

小胞体ストレスとメタロチオネイン

佐藤 政男,* 鈴木 真也

Endoplasmic Reticulum Stress and Metallothionein

Masao SATO* and Shinya SUZUKI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Yamashiro-cho,
Tokushima City 770-8514, Japan*

(Received January 15, 2007)

Much attention has been paid to lifestyle-related diseases including type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, hypertension, and hyperlipidemia because the incidence rates of these diseases are increasing in developed countries. Elucidation of factors contributing to the development of obesity and insulin resistance is needed. Metallothionein (MT), a ubiquitous metal-binding protein, is induced not only by heavy metals but also by various kinds of stresses. Endoplasmic reticulum (ER) stress is caused by accumulation of misfolded proteins in ER. Recently, increased ER stress by obesity and impairment of insulin action by ER stress have been reported. Exposure to ER stress increased induction of MT synthesis, and an enhanced response to ER stress evaluated as expression of Bip/GRP78mRNA was observed in the liver of MT-null mice, suggesting that MT attenuates expression of ER stress. MT may prevent ER stress and thereby modulate the development of obesity and insulin resistance. A possible role of metallothionein in response reaction for ER stress is discussed.

Key words—metalothionein; endoplasmic reticulum stress; diabetes; obesity

1. はじめに

高齢化社会の進展は、加齢を遺伝的背景とした肥満、糖尿病などの疾病が増加しその発症や進展の段階でストレス関与が指摘されている。一般的にストレスは精神的ストレスを指すが、近年、個体へのストレスは組織、細胞、さらに細胞内小器官へのストレス負荷となり、その影響の解析がなされている。本稿では、細胞内小器官である小胞体におけるストレス負荷への生体応答及びその反応におけるメタロチオネイン (MT) 関与の可能性と役割を考察する。小胞体ストレスとメタロチオネインに関しては、研究は開始されたばかりである。そこで本稿では MT が小胞体ストレスになんらかの関係があり、その重要性を示唆する点について述べる。

2. 全身、細胞及び細胞下画分におけるストレス
ストレスは Selye の定義と解釈によれば生体への

侵襲に対する生体に生じる非特異的の反応であり、ストレスを付与するものをストレスと呼んだ。その特徴として、1) 個々の侵襲に対する特異的な反応に加えて、侵襲の種類によらない非特異的の反応の総体、2) 反応パターンは種をこえて保存され、3) 一定範囲で侵襲の強さに比例した反応、4) 繰り返し侵襲に対する抵抗性が生じる、5) 異なるストレスに対して抵抗性が生じることなどが挙げられている。¹⁾ ストレス度の大きな生活上のできごととして配偶者の死が挙げられる。さらに離婚、親族の死などが強いストレスとなる。従来、ストレスは精神的なもの、個体レベルのものとされ、異常温度、手術、外傷、身体拘束、循環不全などが全身的なストレスとして挙げられている。

しかし、全身へのストレス負荷、例えば身体拘束は直接接していない肝臓における細胞で種々のストレスたんぱく質誘導などの反応を引き起こすことから、細胞へのストレスという概念が生じてきた。

細胞に与えるストレスとその応答についての研究の中で用いられるストレスとされるものとして高温、低温、紫外線などの物理的ストレス、活性酸

徳島文理大学薬学部公衆衛生学講座 (〒770-8514 徳島市山城町西浜 180)

