

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	山口大学医学部付属病院 内科学第三
氏 名	田部勝也
研究テーマ	GSK-3βによる膵β細胞機能調節機構の解明とその制御による2型糖尿病治療の研究

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

<研究目的>

肥満・糖尿病患者および2型糖尿病モデル動物での解析から、セリンスレオニンキナーゼGSK-3が様々な程度に糖尿病の病態形成に関与することが推察される。本研究では、膵β細胞におけるGSK-3に焦点を当て、GSK-3を標的とした膵β細胞保護に基づく糖尿病治療戦略とその分子基盤の確立を目指す。具体的には、**糖尿病病態下で想定される小胞体ストレス誘導性膵β細胞アポトーシスにおけるGSK-3βの役割を解明する。**

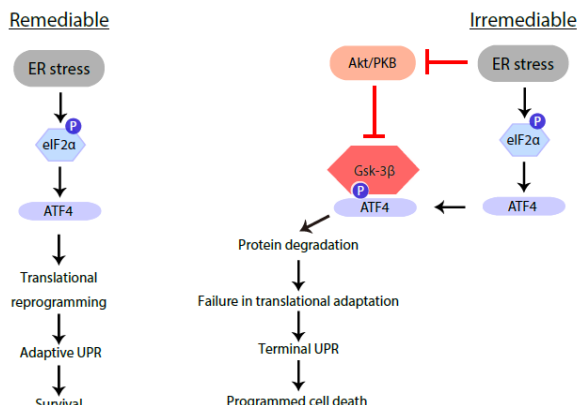
<研究方法>

マウス単離ラ氏島およびβ細胞株に薬剤性に小胞体ストレスを誘導した。Akitaマウスより膵β細胞株を樹立した。これらの小胞体ストレスモデルにおいてGSK-3特異的阻害薬処理またはレトロウィルスを用いたGSK-3β抑制型変異体強制発現によりGSK-3活性を抑制した。アポトーシス誘導について切断型カスパーゼ3およびDNAフラグメントの検出により評価した。小胞体ストレス応答経路に対するGSK-3活性抑制の影響や発現制御機構についてウェスタンブロット、免疫沈降法、real time PCRおよび細胞免疫染色により解析した。GSK-3による標的のリン酸化をIn vitro kinase assayおよびPhostag法により確認した。mRNA翻訳についてメタボリックラベリング法により解析した。

<研究結果>

小胞体ストレス誘導モデルにおいて、GSK-3 が活性化した。GSK-3 活性抑制がアポトーシス誘導を減弱した。このとき、転写因子 ATF4 の発現が増強し、これには ATF4 蛋白の安定性増加が関連した。核における ATF4 と Gsk-3 は共局在を認め、直接の結合を認めた。ATF4 は SCF /E3 ligase を介したユビキチン化-蛋白分解による翻訳後調節をうける。この点について、GSK-3 が ATF4-degron 近傍に位置する Ser214 をリン酸化することにより SCF E3 ligase と ATF4 の結合を促進することが明らかとなった。さらに、ATF4 dominant negative 変異体過剰発現あるいは ATF4 knock down により GSK-3 活性抑制の抗アポトーシス効果が減弱した。一方、GSK-3 活性制御は ATF4 依存的に翻訳調節因子 eIF2α-Ser51 の脱リン酸化を促進するとともに翻訳制御因子 4EBP1 の発現を増強した。このとき、小胞体ストレス急性期でのリン酸化 eIF2α を介した全般的タンパク翻訳抑制が早期に回復し、慢性期においては、4EBP1 発現増強に関連してタンパク翻訳は抑制的に制御された。

<結語> 小胞体ストレス誘導性β細胞アポトーシスにおいて、GSK-3-ATF4経路を介したタンパク翻訳制御の重要性が示唆された。



Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	山口大学医学部付属病院 内科学第三
氏 名	田部勝也
研究テーマ	GSK-3 β による膵 β 細胞機能調節機構の解明とその制御による 2 型糖尿病治療の研究

