

特集：遺伝子発現制御から迫る生体内環境応答機構

膵β細胞のストレス応答・生存と mRNA 翻訳制御

石原 寿 光

糖尿病を来すウォルフラム (Wolfram) 症候群のモデルマウスの研究などから、糖尿病では膵β細胞が減少し、その過程で小胞体ストレスの亢進が大きな役割を担っている可能性が示されている。この小胞体ストレス応答において、これまで知られていたストレス応答早期の mRNA 翻訳抑制に加え、ストレス応答のマスター転写因子 ATF4 による翻訳抑制因子 4E-BP1 の誘導を介する後期の翻訳制御が、膵β細胞の生存に重要であることが明らかとなった。ATF4 による 4E-BP1 の誘導は、ストレス応答と PI3K/Akt/mTOR/4E-BP1 のタンパク質合成・細胞増殖経路をつなぐ重要な経路と考えられる。さらに、最近の国内外の研究成果によれば、膵β細胞以外にも、翻訳抑制が様々なストレス応答および生存に重要な役割を担っていることが示されている。

はじめに

2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌障害と骨格筋や肝臓でのインスリン抵抗性が複雑に絡み合って、発症・進展する疾患である。インスリン分泌障害の要因として、β細胞の分泌機能の異常とともにβ細胞量の減少が重要であると考えられる¹⁾。膵β細胞は、インスリンを分泌するために特化された細胞であり、多量のインスリンを合成している。このため、プロインスリンから成熟インスリン分子への変換の場である小胞体に対する負荷、すなわち小胞体ストレスが、通常から高い状態にある²⁾。またβ細胞は、スーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化タンパク質の発現量が他の組織・細胞より低いことが知られ、酸化ストレスに対して障害を強く受ける³⁾。さらに、膵島へは豊富な血流が供給されているが、低酸素状態ではα細胞に比べβ細胞の生存能が弱いことも明らかにされている⁴⁾。すなわちβ細胞は小胞体ストレス、酸化ストレス、

低酸素ストレスなど様々なストレスに対して脆弱な細胞である。

小胞体ストレスに脆弱なβ細胞は、2000年前後から小胞体ストレスの基礎研究が進んだことと、糖尿病が全世界で爆発的増加をみせているという情勢が手伝って、研究対象として糖尿病領域のみならず注目されている。一方で、膵島・膵β細胞は、膵臓全体の1%を占めるに過ぎず、慣れないとその単離も難しく、一般の生化学者・細胞生物学者からは敬遠される傾向がある。このため、臨床医であるが普段からβ細胞を扱っている我々が何らかの貢献をできる部分があると思っている（同時に慎重さを欠いて、負の貢献をしないように気をつけている）。我々は、糖尿病を来すウォルフラム (Wolfram) 症候群のモデルマウスである *Wfs1* 遺伝子破壊マウスにおけるβ細胞障害のメカニズムを解析する過程で、小胞体ストレスがβ細胞の生存に深く関わっていること^{5,6)}、そして翻訳抑制因子 4E-BP1 タンパク質とそれによる mRNA 翻訳制御が小胞体ストレスを始めとするストレス応答および生存に重要な役割を担っていることを見出した⁷⁾。

本稿では、2型糖尿病の発症に関与する小胞体ストレス応答異常と我々が見出したストレス応答における mRNA 翻訳抑制の新たな経路について、physician-scientistとしての研究の経過をたどりながら述べる。

日本大学医学部内科学系糖尿病代謝内科学分野 (〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1)

Stress responses in pancreatic β-cells: roles of translational control

Hisamitsu Ishihara (Division of Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchi-kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan)

1. Wolfram 症候群の研究から

1-1) Wolfram 症候群

Wolfram 症候群は、1938年に家族性の若年発症糖尿病と視神経萎縮の合併症として初めて報告された疾患である⁸⁾。その後、尿崩症や感音性難聴を併しやすことが報告され、これらを4徴としてDIDMOAD (diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness) 症候群とも呼ばれている。さらに運動失調などの神経学的異常や、うつ病・自殺などの精神科領域の疾患が多いことも特徴である。剖検にて得られた膵組織での検討では、膵β細胞の著明な脱落が報告されている⁹⁾。またMRIによる検討では、脳幹や小脳の著明な萎縮が認められている¹⁰⁾。

これらの知見から、Wolfram 症候群は、膵β細胞や特定の神経系細胞の変性死に基づく疾患であると考えられてきた。常染色体劣性形式で遺伝することが知られ、遺伝学的解析が勢力的に行われてきたが、1998年井上らなどにより原因遺伝子 *Wfs1* が同定された^{11,12)}。

Wfs1 がコードするタンパク質 (WFS1) は多くの組織で発現しているが、特に心・肺・脳・膵などで高い発現が認められる。また、膵では外分泌細胞には発現しておらず、内分泌細胞の特にβ細胞に発現が高く、α細胞にはほとんど発現していない¹³⁾。また、図1に示すように細胞内では、WFS1は小胞体に存在し、奇数個 (おそらく9個) の膜貫通領域を持ち、アミノ末端を細胞質側に、カルボキシル末端を小胞体内腔に伸ばしている。WFS1は既知のタンパク質との相同性を有さず、その機能については、以下に述べる我々のグループを中心とした成果はあるものの、クローニング後10年以上が経過したにもかかわらず、今日まで完全な解決には至っていない。

1-2) *Wfs1* 遺伝子破壊マウス

WFS1 タンパク質の機能と個体における役割を解明する

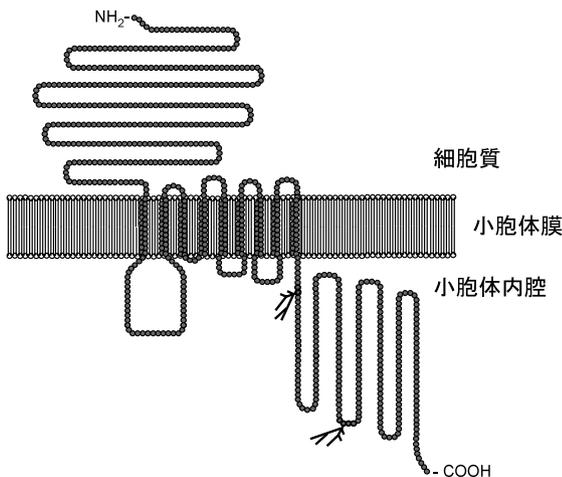


図1 WFS1 タンパク質の構造

ために、我々は *Wfs1* 遺伝子破壊マウスを作製した⁵⁾。*Wfs1* 遺伝子破壊マウスは、ヒトの Wolfram 症候群より軽度であるが、インスリン分泌不全に基づく耐糖能異常を呈した。個体におけるインスリン分泌不全には、その個体が持つ膵β細胞量の異常 (低下) と個々のβ細胞のインスリン分泌機能の異常 (低下) の両者が関与している。すなわちβ細胞の“量の異常”と“質の異常”のいずれれもが重要である。そこで、まず *Wfs1* 遺伝子破壊マウスより膵島を単離し、インスリン分泌能の検討を行った。*Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島では、グルコースやカルバコールによるインスリン分泌が約30%低下していることが認められた。このインスリン分泌の低下は、アデノウイルスベクターを用いてWFS1の発現を回復させることにより、ほぼ正常レベルまで回復した⁵⁾。

