly DJ., *Nat Chem Biol.*, 2014

B



Cross BC., *PNAS.*, 2012

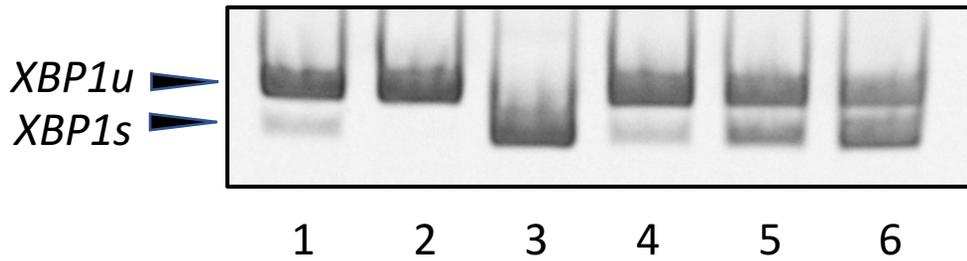
図3. IRE1 $\alpha$ のRNaseドメイン阻害剤

A. IRE1 $\alpha$ のRNaseドメイン阻害剤4 $\mu$ 8CおよびSTF-083010

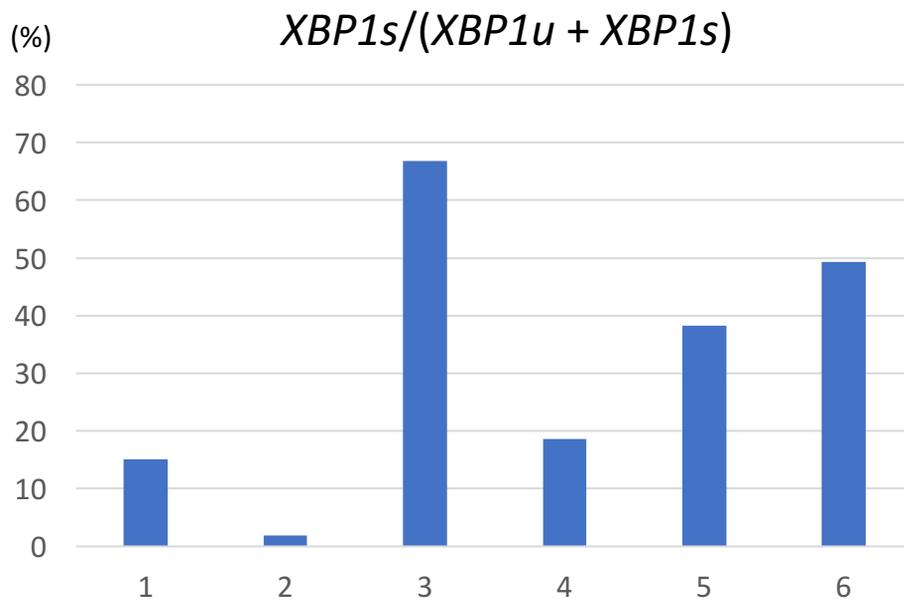
B. IRE1 $\alpha$ と4 $\mu$ 8Cの結合

A

4 $\mu$ 8C (6hr)	—	64	—	64	32	16	( $\mu$ M)
1mM DTT (1hr)	—	—	+	+	+	+	



B



C

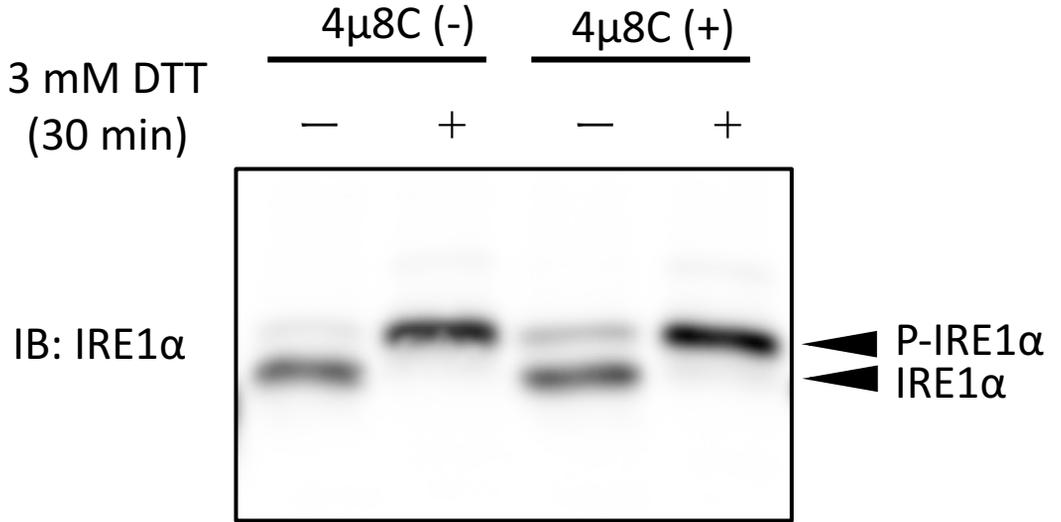
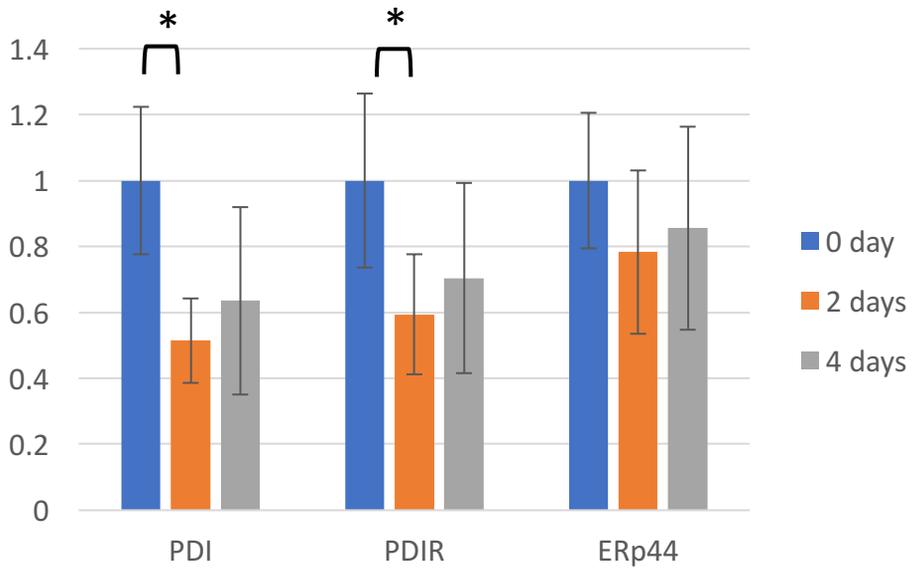


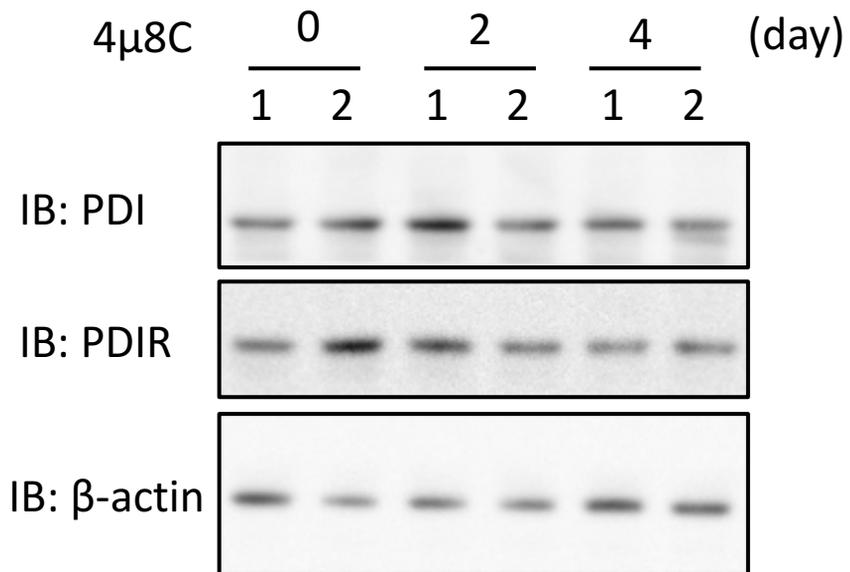
図4. IRE1 $\alpha$ のRNase阻害剤4 $\mu$ 8Cの使用濃度を確認

- DMEMで培養されているマウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは図に示した濃度の4 $\mu$ 8Cで5時間処理した後、続く1時間はそれまでと同じ濃度のDMSOあるいは4 $\mu$ 8Cで処理し、同時に1 mM DTTによりストレスを与えた。細胞を回収しRNA精製後、XBP1のプライマーをもちいてRT-PCRをおこなった。
- Aの結果より、バンドを定量し*XBP1u*および*XBP1s*の総量における*XBP1s*の量を求め、*XBP1* mRNAのスプライシング効率をグラフにした。
- DMEMで培養されているマウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cで5.5時間処理した後、続く30分はDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8C処理と同時に3 mM DTTによりストレスを与えた。細胞を回収しライセートを調整後、Phos-tagをもちいてSDS-PAGEで展開し抗IRE1 $\alpha$ 抗体でイムノブロットをおこなった。