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

(目的)セリンスレオニンキナーゼ GSK-3 はインスリンシグナルの下流に位置し、その酵素活性は PKB/Akt によるリン酸化により抑制的に制御される。インスリン抵抗性を来す肥満・糖尿病患者および 2 型糖尿病モデル動物での解析から、GSK-3 が様々な程度に糖尿病の病態形成に関与することが推察される。膵 β 細胞は小胞体ストレス、酸化ストレスに脆弱であるとされる。こうしたストレス条件下でのアポトーシス誘導における GSK-3 の役割は解明されていない。申請者はこれまでに、マウス単離膵ラ氏島において薬剤性小胞体ストレス誘導により GSK-3 の活性化を来し、GSK-3 特異的阻害剤処理によりアポトーシス誘導が減弱することを確認している。さらに、小胞体ストレスや酸化ストレスに共通したストレス応答分子である転写因子 ATF4 蛋白発現が GSK-3 活性の抑制により増強することを確認した。これらの事実から、GSK-3 によるリン酸化を介した ATF4 翻訳後調節が予想される。本課題では、1)GSK-3 による ATF4 のリン酸化標的部点を同定するとともにリン酸化を介した ATF4 発現調節機構を解明する。2)小胞体ストレスによる膵 β 細胞障害モデルにおいて、アポトーシス誘導および ATF4 発現に対する GSK-3 抑制の影響を解明する。3) GSK-3 抑制によるアポトーシス減弱について、ATF4 とその転写標的を介する分子機構を解明する。

(方法)

A. 小胞体ストレス応答調節における GSK-3 β の役割の解明

薬理的に小胞体ストレスを惹起した野生型マウス単離ラ氏島ならびにマウス膵 β 細胞株 MIN6 および、Insulin2 遺伝子に変異を持つために小胞体ストレスが内因性に活性化されている Akita マウスより樹立した膵 β 細胞株をモデルとして、GSK-3 特異的阻害剤 SB216763 処理、およびレトロウィルスベクターを用いた GSK-3 β kinase dead 変異体強制発現による GSK-3 活性の抑制を行った。アポトーシス誘導についてウェスタンブロットによる切断型カスパーゼ 3 の検出および DNA フラグメントの検出を行った。

B.GSK-3 活性による ATF4 発現調節機構とそのアポトーシス誘導における意義の解析

1. HEK293 および MIN6 における ATF4 と GSK-3 β の細胞内局在を細胞免疫染色により解析した。
2. GSK-3 抑制の下に翻訳阻害剤であるシクロヘキサミド処理を行い ATF4 蛋白安定性について解析した。
3. ATF4 において、GSK-3 によりリン酸化を受ける可能性のあるセリンまたはスレオニン残基のアラニンに置換した変異体シリーズを 293 細胞に強制発現し免疫沈降法により回収する。これらを基質として、GSK-3 β による In vitro kinase assay を行い、リン酸化部点を同定した。さらに、Phostag 法によるバンドシフトによってもリン酸化の確認を行った。
4. GSK-3 によるリン酸化による ATF4 の発現調節がユビキチン-プロテアゾームを介する可能性について、野生型 ATF4 と安定変異体 ATF4 におけるユビキチン化量を比較するとともにユビキチン化酵素(E3 ligase 複合体)との蛋白結合を免疫沈降法により解析した。
5. レトロウィルスベクターを用いて ATF4 恒常転写抑制型変異体の強制発現または shRNA ノックダウン法により ATF4 転写機能を抑制し、GSK-3 抑制による ATF4 発現増強と抗アポトーシス効果発現の関係を解析した。

C. ATF4 転写標的を介した GSK-3 活性制御によるストレス抵抗性獲得機構の解析

1. 既知 ATF4 転写標的である、アミノ酸輸送担体、4e-bp1、gadd34、grp78、chop の発現変化を qPCR 法により解析した。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