*e-mail: msato@ph.bunri-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

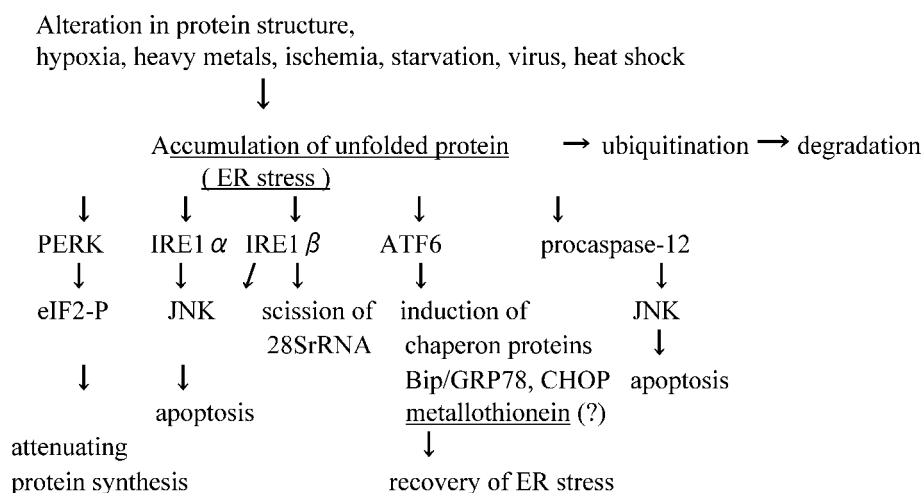


Fig. 1. Endoplasmic Reticulum Stress and Its Sensors

素、低酸素、重金属イオンや様々な細胞毒など化学的ストレスがある。細胞から分泌されるサイトカインによる細胞への作用が検討されている。さらに細胞下画分におけるストレスとその応答反応も研究されるようになり、ブドウ糖の飢餓は後述する小胞体ストレスとなり、エネルギー産生に係わるミトコンドリアにおいては呼吸系反応の不完全さから生じる活性酸素²⁾によるミトコンドリアストレスの検討がそれぞれの画分の機能解析として行われている。

3. 小胞体の機能及び小胞体ストレス

新規に合成されたたんぱく質は小胞体膜を通過し小胞体に取り込まれ、S-S架橋形成や糖鎖修飾などにより高次構造を形成するなどの修飾を受け、ゴルジ体へと運搬される。

さて、内的な反応過程で、あるいは外因性の高温、飢餓、虚血などが負荷され、結果として高次構造異常のたんぱく質が小胞体に蓄積されると小胞体ストレス負荷状態となる (Fig. 1)。このとき、センサーたんぱく質が働いて、翻訳を停止して小胞体への負担を軽くし、高次構造異常たんぱく質をユビキチン化し分解する反応などが起こる。また、シャペロンたんぱく質を誘導して異常高次構造を修飾して正常化するが、このようなストレスに応答して生成する一群のたんぱく質をストレスたんぱくという。

Metallothionein (MT) は重金属のカドミウム、水銀や亜鉛、銅により誘導されるが、絶食ストレス、拘束ストレスなどの様々なストレスによっても誘導・生合成される。³⁾ このようなことから小胞体ストレスに応答して MT が誘導される可能性があ

り、応答反応過程の中で MT が果たす役割の検討が課題となる。小胞体ストレス負荷度が高いとアポトーシスが起これ細胞を死に至らしめる。

疾患との関係としては、アルツハイマー病がよく知られている。アルツハイマー病は β -アミロイドたんぱくが凝集して老人斑を形成する小胞体ストレス負荷状態となる。そこからさらに神経原繊維形成し細胞死が起こる。最近になり、小胞体ストレスが1型糖尿病、肥満、2型糖尿病などの生活習慣病の要因としての可能性が明らかになってきた。肥満マウスでは小胞体ストレスが発現し、インスリン受容体シグナル伝達が抑制されインスリン耐性、糖尿病へと進展させる因子であると報告され、⁴⁾ 肥満・糖尿病研究は新展開を迎えている。

4. 小胞体ストレスと肥満・糖尿病

小胞体ストレスが1型糖尿病を発症させる事が Akita マウスで示された。⁵⁾ インスリンの A 鎖遺伝子が一部変異してシステインの置換が起こり架橋構造形成ができず、異常インスリンが蓄積して小胞体ストレス負荷状態となりインスリン不足状態となる。アポトーシスを起こす転写因子 C. EBP homo-



佐藤政男

徳島文理大学薬学部教授 (公衆衛生学講座)。1944年福島県生まれ。1967年東北大学薬学部卒業。1972年東北大学薬学研究科修士・博士課程終了。1972年薬学博士。1972年福島県立医科大学講師 (公害医学研究室)、1981年福島県立医科大学助教授、1983年英国ロウエット研究所研究員、1998年より現職。カドミウムの障害発現機序解明からメタボリックシンドロームへの影響解析へ。

logues protein (CHOP/GADDA153) mRNA を誘導し膵 β 細胞のアポトーシスを起こすこととなり、1型糖尿病を発症する。CHOP/GADDA153 の欠損は糖尿病を遅延させ、インスリン分泌能が維持される。

2004年 Science 誌に掲載された Ozcan らの論文は、肥満やインスリン耐性に関する従来の概念を越えるもので、高脂肪食による、あるいは食欲抑制ホルモンレプチンが変異したマウスの遺伝的肥満状態では、小胞体ストレス状態を表すに必要な eukaryotic initiation factor 2 (eIF2), PERK や c-jun のリン酸化体及びシャペロンたんぱく質 Bip/GRP78 の発現がみられた (Fig. 2).⁴⁾ すなわち、肥満は小胞体ストレス負荷状態を意味している。さらに、正常代謝ではインスリンはインスリン受容体と結合し、さらにインスリン受容体基質のチロシンをリン酸化し akt を活性化し Glut 4 を膜へ移動させグルコースの細胞への取り込みを起こす (Fig. 3)。しかし、小胞体ストレス負荷状態ではインスリン受容

