

論文内容の要旨

申請者氏名 佐藤 仁美

小胞体内に構造異常の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。このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスセンサーである IRE1 α は小胞体膜に局在し、細胞質ゾル側に RNase ドメインをもつ。IRE1 α が小胞体ストレスを感知すると、標的である *XBPI* mRNA の特殊スプライシングを介して小胞体ストレスの解消を促す。近年、インスリンの分泌を担う膵島 β 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報告されている。また、膵島 β 細胞特異的に IRE1 α を欠損させたマウス (KO マウス) は糖尿病を発症することがわかっている。一方、IRE1 α KO マウスから調製樹立した β 細胞 (膵 β 培養細胞) を用いた先行研究から IRE1 α の欠失によりある種の PDI 関連遺伝子発現が低下し、結果としてプロインスリンの折り畳み不全によるインスリン量低下が示されていた。しかしアデノウィルスを利用した IRE1 α 欠損を利用しているため、解析まで 1-2 週間要しており、他の小胞体ストレス応答経路の代償的活性化などが確認されていた。そこで、本研究では IRE1 α の機能阻害による影響をより早い時間で解析するため、IRE1 α の RNase ドメイン特異的阻害剤として知られている 4 μ 8C を用いて解析した。

膵 β 培養細胞において、64 μ M の 4 μ 8C により、*XBPI* mRNA のスプライシングは完全に抑制されたので、本研究ではこの濃度を用いた。膵 β 培養細胞を 4 μ 8C で 2 日、4 日処理すると、高グルコース刺激によるインスリン分泌が抑制され、PDI ファミリー遺伝子の誘導抑制が観察され、IRE1 α KO 細胞より得られた結果をより短期間で再確認することができた。一方、高グルコース処理後のインスリン分泌をほぼ完全に抑えていたので、より早期での影響を調べた。膵 β 培養細胞を ³⁵SMet/Cys で標識し細胞内プロインスリン、インスリンの合成・成熟過程を調べた所、4 μ 8C の添加による影響は認めらず、細胞外への分泌を強く抑制していることが判明した。この結果は、IRE1 α KO β 細胞を用いたプロインスリンの成熟過程を阻害するという結果と異なるものであった。また、インスリン分泌阻害は膵 β 培養細胞だけでなく、マウスから単離した膵島を用いた場合、さらに IRE1 α KO 膵 β 培養細胞でも同様に観察された。更に詳細にインスリン分泌への阻害効果を調べた所、高グルコース刺激により誘導される *XBPI* mRNA のスプライシングを 15 分以内に抑制していること、細胞外へのインスリン放出に関してもほぼ添加と同時に阻害することが明らかになった。このことは、4 μ 8C が IRE1 α の阻害をすると同時にインスリンの調節性分泌も阻害することを示唆している。その点を詳細に検討した結果、4 μ 8C は構成性分泌には影響を与えないが、インスリンの調節性分泌を即時に阻害するという新たな作用点をもつことが明らかとなった。

以上のように、本研究は、膵臓 β 細胞で IRE1 α 経路を特異的にブロックすると、PDI ファミリー遺伝子の誘導が阻害され、インスリン分泌が抑制されることを示しただけでなく、IRE1 α の RNase ドメイン特異的阻害剤として開発された 4 μ 8C が、IRE1 α 非依存的にインスリン放出の阻害剤としても作用するという新知見を得た。本研究の成果は、膵 β 細胞における小胞体ストレス応答経路恒常的活性化の生理的役割と、その IRE1 α 阻害剤開発に新たな視点を与える重要な研究と位置づけられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐藤 仁美

小胞体ストレスセンサーの一つである IRE1 α は、ノックアウト (KO) マウスや KO β 細胞の解析から糖尿病に関与していることが明らかになりつつある。しかし、これまでの過去の研究では、遺伝子ノックアウトから解析までに数週間要しており、その間に他の小胞体ストレス応答経路の代償的活性化が確認されるなど、IRE1 α 経路の直接的阻害結果なのかが明確ではなかった。そのため、申請者は IRE1 α の機能をより早く阻害しその影響を解析するため IRE1 α の RNase ドメイン特異的阻害剤 4 μ 8C を用いた。

申請者はまず、膵島 β 細胞において高グルコース刺激により誘導される *XBP1* mRNA のスプライシングを 4 μ 8C は 15 分以内に抑制していることを明らかにした。また、これまで IRE1 α KO 膵 β 培養細胞の解析により示されている、高グルコース刺激によるインスリン分泌量の低下や PDI ファミリーの発現量低下を 4 μ 8C 処理によって再現できるかどうかを調べた。その結果、4 μ 8C 処理では、遺伝子 KO に比べより早い段階でインスリン分泌および PDI ファミリーの発現量が低下することを明らかとした。これらの結果は、4 μ 8C が膵島 β 細胞においても、IRE1 α の阻害剤として効果的に働くことを示している。しかし、このとき 4 μ 8C がインスリンの合成や成熟に影響しているのかを調べたところ、それらに変化は見られなかった。この結果は、IRE1 α KO β 細胞を用いた解析とは異なるものであった。

そこで、申請者は 4 μ 8C 処理によるインスリン分泌量の低下が、インスリン放出過程の阻害によるものかを調べた。その結果、4 μ 8C は処理後 5 分以内に高グルコース刺激によるインスリン放出を阻害していることが明らかになった。IRE1 α が *XBP1* mRNA のスプライシングを介して機能していると考えるとその影響が現れるのが非常に早く、4 μ 8C が異なる作用点をもつことが予想された。そのため、IRE1 α の KO 細胞を 4 μ 8C 処理したところ、4 μ 8C は KO 細胞においてもインスリン分泌を顕著に抑制することが明らかになった。すなわち、4 μ 8C は IRE1 α -XBP1 経路によらず、インスリンの調節性分泌を強く阻害することが示された。以上の結果は、4 μ 8C は IRE1 α 依存的、非依存的な 2 つの作用からインスリン分泌を強く阻害する薬剤であることを示している。

以上のように、本論文は膵臓 β 細胞において IRE1 α 経路の活性化が PDI ファミリー遺伝子の誘導に必要なこと、また IRE1 α 特異的阻害剤とされている 4 μ 8C にはインスリンの調節性分泌を特異的に阻害するというこれまでに知られていない重大な新しい作用があることを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。