一方、膵β細胞量を *Wfs1* 遺伝子破壊マウスで測定すると、8週齢以降で有意に低下していた。β細胞量の低下は、新生・増殖とアポトーシスのバランスが負に傾くことによってもたらされる。*Wfs1* 遺伝子破壊マウスでのβ細胞の減少が、アポトーシスの亢進によるものかを検討するため、*Wfs1* 遺伝子破壊マウスの膵においてTUNEL染色や活性化型カスパーゼ3の染色を試みた。しかし、対照の野生型マウスでも *Wfs1* 遺伝子破壊マウスでもわずかの陽性像しか得られず、結論を出すことは難しいと考えられた。これは、膵β細胞が一旦アポトーシスの過程をたどり始めると急速に消滅してしまうためではないかと思われる。そこで、単離膵島にアポトーシス惹起刺激を加え、多くの細胞が同時にアポトーシスを開始するような状態を人為的に作ってやれば、アポトーシスを観察することができるのではないかと考えた。この目的のため、単離膵島におけるアポトーシス特異的なDNAの断片化をligation-mediated PCR法を用いて検討した。その結果、小胞体ストレスに対して *Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島では、アポトーシスを来しやすことが観察された。一方、TNFαやIL1βに対するアポトーシスの誘導には、変化が認められなかった。以上の成績から、*Wfs1* 遺伝子破壊マウスでは、β細胞の質の異常とアポトーシスの亢進に基づくβ細胞の量の異常とがともに存在することが明らかとなった。

1-3) WFS1 タンパク質の細胞内カルシウム制御における役割

インスリン分泌の直接の刺激は、細胞内カルシウムの上昇である。*Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島で、グルコースやカルバコールによるインスリン分泌が低下していたことから、Fura2を用い *Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島より単離したβ細胞でのカルシウム応答を検討した。その結果、*Wfs1* 遺伝子破壊マウスβ細胞では、グルコース刺激に応答した細胞内カルシウム動態に異常が認められることが明らかとなった。

片は、強力な転写活性を有し、GRP78 や次に述べる XBP1 などの遺伝子の転写を誘導する。次に、I 型膜蛋白である IRE1 が、GRP78 の解離の結果活性化されると、その RNase 活性により転写因子 XBP1 の mRNA から 26 塩基を除去する。フレームシフトを起こして生成される活性型 XBP1 タンパク質がフォールディング酵素や、HRD1 など次に述べる ERAD 関連タンパク質の転写を誘導する。さらに前項で述べた PERK の活性化の結果、タンパク質翻訳全般が抑制されると、転写因子 ATF4 の翻訳効率が相対的に高くなり、ATF4 タンパク質の発現が亢進する。ATF4 は、転写因子 CHOP や GRP78 などの転写誘導を惹起する。後で詳述するように、この eIF2 α のリン酸化を介する全般的翻訳抑制とそれに続く、ATF4 および CHOP などの転写活性化の経路は UPR 以外のさまざまなストレス応答において認められ、integrated stress response と呼ばれる。

③ 小胞体関連タンパク質分解 (ERAD: ER associated degradation) ——異常タンパク質を細胞質に引き出して、分解する応答

翻訳抑制や転写誘導で対処しきれず異常タンパク質が蓄積してくると、異常タンパク質を分解する応答が活性化される。異常タンパク質は、トランスロコンと呼ばれるタンパク質複合体を通して ATP 加水分解依存的に細胞質側へ送り出され、HRD1 などのユビキチンリガーゼを介する反応をへて、26S プロテアソームにて分解される。

④ アポトーシス

さらに上記の方法によって対処しきれない時は、アポ

トーシスを誘導し、障害を受けた細胞を除去して、個体としての生存を図る。アポトーシス誘導に至るいくつかの経路が提唱されているが、転写因子 CHOP を介する経路、IRE1 への TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) の結合を介して JNK の活性化に至る経路が代表的である。

1-5) WFS1 欠損膵島における UPR

Wfs1 遺伝子破壊マウス膵島を単離し、小胞体ストレス応答との関連を検討した。*Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島では、翻訳抑制経路を惹起させる小胞体ストレスセンサーである PERK のリン酸化が上昇していた (図 3A)。また、転写誘導に至る応答に重要な役割を果たす XBP1 mRNA のスプライシングが、増加していることも明らかとなった (図 3B)。さらに、小胞体関連タンパク質分解に重要な役割を担う HRD1 や EDEM1 の発現増加が認められた。すなわち、*Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島では、UPR が亢進していた。このことから、生理的に多量のインスリンを作り小胞体ストレスの大きい β 細胞にとって、WFS1 が小胞体ストレスを軽減させる役割を担っている可能性が示唆される。*Wfs1* 遺伝子破壊マウス膵島では、WFS1 タンパク質の作用が欠如するため、インスリン合成によって生理的に生じている小胞体ストレスが、軽減されずに大きな負荷となり、小胞体ストレス応答の亢進を生じさせていると考えられる。また、前項でも述べたとおり WFS1 は小胞体カルシウム制御に重要な役割を担っており、WFS1 の欠落によって小胞体カルシウム動態の変化を生じ、それが小胞体ストレスを惹起し、UPR を亢進させている可能性も考え

