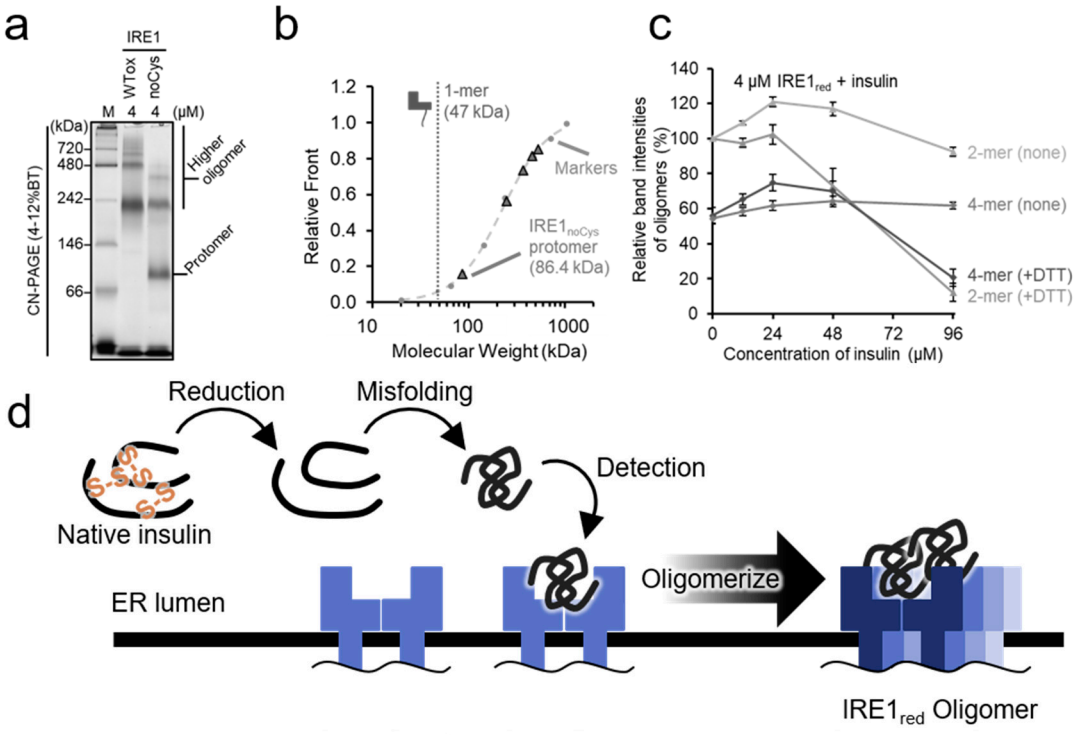
135　ストレスセンサーによる細胞運命制御の分子機構解明	松﨑　元紀

【目的】Ⅱ型糖尿病は、膵臓の細胞（膵島β細胞）の不可逆的な減少によって悪化していくが、糖尿病初期の従来的な治療薬であるスルホニルウレア剤などはインスリン生産量を上げるものの、β細胞死を促進する副作用があるため長期的な視点での治療効果は限定的である。糖尿病の根源的治療法開発のためには、β細胞死を制御するメカニズムを分子レベルで解明し、細胞保護および細胞死抑制を両立する薬剤開発の基盤を構築することが急務である。

【方法】膵島β細胞死を制御するメカニズムを分子レベルで解明し、薬剤開発の基盤を構築するため、本研究では、小胞体ストレスセンサーIRE1 の超分子多量体について、1. Clear Native PAGE（CN-PAGE）法を用いた動態解析、2. 極低濃度域における多量体構造解析、3. 低分子試薬による IRE1 多量体化制御の検討、4. 細胞レベルの細胞保護活性の検討を行った。

【結果】CN-PAGE 法を用いた動態解析により、IRE1 内腔ドメインは、直接的に活性酸素やタンパク質凝集体をストレスとして感知し、超分子多量体を形成することが示唆された。極低濃度域における多量体構造解析から、IRE1 の二量体化は、自発的に生じており、二量体が構成単位となって、分子間ジスルフィド結合形成やインスリン凝集体形成に応答した超分子多量体形成が起きていることが示唆された。IRE1 多量体が含む分子間ジスルフィド結合について、レドックス低分子試薬による影響を検討し、効率よく作用する分子を同定した。レドックス低分子試薬による細胞レベルの細胞保護活性を検討、ストレスの軽減を示唆する結果を得た。これらの結果から、開発したレドックス低分子試薬が、IRE1 超分子多量体に含まれる分子間ジスルフィド結合を制御することで、IRE1 超分子多量体形成の下流シグナルを調節し、細胞保護に働く可能性を見出した。