2. ATF4 転写活性に対する GSK-3 抑制の影響を解析する。ここでは、ATF4 転写標的の一つである翻訳抑制因子 4E-BP1 遺伝子上流に存在する ATF4 結合部位を挿入したルシフェラーゼリポーターベクターを用いてリポーターアッセイを行った。
3. GSK-3 活性抑制が eIF2 α のリン酸化および 4E-BP1 に及ぼす影響をウェスタンブロットにより解析した。
4. 4E-BP1 発現増強により蛋白翻訳が抑制され、このことが小胞体ストレス軽減につながる可能性がある。そこで、MIN6 および Akita マウス由来の β 細胞を用いて、GSK-3 活性抑制が全蛋白翻訳およびインスリン翻訳に与える影響をメタボリックラベリング法により解析する。

(結果)

ツニカマイシン処理により小胞体ストレスを誘導したマウス単離ラシ島および MIN6 あるいは、変異インスリンの蓄積により小胞体ストレスが誘導される Akita マウスより樹立した β 細胞株において、GSK-3 活性が顕著に増加した。これらの小胞体ストレス誘導モデルにおいて、GSK-3 阻害薬 SB216763 あるいは GSK-3 β 活性抑制型変異体過剰発現がアポトーシス誘導を減弱した。このとき、転写因子 ATF4 の発現誘導が増強した。ATF4 dominant negative 変異体過剰発現あるいは ATF4 knock down により GSK-3 活性抑制の抗アポトーシス効果が減弱した。

ATF4 の発現は、定常状態では GSK-3 の抑制に関わらずタンパクレベルでの検出が困難であったが、小胞体ストレス下において誘導されるとともに GSK-3 抑制による顕著に増強した。この時、GSK-3 抑制による ATF4 の発現調節について、転写や翻訳レベルでの変化を認めなかったが、ATF4 蛋白の安定性が GSK-3 抑制により著しく増加した。さらに、ATF4 と GSK-3 の核にける共局在に加え蛋白-蛋白結合を確認した。したがって、GSK-3 が ATF4 の翻訳後調節に直接的に関わることが推察された。

ATF4 は SCF /E3 ligase を介したユビキチン化-蛋白分解による翻訳後調節をうける。この制御には、E3 ligase 複合体のアクセプター分子 β TrCP と ATF4 の結合が必須である。 β TrCP と ATF4 の結合は GSK-3 抑制により著しく阻害され、その結果 ATF4 のユビキチン化が抑制された。ATF4-degron 近傍に位置する Ser214 が GSK-3 のリン酸化標的であることを In vitro kinase assay 法と Phostag 法により明らかにした。さらに、ATF4 と β TrCP の蛋白結合は S214A 変異によりほぼ完全に阻害された。S214A 変異体ではユビキチン化が減弱し、蛋白の安定性が増加した。

小胞体ストレス下では、ATF4 の転写標的であるアミノ酸輸送担体 (slc1a5、slc7a5、slc7a1)、gadd34 および 4e-bp1 の遺伝子発現が GSK-3 の抑制により増強した。さらに、4e-bp1 の enhancer 配列に対する ATF4 の転写活性が GSK-3 の抑制により有意に増強した。一方、GSK-3 抑制は ATF4 による転写誘導が知られる gpr78 や chop の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。