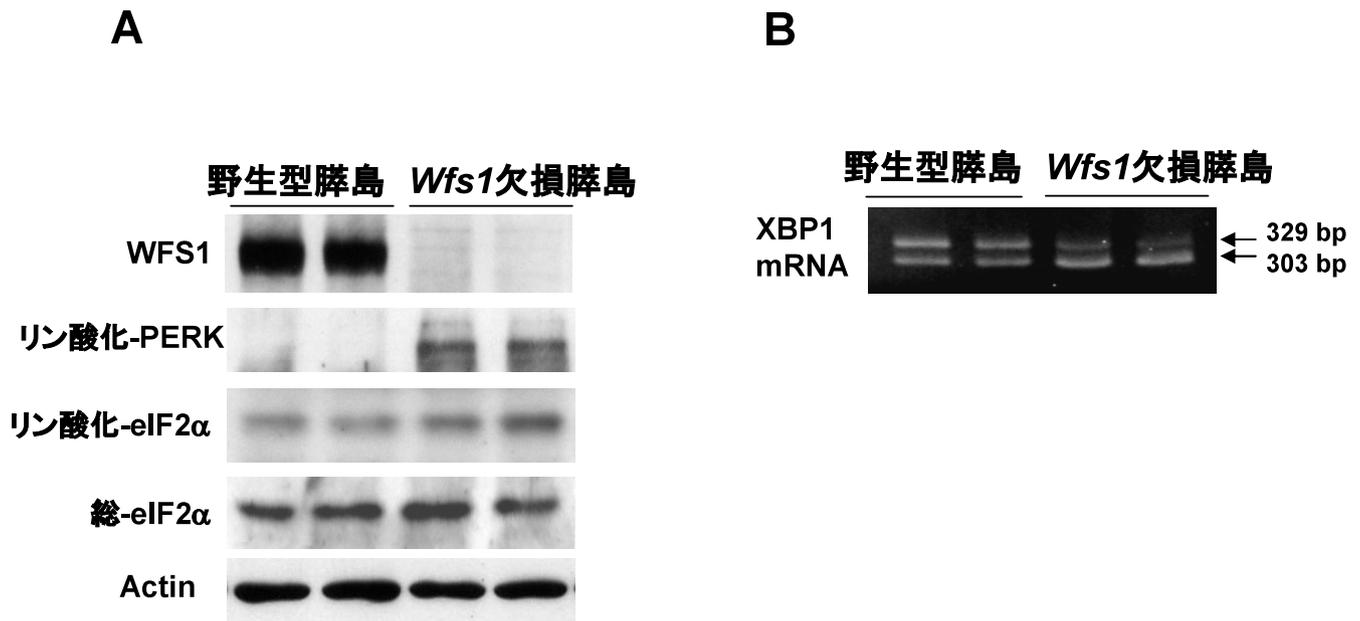


図 3 *Wfs1* 欠損膵島での小胞体ストレス応答の亢進

A. PERK-eIF2 α 経路の亢進：*Wfs1* 欠損膵島では、PERK ならびに eIF2 α のリン酸化が増加している。

B. XBP1 スプライシングの増加：*Wfs1* 欠損膵島では、IRE1 のリボヌクレアーゼ活性によるスプライシングの結果、26 base 欠失した mRNA が増加している。

られる。

Wfs1 遺伝子破壊マウス豚島では、アポトーシスの亢進が示唆されたが、我々は、小胞体ストレスに基づくアポトーシス誘導に重要な役割を果たす CHOP の発現亢進やカパーゼ3の活性化も認めた。従って、*Wfs1* 遺伝子破壊マウス豚島でのアポトーシスの亢進が、小胞体ストレスに基づくものであると考えられた。

膵β細胞量の低下の原因には、β細胞アポトーシスの亢進とともにβ細胞の増殖能の低下が考えられる。そこで、*Wfs1* 遺伝子破壊マウスにおいて膵β細胞の増殖能を検討したところ、*Wfs1* 遺伝子破壊マウス豚島のβ細胞増殖能は、野生型に比べ低下していることが見出された。我々はその原因を探索し、*Wfs1* 遺伝子破壊マウス豚島において、p53の活性化とその下流の細胞周期抑制分子であるp21^{CIP1}の発現が増加していることを見出した。さらに、小胞体ストレスを誘発することが知られているタブシガルギン刺激でMIN6細胞のp21^{CIP1}の発現が増加したことから、小胞体ストレスがp21^{CIP1}を増加させていると考えられた。すなわち、小胞体ストレスは、アポトーシスを亢進させることが注目されているが、細胞周期の抑制ももたらしていると考えられた⁶⁾。小胞体ストレスにおいてp53の活性化を介して細胞増殖を抑制するメカニズムの詳細は、明らかではない。最近の報告では、小胞体ストレスによる翻訳抑制が、リボソームタンパク質とHdm2の結合を促進する結果、Hdm2によるp53の分解が抑制され、p53が増加する可能性が示唆されている¹⁶⁾。

以上の研究から、Wolfram症候群における糖尿病は、膵β細胞における小胞体ストレスによるアポトーシスと細胞増殖の抑制に基づく疾患であると考えられた。

2. β細胞の小胞体ストレスに基づく糖尿病

小胞体ストレス応答の基礎研究が進むにつれ、*Wfs1* 遺伝子異常によるWolfram症候群のほかに、ヒトやマウスにおいて小胞体ストレスが原因となって糖尿病を発症する病態が明らかにされてきた。

2-1) インスリン遺伝子異常

膵β細胞における小胞体ストレスについては分泌細胞における小胞体ストレスの重要性を注目させるきっかけとなったのが、IzumiらによるAkitaマウスでのインスリン遺伝子異常の発見である¹⁷⁾。Akitaマウスで認められる異常インスリン分子(Cys96Tyr変異)と同じ変異インスリンを有するヒトも最近報告されている¹⁸⁾。インスリン分子の高次構造に重要なシステイン残基のヘテロ変異であり、この変異インスリンが小胞体内に蓄積され、小胞体ストレス応答を惹起していることが明らかにされた。すなわち、小胞体の肥大化と前項でのべた小胞体ストレス誘導タンパク質のGRP78, XBP1およびCHOPなどの発現増加が認

められる¹⁷⁾。さらに、Oyadomariらはヘテロ遺伝子異常のAkitaマウスをCHOPノックアウトマウスと交配することにより糖尿病の発症を遅らせることができることを報告した¹⁹⁾。

2-2) *Eif2ak3* 遺伝子異常

小胞体ストレスセンサーであるPERKをコードする*Eif2ak3* 遺伝子の変異によるWolcott-Rallison症候群は、常染色体劣勢遺伝形式をとる稀な疾患で、新生児期発症の糖尿病、骨減少症、精神発達遅滞、白血球異常など多様な臨床症状を呈する。遺伝的解析の結果、2000年に本症候群の原因遺伝子が*Perk/Eif2ak3*であることが明らかにされた²⁰⁾。Wolcott-Rallison症候群患者で認められる*Eif2ak3* 遺伝子異常は、PERK/EIF2AK3タンパク質の点変異やカルボキシ末端の欠失を起こす変異である。また、キナーゼ活性が完全に欠失する変異では糖尿病の発症が生後数ヶ月であるのに対し、キナーゼ活性が残る変異体を持つ患者では、生後30ヶ月と遅いことが報告されており、膵β細胞におけるEIF2AK3機能の重要性を示唆している²⁰⁾。同様の病態は、同時期に発表された*Perk* 遺伝子破壊マウスでも認められている²¹⁾。

2-3) 一般の2型糖尿病における小胞体ストレスの関与

2型糖尿病において、膵β細胞量が減少していることが相次いで報告され^{22,23)}、その原因として小胞体ストレスや酸化ストレスが候補として考えられ、これらのストレス亢進の指標として、CHOPの発現誘導がヒトの剖検材料等で検討された。その結果、2型糖尿病のβ細胞ではCHOPの発現が亢進していることが明らかとなった²⁴⁾。すなわち、2型糖尿病のβ細胞では小胞体ストレスや酸化ストレスが亢進しており、病態形成に重要な役割を演じている可能性が示唆されている。