体基質のセリンをリン酸化し、そのため、インスリン作用はそのシグナル伝達が抑えられること、すなわち、インスリン耐性をもたらす。実際、高脂肪食摂取による、あるいはレプチン遺伝子変異マウスの肥満状態では、Bip/GRP78 の発現がみられ、また、インスリンを添加するとチロシンリン酸化が起こり、ツニカマイシンで抑制される。反対にツニカマイシン処理ではインスリン受容体基質のセリンのリン酸化が進み、インスリンで抑制される。メタボリックシンドロームの基本病態である肥満がインスリン耐性、2型糖尿病進行へ導くことが示された。

2型糖尿病に関して、小胞体ストレスと糖尿病発症に関して次の報告がなされた。(1) 高脂肪食に見合うインスリン産生ができないと糖尿病を発症するが、(2) 膵 β 細胞 ER 内に折り畳まれないたんぱく蓄積は eIF2 のリン酸化が促進され、mRNA 翻訳が阻害される。小胞体ストレス状態になると PERK のリン酸化が起こり、eIF2 のリン酸化が促進され、mRNA 翻訳が阻害され、小胞体への負荷が軽くなり回復をめざすことになる。⁶⁾ しかし、(3) eIF2 遺伝子変異マウス (ヘテロ) は、小胞体スト

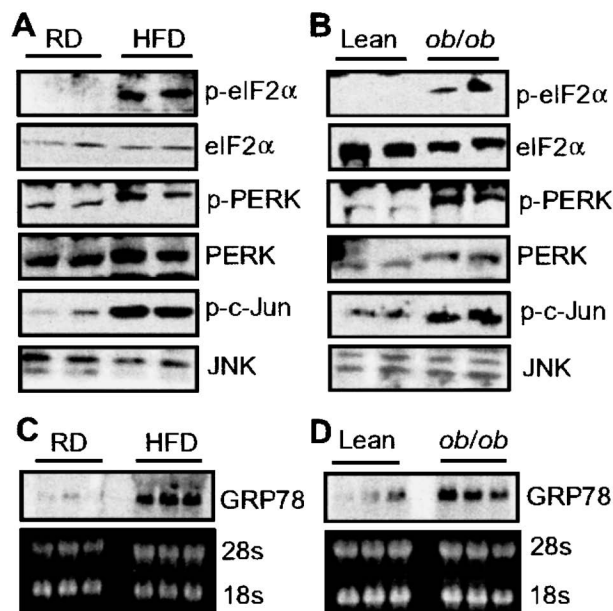


Fig. 2. Increased ER Stress by Obesity⁴⁾

Dietary (HFD-induced) and genetic (ob/ob) models of mouse obesity were used to examine markers of ER stress in liver tissue compared with lean controls. A: ER stress markers including eIF2 α phosphorylation (p-eIF2 α), PERK phosphorylation (p-PERK), and JNK activity (p-c-jun) were examined in the liver samples of the male mice that were kept either on regular diet (RD) or high fat diet (HFD) for 16 weeks. B: Examination of the same ER stress markers in the livers of male ob/ob and wild type (WT) lean mice at the age of 12 to 14 weeks. C: Northern blot analysis of GRP78 mRNA in the liver of mice with dietary-induced obesity and lean controls. D: Northern blot analysis of GRP78 mRNA in the liver of ob/ob and WT. Ethidium bromide staining is shown as a control for loading and integrity of RNA.

