

学位論文

Gsk-3 は ATF4 のプロテアソーム分解を介してマウス
膵 β 細胞のアポトーシスを促進する

氏名 永尾 優子

所属 山口大学大学院医学系研究科
病態制御内科学講座

令和5年4月

目 次

1. 要旨	2
2. 略語一覧	3
3. 研究の背景	4
4. 目的	5
5. 方法	6
6. 結果	11
7. 考察	20
8. 結語	22
9. 謝辞	22
10. 参考文献	22

1. 要旨

膵β細胞量の進行性の減少が糖尿病の発症・進展に関与する。糖尿病病態では、インスリン作用不足による高血糖に対する代償的なインスリン産生の増加や脂質異常のためにβ細胞において小胞体ストレスが亢進する。一方、セリン・スレオニンキナーゼ Gsk-3 は PI3/Akt により抑制され、Gsk-3 の活性制御障害がβ細胞不全と小胞体ストレス関連β細胞死に関連する。しかし、Gsk-3 を介した細胞障害の分子機構は十分に解明されていない。本研究では、Gsk-3 を介する小胞体ストレス応答調節と膵β細胞アポトーシス誘導の関連について検討を行った。

方法：マウス単離膵ランゲルハンス氏島(ラ氏島)およびマウス膵β細胞株で薬理的に小胞体ストレスを誘導した。*Ins2* 遺伝子に変異を持ち、変異インスリンの蓄積により小胞体ストレスが亢進しβ細胞死を来す Akita mouse 由来の膵β細胞株を遺伝的小胞体ストレスのモデルとして用いた。低分子化合物、あるいは酵素不活性型 Gsk-3β の導入により Gsk-3 活性を阻害した。

結果：小胞体ストレス下では Gsk-3 を抑制する Akt の活性が減弱し Gsk-3 が活性化した。Gsk-3 は ATF4 の Ser214 リン酸化を介して ATF4 と SCF-βTrCP の結合とそれに続く ATF4 のユビキチン化、蛋白分解を促進する。したがって、Gsk-3 の抑制により ATF4 の分解速度が低下し、ATF4 蛋白質量が増加することが明らかになった。このとき、β細胞のアポトーシスが減弱することを確認した。この抗アポトーシス効果は dominant negative-ATF4 導入あるいは ATF4 ノックダウンにより有意に減弱した。Gsk-3 抑制によるアポトーシス抑制のメカニズムについて、ATF4 の転写標的である GADD34 および 4E-BP1 の発現増強を介した全般的な蛋白翻訳の動態との関連が考えられた。さらに、Akita mouse 由来の膵β細胞株でも Gsk-3 活性阻害によるアポトーシス抑制が確認され、これには ATF4 の発現増強と全般的な蛋白翻訳抑制が関連した。以上の結果より、インスリンシグナルとストレス応答のクロストークが明らかになり、Gsk-3/ATF4 経路が糖尿病におけるβ細胞保護の治療標的となる可能性が示唆された。

2. 略語一覽

AHA. L-azidohomoalanine

Akt Protein kinase B

ATF4 activating transcription factor 4

ATF6 activating transcription factor 6

Bip/GPR78 Binding immunoglobulin protein /78 - kDa glucose - regulated protein

β TrCP β -transducin repeat containing protein

Chop C/EBP homologous protein

eIF2 α Eukaryotic translation-initiation factor 2 α

4E-BP1 Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

GADD34 Growth-arrest DNA damage gene 34

GAPDH Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase

GFP green fluorescent protein

Gsk-3 glycogen synthase kinase 3

GS glycogen synthase

HEK293 Human Embryonic Kidney cell 293

Ire1 α Inositol requiring enzyme 1 α

IRS Insulin receptor substrate

ISR Integrated stress response

MIN6 mouse insulinoma cell

PERK PKR - like ER kinase

PI3K phosphatidylinositol-3 kinase

PP1 Protein phosphatase 1

SLC Solute Carrier

SCF Skp, Cullin, F-box containing complex

3. 研究の背景

膵β細胞機能障害、すなわちインスリン分泌の減少は1型及び2型糖尿病の成因である(参考文献 1, 2)。2型糖尿病では、膵β細胞個々の機能低下とアポトーシスによる細胞数の経時的減少が想定されている(参考文献 3, 4, 5)。膵β細胞は多量のインスリンを合成するため小胞体に対する負荷が大きく、ミスフォールディング蛋白が蓄積を生じる(参考文献 6)。そのため、小胞体ストレスがβ細胞機能不全の重要なメディエーターと考えられている(参考文献 7, 8, 9)。

小胞体ストレスに適応するため、細胞は unfolded protein response (UPR) や Integrated stress response (ISR) のような特定のストレス応答経路を活性化する(図 1)(参考文献 10, 11)。UPR は Ire1α と ATF6 活性化を介して、ISR は PERK の活性化によって開始される。PERK は eIF2α をリン酸化し全体的な mRNA の翻訳を減少させ、一方で ATF4 を含む特定の蛋白質の翻訳を増加させる(参考文献 12, 13)。ATF4 はアミノ酸の取り込み、グルタチオン合成、蛋白質合成の調節とともに酸化ストレス耐性に関わる遺伝子の転写を誘導する(参考文献 14, 15)。ATF4 の標的遺伝子のうち GADD34 は PP1 と複合体を形成し、eIF2α の脱リン酸化を介して翻訳抑制の解除に働く(参考文献 16)。また、4E-BP1 は ATF4 を介した蛋白質翻訳の再プログラミングに重要であり、ストレス下でのβ細胞生存に寄与する(参考文献 17)。くわえて、ATF4 による転写制御はβ細胞の成熟性維持にも重要な役割を担う(参考文献 18)。

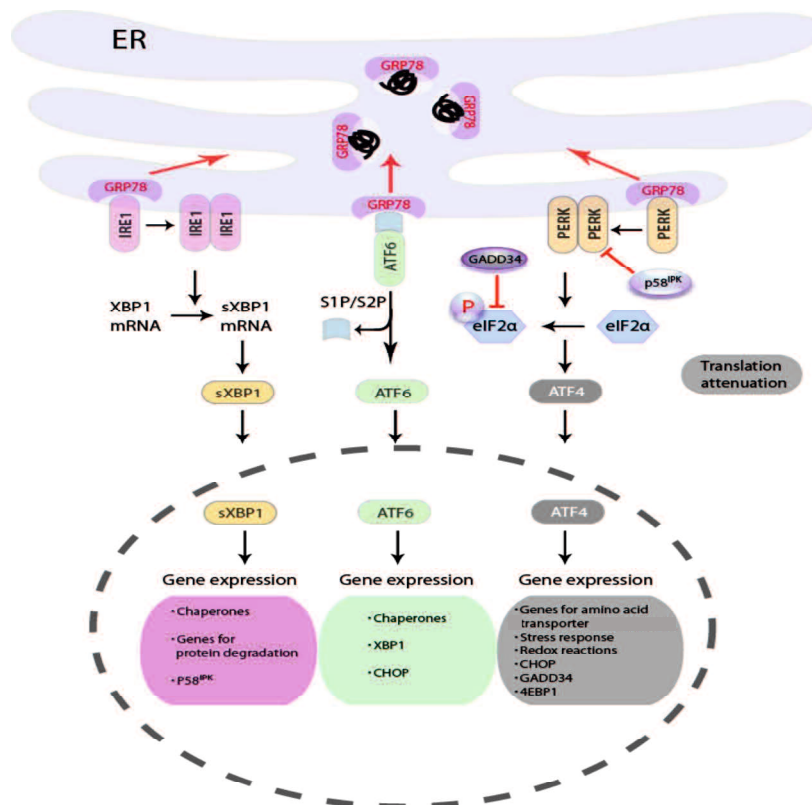


図 1 小胞体ストレス応答に関わる細胞内シグナル伝達

Glycogen synthase kinase-3 (Gsk-3) はインスリンシグナル経路においてグリコーゲン合成酵素を不活性化するセリン/スレオニンキナーゼとして初めに同定された (参考文献 19)。Gsk-3 は α と β の 2 種類のアイソザイムを持ち、これらの酵素活性部位は 95% 相同である。Gsk-3 の活性はインスリン/IGF-1 などの増殖因子により活性化された PI3K/Akt により抑制的に調節される (図 2a)。さらに、PI3K/Akt は Gsk-3 活性を阻害するだけでなく、Gsk-3 β の核外輸送を促進し核基質へのアクセスを制限する (参考文献 20)。Gsk-3 はグリコーゲン代謝以外に、さまざまな標的蛋白質のリン酸化を介して転写活性調節、細胞増殖、アポトーシス、幹細胞維持などの細胞内プロセスに重要な役割を果たしていることが明らかにされている (参考文献 21)。糖尿病モデルマウスの膵島において Gsk-3 が活性化しており (図 2b)、Gsk-3 の発現を遺伝的に減少させることでインスリン分泌障害と β 細胞量減少が予防でき、その結果糖尿病の発症が抑制された (参考文献 22, 23)。くわえて、薬理学的小胞体ストレスや病態として関連が想定されるブドウ糖脂肪毒性の細胞モデルにおいて、Akt/Gsk-3 経路の減弱が膵 β 細胞アポトーシスに関与することが示されている (参考文献 24, 25)。これらの知見より、活性化した Gsk-3 が膵 β 細胞機能不全および小胞体ストレス関連細胞死に重要な役割を担うことが推察されるが、Gsk-3 を介する分子機構は十分に解明されていない。我々は、マウス膵ラ氏島と膵 β 細胞株において Gsk-3 による小胞体ストレス応答調節とアポトーシス誘導との関連性について検討を行った。

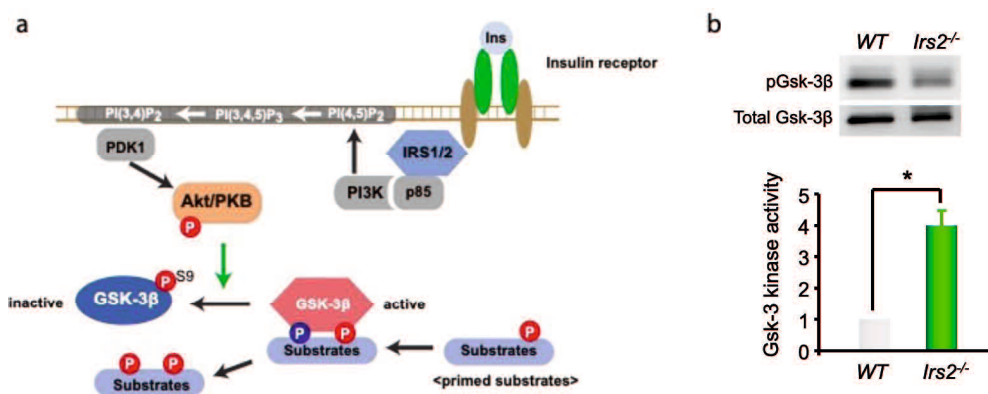


図 2 セリン/スレオニンキナーゼ Gsk-3 は Akt/PKB により抑制的に調節される
a. インスリン受容体シグナルによる Gsk-3 の調節。 b. *Irs2* 欠損マウスの単離膵島における Gsk-3 β のリン酸化低下、活性の上昇 (参考文献 22 より改変)。

