

氏 名	野 崎 潤 一
学 位 の 種 類	博 士 (社会健康医学)
学 位 記 番 号	社 医 博 第 1 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 社 会 健 康 医 学 系 専 攻
学位論文題目	The endoplasmic Reticulum Stress Response is Stimulated Through the Continuous Activation of Transcription Factors ATF6 and XBP1 in <i>Ins2^{+/Akita}</i> Pancreatic β Cells (<i>Ins2^{+/Akita}</i> 膵 β 細胞株における転写因子 ATF6 および XBP1 の持続的活性化を介した小胞体ストレス応答)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 淀 井 淳 司 教 授 小 泉 昭 夫

論 文 内 容 の 要 旨

マウス糖尿病責任遺伝子 *Ins^{akita}* はインスリン遺伝子 *Ins2* の C96Y 変異体である。この変異を有するマウスは出生の時は通常のランゲルハンス島を有しているが、成長にともない β 細胞が消失し糖尿病を発症する。マウス等のげっ歯類は *Ins1*, *Ins2* の 2 種類のインスリン遺伝子を持っており、合計 4 コピーのインスリン遺伝子を発現している。このため *Ins2* の両方のコピーを失ってもインスリン量は十分に補われる。この変異遺伝子は *Insulin2* の A7-B7 間のジスルフィド結合の形成が出来なくなり、小胞体でのホールディングとプロセッシングに障害を起こし、その結果糖尿病を発症すると考えられる。そのため、小胞体での品質管理によるメカニズムが発症に関与していると考えられる。我々は小胞体における蛋白質のホールディングとプロセッシング障害にともなうストレス応答を解析するために *Ins^{+/akita}* 膵 β 細胞株を樹立した。その細胞株は持続的に小胞体ストレスにさらされていることが予想された。この細胞から抽出した蛋白質中の種々の小胞体シャペロンについてウェスタンブロット法により解析すると、Grp78 を始めとしてそのプロモーターに小胞体ストレス応答エレメント (ERSE) を持つ小胞体シャペロンの発現が亢進していた。この小胞体ストレスの応答のメカニズムを解析するために、GRP78 プロモーターを用いたレポーター解析を行った。*Ins^{+/+}* β 細胞株と *Ins^{+/akita}* β 細胞株間でレポーター活性を比較したところ *Ins^{+/akita}* β 細胞株の方が有意に高い値を示した。更に、*Ins^{+/+}* β 細胞株に *Ins^{akita}* を一過的に強制発現させると強い小胞体ストレスを誘導した。この時、GRP78 プロモーターに存在する ERSE に変異を入れるとレポーター活性は低くなった。そこで小胞体ストレス蛋白質発現遺伝子の ERSE に結合する主な転写因子である活性型 ATF6 の発現量を調べたところ、*Ins^{+/akita}* β 細胞株で有意な増加が見られた。これらの結果は、*Ins^{akita}* が小胞体ストレスを強く誘導し、変異型細胞株では持続的に ATF6 を介した小胞体ストレス応答が起きていることを示している。更に小胞体ストレス応答の経路に係わる転写因子 XBP1 に関して XBP1 が特異的に結合する TGACGTG 配列を用いたレポーター解析を行った。その結果、*Ins^{+/akita}* β 細胞株で有意に高い応答がみられた。XBP1 を介した小胞体ストレス応答の経路では、XBP1 mRNA が IRE1 α によってスプライスを受けて活性型 XBP1 蛋白質を生じる。*Ins^{akita/+}* β 細胞株では *Ins^{+/+}* β 細胞株に比べスプライスされた XBP1 mRNA の割合が多かった。これらの結果は、*Ins^{akita}* によって小胞体ストレスが誘導され、活性化された ATF6 と XBP1 が小胞体シャペロンのプロモーター上の ERSE に結合し、転写活性化を示している。変異型細胞株においては、以上の応答が持続的に起こっている。よって今回樹立した細胞株は持続的小胞体ストレス応答のモデルになるものと考えられ、新たな糖尿病発症のメカニズム解析と共にホールディング異常症の解析に有用と考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

マウス糖尿病責任遺伝子 *Ins^{akita}* は *Ins2* の C96Y 変異体のため、A7-B7 間の disulfide bond が形成されず、folding 異常により糖尿病を発症すると考えられている。本研究では、小胞体ストレス応答を解析するために *Ins^{+/akita}* 膵 β 細胞を樹立した。

この細胞株では、GRP78を始めとしてそのプロモーターに小胞体ストレス応答エレメント（ERSE）を持つ小胞体シャペロンの遺伝子発現が亢進していた。さらに、Grp78プロモーターを用いたレポーター解析では、*Ins*^{+/akita}β細胞株が対照に比較し有意に高い値を示した。プロモーターに存在するERSEに変異を入れるとレポーター活性は低くなり、結合する主な転写因子である活性型ATF6の発現量は有意に増加していた。更にXBP1が特異的に結合するTGACGTG配列を用いたレポーター解析では、*Ins*^{+/akita}β細胞株で有意に高い応答がみられ、スプライスされたXBP1mRNAの割合が多かった。これらの結果は*Ins*^{akita}によって活性化されたATF6とXBP1を介して小胞体ストレス応答が生じていることを示している。

以上の研究は、Folding異常症の病態の解明に貢献し、糖尿病発症メカニズム解明に寄与するところが多い。したがって本論文は博士（社会健康医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年2月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。