3. ストレス応答における mRNA 翻訳制御の重要性

3-1) mRNA 翻訳機構

ストレスに曝された細胞は、細胞内のタンパク質発現のプログラムを変更し、ストレスに対抗する陣容を整える。このタンパク質発現のリプログラミングは、遺伝子転写およびmRNA翻訳の二つの段階で主に行われる。これまでに述べた小胞体ストレスに対するβ細胞の応答でも、ATF6, ATF4, XBP1などの転写因子の活性化とeIF2αのリン酸化を介する翻訳抑制が認められる。最近、我々はストレス応答においても一つの翻訳制御機構の重要性を見出した⁷⁾。

① キャップ構造依存的翻訳開始機構

真核生物のmRNA翻訳制御は、主にその開始段階で行われ、図4にまとめる機構によることが明らかにされている²⁵⁾。すなわち、mRNAの翻訳は、まずメチオニンを結合したtRNA (Met-tRNA) とGTPとeIF2の三つの分子が結

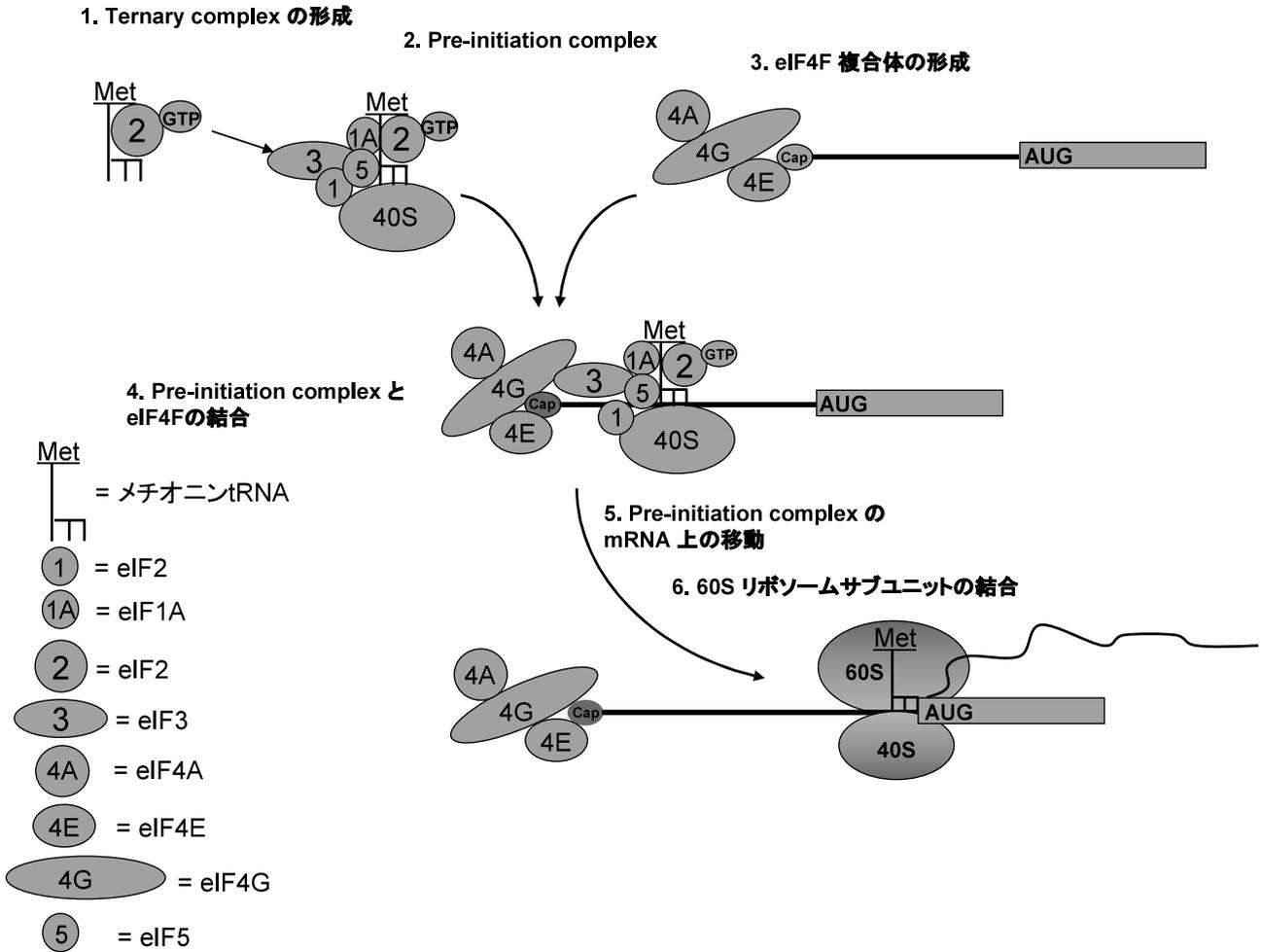


図4 mRNA 翻訳開始機構

合した ternary complex が形成されることから始まる。この ternary complex は、さらにリボソームの 40S サブユニット (18S rRNA とタンパク質 33 種からなる) およびいくつかの翻訳開始因子と結合して、pre-initiation complex を形成する。同時に eIF4A, eIF4E および eIF4G は、複合体を形成して eIF4F となって、mRNA の 5' のキャップ構造に結合する。この eIF4F を目指して、pre-initiation complex が mRNA に引き寄せられ、続いて開始コドンに向かって mRNA 上を移動し、開始コドンに行き当たるとリボソームの 60S サブユニット (5S, 5.8S, 28SrRNA とタンパク質 49 種からなる) と結合し、タンパク質合成が開始される。

このキャップ構造依存的な翻訳開始は、次の二つの機構によって制御されている (図 5)。一つは、ternary complex を形成する eIF2 の α サブユニットをリン酸化して、ternary complex 形成を阻害する機構であり、小胞体ストレス応答の翻訳抑制でも用いられたものである。もう一つは、eIF4E 結合タンパク質 (eIF4E-binding protein: 4E-BPs) が eIF4E に結合することによって、eIF4F 複合体形成を抑制

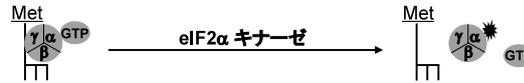
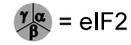
するメカニズムである。4E-BPs, 特に 4E-BP1 の活性は、リン酸化によって抑制されているが、4E-BP1 リン酸化酵素の代表は、mTOR (mammalian target of rapamycin) である。mTOR の活性化による 4E-BP1 の抑制は、タンパク質合成を亢進させる。

② IRES (Internal Ribosome Entry Site) 依存的翻訳開始機構

リボソーム 40S サブユニットを含む pre-initiation complex がキャップ構造に結合して、mRNA 上を開始コドンを目指して移動する上記のメカニズムとは異なって、40S サブユニットが IRES (internal ribosome entry site) と呼ばれる特殊な mRNA の構造と結合して、タンパク質合成に向かう様式が、IRES 依存的翻訳開始機構である。IRES はウイルス RNA で初めて見出されたが、その後細胞の mRNA にも存在することが明らかとなった。eIF4F 複合体形成が阻害されて、キャップ依存的翻訳開始機構が抑制されているストレス下では、IRES 依存的翻訳開始が可能な mRNA が選択的に翻訳されると考えられる。