4. 目的

Gsk-3 を介する小胞体ストレス応答調節を膵 β 細胞アポトーシス誘導との関連において解明し、糖尿病に対する新たな治療標的を同定する。

5. 方法

5-1. 細胞培養・試薬

マウス膵β細胞株(MIN6)(参考文献 26)(passage 22-32)および Akita mouse(Ins2 96C/Y)及び野生型(Ins2 96C/C)由来の膵β細胞株(参考文献 27)を 5%CO₂/37°Cの条件下で 15%FBS とペニシリン/ストレプトマイシン 100units/ml and 50 μg/ml を添加した DMEM(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を用い継代培養した。Ins2 の遺伝子型を RFLP 解析法で確認した(参考文献 28)。血清除去誘発性アポトーシスを調べるため、Ins2 96C/Y および Ins2 96C/C 細胞を無血清培地で 24 時間培養した。HEK293 細胞は ATCC(CRL-1573)から購入し、L-グルタミン、10%FBS を添加した DMEM で培養した。ツニカマイシン、タブシガルギン、シクロヘキシミドを Sigma-Aldrich より購入した。SB216763 を Tocris Bioscience(Bristol, UK)、MG132 を CALBIOCHEM(San Diego, CA, USA)より購入した。

5-2. 膵ラ氏島単離

12 週齢 C57/BL6J 雄性マウスにおいて経総胆管コラゲナーゼ法により膵臓を消化し、70 μm ナイロンセルストレーナーにより濾過と洗浄を行い実体顕微鏡下でハンドピッキングにより膵ラ氏島を単離した(参考文献 29)。単離した膵ラ氏島を 11mM グルコース、10%FBS、200 units/ml ペニシリン、50 μg/ml ストレプトマイシンを含む RPMI 培地で 5%CO₂/37°Cで 24 時間培養後実験に用いた。Gsk-3 阻害薬(SB216763(5 μM)あるいは LiCl(10mM))存在下・非存在下でツニカマイシン(5 μg/ml)を添加し 14-20 時間培養した。

5-3. プラスミド

MIN6 細胞より Gsk-3β と ATF4 cDNA を RT-PCR 法で増幅しサブクローニングした。ヒト β TrCP cDNA を DNAFORM(Yokohama, Japan)より購入した。N 末端側に Flag を付加した ATF4、HA を付加した Gsk-3β と β TrCP の cDNA をそれぞれ pcDNA3.1(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)にサブクローニングした。85、86 番目のリジンをそれぞれメチオニンとアラニンに置換した酵素不活性型 Gsk-3β (Gsk-3β -KM)(参考文献 30)、DNA 結合ドメイン中の 6 アミノ酸を置換(292RYRQKKR298 から 292GYLEAAA298)した dominant negative ATF4(DN-ATF4)(参考文献 31)、ATF4-S214A、ATF4-S218A、ATF4-S214A/218A それぞれの cDNA を direct mutagenesis 法により作成した。

5-4. レトロウイルス、shRNA 遺伝子導入

HA-Gsk-3β -KM 及び Flag-DN-ATF4 cDNA を pMXs-puro(Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)にサブクローニングした。マウス ATF4 に対する shRNA(表 1)を合成し、相

補オリゴヌクレオチドとの 2 本鎖 DNA を pSirenQ retrovirus vector (Invitrogen) にサブクローニングした。pMXs-puro を HEK293T 細胞にトランスフェクションし 48 時間後に回収した培養上清に polybrene (8 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) を添加しウイルス液を調整した。ウイルス液と 4 時間培養し MIN6 にレトロウイルスを感染させた。ウイルス液除去 24 時間後よりピューロマイシン (0.5 μ g/ml) を添加し 48 時間培養することで感染細胞の選択を行った。ピューロマイシン除去後 3 日間通常培養し感染細胞を実験に供した。

表 1 マウス ATF4 の shRNA 配列

Δ 80	Sequence	Position
target	5'-AAACCATGCCAGATGAGCTC-3'	314 relative to initial ATG
sense	5'-ACCATGCCAGATGAGCTCTgtgtgctgccAGAGCTCATCTGGCATGGTTTTTT-3'	
antisense	5'-AAAAAACCATGCCAGATGAGCTCTggacagcacacAGAGCTCATCTGGCATGGT-3'	
Δ 50	Sequence	Position
target	5'-AAGCCTGACTCTGCTGCTTAC-3'	577 relative to initial ATG
sense	5'-GCCTGACTCTGCTGCTTACggtgctgccGTAAGCAGCAGAGTCAGGCCTTTTTT-3'	
antisense	5'-AAAAAAGCCTGACTCTGCTGCTTAC CggacagcacacGTAAGCAGCAGAGTCAGGC-3'	

5-5. シクロヘキシミド (CHX) 蛋白安定性評価実験

単離腓ラ氏島を 4 時間ツニカマイシン \pm 5 μ M SB216763 で処理後、40 μ M シクロヘキシミド (CHX) を添加し 60 分間培養後に蛋白ライセートを抽出した。MIN6 を同様に処理し CHX 添加 10、30、60 分後に蛋白ライセートを回収した。HEK293 細胞に ATF4 野生型あるいは変異体を発現させ、トランスフェクションから 24 時間後に CHX で 60 分間処理した。蛋白質サンプルを調整しウエスタンブロットで解析した。

5-6. ウェスタンブロット

マウス単離腓ラ氏島あるいは MIN6 を cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) で溶解し 10,000 \times g、4°C で 10 分間遠心後上清を回収した。また、核蛋白質を NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて抽出した。蛋白質アッセイキット (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて蛋白濃度を測定した。蛋白サンプル (5 μ g (単離腓ラ氏島)、20 μ g (MIN6)) を 10-20%、または 4-15% 濃度勾配のポリアクリルアミドゲル (Invitrogen) 上で泳動分離しニトロセルロース膜 (GE Healthcare, Buckingham, UK) に転写した。1:1000~5000 倍希釈した一次抗体 (表 2) と 4°C で一晩反応させ、1:2000 倍希釈した HRP 抱合二次抗体 (表 2) と 4°C で 60 分間反応させた。ECL 検出キット (GE Healthcare) で化学発光させ感光フィルムに露光し免疫複合体を検出した。フィルム上のシグナルを NIH Image J ソフトウェア version 1.51s (参考文献 32) を用いて定量化し、 α -tubulin あるいは GAPDH のシグナルで補正した。

表 2 ウェスタンブロッティングに使用した抗体

No	Target	Dilution	Host, MW (kDa)	Cat. No.	Company
Primary Antibodies:					
1	p-Akt (Ser473)	1:1000	Rabbit pAb, 60	#9271	Cell Signaling
2	Akt	1:1000	Rabbit pAb, 60	#9272	Cell Signaling
3	p-Gsk-3 α (Ser21)	1:1000	Rabbit mAb, 51	#9316	Cell Signaling
4	p-Gsk-3 β (Ser9)	1:1000	Rabbit mAb, 46	#9323	Cell Signaling
5	total Gsk-3 α/β	1:1000	Rabbit mAb, 51,46	#5676	Cell Signaling
6	CHOP(GADD153)	1:1000	Rabbit pAb, 30	SC-793	Santa cruz
7	α -Tubulin	1:5000	Mouse mAb, 52	#3873	Cell Signaling
8	p-Glycogen Synthase	1:1000	Rabbit pAb, 85-90	#3891	Cell Signaling
9	Grp78/Bip	1:1000	Rabbit pAb, 78	ADI-SPA-826	Enzo
10	cleaved ATF6	1:1000	Mouse mAb, 50	IMG-273	IMGENEX
11	ATF4	1:1000	Rabbit mAb, 49	#11815	Cell Signaling
12	Gsk-3 β	1:1000	Rabbit mAb, 46	#9315	Cell Signaling
13	Lamin A/C	1:1000	Rabbit pAb, 28,70	#2032	Cell Signaling
14	GAPDH	1:1000	Rabbit mAb, 37	#2118	Cell Signaling
15	Biotin(D5A7)	1:1000	Rabbit mAb, N/A	#5597	Cell Signaling
16	HA-Tag(6E2)	1:1000	Mouse mAb, N/A	#2367	Cell Signaling
17	Phosphoserine	1:1000	Rabbit pAb, N/A	61-8100	Invitrogen
18	FLAG	1:1000	Mouse mAb, N/A	F3165	Sigma-Aldrich
19	Ubiquitin	1:1000	Rabbit pAb, N/A	#3933	Cell Signaling
20	β -TrCP	1:1000	Rabbit mAb, 62	#4394	Cell Signaling
21	Cleaved Caspase-3(ASP175)	1:1000	Rabbit pAb, 17,19	#9661	Cell Signaling
22	p-eIF2 α (Ser51)	1:1000	Rabbit pAb, 38	#9721	Cell Signaling
23	total eIF2 α	1:1000	Rabbit pAb, 38	#9722	Cell Signaling
24	4E-BP1(53H11)	1:1000	Rabbit mAb, 15-20	#9644	Cell Signaling
25	GADD34(D-8)	1:1000	Mouse mAb, 73	SC-46661	Santa Cruz
26	Insulin	1:1000	Guinea pig mAb, 11	A0564	Dako
Secondary Antibodies:					
27	Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody			#7074	Cell Signaling
28	Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody			#7076	Cell Signaling
29	Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG(H+L)			#106-035-003	Jackson ImmunoResearch
30	Streptavidin-HRP			#3999	Cell Signaling

p-, phosphorylated;

pAb, polyclonal antibody ; mAb, monoclonal antibody

5-7. 免疫沈降

細胞を氷上でプロテアーゼ阻害剤を含む RIPA buffer で 10 分間溶解し、4℃、15,000 ×g で遠心し上清を蛋白溶解液として回収した。MIN6 での内因性 Gsk-3 α/β に対する免疫沈降では、500 μ l の蛋白溶解液にプロテイン G セファロース (Cell Signaling Technology) と 5 μ g 抗 Gsk-3 α/β 抗体 (Santa Cruz, CA, USA) を添加し 4℃で 17 時間インキュベートした。サンプルより回収した免疫沈降物を RIPA buffer で 3 回洗浄し、さらに PBS で 1 回洗浄した。免疫沈降物をウエスタンブロットで解析した。トランスフェクションした HEK293 細胞の場合、2 μ g の抗 Flag 抗体 (Cell Signaling Technology)、2 μ g の抗 HA 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて免疫沈降を行った。