A



B



C

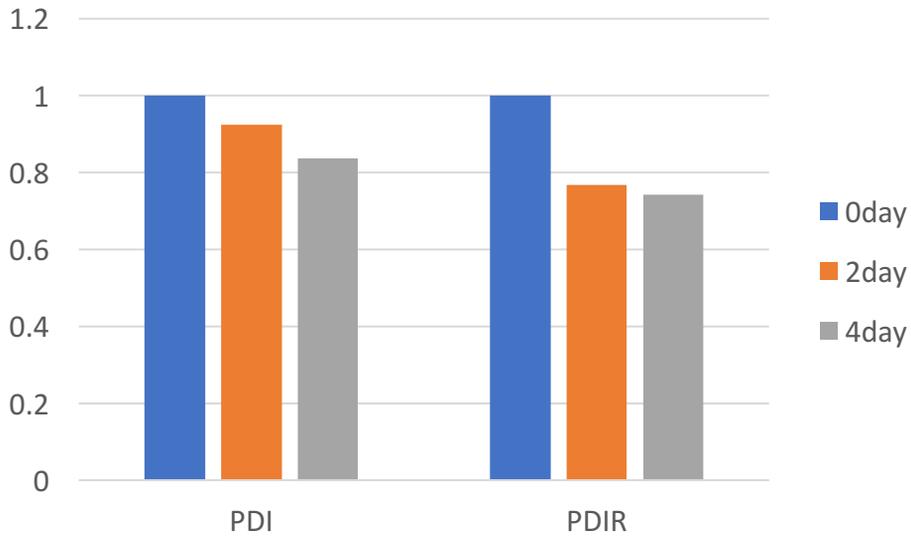
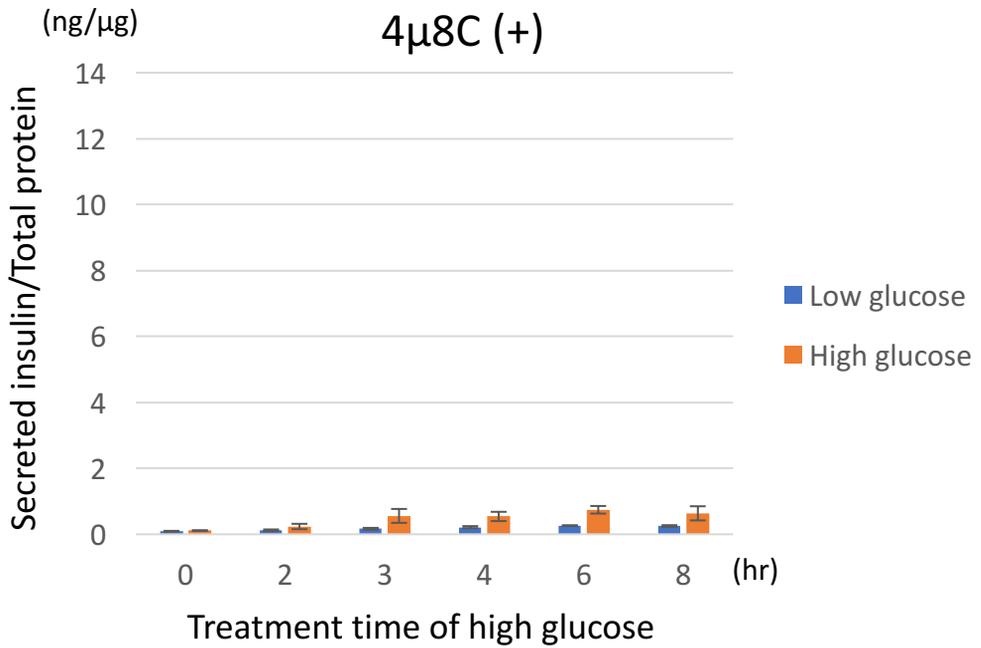
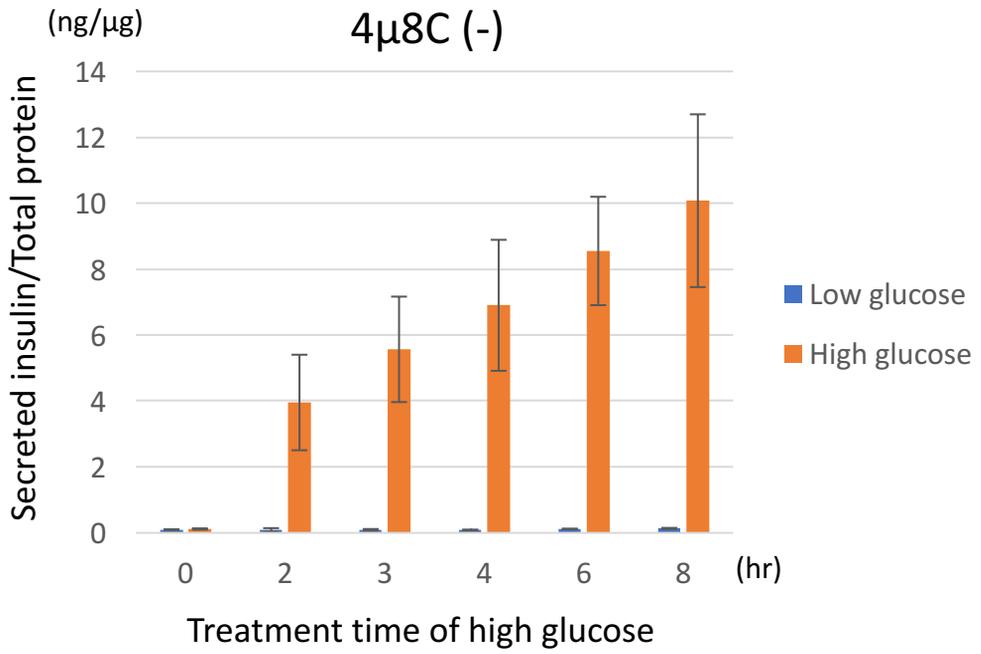


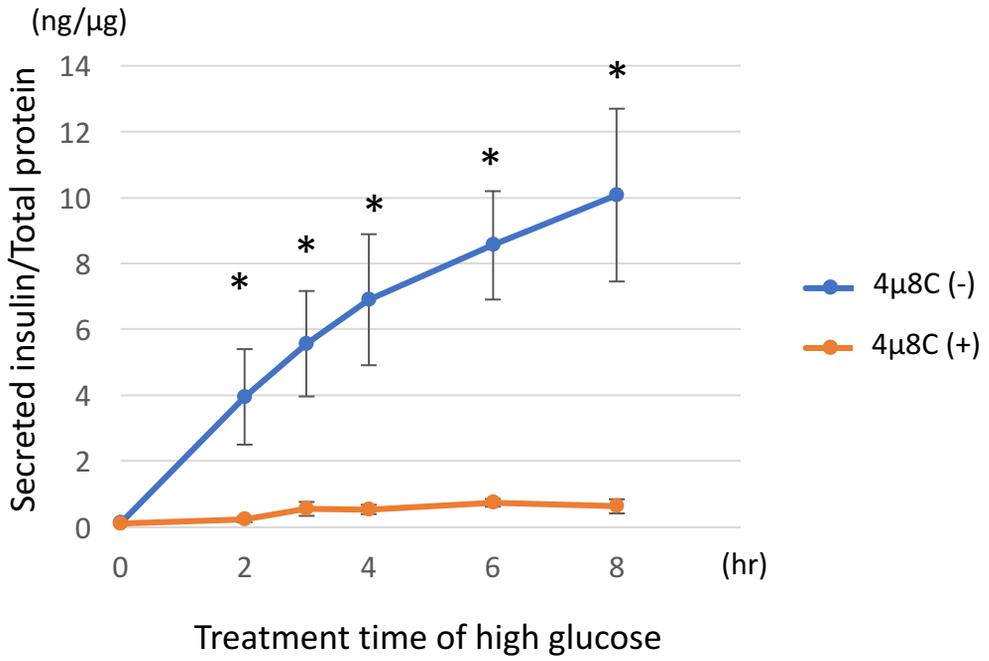
図5. PDIの発現量は4 $\mu$ 8CによるIRE1 $\alpha$ 阻害により低下する

- A. DMEMで培養されているマウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cで図に示した日数処理した。細胞を回収しRNA精製後、PDI、PDIRおよびERp44のプライマーをもちいてqRT-PCRをおこない、 $\beta$ -actinで補正した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。\* $p < 0.05$
- B. DMEMで培養されているマウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cで図に示した日数処理した。細胞を回収しライセートを調整後、NuPAGEにより展開し抗PDI抗体および抗PDIR抗体でイムノブロットをおこなった。1、2は二連の実験によるサンプルを示している。
- C. Bの結果より、バンドを定量し $\beta$ -actinで補正しグラフにした。独立した2回の実験による平均値を示した。