1. Ternary complex 形成の阻害

eIF2 α キナーゼによるeIF2 α -サブユニット のリン酸化



2. eIF4F複合体形成の阻害

eIF4E 結合タンパク質 (4E-BP1, 2, 3) によるeIF4E – eIF4G結合の阻害

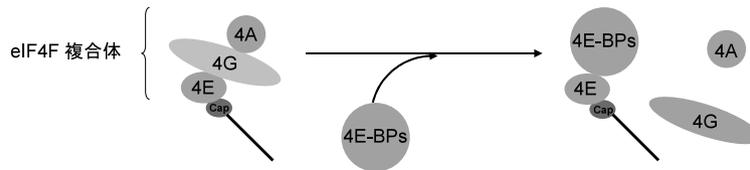


図5 mRNA 翻訳開始の制御

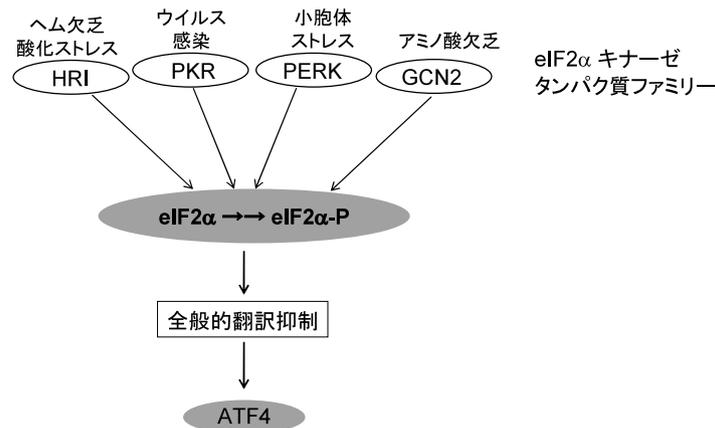


図6 Integrated Stress Response

3-2) Integrated Stress Response (ISR)

翻訳開始制御を eIF2 α のリン酸化を介する ternary complex 形成の阻害により抑制する機構は、小胞体ストレス下で認められるが、同様の翻訳開始制御は、酸化ストレスや低酸素ストレスなど様々なストレスに対する応答でも認められる。この eIF2 α のリン酸化を介する翻訳抑制とそれに続く ATF4 や CHOP の活性化は、integrated stress response (ISR) と呼ばれ、様々なストレスに共通の応答である。

図6に示すように、この経路は、eIF2 α をリン酸化する酵素群 (eIF2 α キナーゼ) の活性化に始まる。eIF2 α キナーゼとしては、

eIF2 α キナーゼ 1 = HRI (heme-regulated inhibitor),

eIF2 α キナーゼ 2 = PKR (double-strand RNA dependent protein kinase),

eIF2 α キナーゼ 3 = PERK (PKR-like ER kinase),

eIF2 α キナーゼ 4 = GCN2 (general control non-derepressible 2)。

の四つが知られ、ストレスの種類によって使い分けられている²⁵⁾。小胞体ストレスの場合は、PERK が活性化され、アミノ酸飢餓ストレス時は GCN2 が活性化される。酸化ストレスの場合は、酸化ストレスを惹起する原因により HRI あるいは GCN2 が活性化されるようであるが、どの eIF2 α キナーゼが活性化されるか不明なものもある。活性化された eIF2 α キナーゼは、eIF2 α の 51 番目のセリン残基をリン酸化し、ternary complex 形成を阻害し、mRNA 翻訳すなわちタンパク質合成を抑制する。ストレス時には、一時的にタンパク質合成を減らし、新たなタンパク質が小胞体に送り込まれるのを防いで小胞体の負荷を軽減 (小胞体ストレスの場合) する、あるいはアミノ酸の消費を抑制 (アミノ酸飢餓の場合) して、ストレスに対抗しようとする

るものと考えられる。

この全般的 mRNA 翻訳抑制は、逆説的ではあるが、一部の特殊な mRNA の翻訳を増加させる。その代表的なものが ATF4 と GADD34 であり、5' の非翻訳領域の構造が重要な役割を果たしていると考えられている^{25,26)}。

3-3) ISR のエフェクターとしての翻訳抑制因子 4E-BP1 の同定

我々は、上記の Wolfram 症候群のモデルマウスである *Wfs1* 遺伝子破壊マウスの膵島における遺伝子発現の変化を検討する過程で、*Wfs1* 遺伝子破壊マウスの膵島では、UPR を構成するいくつかの遺伝子発現の亢進とともに翻訳抑制因子 4E-BP1 の発現が増加していることを見出した⁷⁾。4E-BP1 の発現増加は、既述の Akita マウスの膵島や、膵β細胞株 MIN6 を小胞体ストレス誘導剤（タブシガルギンなど）で刺激した場合にも認められた（図 7）。また、我々はこの 4E-BP1 の発現が、ATF4 の過剰発現で誘導され、ATF4 ノックアウトマウス由来線維芽細胞で消失することから、ATF4 を介する転写誘導によるものであることを明らかにした。さらに、*Eif4ebp1* 遺伝子イントロンに二つの C/EBP-ATF composite site を見出した（図 8）。我々は最近、酸化ストレスを惹起する砒素によっても、4E-BP1 の発現誘導が起こることを確認している（富永未発表観察）。これらの解析から、翻訳抑制因子 4E-BP1 は、ISR によって ATF4 を介して誘導される分子であることが明らかとなった。

eIF2α リン酸化-ATF4 誘導の経路は、比較的短期間の応

答経路であるが、4E-BP1 の活性化はより刺激暴露後期に持続的である（図 9A）。このことは、4E-BP1 の発現を誘導するのが ATF4 の活性化であることを考えると、一見矛盾するかのように思われるが、4E-BP1 のタンパク質としての安定性を考慮すると説明可能である。4E-BP1 は、PHAS-I (phosphorylated heat and acid stable protein regulated by insulin) とよばれ、非常に安定なタンパク質である。実際に、シクロヘキシミドでタンパク質合成を抑えて 4E-BP1 の消失の時間経過を追うと、細胞内での安定性が低いとされる CHOP に比べて、4E-BP1 はゆっくりと減少していた⁷⁾。ATF4 の活性化が終わったあとも 4E-BP1 タンパク質は、細胞内に蓄積されて翻訳抑制効果を発揮すると考えられる。このことから、eIF2α のリン酸化は ISR の早期の翻訳抑制を、4E-BP1 は後期の翻訳抑制を担っていると考えられる（図 9）。以上の結果は主に小胞体ストレスにおける検討を元に得られたが、ATF4 の活性化は、様々なストレス応答において共通の ISR により惹起されることから、この二重の翻訳抑制機構は、他のストレス下でも作動していると考えられる。

