

論文内容の要旨

申請者氏名 土屋 雄一

小胞体のホメオスタシスに働く小胞体ストレスセンサーである IRE1 α は、小胞体ストレスセンサーの中で進化的に最も保存されているだけでなく、哺乳動物の発生にも必須の遺伝子である。したがって、IRE1 α は哺乳動物の様々な組織で重要な機能を持つことが予想されるが、その詳細は十分に解析されていない。

そこで申請者は、IRE1 α の生体内での働きを理解するために、マウスを哺乳動物のモデル生物とし、様々な組織での IRE1 α の活性化を解析した。その結果、他の組織とは異なり、膵臓 β 細胞では IRE1 α が生理的条件下でも恒常的に強く活性化していることを見出した。この生理的意義を明らかにするために、膵臓 β 細胞特異的に IRE1 α を欠損するマウスを作製し解析したところ、IRE1 α 遺伝子欠損マウスは、生後 4 週齢からインスリン分泌量の低下が観察され糖尿病を発症することが判明した。インスリン分泌量の低下の原因を詳しく調べたところ、IRE1 α 遺伝子欠損マウスでは、膵臓 β 細胞でのインスリンの生産が顕著に低下していることが明らかとなった。

次に、膵臓 β 細胞特異的 IRE1 α 遺伝子欠損マウスでのインスリン合成量低下の分子機構を明らかにするために、IRE1 α 遺伝子の活性領域にあたる RNase ドメインが floxed されたモデル β 細胞、MIN6 (Ire1 $\alpha^{fl/fl}$) 細胞を樹立した。MIN6 (Ire1 $\alpha^{fl/fl}$) 細胞に Cre-loxP システムを働かせることで、効率的に IRE1 α の機能を失った MIN6 (Ire1 $\alpha^{ $\Delta R/\Delta R$ }) 細胞を得ることが出来るからである。MIN6 (Ire1 $\alpha^{ $\Delta R/\Delta R$ }) 細胞は、マウスと同様に、インスリン分泌の低下と細胞内インスリン量の低下を示した。この原因について、パルスチェイス実験により詳しく解析したところ、MIN6 (Ire1 $\alpha^{ $\Delta R/\Delta R$ }) 細胞ではインスリンの前駆体であるプロインスリンの酸化的折り畳みが著しく阻害されていることが明らかとなった。そこで、小胞体で折り畳みに働く様々な因子に関して遺伝子及びタンパク質レベルでの発現量を調べたところ、MIN6 (Ire1 $\alpha^{ $\Delta R/\Delta R$ }) 細胞と膵臓 β 細胞特異的 IRE1 α 遺伝子欠損マウスでは、5 つの PDI ファミリー (PDI、PDIR、P5、ERp44、ERp46) の発現量が特異的に低下していることがわかった。さらに、これら 5 つの PDI ファミリーがプロインスリンと直接結合することも見出した。次に、MIN6 (Ire1 $\alpha^{ $\Delta R/\Delta R$ }) 細胞に IRE1 α または標的産物である XBP1s を強制発現し、プロインスリンの折り畳みが回復するかどうかのレスキュー実験を行った。その結果、IRE1 α -XBP1 経路を再構成することで、上記 5 つの PDI ファミリーの発現量が回復すると共に細胞内インスリン量、インスリン分泌も回復することを確認した。さらに、MIN6 (Ire1 $\alpha^{ $\Delta R/\Delta R$ }) 細胞に 5 つの PDI ファミリーを再構成する実験でも、インスリンの折り畳みと分泌が回復することも示した。以上の知見から、申請者は、IRE1 α は膵臓 β 細胞においてインスリンの酸化的折り畳みを促す 5 つの PDI ファミリーを動員することで、インスリンの合成能を維持することに働いていると結論付けた。$$$$$$

論文審査結果の要旨

申請者氏名 土屋 雄一

小胞体の機能不全は小胞体ストレスと総称され、折り畳み不全タンパク質の小胞体への蓄積を伴う。これは細胞にとって有害であり、細胞は小胞体ストレス状態を避けるため(あるいは小胞体ストレス状態から回復するため)、小胞体ストレス応答を引き起こす。小胞体ストレス応答として最もよく知られた事象が、小胞体内在性分子シャペロンを含む小胞体タンパク質の転写レベルの誘導である。なお、小胞体ストレスを感知して小胞体ストレス応答を惹起する小胞体ストレスセンサーとして、哺乳動物細胞は複数の種類のタンパク質を小胞体膜に有しており、その中のひとつが申請者の研究対象である IRE1 α である。

小胞体ストレス応答の存在は1980年代末に明らかにされており、次いで、1990年代から2000年代前半にかけて、主として出芽酵母や哺乳類培養細胞を用いた研究により、どのような因子がどのように働いて小胞体ストレス応答が引き起こされるのかについて、分子細胞生物学的な理解が深められてきた。一方、哺乳動物個体がどのような局面において小胞体ストレス応答を引き起こし、あるいは、小胞体ストレス応答シグナル伝達経路を必要とするのかについては、その一端は明らかにされているものの、いまだに未解明な点が多く残されている。

哺乳動物個体が生理的条件下で引き起こす小胞体ストレス応答に関して、現在広く受け入れられているコンセプトのひとつは、「分泌が盛んな細胞は、そもそも小胞体が過負荷状態にあり、小胞体ストレス応答が惹起されている」ということである。その最も顕著な事例が、本論文の研究対象である膵ランゲルハンス島 β 細胞であり、インスリンの高分泌に応じて小胞体ストレス状態になり IRE1 α が活性化することが以前から知られており、その事象と糖尿病との関連を指摘する論文も過去には報告されている。しかし、IRE1 α 遺伝子破壊はマウスでは胎生致死であるため(成長因子を高分泌する胎盤細胞がダメージを受けるため)、ノックアウトマウスなどを用いた詳細な IRE1 α の機能解析は困難であった。

そこで申請者は、Cre-LoxP システムを用いて β 細胞のみで IRE1 α 遺伝子をノックアウトする系を作製し、また、そのマウスの β 細胞を株化することにより、*In vitro* にて β 細胞における IRE1 α の機能にアプローチすることができる実験手法を立ち上げた。さらには、それを用い、 β 細胞では IRE1 α 依存的なタンパク質ジスルフィド結合イソメラーゼ(PDI)群の発現誘導(そして、それらによるインスリンの分子内ジスルフィド結合)が重要であることを実証した。すなわち、IRE1 α 遺伝子ノックアウト β 細胞では、タンパク質ジスルフィド結合イソメラーゼ(PDI)群の発現量が低下し、かつ、インスリンの酸化的フォールディングと分泌が不全を来した。そして、そのような IRE1 α 遺伝子ノックアウト β 細胞の表現型は、PDI 群の強制発現によって抑圧された。

以上のように、本論文は小胞体ストレス応答の動物個体内での意義を解明するもので、糖尿病を含めた疾患の理解にもつながると期待され、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。