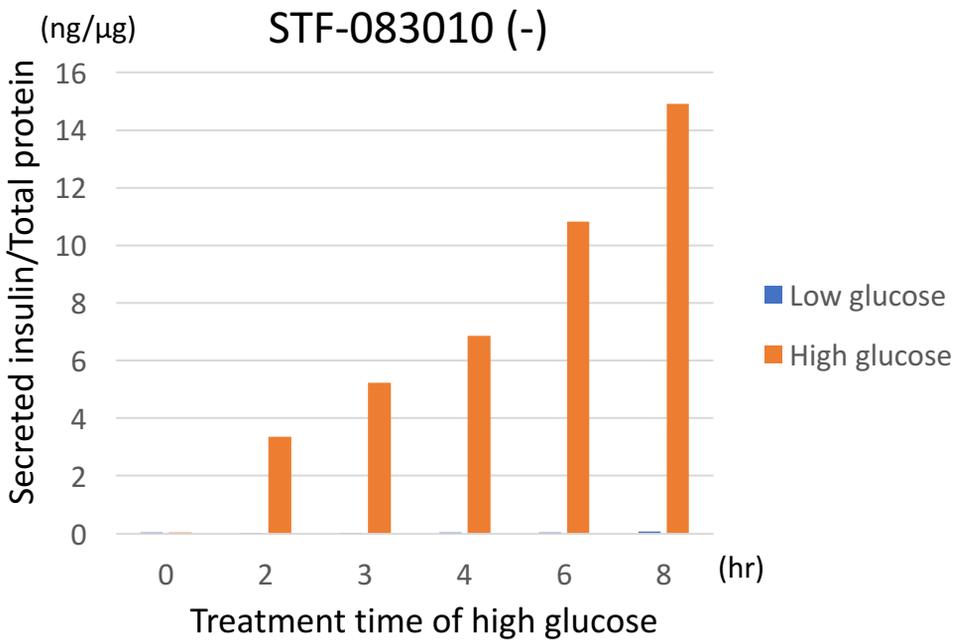
A



B



C



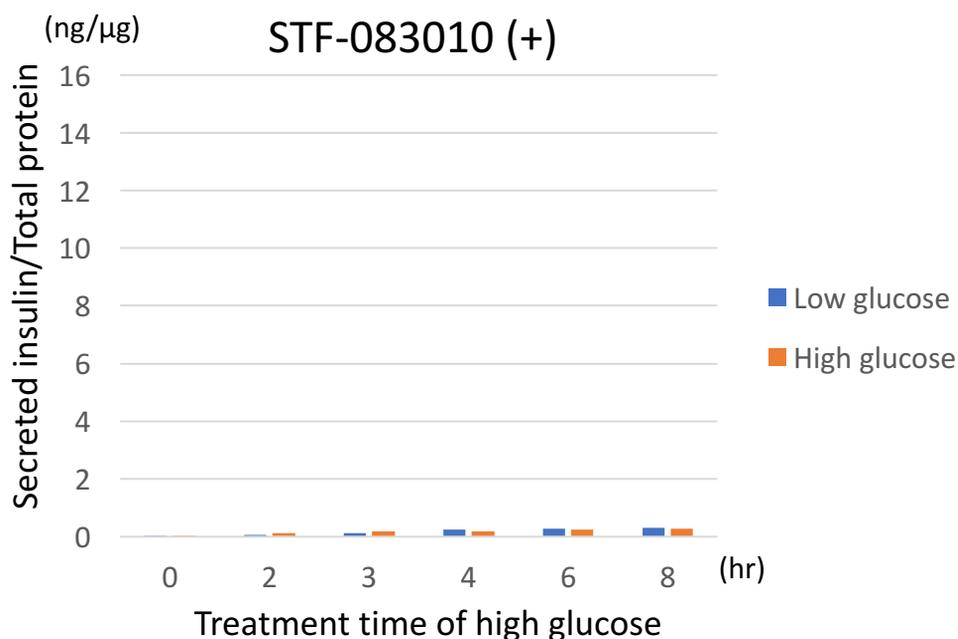
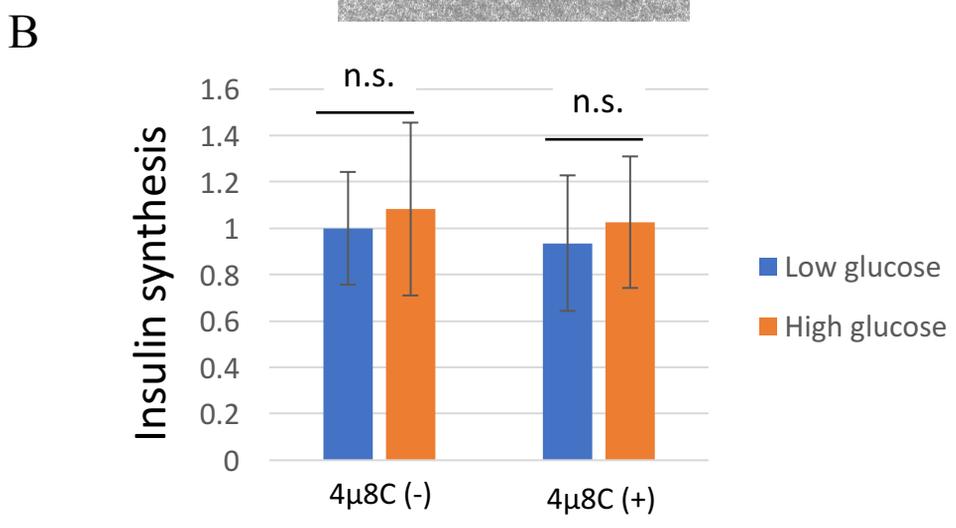
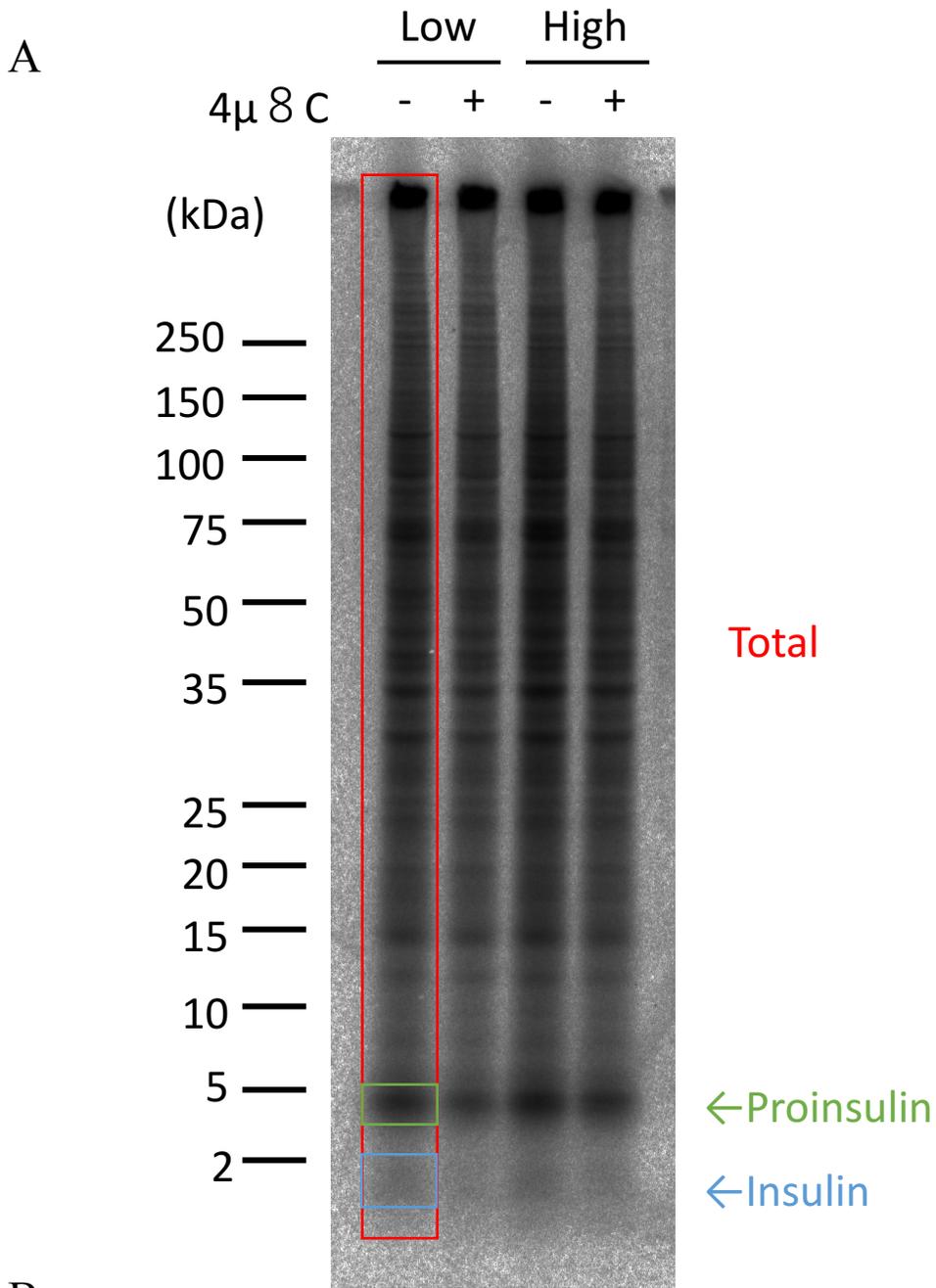
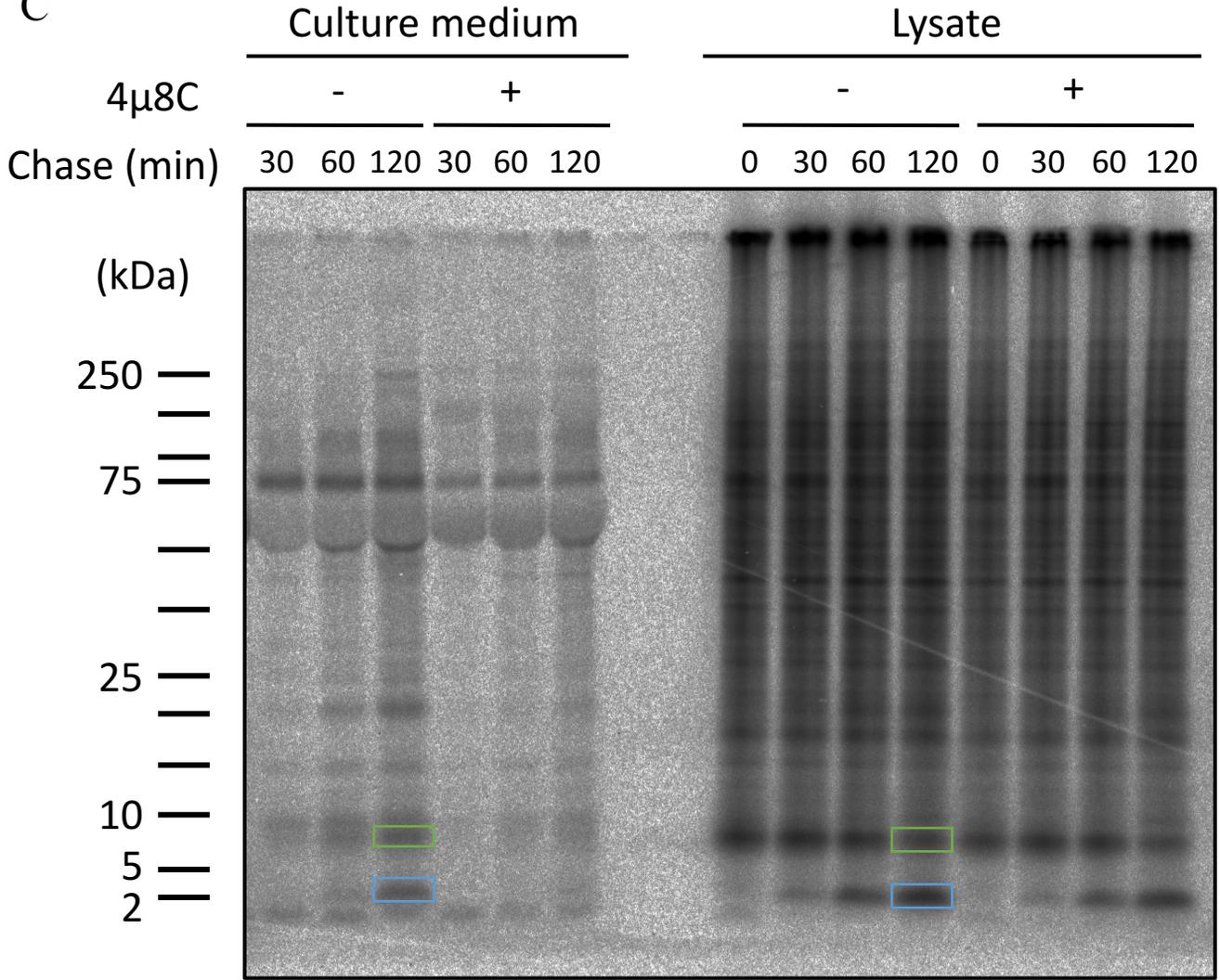