3-4) 翻訳抑制因子 4E-BP1 によるβ細胞の保護

ストレス下での 4E-BP1 誘導の生体での意義を解析するため、*Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスとインスリノーマを発症する IT6 マウス²⁸⁾を交配して、*Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスにおいてインスリノーマを作らせ、4E-BP1 を欠損する膵β細胞株を樹立した⁷⁾。4E-BP1 欠損β細胞は、小胞体ストレスに暴露した際のタンパク質合成の抑制が不十分で

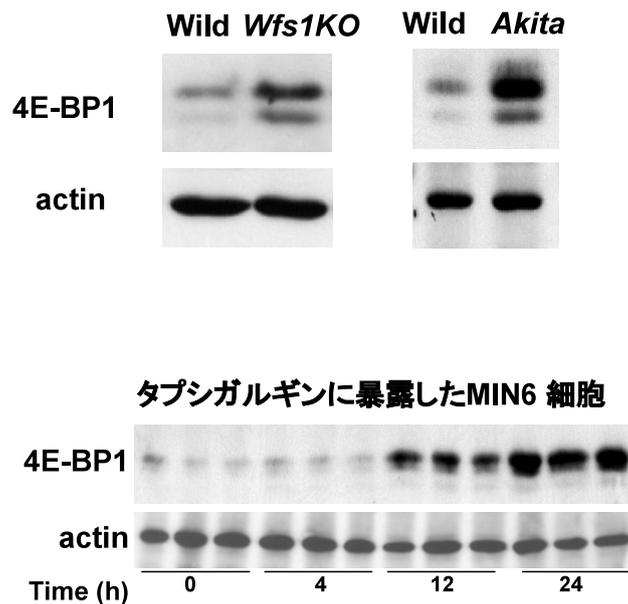


図 7 小胞体ストレスによる 4E-BP1 の発現増加
Wfs1KO 膵島および Akita マウス膵島における 4E-BP1 の増加と MIN6 細胞における小胞体ストレス惹起剤タブシガルギンによる 4E-BP1 の誘導

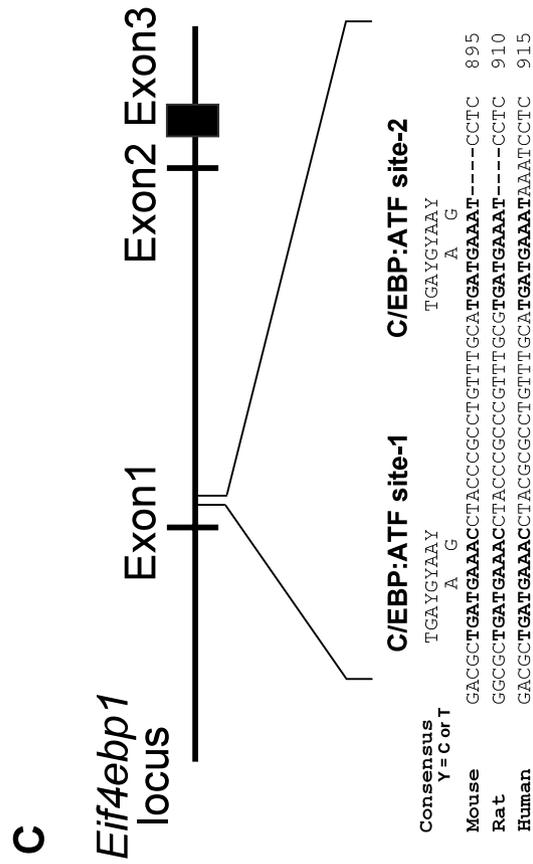
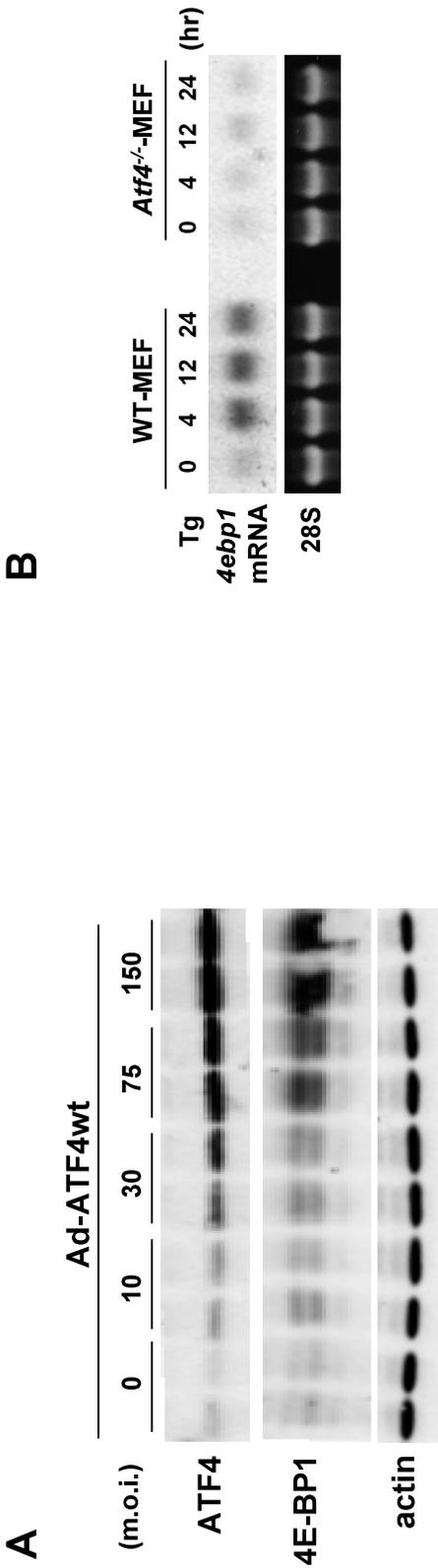