IRE1 内腔ドメインの会合状態分布の可視化とストレス感知による多量体形成促進



135. ストレスセンサーによる細胞運命制御の分子機構解明

松﨑　元紀

徳島大学 先端酵素学研究所 分子生命科学分野

Key words：小胞体ストレス応答，小胞体ストレスセンサー，ジスルフィド結合，タンパク質多量体

緒　言

近年、食の欧米化や高齢化の中で、糖尿病やその予備軍と考えられる人口は日本国内で 2,000 万人に上り、国内の関連医療費は 1.2 兆円（2017 年度）と最重要な医学的課題になっている。糖尿病は膵臓の細胞（膵島β細胞）の減少による機能不全により診断されることが多いが、診断時点ですでに健常時の半分ほどが死滅しており補充ができないことが根本的な治療法の確立を難しくしている。また、糖尿病初期の従来的な治療薬であるスルホニルウレア剤などはインスリン生産量を上げるものの、β細胞死を促進する副作用があるため長期的な視点での治療効果は限定的である。糖尿病の根源的治療法開発のためには、β細胞死を制御するメカニズムを分子レベルで解明し、細胞保護および細胞死抑制を両立する薬剤開発の基盤を構築することが急務である。

β細胞死の一因は、許容量を超えたインスリンの生合成がミスフォールドインスリン凝集体形成につながり、アポトーシスで死滅することである［1］。小胞体のストレスセンサーIRE1 は、内腔ドメインの超分子多量体形成によってこの凝集体形成を感知し、通常はストレスの緩和とアポトーシスの抑制の制御を、慢性的ストレス下ではアポトーシスの抑制を解くと言われている［2］。すなわち、IRE1 はストレスに対する細胞の適応と死を切り替える重要なスイッチとして機能する。しかし、IRE1 の多量体構造や、スイッチングの分子機構は不明である。近年、酸化還元酵素を介して IRE1 が制御されうることが報告され［3］、レドックスが IRE1 による細胞運命のスイッチングに関わっていることが示唆された。そこで、本研究では、超分子多量体の定量的評価法を確立し、インスリン凝集とレドックスを多量体形成に影響する因子として解析する。加えて、構造解析および細胞レベルのシグナリング解析も行い、IRE1 による細胞運命制御の分子機構に迫る。最終的に、レドックスを新たな作用点とし、凝集抑制と IRE1 シグナル制御の両方に働く創薬基盤確立を試みた。

方　法

1. CN-PAGE 法を用いた動態解析

大腸菌発現系により、リコンビナント IRE1 内腔ドメインを大量発現し、純化した。CN-PAGE 法を用いて、過酸化水素あるいはインスリン凝集体存在下で、会合状態分布を分離した。CBB 染色により、IRE1 を検出し、バンド強度を定量解析した。

2. 極低濃度域における多量体構造解析

サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱（SEC-MALS）法、マスフォトメトリー（MP）法、およびマイクロ流体拡散サイジング（MDS）法、動的光散乱（DLS）法を用いて、IRE1 濃度に応じた IRE1 多量体あるいは単量体の平均分子量、単粒子質量、および粒子径について測定し、0.01～50μM の広範な濃度域における状態変化から、構成単位と会合状態変化を解析した。

3. 低分子試薬による IRE1 多量体化制御の検討

先行研究に基づいて設計した様々なレドックス低分子存在下で、酸化型 IRE1 を恒温処理し、経時的に N-メチルマレイミドを含んだ SDS サンプルバッファ（SDS-NEM）と混合して反応停止を行った。サンプルを SDS-PAGE 法により分離し、バンド強度を定量した。

4. 細胞レベルの細胞保護活性の検討

3. で選抜したレドックス低分子存在下および非非存在下で、ヒト培養細胞 HAP1 にツニカマイシン（TM）によるストレス処理を行い、SDS-NEM で細胞を回収した。サンプルを、超音波処理、SDS-PAGE 法の分離、抗 KDEL 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、BiP タンパク質に相当するバンド強度を定量した。

結果および考察

1. CN-PAGE 法を用いた動態解析

IRE1 超分子多量体の形成および細胞内シグナリングの分子機構を明らかにするため、超分子多量体の検出法を開発し、レドックス（分子間ジスルフィド結合）とインスリン凝集による多量体形成への影響を解析した（図 1）。IRE1 内腔ドメインは、複数の会合状態を取ることが明らかとなった。また、分子間ジスルフィド結合は会合状態分布を大きく変えていた。分子量マーカーとの比較から、ほぼ全ての IRE1 分子が単量体よりも大きな多量体として存在することが示唆された。インスリンと IRE1 内腔ドメインを共存させて CN-PAGE 分析を行ったところ、インスリンが異常な凝集体を形成したときに限って、内腔ドメインの会合が促進されることが分かった。