図6. IRE1 $\alpha$ のRNaseドメイン阻害剤により高グルコース刺激によるインスリン分泌量が低下する

- A. マウス膵島 $\beta$ 細胞を64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む高グルコース (16.7 mM) 培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。図に示した各時間において培地を一部回収し、培地中に放出されたインスリン量をELISAで検出しタンパク質量で補正した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- B. Aの結果から高グルコース下のインスリン分泌量のみを表し、4 $\mu$ 8C処理による影響を示した。\* $p < 0.05$
- C. マウス膵島 $\beta$ 細胞を150  $\mu$ M STF-083010を含む低グルコース培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは150  $\mu$ M STF-083010を含む高グルコース培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。Aと同様の手順によりインスリン分泌量を示した。



C



D

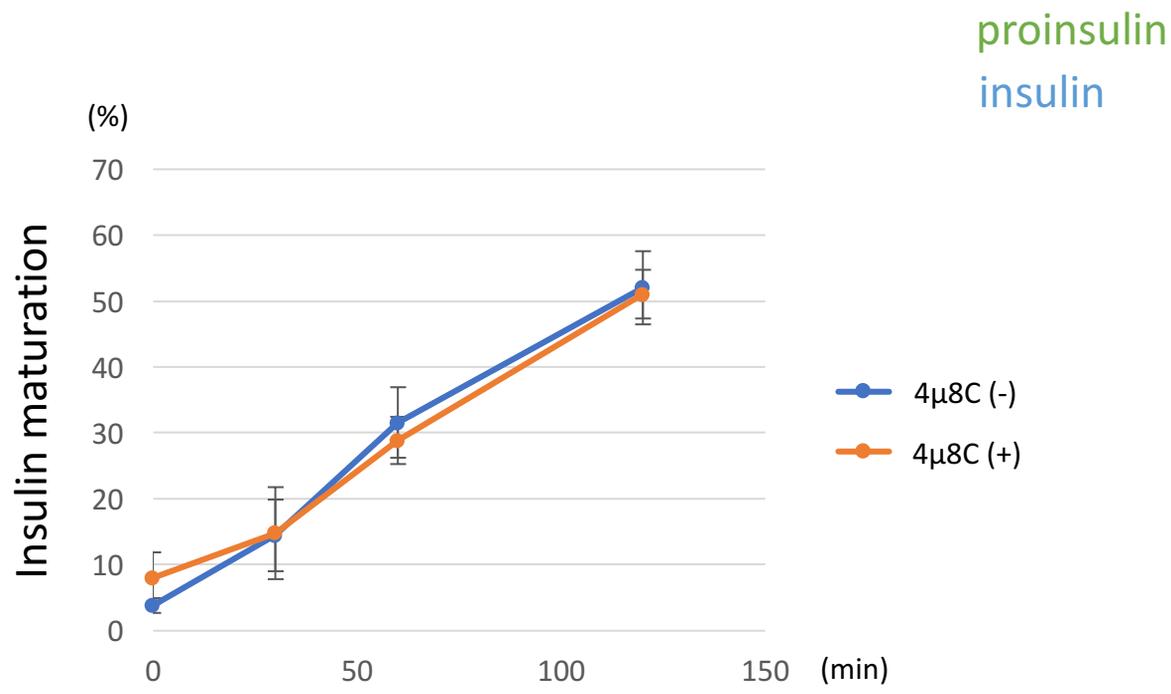
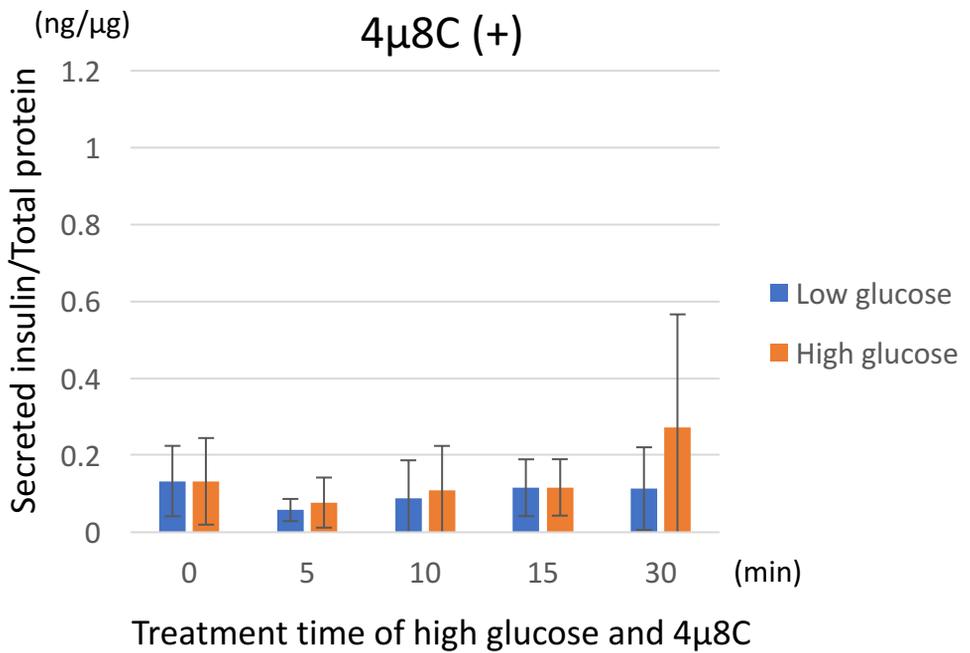
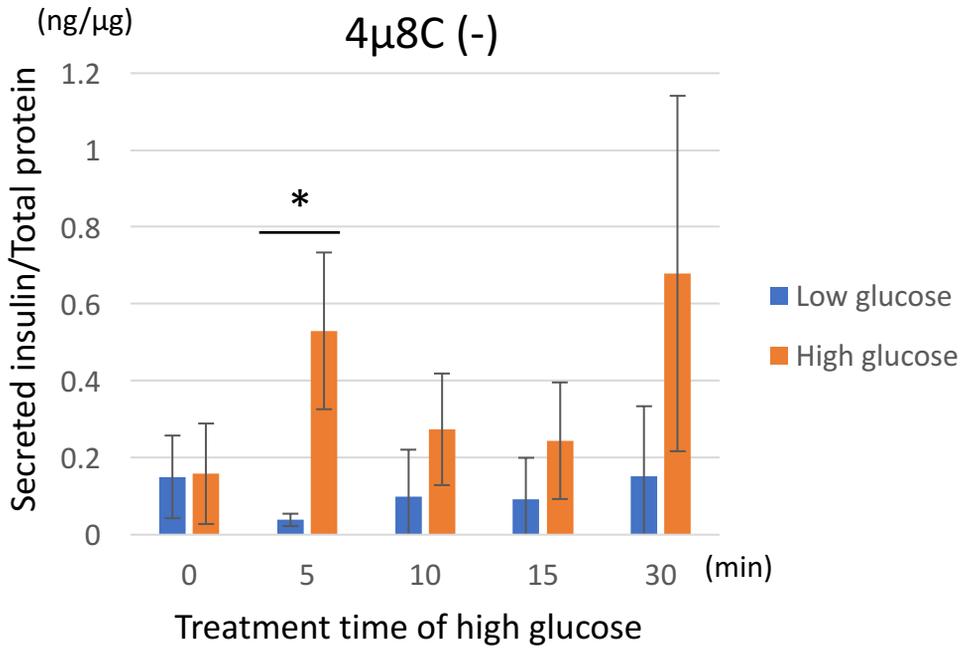


図7. インスリンの合成および成熟は4 $\mu$ 8CによるIRE1 $\alpha$ 阻害により変化しない

- A. 低グルコース (1.67 mM) 条件下でのインスリン合成量を調べるため、マウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む低グルコース培地で1時間培養した後、DMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8C、および $^{35}$ S]-Met/Cysを含む低グルコース培地で30分間パルスした。また、高グルコース (16.7 mM) 条件下でのインスリン合成量を調べるため、マウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む低グルコース培地で2時間培養した後、DMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cおよび $^{35}$ S]-Met/Cysを含む高グルコース培地で30分間パルスした。細胞を回収しライセートを調整後、総タンパク質をNuPAGEにより分離し放射活性を検出した。
- B. Aの結果より、バンドの定量をおこない、プロインスリンおよびインスリンの総量を総タンパク質量で補正し、インスリンの合成量とした。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- C. マウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む低グルコース培地で2時間培養した後、DMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8C、および $^{35}$ S]-Met/Cysを含む高グルコース培地で15分間パルスした。その後、DMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cのみを含む高グルコース培地で図に示した時間チェイスした。細胞を回収しライセートを調整後、総タンパク質をNuPAGEにより分離し放射活性を検出した。
- D. Cの結果より、バンドの定量をおこない、プロインスリンおよびインスリンの総量におけるインスリン量を求めることでインスリンの成熟度とした。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。