図8 ATF4 を介する 4E-BP1 の発現誘導

A. MIN6 細胞におけるアデノウイルスベクターを用いた ATF4 の過剰発現による 4E-BP1 タンパク質の誘導

B. *Aif4* 欠損 MEF (マウス胎児線維芽細胞) における タブシガルギン (Tg) による *4ebp1* mRNA 誘導の消失

C. *Eif4ebp1* 遺伝子イントロン 1 に見出された二つの C/EBP: ATF composite site

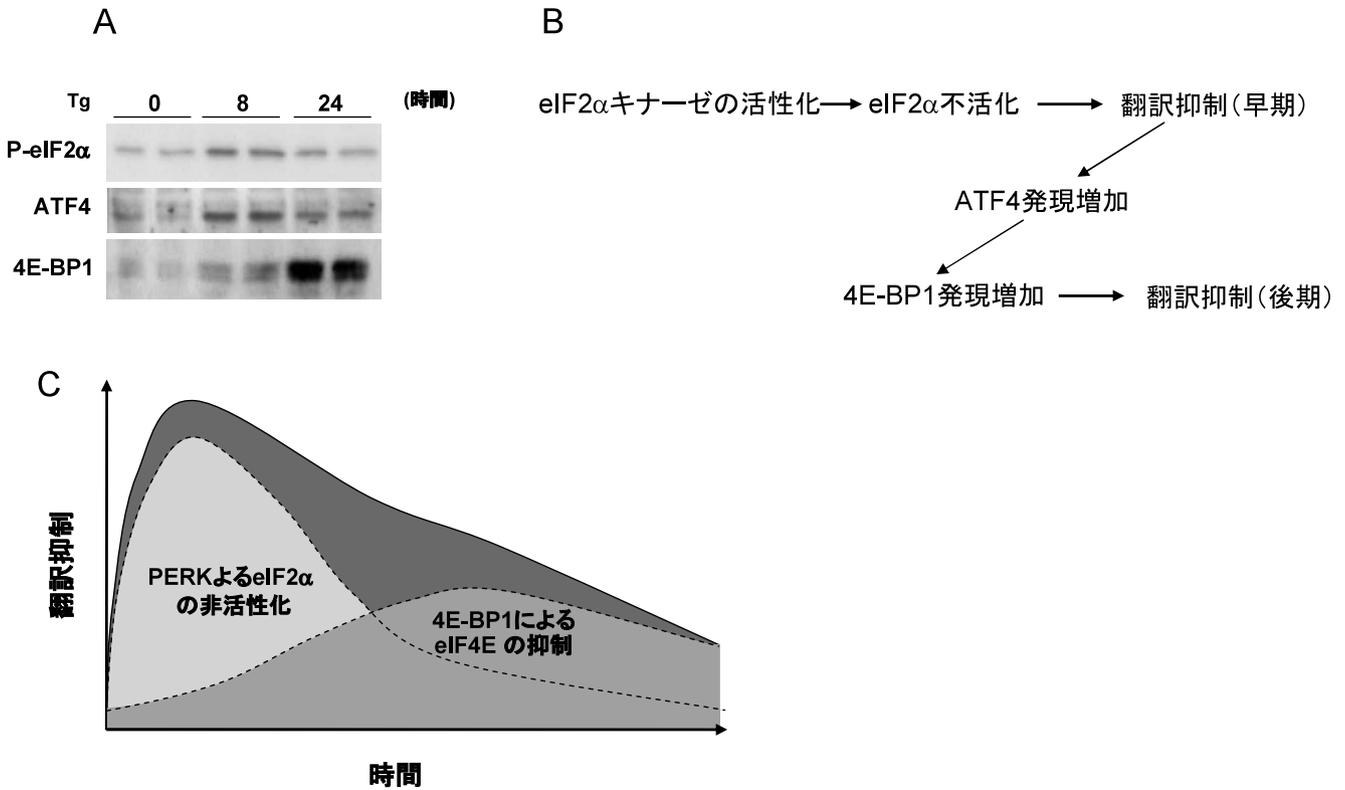


図9 二つの様式によるストレス下での mRNA 翻訳抑制

A, B: タブシガルギン (Tg) による小胞体ストレスによって惹起される eIF2α のリン酸化とそれに続く ATF4 の発現亢進は、ストレス応答の早期に誘導され、ATF4 による 4E-BP1 の増加は、後期に誘導される。

C: ストレス下では、PERK による eIF2α の非活性化の結果もたらされる早期の翻訳抑制と 4E-BP1 の誘導による eIF4E の抑制の結果もたらされる後期の翻訳抑制の二つの様式で翻訳制御が行われている。

あるとともに、生存能の低下を示した。これらの結果から、4E-BP1 は、小胞体ストレスに暴露された細胞のタンパク質合成を抑制し、細胞に対する負荷を軽減するとともに、細胞死を防ぐ役割を担っていると考えられた。

さらに、小胞体ストレスによる 4E-BP1 誘導の個体での意義を解析するため、β 細胞での小胞体ストレス亢進によって糖尿病を発症する Akita マウスあるいは *Wfs1* 遺伝子破壊マウスと *Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスを交配して二重変異マウスを作製し、解析した。Akita マウスおよび *Eif4ebp1* 遺伝子破壊マウスいずれにおいても、4E-BP1 の欠損が耐糖能障害を悪化させることが観察された⁷⁾。そして、この耐糖能障害の悪化は、膵 β 細胞障害が増悪することによることも明らかとなった⁷⁾。小胞体ストレス下の β 細胞では、タンパク質合成を抑制しておくことが、長期的な生存にとっては有利であり、その役割の少なくとも一部を 4E-BP1 が担っているものと考えられる。

3-5) mRNA 翻訳制御とストレス応答および寿命

4E-BP1 のストレス応答における役割を検討している過程で、いくつかの関連する報告が相次いでなされた。まず、Schneider のグループは、低酸素状態にさらされやすいがん細胞では 4E-BP1 の発現が亢進していることを見出

した²⁹⁾。4E-BP1 は、既述のようにキャップ構造依存性の mRNA 翻訳を抑制するが、同時に一部の mRNA で行われる IRES 依存性の翻訳を亢進させる。その報告で用いられた乳がん細胞では、4E-BP1 の発現亢進による IRES 依存性翻訳亢進により、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現が増加していることが示されている。VEGF の mRNA には IRES が存在し、低酸素ストレス下では、この IRES が活性化されると考えられる。この機構は、低酸素ストレス下で、4E-BP1 の発現を増加させ、VEGF の IRES 依存性の翻訳により血管新生を亢進させて対抗しようとする適応応答と考えられる。

また、過誤腫の原因遺伝子の一つである *Tsc2* の遺伝子産物 TSC2 は、mTOR を活性化させる低分子 G タンパク質 Rheb に対する GAP 活性を有している。TSC2 のノックアウト細胞では、恒常的に Rheb タンパク質が活性化され、mTOR も活性化される。この結果 4E-BP1 は、常にリン酸化されて、その活性は低く保たれている。すなわち、4E-BP1 がノックアウトされた状態に近い。このような細胞では、低酸素や栄養制限ストレスが加わった場合に、p53 の発現抑制ができないために、アポトーシスに陥りやすいことが観察されている³⁰⁾。また、Ozcan らは、

