

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 27 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)（一般） 4. 補助事業期間 平成 26 年度～平成 28 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	准教授

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

<p>哺乳類細胞における小胞体ストレスセンサーのうちのひとつである IRE1 の膵 細胞における機能を明らかにするため、膵 細胞特異的に IRE1 を欠失させたマウスを用い、解析を行っている。このマウスは、生後16週目あたりから血糖値の上昇が認められ、これはインスリン抵抗性のせいではなく、インスリン量の不足によるものであることがわかっている。また、糖負荷による解析で、インスリン分泌に低下が見られることもわかった。この詳細を調べるために、マウス個体ではなく細胞を用いて解析することとし、IRE1 RNase ドメインの flox マウスと膵 細胞特異的にがん化を起こすマウスを掛け合わせたマウス膵臓より、IRE1 RNase flox の遺伝子座を持つ株化 細胞を樹立した。この細胞にアデノウイルスを用いて Cre タンパク質を発現させ、IRE1 RNase ドメインを欠失した細胞を得ることができる。この細胞を用いて、インスリン分泌の低下、インスリンタンパク量の低下を確認した。この成熟型インスリンタンパク量の低下が何に起因するのかを調べるために、小胞体ストレスに関わる遺伝子群、タンパク質フォールディングに関わるシャペロン遺伝子群などの遺伝子発現解析を行ったところ、シャペロンの一部が減少していることがわかった。</p>

10. キーワード

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

11. 現在までの進捗状況

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)

IRE1 RNase ドメインのfloxマウスと膵 細胞特異的にがん化を起こすマウスを掛け合わせ、得られたマウスの膵臓より、IRE1 RNase flox の遺伝子座を持つ株化 細胞を樹立した。この細胞にアデノウイルスを用いてCreタンパク質を発現させて、loxP配列で囲まれたIRE1 RNase ドメインを欠失した細胞を得た。この樹立した細胞からRNAを抽出し、小胞体ストレス関連遺伝子とタンパク質のフォールディングに関わる遺伝子群の発現を調べた。また、放射性同位元素を取り込ませて調べたところ、翻訳に大きな差はないが、成熟過程に変化が認められた。

膵b細胞特異的にIRE1 RNaseドメインを欠失させたマウスの各週齢 (8 , 1 2 , 1 6 週) の組織学的解析を行い、血糖値上昇は膵島の数や面積の減少によるものではないことがわかった。

本学動物実験施設が空調機更新工事のため、ほぼ10ヶ月使用することができなかったため、IRE1 とATF6のダブルノックアウトの解析に関しては行うことができなかった。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

樹立したIRE1 RNaseドメイン欠失細胞において、成熟に差があることがわかってきたので、どの因子がインスリンタンパク質のフォールディングに関わっているのかを、遺伝子発現、タンパク質の発現などで確認する。因子がある程度特定できたら、その因子を細胞に導入しレスキューさせることができるのかどうか確認する。また、細胞で起こっている現象が、マウスでも起こっている現象であるのかどうか、マウス膵臓を用いて遺伝子発現、タンパク質発現を確認する予定である。

IRE1 とATF6のダブルノックアウトマウスに関しては、IRE1 RNase欠損細胞と同様に、細胞株を樹立し急激な血糖値上昇が起こる原因がどこにあるのか、詳細を調べる。まずは、IRE1 シングルノックアウト細胞で確認された因子がどのように変化しているのかを調べ、さらに別の因子にも差があるのかどうかを確認する。

形態学的な差を調べるために、電子顕微鏡での観察を行う。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

本年度は、動物実験施設が空調工事のため半年間動物を飼育できない状況であり、動物実験にかかる費用が当初の予定より少なくなった。また、学会参加費用が予定より少なくなったため。

(使用計画)

学会参加、および動物実験関連の試薬や動物購入に充てる予定である。

(課題番号 : 26430090)

(注) ・印刷に当たっては、A 4 判 (縦長) ・両面印刷すること。

(2 / 6)

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計(1)件/うち査読付論文 計(1)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著 者 名		論 文 標 題				
Tsuru, A.*, Imai, Y.*, Saito, M.*, and Kohno, K.		Novel mechanism of enhancing IRE1 -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway.				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Scientific Reports		有	6	2016	24217	-
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1038/srep24217						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

〔学会発表〕 計(7)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(2)件

発 表 者 名		発 表 標 題	
Yuichi Tuchiya, Michiko Saito, Jun-ichi Miyazaki, Takao Iwawaki, and Kenji Kohno		Physiological activation of IRE1 upregulates a subset of insulin folding enzymes in pancreatic cells.	
学 会 等 名		発表年月日	発表場所
Keystone Symposia "Diabetes: New Insights into Mechanism of Disease and Therapeutic Strategies (T2)" (国際学会)		2015年10月25日 ~ 2015年10月29日	Westin Miyako Kyoto, Kyoto, Japan

発 表 者 名		発 表 標 題	
Akio Tsuru, Yasutaka Imai, Michiko Saito and Kenji Kohno		PERK-ATF4 branch of the unfolded protein response is required for the full activation of IRE1 - XBP1 signaling	
学 会 等 名		発表年月日	発表場所
FASEB Science Research Conferences, "From Unfolded Proteins in the ER to Disease" (国際学会)		2015年06月14日 ~ 2015年06月19日	Saxtons River, VT, USA

発 表 者 名	発 表 標 題	
土屋雄一、斉藤美知子、宮崎純一、岩脇隆夫、河野憲二	膵臓beta細胞でのIRE1aの小胞体プロテオスタシスにおける役割	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第38回日本分子生物学会年会	2015年12月01日 ~ 2015年12月04日	神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
藤本拓志、斉藤美知子、都留秋雄、松本雅記、河野憲二、稲葉謙次、門倉広	膵臓特異的に発現しているPDIファミリータンパク質(PDIp)の生理的な機能の解析	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第38回日本分子生物学会年会	2015年12月01日 ~ 2015年12月04日	神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
額田知実、小池雅昭、山田麗奈、斉藤美知子、伊川正人、河野憲二	哺乳動物細胞におけるEF2 -ジフタミド修飾の機能解析	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第38回日本分子生物学会年会	2015年12月01日 ~ 2015年12月04日	神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
土屋雄一、斉藤美知子、宮崎純一、岩脇隆夫、河野憲二	膵臓 細胞におけるIRE1 の小胞体プロテオスタシスにおける役割	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第67回日本細胞生物学会大会	2015年06月30日 ~ 2015年07月02日	タワーホール船堀(東京都江戸川区)

発 表 者 名		発 表 標 題	
藤本拓志、斉藤美知子、都留秋雄、河野憲二、稲葉謙次、門倉広		膵臓特異的に発現しているPDIファミリータンパク質(PDIp)の生理的な機能の解析	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第67回日本細胞生物学会大会		2015年06月30日 ~ 2015年07月02日	タワーホール船堀(東京都江戸川区)

(図書) 計(0)件

著 者 名		出 版 社	
書 名			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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1)国際共同研究： -

17.備考

奈良先端科学技術大学院大学 動物細胞工学研究室(河野研)
<http://bsw3.naist.jp/kouno/research01.html>