A



B

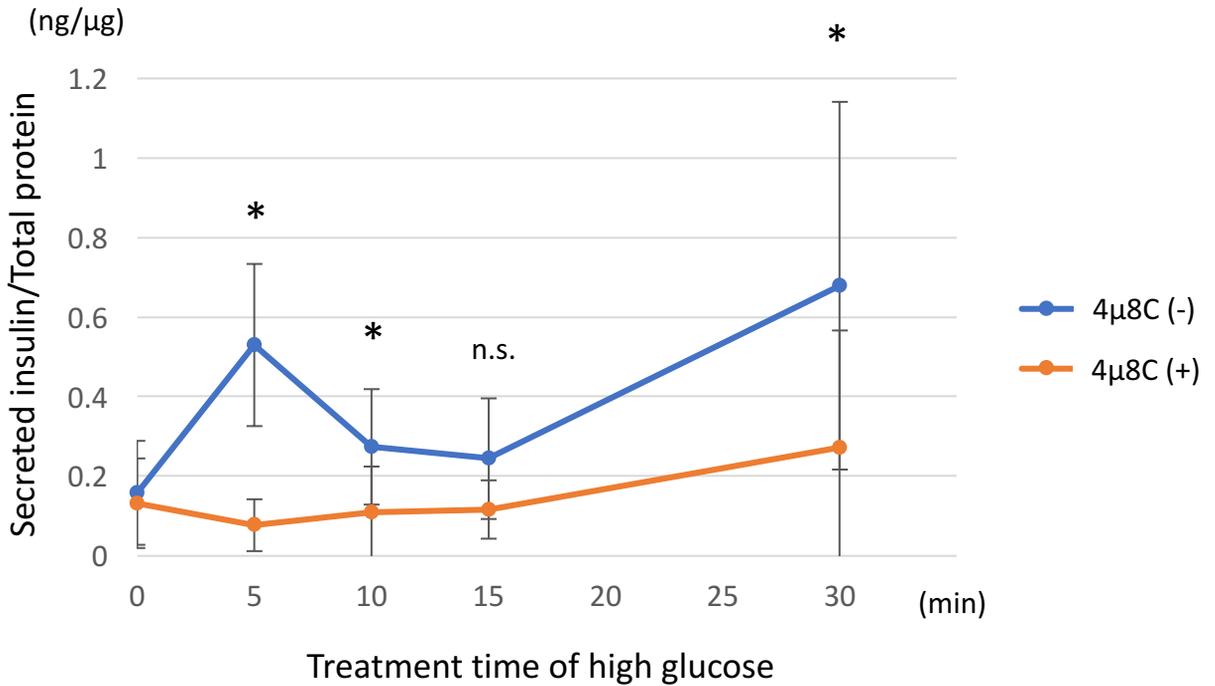
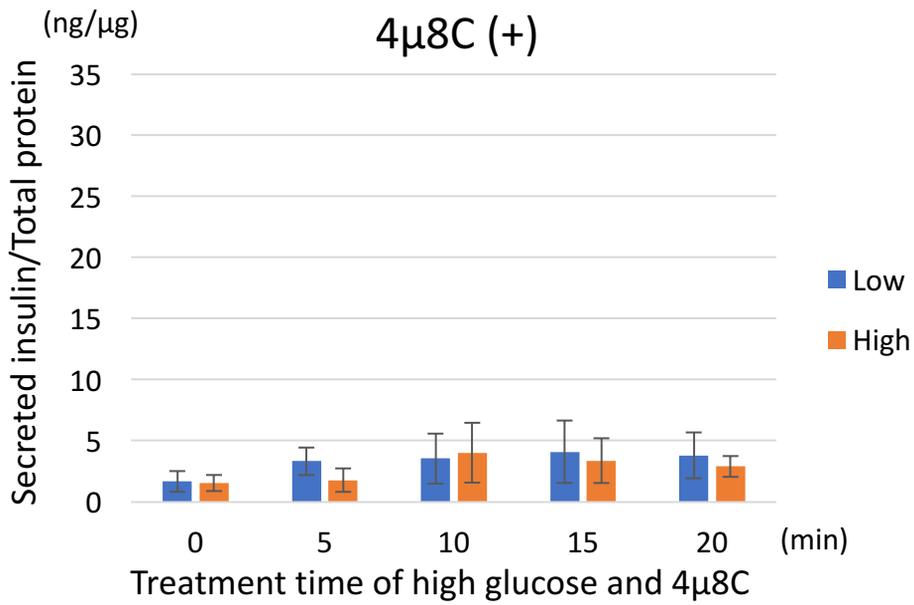
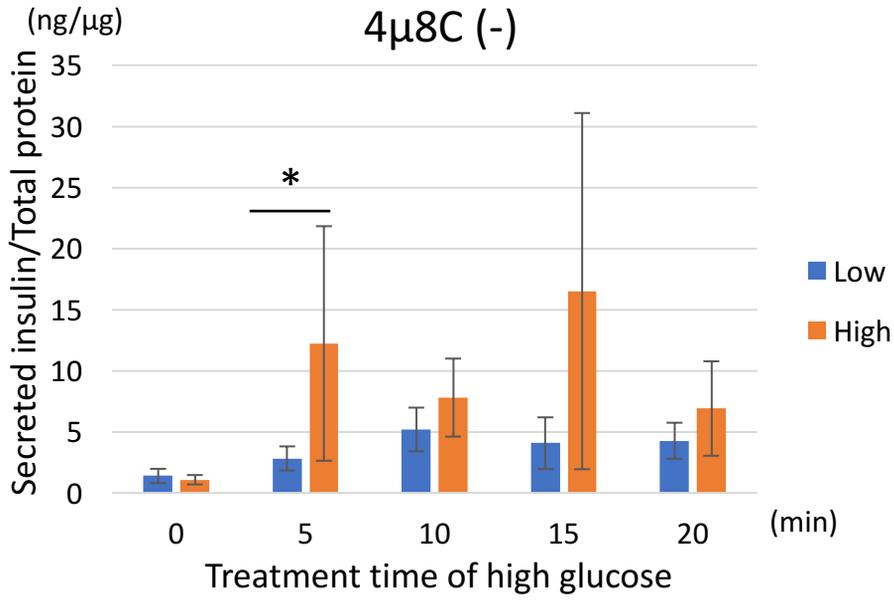


図8. 4μ8C処理により高グルコース刺激によるインスリン分泌量が瞬時に低下する

- A. マウス膵島β細胞を低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは64 μM 4μ8Cを含む高グルコース (16.7 mM) 培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。図に示した各時間において培地を一部回収し、培地中に放出されたインスリン量をELISAで検出しタンパク質量で補正した。独立した4回の実験結果より標準偏差を示した。
- B. Aの結果から高グルコース下のインスリン分泌量のみを表し、4μ8C処理による影響を示した。\*p<0.05

A



## B

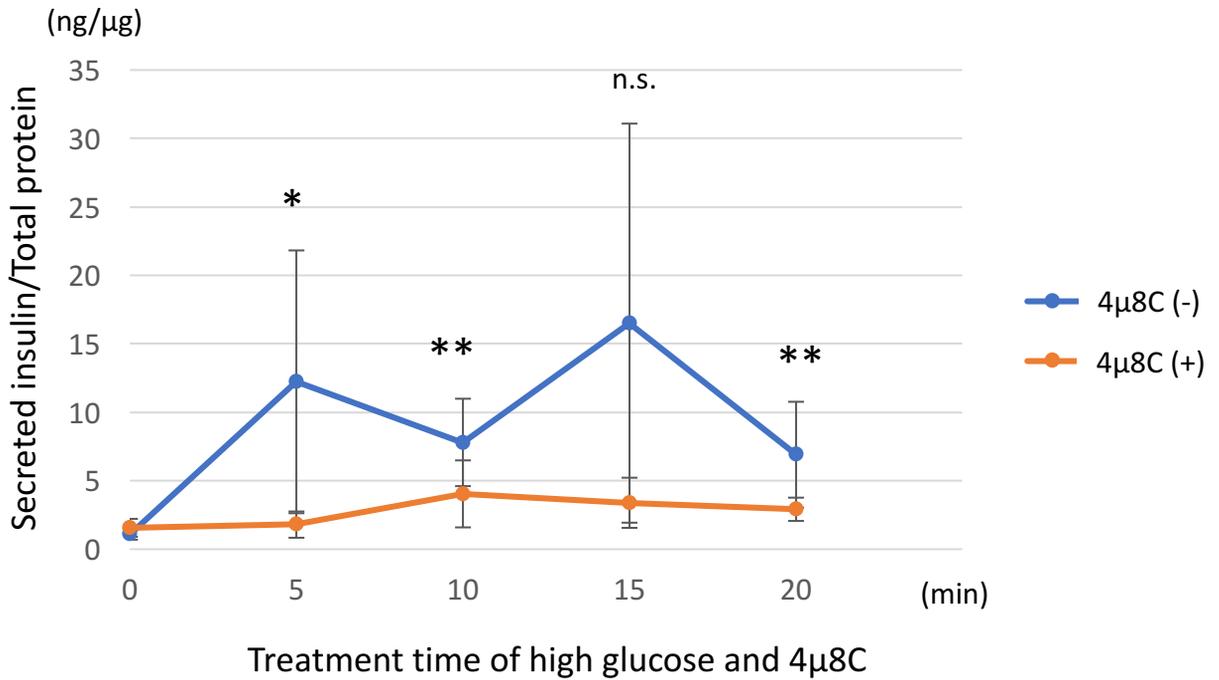


図9. マウスの膵島において4μ8C処理により高グルコース刺激によるインスリン分泌量が瞬時に低下する

- A. マウスから単離した膵島を低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは64 μM 4μ8Cを含む高グルコース (16.7 mM) 培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。図に示した各時間において培地の回収および培地交換をおこなった。培地中に放出されたインスリン量はELISAで検出しタンパク質量で補正した。独立した6回の実験結果より標準偏差を示した。
- B. Aの結果から高グルコース下のインスリン分泌量のみを表し、4μ8C処理による影響を示した。\*p<0.05、\*\*p<0.01

A



B

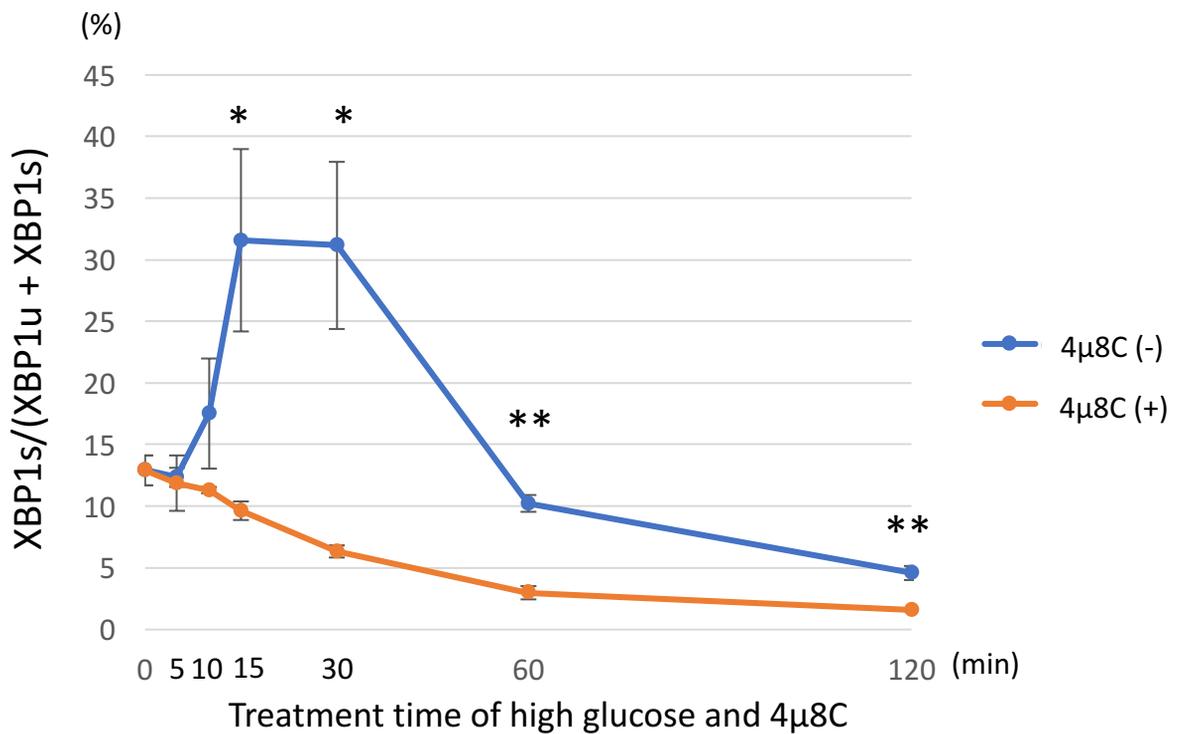


図10. 4μ8C処理により高グルコース刺激による*XBP1* mRNAのスプライシング効率が低下する

- A. マウス膵島β細胞を低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは64 μM 4μ8Cを含む高グルコース (16.7 mM) 培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。細胞を回収しRNA精製後、*XBP1*のプライマーをもちいてRT-PCRをおこなった。
- B. Aの結果より、バンドを定量し*XBP1u*および*XBP1s*の総量における*XBP1s*の量を求め、各時間での*XBP1*のスプライシング効率をグラフにした。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