5-8. Phos-tag 解析

MIN6 をツニカマイシン±Gsk-3 阻害剤で 5 時間培養後、MG132 (25 μ M) を添加しさらに 1 時間培養した。細胞溶解液を既報に従い調整し (参考文献 33)、25 μ M Phos-tag アクリルアミドと 50 μ M MnCl₂ を添加した 8%アクリルアミド上で 90V・4 時間泳動しウエスタンブロットにより解析した。

5-9. Gsk-3 による ATF4 リン酸化解析

Flag-ATF4 と Flag-ATF4-Ser214 をトランスフェクションにより発現させた HEK293 を、SB216763 で 24 時間処理し抗 Flag 抗体抱合セファロースビーズを用いて ATF4 蛋白を免疫精製した。精製 ATF4 蛋白を 20 μ M ATP を添加したキナーゼアッセイバッファ (Cell Signaling Technology) 中でヒト GST-GSK-3 β (Cell Signaling Technology) と 30℃、20 分間反応させた。反応液を SDS-PAGE に供し、抗 Phospho-Ser 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いウエスタンブロットでリン酸化 ATF4 を検出した。

5-10. DNA 断片解析

5 μ M のツニカマイシン±Gsk-3 阻害剤で 20 時間処理した単離暁ラ氏島及び MIN6 より Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA) を用いて DNA を抽出し 1.2%アガロース/EtBr ゲル上で泳動分離した。ChemiDOC XRS+ (Bio Rad) を用いて可視化しゲルイメージを撮影した。

5-11. メタボリックラベリングを用いた蛋白翻訳解析

Click-iT AHA (1-azidehomoalanine) (Invitrogen) を用いて、新生蛋白質を検出した。MIN6 を 6 cm プレートで培養し、80%コンフルエントの状態 Gsk-3 阻害剤存在下または非存在下でツニカマイシンと 4、10、18 時間培養後メチオンin除去培地でさら

に1時間培養した。続いて、MIN6をClick-iT AHAで2時間処理し細胞溶解液を作成した。溶解液中のAHAをビオチン結合アルキンで標識し、ストレプトアビジンアガロースレジンを用いて標識蛋白質を回収した。全細胞溶解液またはストレプトアビジンアガロースレジン回収物をウエスタンブロットで解析した。前者ではHRP結合ストレプトアビジンを用い、後者では抗ビオチン抗体を用いてビオチン標識蛋白質を検出した。

5-12. リアルタイムPCR

Ins2 96C/Y細胞をPBSで洗浄後TRIZOL(Invitrogen)を添加し、常法に従いRNAを抽出した。豚ラ氏島の場合、PicoPure RNA isolation kit(Thermo Fisher Scientific)を使用しRNAを抽出した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)を用いて作成したcDNA、PowerUp SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)とプライマーによる反応液を作成し、これをABI StepOne PlusリアルタイムPCRシステムで反応させた。遺伝子発現量を $\Delta\Delta$ Ct法で定量解析し、Cypaを内部標準遺伝子として用いた。解析した遺伝子とプライマーは表3に示す。

表3 リアルタイムPCRで用いたプライマー配列

Gene	Forward	Reverse
<i>insulin1</i>	GTGACCAGCTATAATCAGAGACCATC	AAAGCCTGGGTGGGTTTGG
<i>insulin2</i>	GTC AAGCAGCACCTTTGTGG	TCTGAAGGTCACCTGCTCCC
<i>atf4</i>	GGACAGATTGGATGTTGGAGA	AGAGGGGCAAAAAGATCACAT
<i>4e-bp1</i>	GAGAGCTGCACAGCATT CAG	AGTCATTCCCCTGCAGTAGC
<i>bip</i>	TTCAGCCAATTATCAGCAA AACTCT	TTTTCTGATGTATCCTATT CACCAGT
<i>chop</i>	CCACCACACCTGAAACGAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<i>total xbp-1</i>	TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG	GTCCATGGGAAGATGTTCTGG
<i>spliced xbp-1</i>	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG	GTCCATGGGAAGATGTTCTGG
<i>gadd34</i>	GACCCCTCCA AACTCTCCTTC	CTTCCTCAGCCTCAGCATT C
<i>slc1a5</i>	TCAACCATGGTCCAGCTTCT	CGGGTGCGTACCACATAATC
<i>slc7a5</i>	CTGCTACAGCGTAAAGGC	AACACAATGTTCCCACGTC
<i>slc7a1</i>	ATCGGTACTTCAAGCGTGGC	CCATGGCTGACTCCTTCACG

5-13. 蛍光リポフェラーゼレポーターアッセイ

ATF4/C/EBP β 複合結合配列を含むマウスEif4ebp1遺伝子の転写開始点から-938~-895の配列とコンボジット配列に変異を導入した配列と相補配列をオリゴヌクレオチドで合成し、2本鎖DNA配列をpGL3レポーターベクター(BamHI-SalI)(Promega, Madison, WI, USA)に挿入した。これをRenilla luciferase vectorと共にLipofectamine 2000(Invitrogen)を使用してMIN6にトランスフェクションした。トランスフェクション36時間後に細胞溶解液を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay system(Promega)を使用してluciferaseの発光強度を測定した。

5-14. 統計

定量的データは特に記載がない限り平均値±SD で表示した。One-way または two-way ANOVA を用いて統計学的有意差を評価し Bonferroni 検定による補正を行った。2 群間の比較は unpaired-t 検定を行った。p<0.05 を統計学的有意差と判定した。GraphPad Prism version7 (Promega) を使用して統計解析を行った。

5-15. 倫理

本研究は、山口大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ており、カルタヘナ法に則して山口大学遺伝子組換え実験実施規則に基づき、これを遵守して行った(許可番号：25-025)。動物実験では山口大学の動物実験委員会の承認を得た上で、山口大学の動物実験講習を定期的に受講し諸規則に則り動物愛護の精神を持って実験を実施した(許可番号：J21038)。

6. 結果

6-1. 小胞体ストレス下において Gsk-3 活性は増大し ATF4 の発現を抑制的に調節する

膵β細胞において、IRS/PI3K/Akt 経路が小胞体ストレスにより減弱する(参考文献 24, 25, 34)。そこで、小胞体ストレス下での Gsk-3 活性制御を検討した。ツニカマイシンで処理した単離膵ラ氏島において、Akt-S473 のリン酸化減少とともに、Gsk-3α-S21 と Gsk-3β-S9 におけるリン酸化が減少し(図 3a)、Gsk-3β(S9)のリン酸化量はコントロールと比較し 80%減少した。さらに、Gsk-3 のリン酸化標的であるグリコーゲン合成酵素(GS)のリン酸化が増加し、これは Gsk-3 特異的阻害剤 SB216763 処理により抑制された(図 3b)。Gsk-3 と小胞体ストレス応答の関連について、Gsk-3 阻害剤存在下で CHOP、Bip/Grp78 及び cleaved ATF6 の発現は変化しないものの、ATF4 の発現がコントロール処理の 2 倍以上に増加した(図 3b)。この効果について、MIN6 で ATF4 発現の経時的変化を検討した。ツニカマイシン処理で誘導された ATF4 は、Gsk-3 阻害剤存在下で発現が増強し、処理後 12 時間においても検出可能であった(図 3c)。さらに、Gsk-3β KM 安定発現 MIN6 においても ATF4 の発現が増強し(図 3d)、核内での発現増加より転写機能との関連が推察された(図 3e)。Gsk-3 による ATF4 発現調節について、転写および翻訳レベルで変化がないため翻訳後調節が推察された(図 3f, g)。