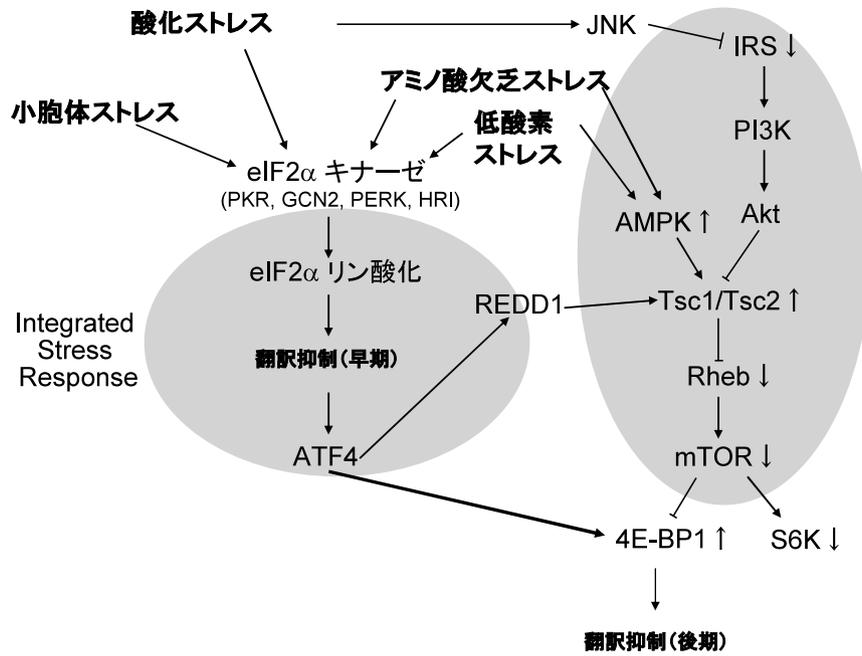


図10 ストレス応答と PI3K/Akt/mTOR 経路の連関

TSC2 (あるいは TSC1) の欠如した細胞では、タンパク質合成の抑制がかからないため、小胞体に対する付加が軽減されず、小胞体ストレスによるアポトーシスに陥りやすいことを示している³¹⁾。

さらに、低酸素ストレスは、さまざまな病態にかかわっていることが明らかになってきているが、低酸素ストレスへの抵抗能も tRNA の量の制御を介した翻訳抑制とかかわっていることが、最近線虫を用いた研究で明らかとなっている¹²⁾。また、線虫では、eIF4E のアイソフォームの欠失とそれによる翻訳・タンパク質合成の抑制が寿命を長くすることが見出されている。これらの成績は、ストレス応答については寿命の延長において mRNA 翻訳制御が普遍的に重要であることを示している。

我々の報告を含め、ストレス応答と mRNA 翻訳制御をつなぐシグナル伝達経路について、図10にまとめた。ISR を引き起こすストレスが、PI3K/Akt/mTOR 系による 4E-BP1 のリン酸化とともに ATF4-4E-BP1 の経路を介する転写活性化を介して、4E-BP1 量の増加をもたらし、mRNA 翻訳制御・タンパク質合成制御に重要な役割を担っていると考えられる。

おわりに

東北大学大学院医学系研究科分子代謝病態学分野・糖尿病代謝科に在任中の7年間の仕事を中心にまとめさせていただいた。これらの研究を通して得られた知識は、2型糖尿病の病態を考える上で、非常に役立っている。たとえば、過栄養によりインスリン需要を増大させるような状

態、あるいは、インスリン分泌促進薬によりインスリン合成を亢進させることは、β細胞障害を助長させる可能性が高いことが、上述の研究結果を基に類推される。糖尿病の新たな治療戦略を考えていく上で、重要な点であると思われる。

文 献

- 1) Rhodes, C.J. (2005) *Science*, 307, 380–384.
- 2) 浦野文彦 (2007) 生化学, 79, 1055–1059.
- 3) Robertson, P. & Harmon, J.S. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 3743–3748.
- 4) Vasir, B., Aiello, L.P., Yoon, K.H., Quicquel, R.R., Bonner-Weir, S., & Weir, G.C. (1998) *Diabetes*, 47, 1894–1903.
- 5) Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y., & Oka, Y. (2004) *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1159–1170.
- 6) Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J., & Oka, Y. (2006) *Hum. Mol. Genet.*, 15, 1600–1609.
- 7) Yamaguchi, S., Ishihara, H., Yamada, T., Tamura, A., Usui, M., Tominaga, R., Munakata, Y., Satake, C., Katagiri, H., Tashiro, F., Aburatani, H., Tsukiyama-Kohara, K., Miyazaki, J., Sonenberg, N., & Oka, Y. (2008) *Cell Metab.*, 7, 269–276.
- 8) Wolfram, D.J. & Wegener, H.P. (1938) *Mayo Clin. Proc.*, 13, 715–718.
- 9) Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., & Herskowitz, R.D. (1989) *Diabetes Care*, 12, 135–138.
- 10) Rando, T.A., Horton, J.C., & Layzer, R.B. (1992) *Neurology*, 42, 1220–1224.

- 11) Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y., & Permutt, M.A. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 143–148.
- 12) Strom, T.M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K.D., & Meitinger, T. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 2021–2028.
- 13) Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., & Oka, Y. (2001) *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 477–484.
- 14) Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., & Oka, Y. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 5635–5640.
- 15) Ron, D. & Walter, P. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 519–529.
- 16) Zhangm, F., Hamanaka, R.B., Bobrovnikova-Marjon, E., Gordan, J.D., Dai, M.S., Lu, H., Simon, M.C., & Diehl, J.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 30036–30045.
- 17) Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S.K., Kayo, T., Lu, D., Takata, K., Koizumi, A., & Izumi, T. (1999) *J. Clin. Invest.*, **103**, 27–37.
- 18) Stoy, J., Edghill, E.L., Flanagan, S.E., Ye, H., Paz, V.P., Pluzhnikov, A., Below, J.E., Hayes, M.G., Cox, N.J., Lipkind, G.M., Lipton, R.B., Greeley, S.A., Patch, A.M., Ellard, S., Steiner, D.F., Hattersley, A.T., Philipson, L.H., Bell, G.I.; Neonatal Diabetes International Collaborative Group (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15040–15044.
- 19) Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., & Mori, M. (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**, 525–532.
- 20) Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., & Julier, C. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 406–409.
- 21) Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., & Ron, D. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 1153–1163.
- 22) Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., & Butler, P.C. (2003) *Diabetes*, **52**, 102–110.
- 23) Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., & Henquin, J.C. (2008) *Diabetes Obes. Metab.*, **10** Suppl 4, 32–42.
- 24) Huang, C.J., Lin, C.Y., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A.E., Rizza, R.A., & Butler, P.C. (2007) *Diabetes*, **56**, 2016–2027.
- 25) Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G. (2009) *Cell*, **136**, 731–745.
- 26) Wek, R.C., Jiang, H.Y., & Anthony, T.G. (2006) *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 7–11.
- 27) Lee, Y.Y., Cevallos, R.C., & Jan, E. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 6661–6673.
- 28) Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., & Yamamura, K. (1990) *Endocrinology*, **127**, 126–132.
- 29) Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S.C., & Schneider, R.J. (2007) *Mol. Cell*, **28**, 501–512.
- 30) Lee, C.H., Inoki, K., Karbowiczek, M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Henske, E.P., & Guan, K.L. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4812–4823.
- 31) Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Düvel, K., Sahin, M., Manning, B.D., & Hotamisligil, G.S. (2008) *Mol. Cell*, **29**, 541–551.
- 32) Syntichaki, P., Troulinaki, K., & Tavernarakis, N. (2007) *Nature*, **445**, 922–926.
- 33) Anderson, L.L., Mao, X., Scott, B.A., & Crowder, C.M. (2009) *Science*, **323**, 630–633.