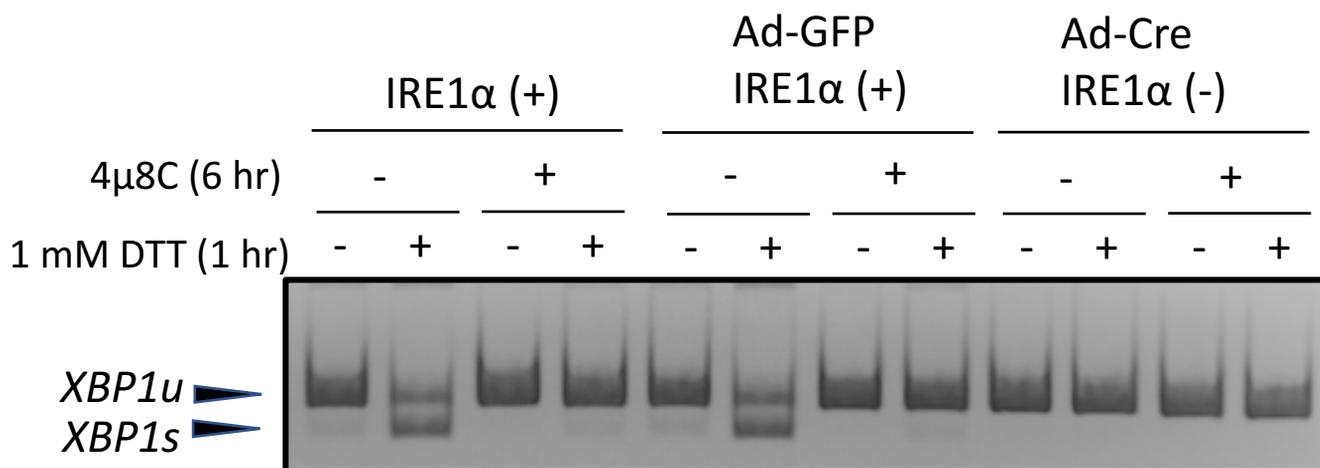
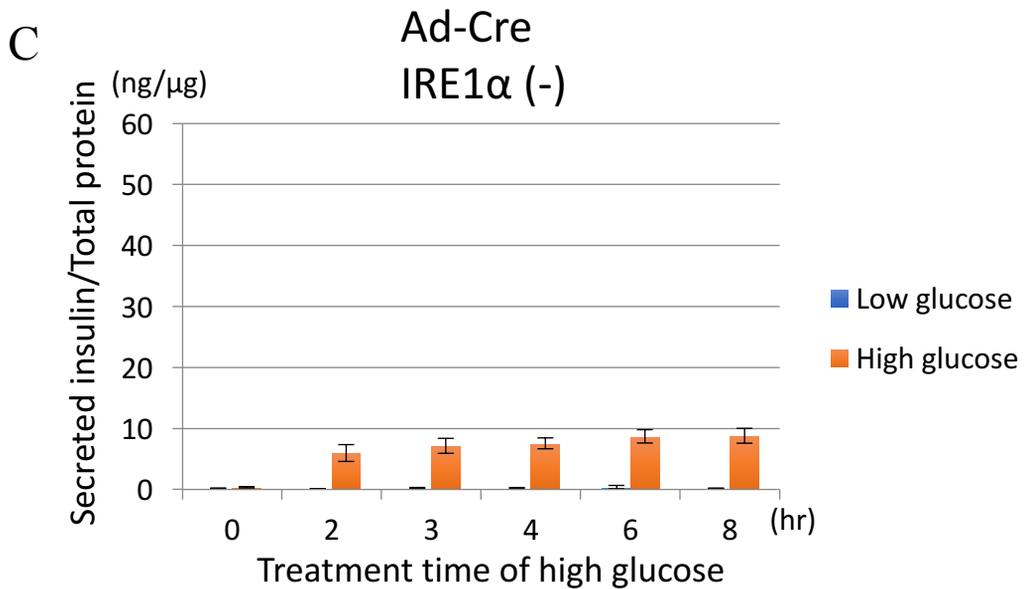
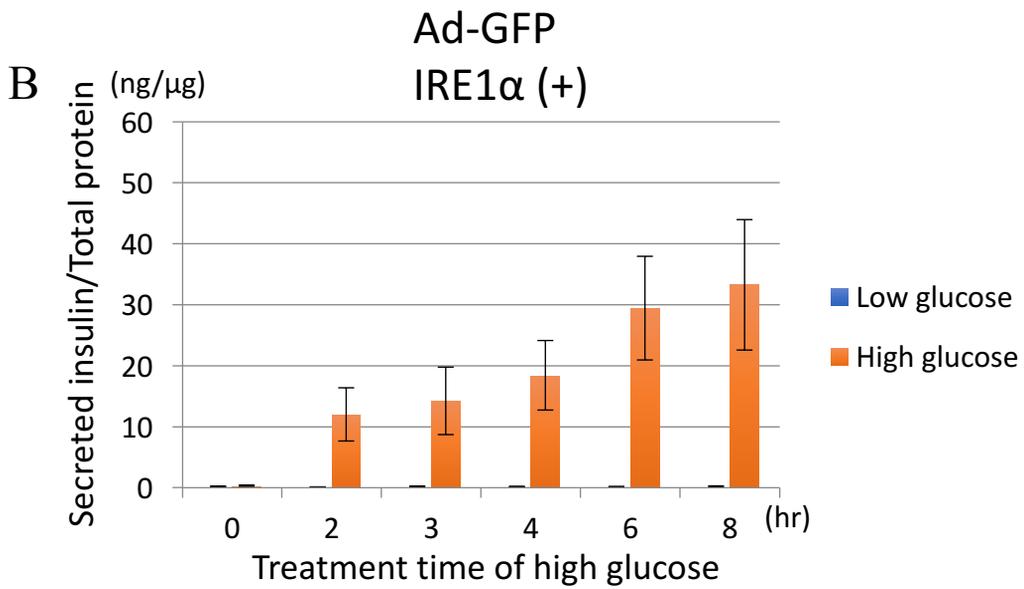
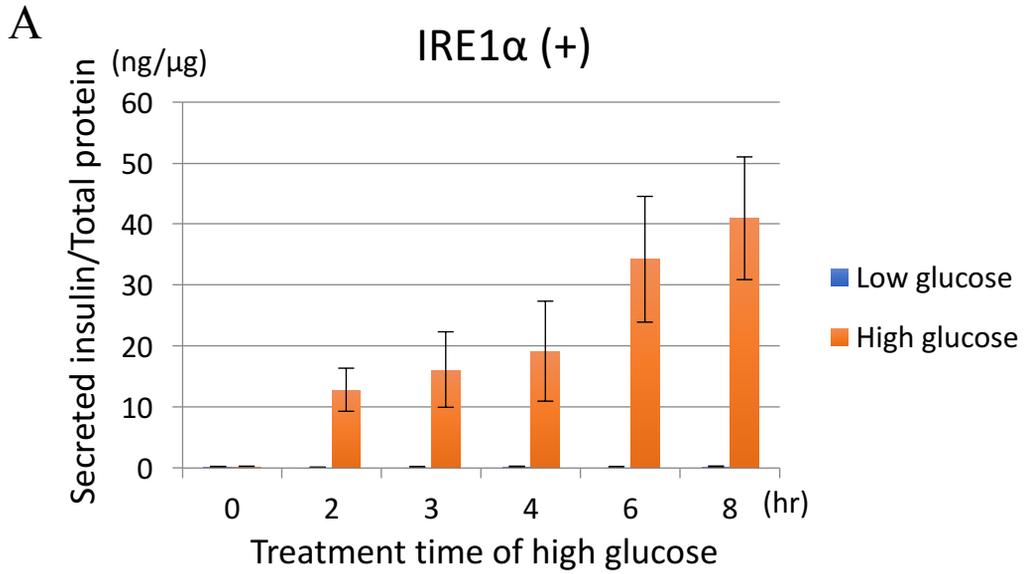


図11. IRE1 $\alpha$ ノックアウト細胞において*XBP1* mRNAのスプライシングは抑制されている  
 DMEMで培養されているアデノウイルス未処理のマウス膵島 $\beta$ 細胞、アデノウイルスで  
 GFPを発現させた細胞およびアデノウイルスでCreを発現させIRE1 $\alpha$ をノックアウトした  
 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cで5時間処理した後、続く1時間はDMSOあるいは64  
 $\mu$ M 4 $\mu$ 8C処理と同時に1 mM DTTによりストレスを与えた。細胞を回収しRNA精製後、  
*XBP1*のプライマーをもちいてRT-PCRをおこなった。



