

平成27年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

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

研究活動スタート支援

4. 研究期間

平成27年度～平成28年度

5. 課題番号

1

5

H

0

6

4

1

0

6. 研究課題名

インスリン分泌における小胞体ストレスセンサーIRE1aの機能とその分子機構の解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
50755866	シバ ヨウコ 芝 陽子	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

当研究室では以前にIRE1αのRNaseドメインを膵島で特異的にノックアウトしたマウスでインスリン分泌量の低下がみられることを発見した。本研究ではIRE1αのRNase活性の阻害がなぜインスリン分泌を阻害するかについて、IRE1αのRNase活性阻害剤を培養細胞系の膵島β細胞にかけることによって調べた。1. IRE1αのRNase活性阻害剤、4μ8cおよびSTF083010を膵島β細胞にかけるとインスリン分泌が2時間以内で阻害されることを明らかにした。

2. 構成性分泌が阻害されていないかどうかSecreted Alkaline Phosphatase (SEAP)を膵島β細胞に発現させて調べたところ、4μ8cをかけた時にSEAPの分泌は阻害されていなかった。このことは4μ8cはインスリン分泌を特異的に阻害していることを示唆する。

3. インスリンの合成量を高グルコース時に[35S]-Met/Cysで細胞内タンパク質を30分ラベルして調べたところ、4μ8c存在下でインスリン合成量はコントロールと比べて10%低下していることが明らかとなった。

4. インスリンの成熟速度を[35S]-Met/Cysで15分細胞内タンパク質をラベルして、その後30,60,120分インキュベーションしてインスリンが成熟型になる速度を調べたところ、4μ8c存在下でインスリンの成熟速度はコントロールと比べて変化がないことがわかった。

5. SNAPタグをつけたインスリンを膵島β細胞に発現させて4μ8cをかけたところ、インスリンの細胞内局在には変化がないことがわかった。

10. キーワード

(1) インスリン	(2) 小胞体ストレスセンサー	(3) 阻害剤	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの進捗状況

(区分) (3) やや遅れている。

(理由)

4 μ 8cを膵島 β 細胞にかけてインスリン分泌を5分から2時間のタイムコースで測定したところ、5分の段階で4 μ 8cはインスリン分泌を阻害している可能性があることが明らかとなった。IRE1 α は小胞体に存在し、インスリンの生合成に関与していると考えられることから、4 μ 8cにはIRE1 α のRNase活性の阻害効果に加えて、他の細胞内因子も阻害している可能性が考えられる。SEAPの分泌には影響がないことから、このIRE1 α 以外の因子に対する阻害効果はインスリンのような調節性分泌経路にだけ存在するものと思われる。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

まず4 μ 8cのIRE1 α 以外の因子に対する阻害効果がインスリンの生合成段階にあるのかエクソサイトーシスの段階にあるのかを明らかにする。現在は培養細胞系の膵島 β 細胞を用いているが、培養細胞だと高グルコースにして5分の段階だとインスリン分泌がはっきりとは見えないため、マウスから膵島をとって高グルコース存在下で5分で4 μ 8cの効果が現れるかを見る。4 μ 8c存在下でインスリン分泌が5分で阻害された場合、エクソサイトーシスに関わる因子を4 μ 8cが直接阻害している可能性が高い。これを明らかにした上で、今後はIRE1 α の阻害にはレンチウイルスにsiRNAもしくはsgRNAを入れて阻害を行う。Preliminaryな結果では、4 μ 8c存在下で蛍光抗体法によりインスリン顆粒の量が減少している可能性があること、またIRE1 α のRNaseドメインの変異体をマイクロインジェクションにより15時間程度で発現させたところ、インスリンの合成阻害が起こることがわかった。このことはIRE1 α が短時間の間にインスリンの生合成に関与していることを示唆する。今後は高グルコース時にIRE1 α に別のタンパク質が結合していないかどうか免疫沈降法によって結合タンパク質を調べ、遺伝子発現を介さずにIRE1 α がインスリン分泌に影響を与える分子機構を明らかにする。

13.研究発表 (平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計 (0) 件／うち査読付論文 計 (0) 件／うち国際共著論文 計 (0) 件／うちオープンアクセス 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	国際共著	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
オープンアクセス						

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

発 表 者 名		発 表 標 題	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	

(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. 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

--