これらの結果から、IRE1 内腔ドメインは、直接的に活性酸素やタンパク質凝集体をストレスとして感知し、超分子多量体を形成することが示唆された。

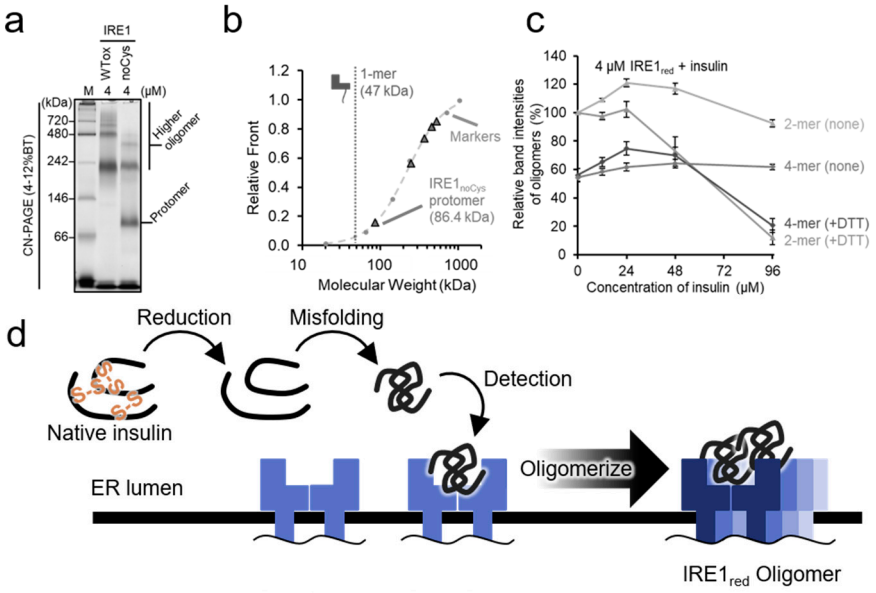


図 1. CN-PAGE を用いた IRE1 内腔ドメインの動態解析

a）IRE1 内腔ドメインの CN-PAGE 分析。

b）a）における内腔ドメイン会合体の分子量推定。

c）インスリン凝集体存在下における IRE1 内腔ドメインの CN-PAGE 分析。

d）IRE1 内腔ドメインによるインスリン凝集体の感知と超分子多量体形成の模式図。

2. 極低濃度域における多量体構造解析

IRE1 の会合状態は、分子間ジスルフィド結合、インスリン凝集体のみならず、IRE1 の濃度にも影響を受けていた。そこで、IRE1 超分子多量体の構成単位（protomer）を決定するため、極低濃度域における粒子径および分子量について検討した（図 2）。SEC-MALS によって、分子量推定を行ったところ、数μM オーダーでは、二量体よりも小さくならないことが示唆された。MP により、10～100 nM における会合状態分布を測定したところ、低濃度側では単量体が観測され、濃度が上がるにつれて二量体化することが明らかとなった。さらに MDS によって、5 nM～50 μM の広い濃度域で平均粒子径を測定したところ、IC_{50}＝120 nM で、単量体から二量体の状態遷移があることが示唆された。加えて、高濃度域では連続的な粒子径の増加が観測され、超分子多量体の会合状態変化はμM オーダーで生じることが示唆された。この傾向は、DLS でも同様だった。

これらのことから、IRE1 の二量体化は、自発的に生じており、二量体が protomer となって、分子間ジスルフィド結合形成やインスリン凝集体形成に応答した超分子多量体形成が起きていることが示唆された。