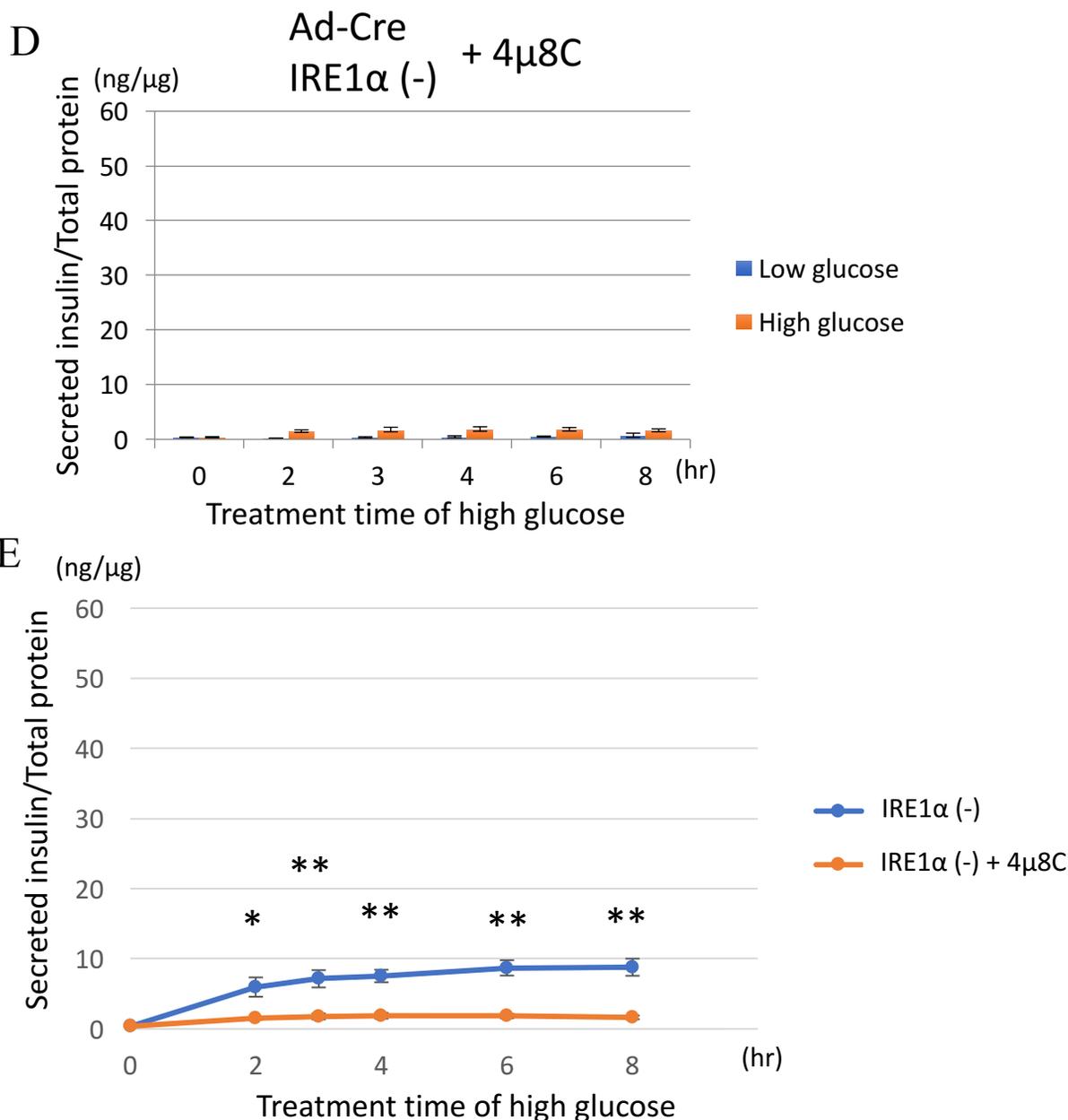
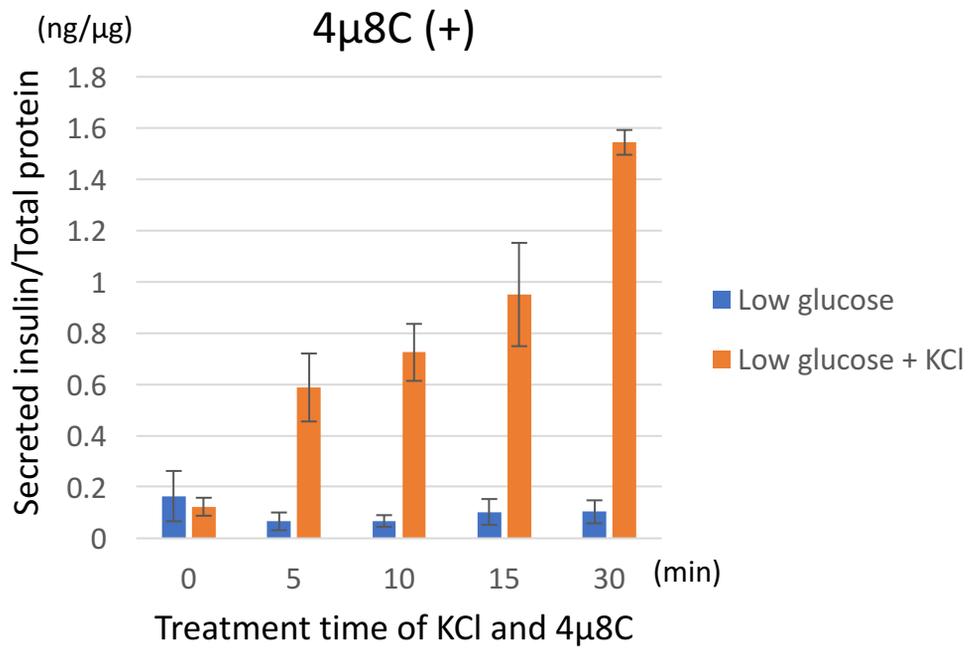
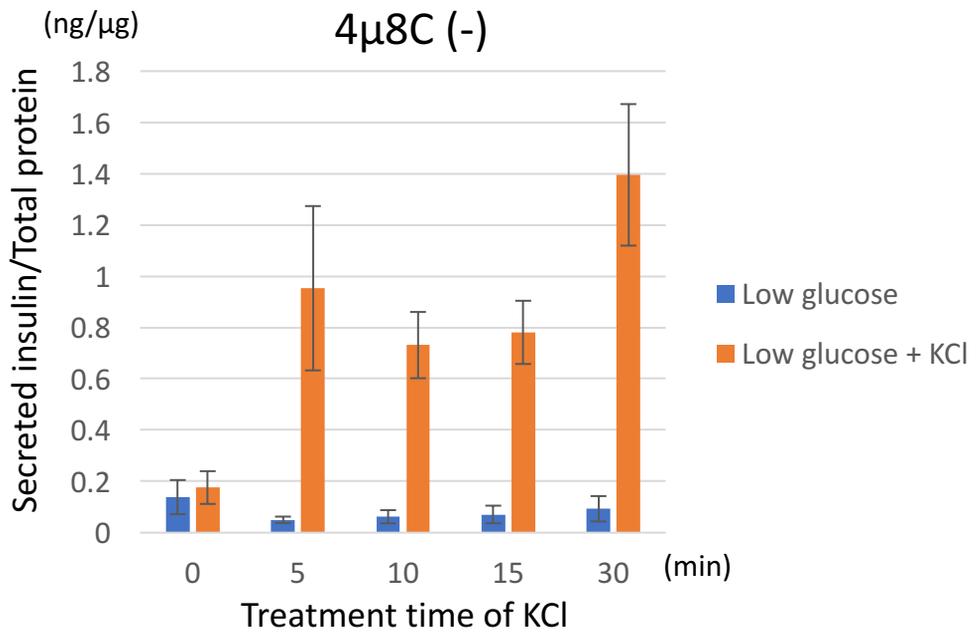


図12. IRE1 $\alpha$ ノックアウト細胞においても4 $\mu$ 8C処理により高グルコース刺激によるインスリン分泌量が低下する

- A. アデノウイルス未処理のマウス膵島 $\beta$ 細胞を低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、高グルコース (16.7 mM) 培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。図に示した各時間において培地を一部回収し、培地中に放出されたインスリン量をELISAで検出しタンパク質量で補正した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- B. アデノウイルスでGFPを発現させたマウス膵島 $\beta$ 細胞をAと同様の手順で処理した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- C. アデノウイルスでCreを発現させIRE1 $\alpha$ をノックアウトしたマウス膵島 $\beta$ 細胞をAと同様の手順で処理した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- D. IRE1 $\alpha$ をノックアウトしたマウス膵島 $\beta$ 細胞をDMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む低グルコース培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは64  $\mu$ M 4 $\mu$ 8Cを含む高グルコース培地で刺激しインスリン分泌を誘導した。以降、Aと同様の手順で処理した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- E. CおよびDの結果から高グルコース下のインスリン分泌量のみを表し、4 $\mu$ 8C処理による影響を示した。\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01

A



B

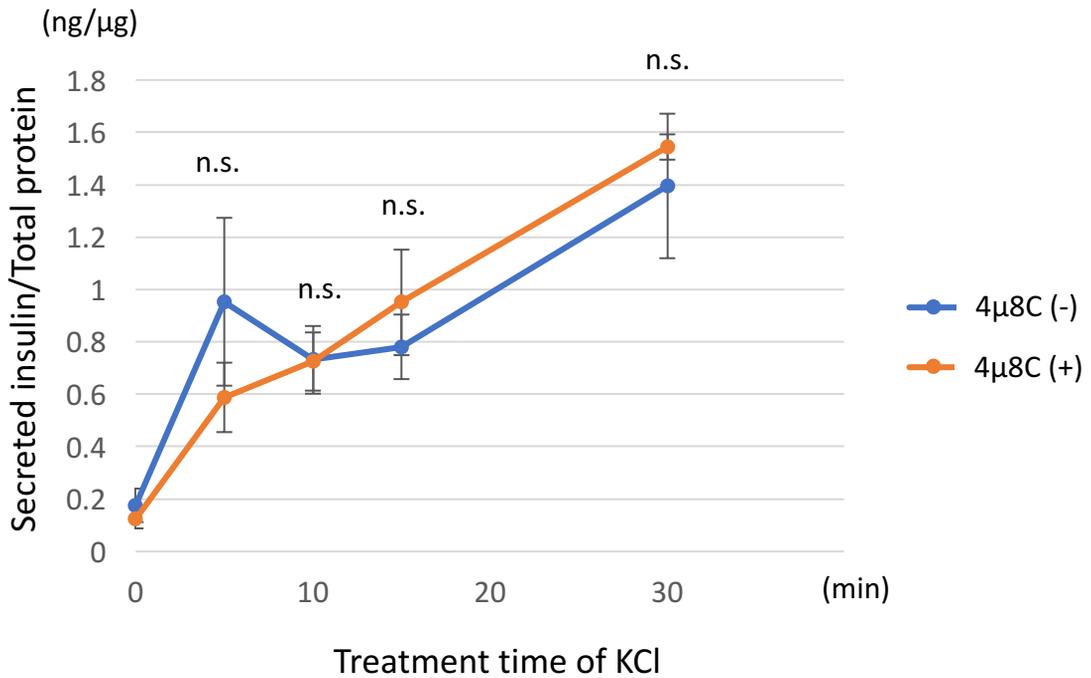


図13. カリウム刺激によるインスリン分泌量は4μ8C処理により低下しない

- A. マウス膵島β細胞を低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは64 μM 4μ8Cを含む低グルコース培地において60 mM KClによりインスリン分泌を誘導した。図に示した各時間において培地を一部回収し、培地中に放出されたインスリン量をELISAで検出しタンパク質量で補正した。独立した3回の実験結果より標準偏差を示した。
- B. Aの結果からKCl処理下のインスリン分泌量のみを表し、4μ8C処理による影響を示した。