小胞体ストレス下では、活性化した PERK による eIF2 α のリン酸化とそれに続く、全般的 mRNA 翻訳の抑制と逆説的な ATF4 の翻訳促進を来す。この経路は、様々なストレスに共通する経路である Integrated Stress Response (ISR) として知られる。一方、Gadd34 は Protein Phosphatase を介して eIF2 α の脱リン酸化を促進することで、ストレス急性期における全般的翻訳抑制を終息させる。ツニカマイシン処理を行った MIN6 において、GSK-3 活性抑制が ATF4 依存的に翻訳制御因子 4E-BP1 の発現を増強するとともに eIF2 α の脱リン酸化を促進した。eIF2 α リン酸化-ATF4 誘導の経路は比較的短時間の応答であるが、4E-BP1 の活性は蛋白それ自体の安定性によりストレス暴露後持続的である。GSK-3 による ISR 制御と細胞機能との関連について、mRNA 翻訳について解析を行った。GSK-3 抑制が ATF4 依存的に小胞体ストレス暴露後急性期における全般的翻訳抑制をより早期に解除し、一方、慢性期においては、ATF4 依存的に mRNA 翻訳を抑制した。さらに、Akita マウスから樹立した β 細胞株では、GSK-3 阻害剤処理後 24 時間において mRNA 翻訳が顕著に抑制されるとともにアポトーシス誘導が減弱した。mRNA 翻訳抑制との関連において、インスリンの生合成について解析を行ったところ、mRNA レベルでの変化は認めなかったもののタンパクレベルでの有意な減少を認めた。すなわち、インスリン生合成が GSK-3 抑制により翻訳レベルで制御されることが推察された。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

以上の結果から、小胞体ストレスに暴露された膵β細胞において、GSK-3がATF4発現制御を介してアポトーシス誘導に重要な役割を担うことが示唆される。さらに、その分子機構の一部として、小胞体ストレスに対するmRNA翻訳調節障害を介していることが推察された。

(考察)

肥満、インスリン抵抗性によるインスリン需要の増大や、インスリン抵抗性を基盤とした種々の代謝異常が膵β細胞において酸化ストレスや小胞体ストレスを亢進する。一方、このような状況ではPI3K-Akt経路の減弱によりGSK-3活性の制御障害を来すことが推察される。GSK-3は本質的に膵β細胞量を抑制的に調節することが示唆されており(Tanabe K. et al PLoS Biology 2008, Liu Z. et al Diabetologia 2008, Liu Y. et al Diabetologia 2010, Figeac F. et al Molecular Therapy 2012)、さらに、人の単離ラ氏島においてもGSK-3の抑制がβ細胞増殖能を亢進することが報告されている。これらの知見から、GSK-3が膵β細胞不全に対する有望な治療標的となり得る可能性がある。本課題では、膵β細胞不全進展におけるGSK-3を介した分子メカニズムの解明を目的とし、GSK-3がストレス応答に重要なATF4の発現制御を介してアポトーシス誘導に寄与することを明らかにした。

GSK-3がATF4蛋白分解を促進することを解明した。そのメカニズムとしてGSK-3によるATF4 S214のリン酸化がATF4とSCF E3 ligaseとの結合に必須であることを解明した。一方、ATF4転写活性はGSK-3抑制により増強した。これにはATF4自体の発現増加が寄与するものと推察されるが、GSK-3によるリン酸化を介した調節あるいは、GSK-3を直接介さない他の何らかの機序による転写活性調節機構の存在も否定できない。

GSK-3抑制によりATF4の既知転写標的の発現増強を認めた。一方、ATF4の転写標的として知られるGRP78およびCHOPの発現はGSK-3抑制による影響を受けず、さらにはATF4 knockdownや恒常抑制型変異体過剰発現によっても発現が減少しなかった。これらの観察から、膵β細胞では、小胞体ストレス下におけるGRP78とCHOPの転写誘導は主にATF6やXBP-1を介して行われることが推察される。