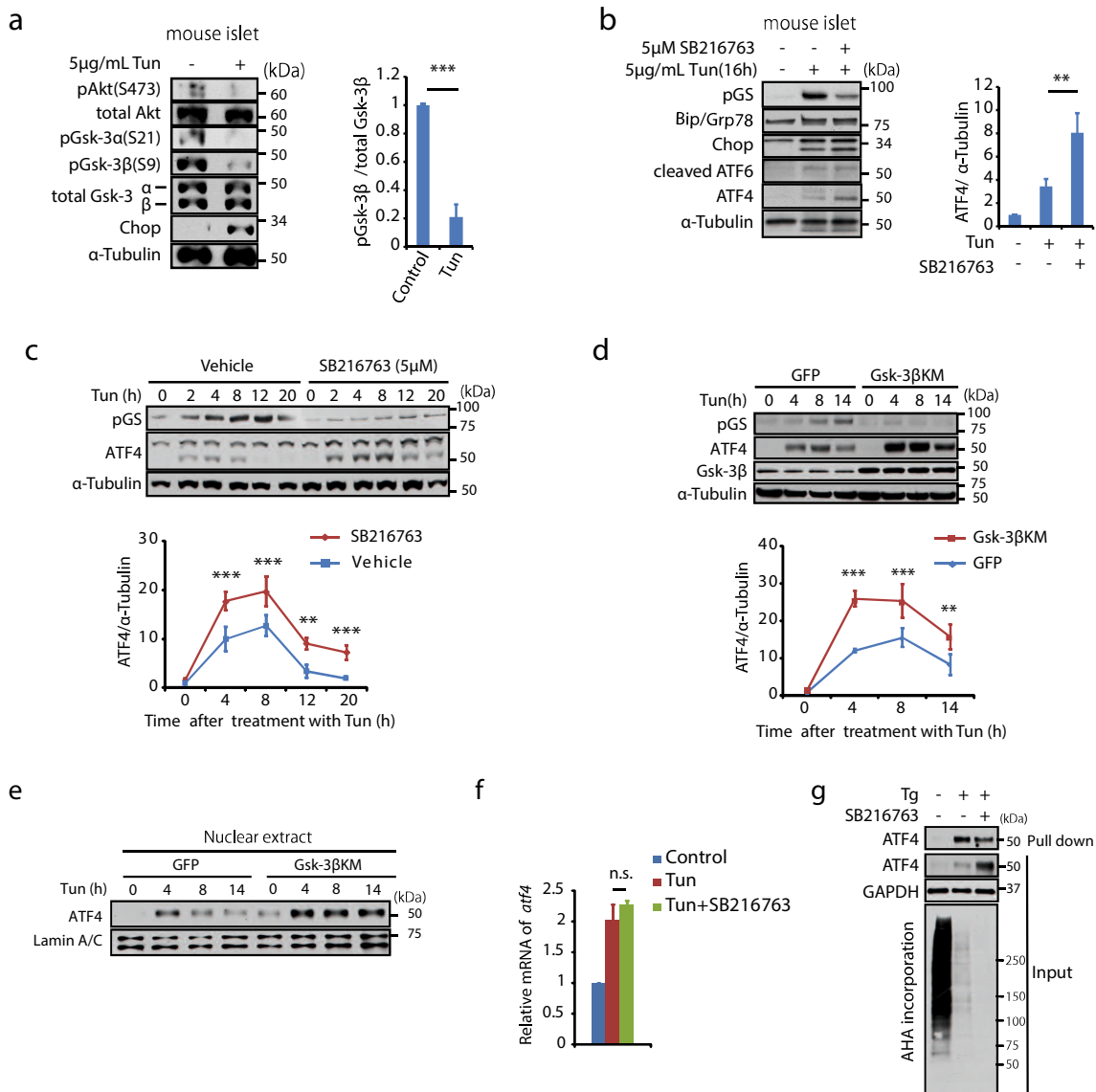


図3. 小胞体ストレス下においてGsk-3はATF4の発現を抑制的に制御する (a)マウス単離膵ラ氏島をツニカマイシン(5 μg/ml)でインキュベートしAkt-Gsk-3シグナル経路をウェスタンブロットで解析した。pGsk-3β/Gsk-3βを平均値±SD(n=3)として示した。***p<0.001(unpaired student t検定)。(b)単離膵ラ氏島をツニカマイシン±Gsk-3阻害剤SB216763(5μM)で14時間インキュベートしウェスタンブロットで解析した。ATF4発現は平均値±SDで示した(n=3)。**p<0.01(by one-way ANOVA by followed Bonferroni's post hoc test)。(c)SB216763(5μM)でインキュベートまたは(d)HA-Gsk-3βKM安定発現MIN6をツニカマイシン(5 μg/ml)で示した時間インキュベートした。細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。ベースに対するATF4の発現を平均値±SDで示した(n=3)。**p<0.01、***p<0.001by two-way ANOVA by followed Bonferroni's post hoc test。(e)GFPあるいはHA-Gsk-3βKM安定発現MIN6を提示した時間でツニカマイシンとインキュベートした後に核蛋白質を抽出しウェスタンブロットで解析した。(f)ツニカマイシン±SB216763(5μM)8時間インキュベートした膵ラ氏島のリアルタイムPCR。平均値±SDで示した(by one-way ANOVA by followed Bonferroni's post hoc test)。(g)MIN6細胞をタブシガルギン(1 μM)±SB216763と4時間インキュベートしClick-iT AHAを用いて新生蛋白質を検出した。新生ATF4蛋白質はストレプトアビジニアガロースレジンによって回収しAHA-ビオチン標識蛋白質を用いて検出した。

6-2. Gsk-3 活性抑制は ATF4 蛋白質を安定化させる

ATF4 蛋白安定性に対する Gsk-3 活性の影響を明らかにするため、シクロヘキシミド (CHX) ・ パルス-チェイス実験を行った。マウス膵ラ氏島において、ツニカマイシン

処理で誘導された ATF4 蛋白は CHX パルス 60 分後に消失したが、Gsk-3 阻害剤存在下ではベースラインから 60%の減少に止まった(図 4a)。Gsk-3 β KM 安定発現 MIN6 での ATF4 減少速度はコントロールの約 1/5 に低下した(図 4b)。プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下で発現減少が抑制されることからプロテアソーム蛋白分解とそこでの Gsk-3 の役割が推察された(図 4c)。

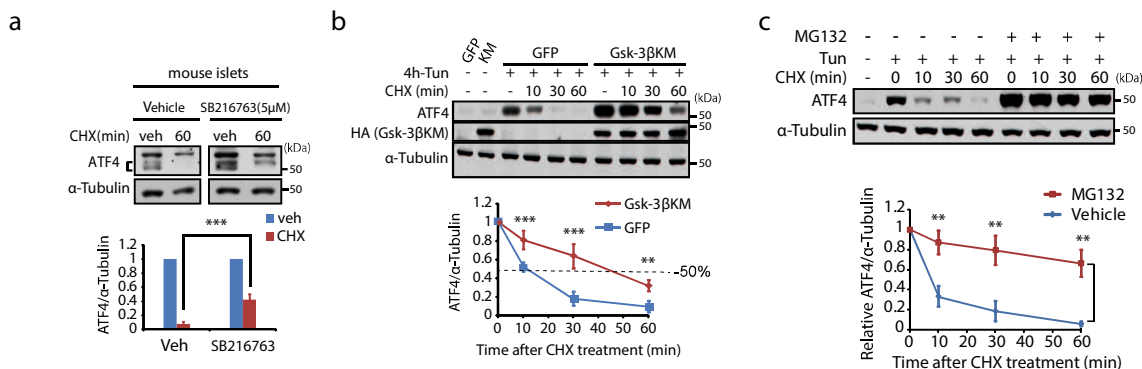


図 4. Gsk-3 活性抑制は ATF4 蛋白質を安定化させる

(a) 単離膵ラ氏島を 4 時間ツニカマイシン (5μg/ml) ± SB216763 (5μM) 処理後、シクロヘキシミド (CHX) 処理を行い ATF4 発現レベルを解析した。ATF4/α-tubulin 相対値を平均値 ± SD で示した (n=3)。***p<0.001 by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. (b) GFP または HA-Gsk-3βKM 安定発現 MIN6 をツニカマイシン 4 時間処理し CHX パルス - チェイス実験を行い示した時間で回収した。ATF4 発現をウエスタンブロットにより解析した。ベースに対する ATF4 の相対値を平均値 ± SD で示した (n=3)。**p<0.01、***p<0.001 by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. (c) MIN6 をツニカマイシンで 4 時間培養後、MG132 (25 μM) と 1 時間培養した。CHX パルス - チェイス実験を行い示した時間で回収した。ATF4 発現はウエスタンブロットにより解析した。ベースに対する ATF4 の相対値を平均値 ± SD で示した (n=3)。**p<0.01、***p<0.001 by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

6-3. Gsk-3 は ATF4S214 をリン酸化する

次に、Gsk-3 と ATF4 の相互作用を調べた。ツニカマイシンで処理した MIN6 において内因性 Gsk-3 が、キナーゼ活性に関わらず ATF4 と結合した(図 5a)。ATF4 のリン酸化状態を phos-tag ゲルを用いて解析した。ATF4 の推定分子量は 50kDa であるが、小胞体ストレスで誘導された ATF4 は分子量 70kDa 付近で同定され MG132 添加により発現が増加した。一方、SB216763 あるいは LiCl 存在下では 50kDa にも免疫反応分画が出現し、この分画は非リン酸化 ATF4 と推定された(図 5b)。この観察に基づき、ATF4 における Gsk-3 の推定標的配列を同定し、種々の動物種で保存されていることを確認した(図 5c)。Gsk-3 の酵素反応は、リン酸化部位より 4 アミノ酸 C 末端側に位置するセリン(S)またはスレオニン(T)のリン酸化を必要とする(参考文献 21)。ATF4 では、カゼインキナーゼによる S218 リン酸化を介して S214 が Gsk-3 の標的となる可能性が考えられた(参考文献 35)。免疫精製した ATF4 を基質とする Gsk-3 の in vitro kinase assay では、野生型 ATF4 におけるリン酸化セリン増加が ATF4-S214A では消失した(図 5d)。さらに、S214A、S218A 変異体では蛋白安定性が増加した(図 5e)。

6-4. S214 のリン酸化は、SCF- β TrCP を介するユビキチン化蛋白分解に必要である
 カゼインキナーゼ/SCF- β TrCP 経路を介する ATF4 の分解経路が明らかにされており (参考文献 36)、S218 が Gsk-3 の標的と degron で重複する (図 5f)。ATF4 と β TrCP の結合が S218A 変異により消失し、重要なことに ATF4-S214A でも阻害された (図 5g, h)。さらに、これらの ATF4 変異体ではユビキチン化が抑制された (図 5i)。したがって、S218 と共に S214 は β TrCP との結合に必須であり、Gsk-3 を介した蛋白分解調節が示唆された (図 5j)。

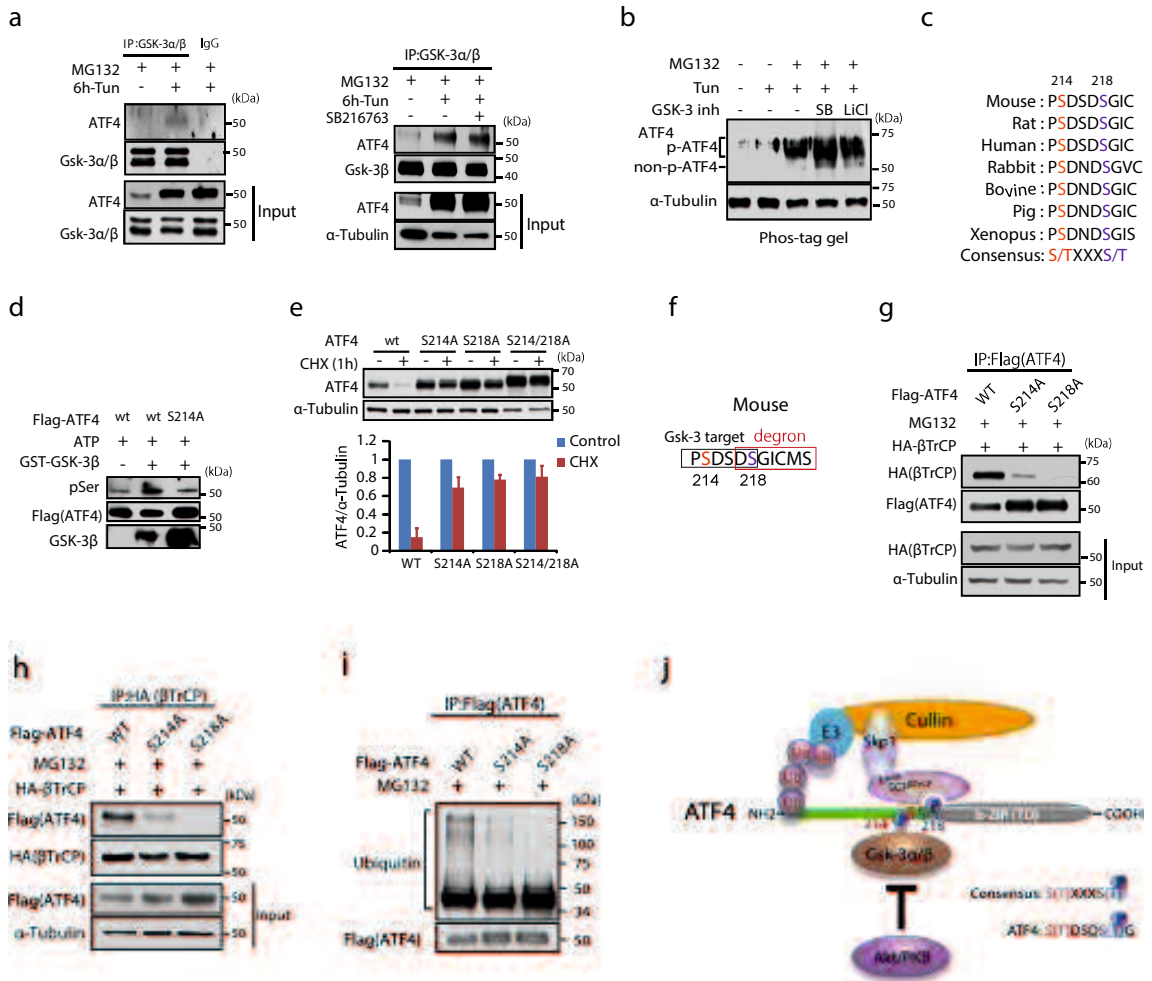
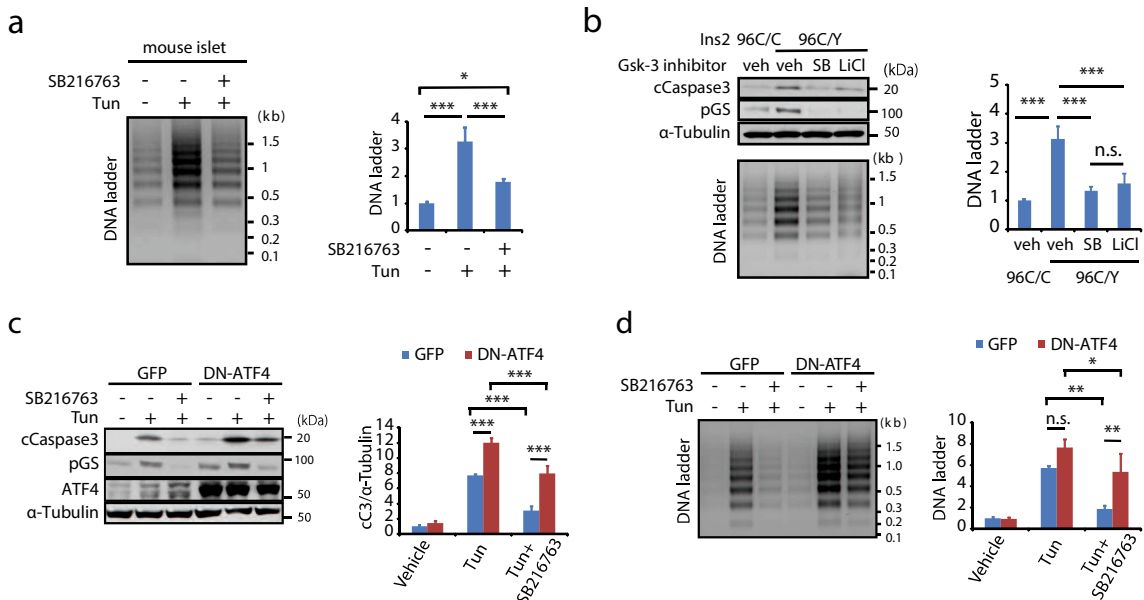