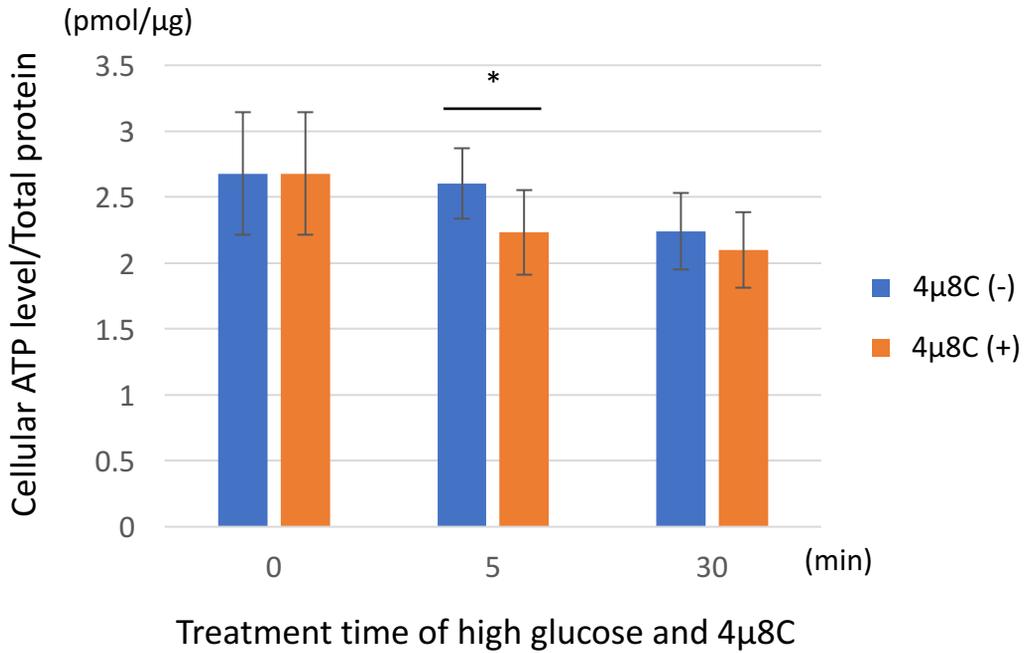


図14. 4μ8C処理により高グルコース条件下での細胞内ATP量は低下する  
 マウス膵島β細胞を低グルコース (1.67 mM) 培地で2時間培養したのち、DMSOあるいは  
 64 μM 4μ8Cを含む高グルコース (16.7 mM) 培地で図に示した時間培養した。細胞を回収  
 しライセートを調整後、ルシフェラーゼアッセイによりATP量を検出しタンパク質量で  
 補正した。独立した4回の実験結果より標準偏差を示した。\* $p \leq 0.05$

## 謝辞

入学前から私を温かく迎え、入学後に私が困らないようにと勉強できる場を与えてくださった河野憲二教授には大変感謝しています。入学後は、研究の場を与え最後まで指導していただき本当にありがとうございます。研究のことを何一つわからない私に一から丁寧に教えてくださった山本洋平博士、いつでも熱心に話を聞いていただき幅広い知識からアドバイスをくださった門倉広博士に御礼申し上げます。また、私が河野研に入った直後から、先輩として指導して下さるだけでなくずっと仲良く接して下さった保田裕貴氏に感謝しています。入学直後に不安になったとき、保田さんがいて下さったおかげで気持ちが楽になったことを昨日のこのように覚えています。

本研究は、斉藤美知子博士、今川祐介博士、芝陽子博士、土屋雄一氏からのご指導やディスカッションにより進めることができました。本当にありがとうございます。斉藤さん、今川さんには、貴重なお時間を使い、マウス個体を扱う実験にもご協力いただきました。芝さんには、思ってもいなかったところから論文を出す機会を与えていただきました。土屋さんには、 $\beta$ 細胞を使った実験の基本を教わり、また常に役立つ情報を提供し続けていただきました。

アドバイザーの別所康全教授、河合太郎教授には、毎年アドバイザーヒアリングで貴重なご意見をいただきました。修士論文発表後に優しいメールをくださった別所先生、本研究のために実験の場を提供して下さった河合先生に御礼申し上げます。

木俣行雄准教授、都留秋雄助教をはじめとするスタッフのみなさまがリードして、他のラボメンバーとともに研究しやすい環境を作ってくくださったことに感謝しています。また、苅田聡くんとは河野研の同期として5年間過ごすことができ、本当によかったと思っています。ありがとうございます。

最後に、これまでずっと支え続けてくれた家族には本当に感謝しています。ありがとうございます。

## 参考文献

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C., & Wechsler, S. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science*, 268(5209), 423-426.

Back, S., & Kaufman, R. (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*, 81(1), 767-793.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L., Harding, H., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2(6), 326-332.

Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., et al. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92-96.

Cross, B. C., Bond, P. J., Sadowski, P. G., Jha, B. K., Zak, J., Goodman, J. M., et al. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci. {U.S.A.}*, 109(15), E869-78.

Gao, Y., Sartori, D., Li, C., Yu, Q., Kushner, J., Simon, M., et al. (2012). PERK is required in the adult pancreas and is essential for maintenance of glucose homeostasis. *Mol Cell Biol*, 32(24), 5129-5139.

Gilon, P., Shepherd, R. M., & Henquin, J. (1993). Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidences in single pancreatic islets. *Diabetes*, 42(11), 22265-22268.

Gomez, E., Powell, M.L., Greenman, I.C., & Herbert, T.P. (2004). Glucose-stimulated protein synthesis in pancreatic  $\beta$ -cells parallels an increase in the availability of the translational ternary complex (eIF2-GTP.Met-tRNA<sub>i</sub>) and the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ \*. *J Biol Chem*, 279(52), 53937-53946.

Grill, V., Radtke, M., Qvigstad, E., Kollind, M., & Björklund, A. (2009). Beneficial effects of K-ATP channel openers in diabetes: An update on mechanisms and clinical experiences.

Diabetes Obes Metabolism, 11(s4), 143-148.

Harding, H. P., & Ron, D. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: A review. *Diabetes*, 51 Suppl 3, S455-61.

Harding, H., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., et al. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol.Cell*, 7(6), 1153-1163.

Hassler, J., Scheuner, D., Wang, S., Han, J., Kodali, V., Li, P., et al. (2015). The IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway is essential for the glucose response and protection of  $\beta$  cells. *Plos Biol*, 13(10), e1002277.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10(11), 3787-3799.

Hetz, C., Chevet, E., & Harding, H. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12(9), 703-719.

Hollien, J., Lin, J., Li, H., Stevens, N., Walter, P., & Weissman, J. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biology*, 186(3), 323-331.

Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., & Miura, M. (2003). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med*, 10(1), 98-102.

Korennykh, A., Korostelev, A., Egea, P., Finer-Moore, J., Stroud, R., Zhang, C., et al. (2011). Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. *Bmc Biol*, 9(1), 1-15.

Lee, A., Heidtman, K., Hotamisligil, G., & Glimcher, L. (2011). Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 $\alpha$  and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc National Acad Sci*, 108(21), 8885-8890.

Lipson, K., Fonseca, S., Ishigaki, S., Nguyen, L., Foss, E., Bortell, R., et al. (2006).

Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab*, 4(3), 245-254.

Maly, D., & Papa, F. (2014). Druggable sensors of the unfolded protein response. *Nat Chem Biol*, 10(11), 892-901.

Matsuda, M., Kawasaki, F., Mikami, Y., Takeuchi, Y., Saito, M., Eto, M., et al. (2002). Rescue of beta-cell exhaustion by diazoxide after the development of diabetes mellitus in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol*, 453(1), 141-148.

Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y., Cirstea, D., Santo, L., et al. (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 $\alpha$  is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*, 119(24), 5772-5781.

Ming, J., Ruan, S., Wang, M., Ye, D., Fan, N., Meng, Q., et al. (2015). A novel chemical, STF-083010, reverses tamoxifen-related drug resistance in breast cancer by inhibiting IRE1/XBP1. *Oncotarget*, 6(38), 40692-40703.

Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., & Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 279(2), 445-450.

Ota, Y., & Samelson, L. (1997). The product of the proto-oncogene c-cbl: A negative regulator of the syk tyrosine kinase. *Sci New York N Y*, 276(5311), 418-420.

Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 8(7), 519-529.

Shi, Y., Vattam, K., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., et al. (1998). Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2  $\alpha$ -subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18(12), 7499-7509.

Smeekens, S., Montag, A., Thomas, G., Albiges-Rizo, C., Carroll, R., Benig, M., et al. (1992). Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc.Natl.Acad.Sci. {U.S.A.}*, 89(18), 8822-8826.

Tsuchiya, Y., Saito, M., & Kohno, K. (2016). Pathogenic mechanism of diabetes development due to dysfunction of unfolded protein response. *Yakugaku Zasshi*, 136(6), 817-825.

Wiseman, R., Zhang, Y., Lee, K., Harding, H., Haynes, C., Price, J., et al. (2010). Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1. *Mol Cell*, 38(2), 291-304.

Ye, J., Rawson, R., Komuro, R., Chen, X., Davé UP, Prywes, R., et al. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol.Cell*, 6(6), 1355-1364.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881-891.

Zhang, C., Katoh, M., Shibasaki, T., & Minami, K. (2009). The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science*, 325(5940), 607-610.

Zhang, L., Nosak, C., Sollazzo, P., Odisho, T., & Volchuk, A. (2014). IRE1 inhibition perturbs the unfolded protein response in a pancreatic  $\beta$ -cell line expressing mutant proinsulin, but does not sensitize the cells to apoptosis. *Bmc Cell Biol*, 15(1), 29.

Zhang, W., Feng, D., Li, Y., Iida, K., McGrath, B., & Cavener, DR. (2006). PERK EIF2AK3 control of pancreatic  $\beta$  cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab*, 4(6), 491-497.

新井布美子 (2008) 膵臓における小胞体ストレス応答の解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 0671006)