GSK-3抑制がATF4依存的に翻訳抑制因子4E-BP1の発現を増強し、ストレス慢性期におけるmRNA翻訳を抑制した。興味深いことに、一連の結果は変異インスリンの蓄積により膵β細胞不全を発症するAkitaマウス由来の膵β細胞株においても観察し得た。このモデルにおいて、インスリンの発現が蛋白レベルで抑制された。すなわち、GSK-3抑制が変異インスリンの蓄積を減少させることで小胞体への負荷を軽減する可能性が考えられた。小胞体ストレス下の膵β細胞において、ATF4-4E-BP1経路は蛋白合成の抑制により小胞体への負荷を軽減することで細胞生存に有利に働く(Yamaguchi S. et al, Cell Metabolism 2008)。一方、恒常的なTORC活性の亢進が、4E-BP1の抑制による蛋白合成の亢進を招く結果、小胞体ストレスが亢進することを報告している(Ozcan U. et al, Mol Cell 2008)。これらの知見を踏まえて、GSK-3活性化によるATF4-4E-BP1経路の抑制が蛋白合成の制御異常を招く結果、小胞体ストレスに対する脆弱性を増加させる可能性が考えられる。一方、GSK-3抑制はATF4依存的にeIF2αの脱リン酸化を促進するとともにアミノ酸輸送担体の発現を増強した。その結果、小胞体ストレス暴露後急性期における全般的翻訳抑制をより早期に解除し、この効果はATF4依存的であった。したがって、一連のmRNA翻訳に対するGSK-3抑制の効果から、GSK-3がATF4発現制御を介して、小胞体ストレスに対する急性応答としての翻訳制御から4E-BP1を介したよりadaptiveな翻訳制御への移行を妨げており、このことと細胞障害との関連が推察された。

今回の検討から、GSK-3によるATF4の発現制御が膵β細胞アポトーシスに重要な役割を演じることが示唆された。このことは膵β細胞不全の分子機構に新たな洞察を加えるとともに、膵β細胞でのGSK-3制御による2型糖尿病治療戦略を考える上での分子基盤となり得る。

(今後の課題)

本課題で得られた結果はin vitroでの解析に基づく。そのため病態における意義を解明するためには、今後in vivoモデルでの検証が必要である。

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	山口大学医学部付属病院 第三内科
氏 名	田部勝也

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Nakabayashi H., Ohta Y., Yamamoto M., Susuki Y., Taguchi A., <u>Tanabe K.</u> , Kondo M., Hatanaka M., Nagao Y., Tanizawa Y. Clock-controlled output gene Dbp is a regulator of Arnt/Hif-1 β gene expression in pancreatic islet β -cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013 May 3;434(2):370-5. 査読あり
2	Iwasaki N., Fukawa K., Matsuo M., Urano M., Watanabe M., Ono Y., <u>Tanabe K.</u> , Tanizawa Y., Ogata M., Ide R., Takizawa M., Nagata S., Osawa M., Uchigata Y., Saito K.. A sibling case of Wolfram syndrome with a novel mutation Y652X in WFS1. Diabetology International October 2013 査読あり
3	Matsunaga K, <u>Tanabe K.</u> , Inoue H, Okuya S, Ohta Y, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. PLoS One. 2014 Sep 11;9(9):e106906. 査読あり
4	
② <論文 PDF 添付なし>	
1	<u>田部勝也</u> 、秋山 優、幡中雅行、近藤 学、松永仁恵、谷澤幸生 Wolfram 症候群における膵 β 細胞の量的、質的異常 Diabetes Frontier Vol.24. No.25. 519-526 2013.Oct.メディカルレビュー社 査読なし
2	<u>田部勝也</u> 膵 β 細胞量の調節における GSK-3 β の役割 Islet Equality Vol.3. No.1. 18-21 2014 メディカルレビュー社 査読なし
3	

様式 4-3②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	平成 25 年 5 月 18 日	第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 <u>Tanabe K.</u> , Nagao Y., Tanizawa Y. SCFβTyCP and GSK3-mediated degradation of ATF4 is a pro-apoptotic mechanism in pancreatic beta cell under ER stress(抄録集 S-79)
2	平成 26 年 5 月 24 日	第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 <u>Tanabe K.</u> , Nagao Y., Kikuko Shinoki-Amo, MA Permutt, Tanizawa Y. Role of GSK3 in the development of beta cell failure(抄録集 S-85)
3		
4		
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2015 年 3 月	雑誌名;未定
2		
3		
4		