図 5. Gsk-3 は Ser214 のリン酸化を介して ATF4 蛋白分解を促進する

(a) 左: MIN6 にツニカマイシン (5 $\mu\text{g/ml}$)、MG132(25 μM) 処理を行い抗 Gsk-3 α/β 抗体または非特異的 IgG 抗体を用いて免疫沈降を行い免疫沈降物、input をウェスタンブロットにより解析した。右: MIN6 をツニカマイシン (5 $\mu\text{g/ml}$) \pm SB216763 (5 μM) で処理し、抗 Gsk-3 α/β 抗体を用いて免疫沈降物、input をウェスタンブロットにより解析した。(b)MIN6 をツニカマイシン \pm Gsk-3 阻害剤 (5 μM SB216763, 10 mM LiCl) で 4 時間処理後、MG132(25 μM) で 1 時間処理し phos-tag を用いて ATF4 の発現を解析した。(c) さまざまな生物種間における ATF4 に対する Gsk-3 リン酸化予測部位の比較。(d) 免疫精製した ATF4 を基質とする GSK-3 の *in vitro* kinase assay。(e)HEK293 で ATF4 変異体を発現させた CHX チェイス実験。ATF4 発現量の変化を平均値 \pm SD で示した (n=2)。(f)Gsk-3 リン酸化標的部位およびデグロン配列。HEK293 において、HA- β TrCP、ATF4 WT、ATF4 変異体 (S214A、S218A) を共発現させ、MG132(25 μM) で 2 時間処理、免疫沈降物を用いて、 β TrCP と ATF4 間の相互作用を (g) 抗 Flag 抗体 (ATF4)、(h) 抗 HA 抗体 (β TrCP) によりウェスタンブロットにて解析した。(i)ATF4 WT および変異体に対するユビキチン化の解析。(j) 模式図: Gsk-3 を介した ATF4-S214 のリン酸化が β TrCP のデグロンへの結合を促進しプロテアソーム分解を引き起こす。

6-5. Gsk-3-ATF4 経路は小胞体ストレス下におけるアポトーシスを促進する

小胞体ストレス誘導性アポトーシスへの Gsk-3/ATF4 経路の関与を検討した。単離豚ラ氏島において、ツニカマイシン処理によるアポトーシス誘導が Gsk-3 活性阻害により有意に減弱した(図 6a)。さらに、無血清培地で培養した Ins2 96C/Y では Gsk-3 が活性化しアポトーシスが增強した。この時、SB216763 あるいは LiCl により Gsk-3 活性を抑制したところ、アポトーシスが有意に減弱した(図 6b)。Gsk-3 抑制の抗アポトーシス作用が DN-ATF4 強制発現により抑制された(図 6c、6d)。また、ATF4 を 50%と 80%ノックダウンした MIN6 では Gsk-3 抑制による抗アポトーシス作用が ATF4 発現減少と共に減弱した(図 6e、6f)。



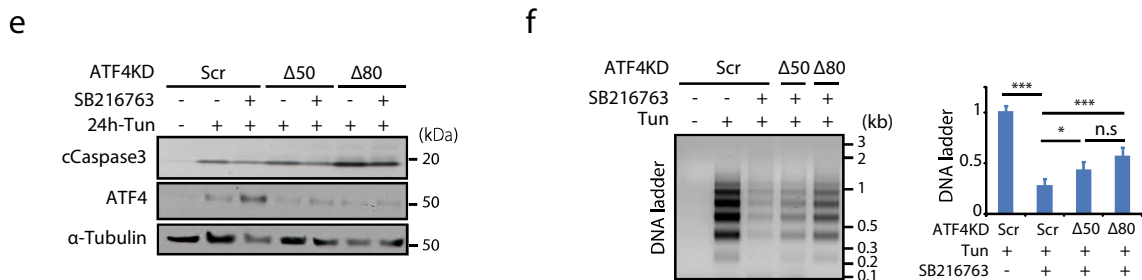
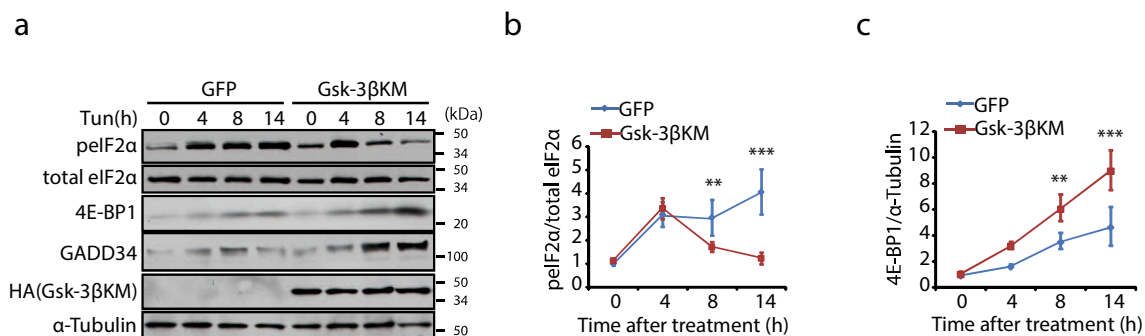


図6. Gsk-3活性抑制はATF4依存的に小胞体ストレス誘導性アポトーシスを減弱させる
 (a)単離藤ラ氏島においてツニカマイシン±SB216763で20時間処理後、DNA断片を解析した。グラフは平均値±SDを示す(n=4)。(b)Ins2 96C/YおよびIns2 96C/Cを無血清培地で培養し、SB216763あるいはLiClでGsk-3抑制し切断型カスパーゼ3およびDNA断片を検出した。グラフは平均値±SD(n=3)を示す。GFPまたはDN-ATF4強制発現MIN6をツニカマイシン±SB216763で20時間処理した。蛋白溶解液をウェスタンブロットにより解析し、(c)切断型カスパーゼ3および(d)DNA断片の相対値をグラフに示した(n=3)。ATF4ノックダウン(Δ50、Δ80)したMIN6におけるGsk-3活性抑制による抗アポトーシス効果を評価した。異なる2つの配列を標的としたshRNAを導入しノックダウンされたATF4を作成した。ツニカマイシン±SB216763処理を行い(e)切断型カスパーゼ3の発現、(f)DNA断片を評価した。グラフは相対値を示す(n=3)。すべての統計データはone-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc testで評価した。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

6-6. Gsk-3 は統合的ストレス応答(Integrated Stress Response)を制御する

ATF4 は Integrated Stress Response(ISR)の重要なメディエーターである(図1)(参考文献17)。そこで、Gsk-3/ATF4によるISR調節を検討した。Gsk-3βKM安定発現MIN6では、ツニカマイシン処理で誘導されるeIF2α-S51のリン酸化が8時間以降に減弱し(図7a、b)、この時GADD34と翻訳制御因子4E-BP1の発現が有意に上昇した(図7a、c)。Gsk-3阻害剤でも同様の変化が観察され、この効果はDN-ATF4強制発現により消失した(図7d、e)。くわえて、小胞体ストレスで誘導されるATF4を介する4ebp1遺伝子のプロモーター活性がGsk-3抑制により増強し(図7f)、さらにATF4の転写活性化能がS214Aにより増加した(図7g)。