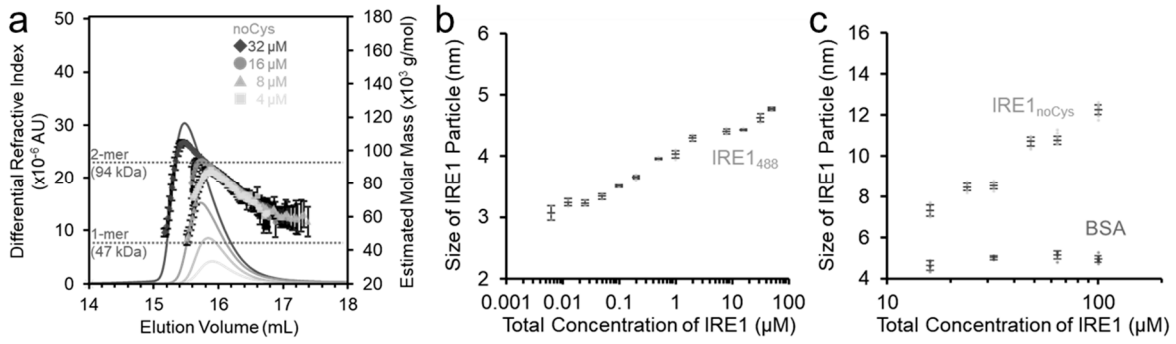


図 2. IRE1 内腔ドメインの濃度依存的な動態解析

a) IRE1 内腔ドメイン分子量の SEC-MALS 分析。

b) 広い濃度域における IRE1 内腔ドメイン平均粒子径の MDS 分析。

c) 高濃度域における IRE1 内腔ドメイン平均粒子径の DLS 分析。

3. 低分子試薬による IRE1 多量体化制御の検討

分子間ジスルフィド結合が、IRE1 超分子多量体の会合状態分布を大きく変化させることが明らかとなったため、分子間ジスルフィド結合を制御するレドックス低分子試薬を設計し、IRE1 多量体に対する反応性をスクリーニングした。低分子の反応部位付近の官能基によって、異なる活性が検出され、反応性の高い分子を選抜できた。

4. 細胞レベルの細胞保護活性の検討

選抜した分子による細胞保護活性を検討するため、ヒト培養細胞系で、ストレス処理と併せて低分子試薬処理を行い、ストレス応答の度合いを定量した。スクリーニングで得られた化合物 A と B について、細胞保護活性を検討するため、化合物存在下で培養細胞をストレス誘導剤 TM で処理し、ストレスの度合いをストレス応答性分子シャペロンの発現量を指標として評価した。化合物 A 存在下で、分子シャペロン発現量が有意に低下し、化合物 A によるストレスの軽減が示唆された（図 3）。

これらの結果から、開発したレドックス低分子試薬が、IRE1 超分子多量体に含まれる分子間ジスルフィド結合を制御することで、IRE1 超分子多量体形成の下流シグナルを調節し、細胞保護に働く可能性を見出した。

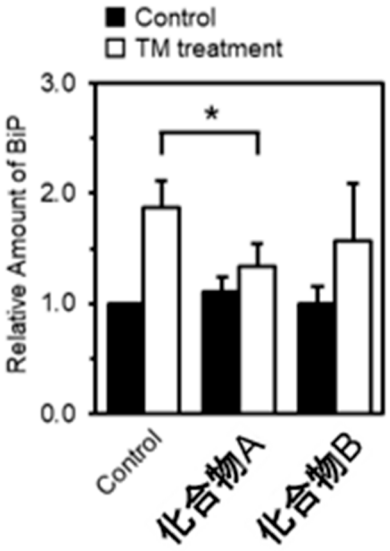


図 3. 分子シャペロン発現量を指標とした細胞保護活性の評価
ストレス誘導剤処理と開発した化合物 A および B について同時に処理し、ストレス誘導の度合いを WB により定量した。Control 群（DMSO 処理）にストレス処理した場合と化合物 A 処理群にストレス処理した場合について、Welch の t 検定を行った。$P<0.05$ を有意差ありとした（*）。$p=0.046$、Hedges' $g=1.9$。

共同研究者・謝辞

本研究の DLS データ測定は、Anton Paar Japan の協力を得て行った。

文　献

1） Lindholm D, Korhonen L, Eriksson O, Kõks S. Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease. Front Cell Dev Biol. 0(MAY):48, 2017; PMID: 28540288; DOI: 10.3389/fcell.2017.00048

2） Chang TK, Lawrence DA, Lu M, Tan J, Harnoss JM, Marsters SA, et al. Coordination between Two Branches of the Unfolded Protein Response Determines Apoptotic Cell Fate. Mol Cell. 71(4):629-636.e5, 2018; PMID: 30118681; DOI: 10.1016/j.molcel.2018.06.038

3） Eletto DD, Eletto DD, Dersh D, Gidalevitz T, Argon Y. Protein Disulfide Isomerase A6 Controls the Decay of IRE1α Signaling via Disulfide-Dependent Association. Mol Cell. 53(4):562–576, 2014; PMID: 24508390; DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.004