

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 2 6 年度）

1. 機 関 番 号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成 2 6 年度 ~ 平成 2 8 年度
5. 課 題 番 号

2	6	4	3	0	0	9	0
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 小胞体ストレス応答不全による糖尿病発症機構の解析

7. 研究代表者

研 究 者 番 号	研 究 代 表 者 名	所 属 部 局 名	職 名
4 0 3 7 9 5 5 8	サイトウ ミチコ 斉藤 美知子	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研 究 者 番 号	研 究 分 担 者 名	所属研究機関名・部局名	職 名

9. 研究実績の概要

小胞体ストレスセンサーのひとつである IRE1 α の膵 β 細胞における役割を解析するため、膵 β 細胞特異的に IRE1 α を欠失させたマウス (IRE1 α CKO) を作製し、その解析を行ったところ、16週齢くらいから血糖値の上昇が見られた。さらに、ATF6 とのダブルノックアウトマウスを作製し、血糖値を調べたところ、シングルノックアウトマウスに比べ、さらに早い4週齢くらいから血糖値の上昇がみられた。

また、IRE1 α RNase ドメインの flox マウスと膵 β 細胞で特異的にガン化を起こすマウスとの掛け合わせにより、IRE1 α flox 遺伝子を持った膵 β 細胞の株化に成功した。この細胞にアデノウイルスで Cre を発現させることにより IRE1 α RNase ドメインを欠失させた細胞を樹立した。この細胞を用いて、インスリン分泌、インスリンタンパク質の合成を調べたところ、RNase ドメインを欠失させない細胞と比べ、明らかにインスリン分泌量が低下し、細胞内のインスリンタンパク質の量も減っていることがわかった。

10. キーワード

(1) 糖尿病	(2) 小胞体ストレス	(3) 小胞体ストレス応答	(4) インスリン
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

今年度の計画にあった、膵β細胞得意的にIRE1αのRNaseドメインを欠失したマウスとATF6 KOマウスを掛け合わせることに伴うATF6を全身で、IRE1αを膵β細胞で特異的に欠失したダブルノックアウトマウス(IRE1α-ATF6 DKO マウス)の作製は終了した。このマウスの血糖値を調べたところ生後4週以降、血糖値が高くなっていることがわかった。これは、IRE1α単独でノックアウトしたマウスよりも早い時期であった。また、IRE1αのRNaseドメインをloxPで囲んだfloxedマウスと膵β細胞特異的にSV40 Large T antigenを発現しガン化させるようにしたマウスとを掛け合わせることに伴い、IRE1α floxed遺伝子を持った膵β細胞株を作製した。これらの樹立した細胞において、アデノウイルスでCreを発現させることによってIRE1αのRNaseドメインを欠失させた。このIRE1α KO細胞を用いて小胞体関連遺伝子やタンパクのfoldingに関わる遺伝子の転写やタンパク合成がどのように変化しているのか解析中である。マウスの表現型解析については、グルコース負荷による耐糖能試験はほぼ終了しているが、インスリン負荷試験、および組織学的解析が解析途中である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

IRE1α CKOマウス、IRE1α-ATF6 DKO マウスの作製は終了したため、今後それらマウスの各週齢の耐糖能試験、インスリン負荷試験を行う。さらに、解析途中である組織学的解析も引き続き行う予定である。マウスの個体差が大きいため、各週齢それぞれ5匹以上のマウスを用い、さらにホルモンの影響のない雄マウスのみを使用することを計画している。このため、マウスがそろうのに時間がかかり、細胞の解析と平行して行うことにより、細胞における詳細な実験を前倒して行う予定である。また、組織学的解析において、BrdUで染色された細胞がβ細胞であるかどうかをわかりやすく、抗インスリン抗体と同時染色をする必要があるが、核染色と細胞質染色の同時染色がうまく行かないため、この染色方法を確立する必要がある。連続切片を用いることによる解析も考慮に入れて解析を進める予定である。各週齢での膵島の採取は順調に進んでいる。これらを用いて、転写量の変化をRT-PCRによって解析していく。またタンパク質レベルでの発現もWestern blotによって調べる予定である。樹立した細胞を用い、アデノウイルスでCreを発現させることによってIRE1αのRNaseドメインを欠失させ、その細胞で小胞体関連遺伝子やタンパクのfoldingに関わる遺伝子の転写やタンパク合成がどのように変化しているのかも解析途中であるので、今年度も引き続き行う。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

マウス飼育費が予定より大幅にかかり、その分旅費や消耗品を抑えたため、少しあまりが出た結果となった。

(使用計画)

マウス飼育費が少し抑えられる予定であること、逆に抗体、ELISAキットなどに予定以上の金額がかかることが判明したため、消耗品費に計上する予定である。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

著 者 名		論 文 標 題			
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

(学会発表) 計(4)件 うち招待講演 計(0)件

発 表 者 名		発 表 標 題	
土屋雄一、斉藤美知子、岩脇隆夫、宮崎純一、河野憲二		インスリン産生細胞における小胞体ストレスセンサーIRE1αの生理的役割	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第66回日本細胞生物学会大会		2014年06月11日～2014年06月13日	奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

発 表 者 名		発 表 標 題	
門倉 広、斉藤美知子、都留秋雄、稲葉謙次、河野憲二		ERdj5(JPDI)基質候補タンパク質のマウス個体組織からの網羅的同定	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第66回日本細胞生物学会大会		2014年06月11日～2014年06月13日	奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

発 表 者 名		発 表 標 題	
土屋雄一、斉藤美知子、岩脇隆夫、宮崎純一、河野憲二		インスリン産生細胞における小胞体ストレスセンサーIRE1αの生理的役割	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第9回小胞体ストレス研究会		2014年07月04日～2014年07月05日	徳島大学(徳島県徳島市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
斉藤美知子、土屋雄一、岩脇隆夫、森和俊、宮崎純一、河野憲二	小胞体ストレス応答不全による糖尿病発症機構の解明	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕計(0)件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考