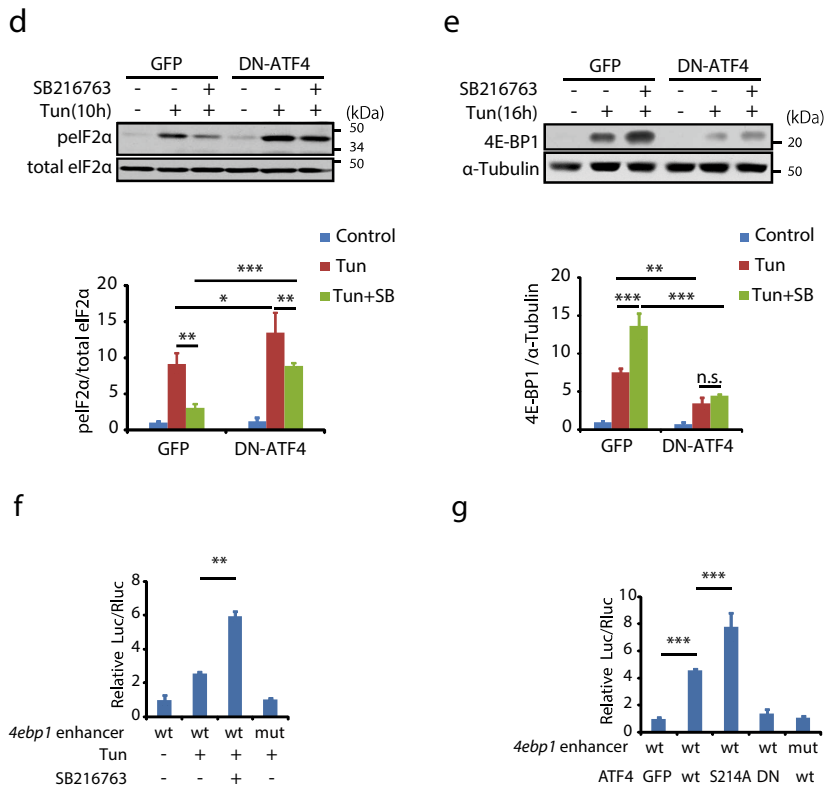


図7.Gsk-3はATF4の転写標的とeIF2αのリン酸化を制御する
 GFPまたはHA-Gsk-3 KM安定発現MIN6を示した時間でツニカマイシン処理し、蛋白溶解液をウエスタンブロットで解析した。(a)同じゲルで得られた代表的なプロット画像。(b)pEIF2α(c)4E-BP1発現のベースラインからの変化を平均値±SDで示した(n=3)。**p<0.01、***p<0.001 by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test。レトロウイルスによりDN-ATF4を発現させたMIN6においてGsk-3活性抑制した場合の(d)pEIF2αと(e)4E-BP1の発現量の解析。グラフはpEIF2α、4E-BP1の相対量を平均値±SDで示した(n=3)。*p<0.05、***p<0.001 by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test。
 (f)4ebp1 intron内のATF4/C/EBPβ composite siteを含む転写開始点から-938~-895の領域、または同領域ATF4結合部位に変異を導入した陰性コントロール配列を有するEif4ebp1遺伝子をSV40プロモーターとともにMIN6細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後よりツニカマイシン±SB216763で処理した細胞におけるルシフェラーゼレポーター活性を測定した。グラフはLuc/Rluc平均値±SDで示した。(g)さらにpcDNA3.1-GFP、pcDNA3.1-wt、-S214、あるいはDN-ATF4をMIN6細胞にトランスフェクションしたMIN6細胞におけるルシフェラーゼレポーター活性。Luc/Rlucの平均値±SDを示した。それぞれn=4、**p<0.01、***p<0.001、by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test。

6-7. Gsk-3 抑制は小胞体ストレス下でのタンパク質翻訳制御を調節する

Gsk-3/ATF4 経路の機能的関連を明らかにするため、小胞体ストレス下の全般的蛋白翻訳動態に対する Gsk-3 抑制の効果を metabolic labeling 法で検討した。ツニカマイシンで 4 時間処理した MIN6 では、Gsk-3 活性阻害にかかわらず、蛋白翻訳が著しく抑制された(図 8a)。しかし、10 時間では Gsk-3 阻害剤存在下で蛋白翻訳が部分的ではあるが有意に回復した。一方、18 時間において、コントロール処理では蛋白翻訳はベースラインと同等にまで回復するが、Gsk-3 抑制により阻害され、蛋白翻訳は 10 時間と同程度であった(図 8a)。重要なことに、DN-ATF4 導入あるいは ATF4 80%ノックダウンにより Gsk-3 抑制の効果は、ツニカマイシン処理 10 時間で完全に消失し、18 時間では有意に減弱した(図 8b, c)。すなわち、Gsk-3/ATF4 経路が小胞体ストレスにおける蛋白翻訳調節に重要な役割を担うことが示唆された。

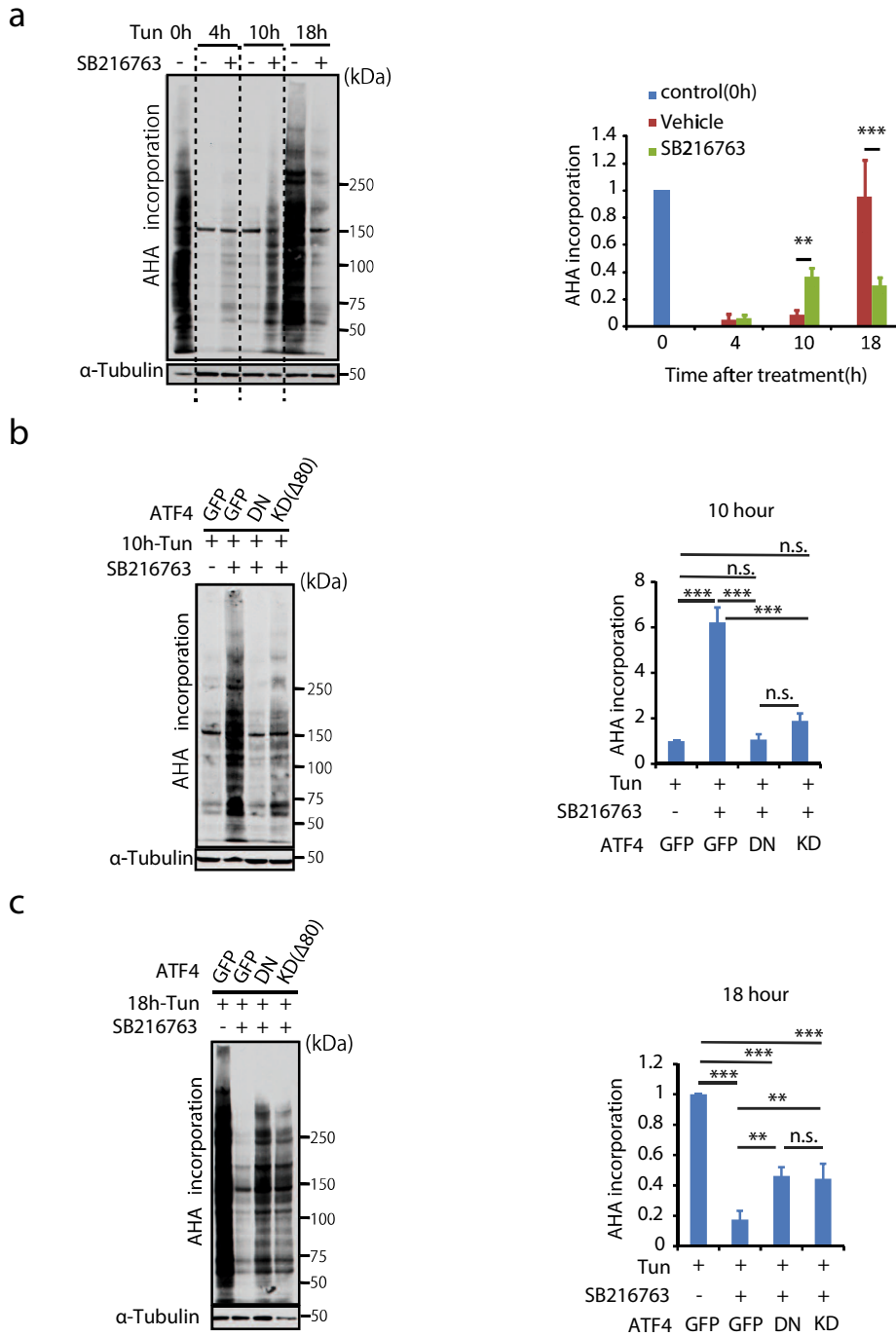


図8. Gsk-3活性抑制は小胞体ストレス下での全般的な翻訳状態を変化させる
 MIN6をツニカマイシン±SB216763で表示した時間処理しAHAを用いてメタボリックラベリング解析を行なった。全細胞溶解液中のAHAで標識した新生蛋白質を(a)HRP標識ストレプトアビジンを用いてウエスタンブロットにより評価した(n=3)。 α -tubulinで補正した相対的なAHA取り込み量を平均値±SDでグラフに示した。**p<0.01, ***p<0.001 by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test。DN-ATF4強制発現MIN6またはsh RNA(Δ 80)によりATF4ノックダウンしたMIN6をツニカマイシン処理し(b)10時間、(c)18時間後のAHA取り込みに対する影響(n=3)。 α -tubulinで補正した相対的なAHA取り込み量を平均値±SDでグラフに示した。**p<0.01, ***p<0.001 by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test。

6-8. Gsk-3 抑制は遺伝的小胞体ストレスにおける ISR を増強する

遺伝的小胞体ストレスモデル *Ins2* 96C/Y において、無血清培養によるアポトーシス誘導が Gsk-3 活性阻害で減弱した(図 6b)。そこで、*Ins2* 96C/Y での Gsk-3 による ISR 制御を検討した。*Ins2* 96C/Y を Gsk-3 阻害剤存在下で 16 時間培養したところ、ATF4 とその転写標的である *4ebp1*、*chop*、*gadd34* 及びアミノ酸トランスポーターの遺伝子発現が有意に上昇した(図 9a)。蛋白レベルでは、ATF4 発現増強、eIF2 α -S51 のリン酸化減少と 4E-BP1 の発現量増加を認めた(図 9b, c)。さらに、Gsk-3 抑制はインスリン合成に影響することなく(図 9a, d)、全般的蛋白翻訳を抑制した。したがって、薬理的小胞体ストレスに加え *Ins2* 96C/Y でも Gsk-3 による ISR 制御と細胞死誘導との関連が示唆された。

一連の実験結果より膵 β 細胞において、小胞体ストレスにおける Akt/Gsk-3 経路の減弱が ATF4 蛋白分解を促進する。その結果、ATF4 を介する蛋白翻訳の適応調節が破綻し、細胞死誘導に寄与することが示唆された(図 10)。

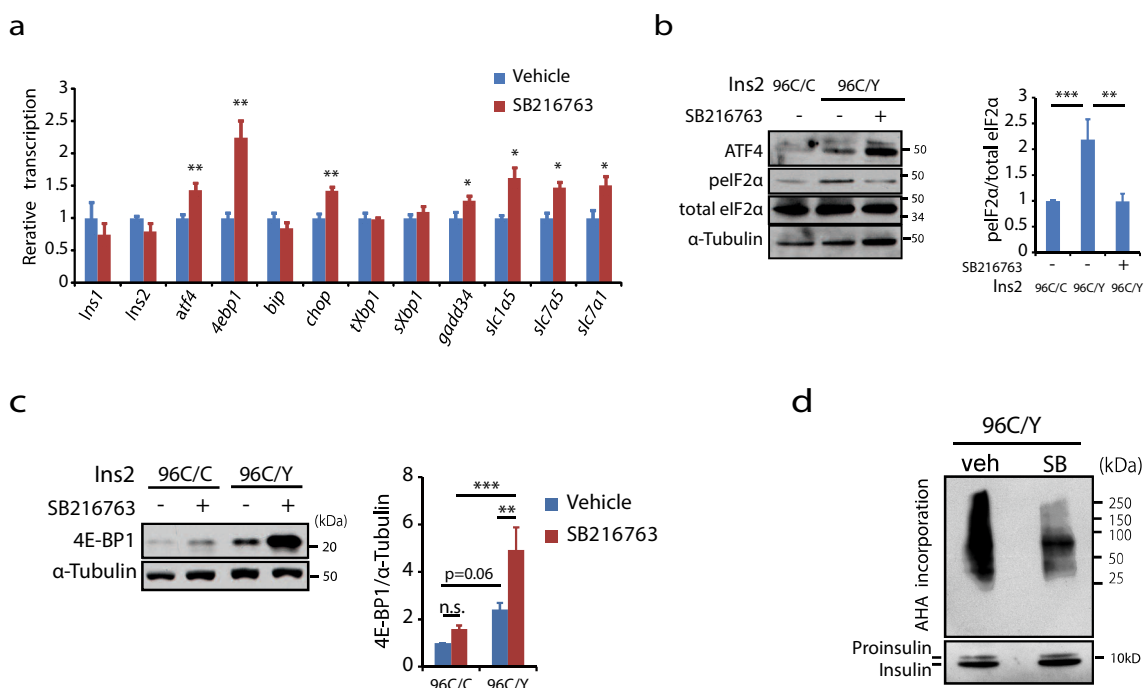


図9 Gsk-3活性抑制はIns2変異膵 β 細胞株における統合的ストレス応答を調節する

(a)*Ins2* 96C/Yをvehicle(DMSO)あるいはSB216763で16時間インキュベート後、定量的リアルタイムPCR法でATF4の転写標的因子の遺伝子発現レベルを解析した(n=3)。相対量は平均値 \pm SDで示した。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ (unpaired student t-test)(b,c)*Ins2* 96C/Cまたは*Ins2* 96C/YをvehicleまたはSB216763で16時間インキュベートし蛋白溶解液をウエスタンブロットにより解析した。(b)p-eIF2 α および(c)4E-BP1の相対量をグラフに示した(それぞれn=3)。 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$: one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test。(d) *Ins2* 96C/Yを20時間vehicleあるいはSB216763でインキュベートしメタボリックラベリング解析をおこなった。ピオチンで標識した蛋白質はストレプトアビジンビーズを用いて回収した。回収物は抗ピオチンまたは抗インスリン抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

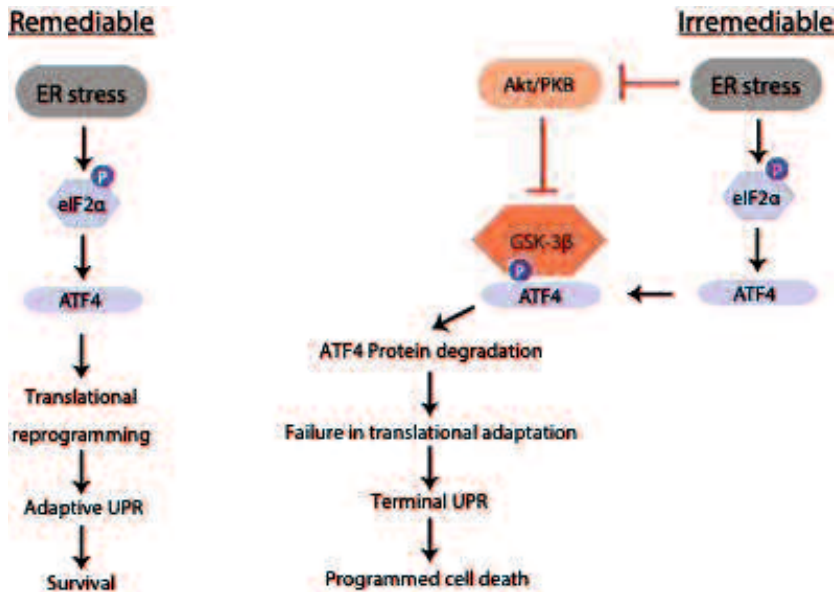


図 10 小胞体ストレス下における eIF2 α -ATF4 経路における Gsk-3 役割
 β 細胞が小胞体ストレスに直面すると eIF2 α のリン酸化により全般的な翻訳が抑制され逆的に ATF4 の翻訳が促進される。ATF4 は 4E-BP1 を誘導することによって、eIF2 α による翻訳抑制をより適応的な状態に切り替えている可能性がある。このような背景から、Akt-Gsk-3 経路の減衰は ATF4 蛋白質の分解を促進し、小胞体ストレスは修復不可能 (Terminal UPR) となりアポトーシスに至る。

7. 考察

2 型糖尿病における β 細胞機能不全を促進するメカニズムはまだ十分に解明されていないが、小胞体ストレスはこのプロセスにおける重要なメディエーターであると考えられている (参考文献 8, 9, 37)。Gsk-3、特に Gsk-3 β による β 細胞アポトーシス誘導が想定されている (参考文献 22, 24, 25)。Gsk-3 の生物学的基質はいくつか報告されているが、 β 細胞生物学における Gsk-3 の役割は十分に理解されていない。本研究は小胞体ストレス応答調節とアポトーシス誘導における Gsk-3 の役割を検討し、以下の新しい知見を得た。(1)ATF4 が Gsk-3 の新規基質であること、(2)Gsk-3 による ATF4-S214 のリン酸化は β TrCP と degron の結合を促進すること、(3)Gsk-3-ATF4 経路は小胞体ストレス下でアポトーシスを促進する。研究結果はインスリン/IGF1 をはじめとする成長因子シグナルと ISR の新しいクロストークを明らかにし、膵 β 細胞障害の分子機構の一層の理解に貢献する。

ATF4 において S214 と S218 が Gsk-3 のコンセンサス配列を構成する。一方、S218 は degron 配列とオーバーラップしており、カゼインキナーゼによる S218 のリン酸化が SCF- β TrCP を介する ATF4 のプロテアソーム分解に必須である (参考文献 35, 36)。さらに、S218 が “priming phosphate” を提供し S214 が Gsk-3 のリン酸化標的となる。ATF4 と β TrCP の結合には S218 のリン酸化とそれに続く S214 のリン酸化が必要であり、Gsk-3 活性が ATF4 のプロテアソーム分解の決定因子となる。種々

の分子において Gsk-3 を介するプロテアソーム蛋白分解が報告されており(参考文献 38)、生理的および病態生理学的な条件下で Gsk-3/ β TrCP axis によるさまざまな細胞機能制御が推察される。

Gsk-3 活性は PI3K/Akt 経路によって抑制的に調節され、この経路が小胞体ストレスによって減弱する可能性がある。Irs2 欠損マウスでは、 β 細胞における Akt-Gsk-3 β 経路減弱が、アポトーシス増加、増殖能低下およびインスリン産生低下の原因となる(参考文献 22)。この結果から、Gsk-3 β は Gsk-3 α より β 細胞死や機能障害に関与している可能性が高いと考えられる。しかし、膵 β 細胞における Gsk-3 各アイソフォームの組織特異的な役割はまだ解明されておらず、さらなる研究が必要である。Gsk-3 β は主に細胞質に局在するが、核-細胞質間を移行している(参考文献 20)。重要なことに、PI3K/Akt 経路は Gsk-3 β の核外輸送を促進し、そのため Akt 活性が低下すると Gsk-3 β はその触媒活性とは無関係に核内に蓄積する(参考文献 20, 39)。小胞体ストレス下では、核内 Gsk-3 β による核内蛋白のリン酸化亢進が予想される。

Gsk-3 は eIF2 α -ATF4 を介した統合的ストレス応答を調節する。Gsk-3 抑制による GADD34 と 4E-BP1 の発現が増加し、eIF2 α の脱リン酸化が亢進した。ストレス応答初期段階での PERK 活性化と eIF2 α リン酸化による全般的翻訳抑制は β 細胞の恒常性維持に重要であるが、翻訳抑制が長期化すれば様々な細胞活動が停止し、結果的に細胞死を引き起こす。一方、4E-BP1 による翻訳抑制は eIF2 α と異なる制御モードと考えられ、より適応的で小胞体ストレス下の β 細胞の恒常性維持に寄与する(参考文献 17)。eIF2 α による全般的翻訳抑制は ATF4 を介したフィードバックにより終息し(参考文献 40)、小胞体ストレス応答の後期段階では 4E-BP1 による翻訳抑制に移行する。Gsk-3 はこの過程を阻害し、小胞体ストレスが修復不能となり、 β 細胞死誘導に寄与すると考えられる。

小胞体ストレス下での Gsk-3 の役割について、Gsk-3 によって制御される他の潜在的な経路を考慮する必要がある。Gsk-3 による eIF2B ϵ のリン酸化は、eIF2 α のリン酸化と共に eIF2 阻害に寄与する(参考文献 41, 42)。この eIF2 の二重の負の制御は、過剰な翻訳抑制と翻訳回復の遅延を引き起こす可能性がある。実際、Gsk-3 抑制は、eIF2 α のリン酸化を減少させるが、全般的翻訳抑制を早期に回復させた。一方、Gsk-3 β は成長因子欠乏及び小胞体ストレス条件下でのオートファジーの制御に関与していることが報告されている(参考文献 43, 44, 45)。Gsk-3 β は HIV Tat-interactive protein, 60kDa(TIP60)をリン酸化し、TIP60 を介した Unc-51-like キナーゼ 1(ULK1)のアセチル化とオートファジーの活性化を引き起こす。興味深いことに、Gsk-3 β -TIP60-ULK1 経路の減弱により、HeLa 細胞では小胞体ストレスに対する感受性が高まり、毒性が増大する(参考文献 45)。このような Gsk-3 β の適応的な細胞保護作用は、 β 細胞における作用と相反する。したがって、小胞体ストレス下での Gsk-3 β の役割は細胞の種類によって異なる可能性がある。 β 細胞における Gsk-3

を介したオートファジーの役割について、さらなる研究が必要である。

本研究では切断型カスパーゼ 3 と DNA 断片の解析を行なったが、個々の死細胞やアポトーシス細胞の検出と定量化は行っていない。このことは、 β 細胞死やアポトーシスの評価に関する本研究の限界である。さらに、本研究で得られた知見は、生体内での関連性は不明のままである。小胞体ストレス下での Gsk-3 活性の生体内での役割を解明するにはさらなる研究が必要であり、このことも本研究の限界である。

8. 結論

本研究により、PI3K-Akt 経路により抑制される Gsk-3 活性が、ATF4 のプロテアソーム分解を促進し膵 β 細胞における小胞体ストレス関連細胞死を増強する。この発見は、膵 β 細胞不全の分子病態への理解を深めるとともに Gsk-3 を標的とする新規糖尿病治療法開発への根拠を提供する。

9. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました田部勝也講師および谷澤幸生前教授(現 山口大学 学長)に深く感謝いたします。実験への協力と助言をいただいた分子代謝制御学講座 椎木幾久子先生、江本政広先生(現 江本内科 院長)および病態制御内科学講座(第三内科)の先生方に厚く御礼申し上げます。

10. 参考文献

本論文は、著者執筆の関連論文

「Gsk-3 Mediated Proteasomal Degradation of ATF4 Is a Proapoptotic Mechanism in Mouse Pancreatic β -cells」

著者 : Yuko Nagao, Kikuko Amo-Shiinoki, Hiroko Nakabayashi, Masayuki Hatanaka, Manabu Kondo, Kimie Matsunaga, Masahiro Emoto, Shigeru Okuya, Yukio Tanizawa and Katsuya Tanabe

International Journal of Molecular Sciences 23(21), 13586, Nov 2022

に公表したデータをもとに執筆したものである

1. Weir, GC. ;Bonner-Weir, S. Islet cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci.* 2013, 1281, 92-105.
2. Nolan, CJ. ;Damm, P. ;Prentki, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 2011, 378, 169-181.
3. Butler, AE. ;Jansen, J. ;Bonner-Weir, S. ;Ritzel, R. ;Rizza RA. ;Butler, PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with

- type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003, 52(1), 102–110.
4. Poitout, V. ;Robertson, RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008, 29(3), 351–366.
 5. Prentki, M. ;Nolan, CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006, 116(7), 1802–1812.
 6. Schröder, M. ;Kaufman, RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005, 6;569(1–2), 29–63.
 7. Eizirik, DL. ;Cardozo, AK. ;Cnop, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008, 29(1), 42–61.
 8. Laybutt, DR. ;Preston, AM. ;Akerfeldt, MC. ;Kench, JG. ;Busch, AK. ;Biankin, AV. ; Biden, TJ. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007, 50(4), 752–763.
 9. Mizukami, H. ;Takahashi, K. ;Inaba, W. ;Tsuboi, K. ;Osonoi, S. ;Yoshida, T. ;Yagihashi, S. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of β -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2014, 37(7), 1966–1974.
 10. Hetz, C. ;Zhang, K. ;Kaufman, RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020, 21(8), 421–438.
 11. Costa-Mattioli, M. ;Walter, P. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science*. 2020, 24, 368(6489):eaat5314.
 12. Harding, HP. ;Novoa, I. ;Zhang, Y. ;Zeng, H. ;Wek, R. ;Schapira, M. ;Ron, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000, 6(5), 1099–108.
 13. Vattem, KM. ;Wek, RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 3;101(31), 11269–74.
 14. Harding, HP. ;Zhang, Y. ;Zeng, H. ;Novoa, I. ;Lu, PD. ;Calfon, M. ;Sadri, N. ;Yun, C. ;Popko, B. ;Paules, R, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003, 11(3), 619–33.
 15. Wek, RC. ;Cavener, DR. Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal*. 2007, 9(12), 2357–71.
 16. Zadorozhnii, PV. ;Pokotylo, IO. ;Kiselev, VV. ;Okhtina, OV. ;Kharchenko, AV. Molecular docking studies of salubrinal and its analogs as inhibitors

- of the GADD34:PP1 enzyme. *ADMET DMPK*. 2019, 5;7(2), 140–150.
17. Yamaguchi, S. ;Ishihara, H. ;Yamada, T. ;Tamura, A. ;Usui, M. ;Tominaga, R. ;Munakata, Y. ;Satake, C. ;Katagiri, H. ;Tashiro, F. ;et al. ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*. 2008, 7(3), 269–76.
 18. Kitakaze, K. ;Oyadomari, M. ;Zhang, J. ;Hamada, Y. ;Takenouchi, Y. ;Tsuboi, K. ;Inagaki, M. ;Tachikawa, M. ;Fujitani, Y. ;Okamoto, Y. ;et al. ATF4-mediated transcriptional regulation protects against β -cell loss during endoplasmic reticulum stress in a mouse model. *Mol Metab*. 2021, 54, 101338.
 19. Hurel, S.J. ;Rochford, J.J. ;Borthwick, A.C. ;Wells, A.M. ;Vandenheede, J.R. ;Turnbull, D.M. ;Yeaman, S.J. Insulin action in cultured human myoblasts: contribution of different signalling pathways to regulation of glycogen synthesis. *Biochem J*. 1996, 15;320(Pt3) (Pt3), 871–7.
 20. Beurel, E. ;Grieco, S.F. ;Jope, R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015, 148, 114–31.
 21. Meares, G.P. ;Jope, R.S. Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2007, 282, 6989–17001.
 22. Tanabe, K. ;Liu, Z. ;Patel, S. ;Doble, B.W. ;Li, L. ;Cras-Méneur, C. ;Martinez, S.C. ;Welling, C.M. ;White, M.F. ;Bernal-Mizrachi, E. ; et al. Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3 β corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biol*. 2008, 6(2), e37.
 23. Liu, Y. ;Tanabe, K. ;Baronnier, D. ;Patel, S. ;Woodgett, J. ;Cras-Méneur, C. ; Permutt, M.A. Conditional ablation of Gsk-3 β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. *Diabetologia*. 2010, 53(12), 2600–10.
 24. Srinivasan, S. ;Ohsugi, M. ;Liu, Z. ;Fatrai, S. ;Bernal-Mizrachi, E. ;Permutt, M.A. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signalling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3 β in mouse insulinoma cells. *Diabetes*. 2005, 54(4), 968–75.
 25. Tanabe, K. ;Liu, Y. ;Hasan, S.D. ;Martinez, S.C. ;Cras-Méneur, C. ; Welling, C.M. ; Bernal-Mizrachi, E. ;Tanizawa, Y. ;Rhodes, C.J. ;Zmuda, E. ;et al. Glucose and fatty acids synergize to promote B-cell apoptosis through activation of glycogen synthase kinase 3 β independent of JNK activation. *PLoS*

- One.* 2011, 26;6(4), e18146.
26. Miyazaki, J. ;Araki, K. ;Yamato, E. ;Ikegami, H. ;Asano, T. ;Shibasaki, Y. ;Oka, Y. ;Yamamura, K. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: Special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 1990, 127, 126-132.
 27. Nozaki, J. ;Kubota, H. ;Yoshida, H. ;Naitoh, M. ;Goji, J. ;Yoshinaga, T. ;Mori, K. ;Koizumi, A. ;Nagata, K. The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells* 2004, 9, 261-270.
 28. Ueda, K. ;Kawano, J. ;Takeda, K. ;Yujiri, T. ;Tanabe, K. ;Anno, T. ;Akiyama, M. ;Nozaki, J. ;Yoshinaga, T. ;Koizumi A. ; et al. Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *Eur. J. Endocrinol.* 2005, 153, 167-176.
 29. Hatanaka, M. ;Tanabe, K. ;Yanai, A. ;Ohta, Y. ;Kondo, M. ;Akiyama, M. ;Shinoda, K. ;Oka, Y. ;Tanizawa, Y. Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells. *Hum. Mol. Genet.* 2011, 20, 1274-1284
 30. Kim, H. S. ;Skurk, C. ;Thomas, S. R. ;Bialik, A. ;Suhara, T. ;Kureishi, Y. ;Birnbaum, M. ;Keaney, J. F., Jr. ;Walsh, K. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 41888-41896
 31. He, C. H. ;Gong, P. ;Hu, B. ;Stewart, D. ;Choi, M. E. ;Choi, A. M. ;Alam, J. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 20858-20865
 32. Girish, V. ;Vijayalakshmi, A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J. Cancer* 2004, 41, 47.
 33. Kinoshita, E. ;Kinoshita-Kikuta, E. ;Takiyama, K. ; Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteom.* 2006, 5, 749-757
 34. Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010, 140, 900-917.
 35. Feng, L. ;Li, M. ;Hu, X. ;Li, Y. ;Zhu, L. ;Chen, M. ;Wei, Q. ;Xu, W. ;Zhou, Q. ;Wang, W. ; et al. CK1 stimulates ubiquitination-dependent proteasomal degradation of ATF4 to promote chemoresistance in gastric Cancer. *Clin. Transl. Med.* 2021, 11, e587.

36. Lassot, I. ;Ségéral, E. ;Berlitz-Torrent, C. ;Durand, H. ;Groussin, L. ;Hai, T. ; Benarous, R. ;Margottin-Goguet, F. ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF (betaTrCP) ubiquitin ligase. *Mol. Cell Biol.* 2001, 21, 2192-2202.
37. Fonseca, S. G. ;Lipson, K. L. ;Urano, F. Endoplasmic reticulum stress signalling in pancreatic beta-cells. *Antioxid. Redox. Signal.* 2007, 9, 2335-2344.
38. Robertson, H. ;Hayes, J. D. ;Sutherland, C. A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. *Biochem. Pharmacol.* 2018, 47, 77-92.
39. Bechard, M. ;Trost, R. ;Singh, A. M. ;Dalton, S. Frat is a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-regulated determinant of glycogen synthase kinase 3 subcellular localization in pluripotent cells. *Mol. Cell Biol.* 2012, 32, 288-296.
40. Novoa, I. ;Zeng, H. ;Harding, H. P. ;Ron, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* 2001, 7, 1153-1163.
41. Welsh, G. I. ;Stokes, C. M. ;Wang, X. ;Sakaue, H. ;Ogawa, W. ;Kasuga, M. ; Proud, C. G. Activation of translation initiation factor eIF2B by insulin requires phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett.* 1997, 410, 418-422.
42. Kashiwagi, K. ;Takahashi, M. ;Nishimoto, M. ;Hiyama, T. B. ;Higo, T. ;Umehara, T. ; Sakamoto, K. ;Ito, T. ;Yokoyama, S. Crystal structure of eukaryotic translation initiation factor 2B. *Nature* 2016, 531, 122-125
43. Lin, S. Y. ;Li, T. Y. ;Liu, Q. ;Zhang, C. ;Li, X. ;Chen, Y. ;Zhang, S. M. ;Lian, G. ;Liu, Q. ;Ruan, K. ;et al. GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science* 2012, 336, 477-481.
44. Lin, S. Y. ;Li, T. Y. ;Liu, Q. ;Zhang, C. ;Li, X. ;Chen, Y. ;Zhang, S. M. ;Lian, G. ;Liu, Q. ;Ruan, K. ;et al. Protein phosphorylation acetylation cascade connects growth factor deprivation to autophagy. *Autophagy* 2012, 8, 1385-1386.
45. Nie, T. ;Yang, S. ;Ma, H. ;Zhang, L. ;Lu, F. ;Tao, K. ;Wang, R. ;Yang, R. ;Huang, L. ;Ma o, Z. ;et al. Regulation of ER stress-induced autophagy by GSK3 -TIP60-ULK1 pathway. *Cell Death Dis.* 2016, 7, e2563.