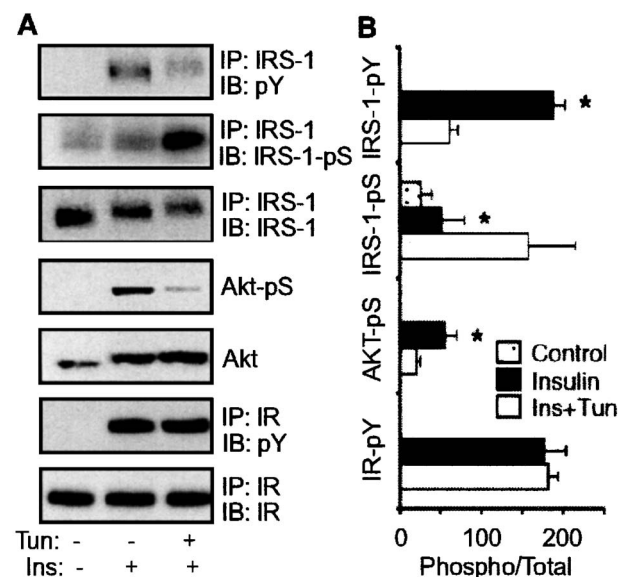


Fig. 3. Induction of ER Stress Impairs Insulin Action through JNK-mediated Phosphorylation of IRS-1⁴⁾

A: ER stress was induced in Fao liver cells by a 3-hour treatment with 5 μ g/ml tunicamycin (Tun). Cells were subsequently stimulated with insulin (Ins), IRS-1 tyrosine (pY) and serine (pS) phosphorylation, Akt-Ser173 (Akt-pS) phosphorylation, insulin receptor (IR) tyrosine phosphorylation, and their total protein levels were examined either with immunoprecipitation (IP) followed by immunoblotting (IB) or by direct immunoblotting. B: Quantification of IRS-1 (tyrosine and Ser307), Akt (Ser473), and IR (tyrosine) phosphorylation (tyrosine) phosphorylation in (A) with normalization to protein levels for each molecule.

レスへの対応ができず脂肪食摂取で肥満、インスリン分泌能低下が起こる。

5. MTと小胞体ストレスが関係する可能性を予知させる報告

5-1. 亜鉛投与による糖尿病抑制 膵臓は小胞体ストレスに脆弱であるとされるが、高濃度に含まれるMTはなんらかの役割を果たしていると考えられる。小胞体ストレスを負荷するとされるストレプトゾトシンを野生型、MT欠損マウスに投与すると糖尿病が発症する。この時少量の亜鉛を前投与しておく、野生型マウスで糖尿病発症抑制効果はみられないがMT欠損マウスで発症は抑制され、亜鉛がMTから遊離したとき抑制作用を示す可能性を示した。さらに亜鉛投与量を増大させるとMT誘導能を有する野生型マウスで完全に抑制した。⁷⁾ 亜鉛とMTがストレプトゾトシン誘導糖尿病発症に対する抑制作用を有する可能性を示唆している。

5-2. MTによる肥満抑制作用 Beattieらは野生型に観察されないが、MT欠損マウスの一部が肥満及び高レプチン血症を示し、MTは肥満に関与して調節作用を有することを報告した。⁸⁾ しかし、対照群が適当でないためにみられた結果ではないかとの批判もあった。⁹⁾ そこで、筆者らはマウスに高脂肪食を連続して摂取させると野生型は成長に連れ体重は増加するが正常食摂取群と同程度であるのに対し、MT欠損マウスでは約10週間頃から正常食摂取群に比べ高脂肪食摂取群は体重増加が大きくなり、肥満となった。また、高脂肪食摂取群は脂肪組織も顕著に大きくなった(未発表)。これはMTが肥満を抑制する作用を有することを示唆し、肥満は小胞体ストレス負荷状態であることを考慮するとMTが小胞体ストレスを抑制する可能性を示唆している。

5-3. 亜鉛欠乏症による小胞体ストレス発現

小胞体内の異常たんぱく質を感知して応答するレポータージーンを指標にしてみると、(1)野生型酵母では、活性は添加亜鉛では高く高濃度亜鉛では低下した。(2)亜鉛トランスポーターが異常なzrt1酵母では高活性を示した。これは亜鉛が細胞内へ取り込まれないため亜鉛欠乏では小胞体ストレスになることを示している。¹⁰⁾ この論文ではメタロチオネンには直接触れていないが、MTが亜鉛を保持する機能を有する性質を考慮すれば、亜鉛供給が不足し

た結果として起こるMT不足状態では小胞体ストレスが発現することも考えられる。ラットでは亜鉛欠乏では肝臓中の亜鉛及びMT濃度は減少し、それを反映して血漿MTも減少することはよく知られている。¹¹⁾

6. 小胞体ストレスとMTのより直接的な関係

ところで実験的に、あるいは生理的状态で小胞体ストレスを起こす条件は、¹²⁾

(1) 小胞体内カルシウムの恒常性を乱すもの；タプシガルギン、高濃度A23187

(2) たんぱく質への糖鎖付加の過程を阻害するもの；ツニカマイシン、グルコース飢餓

(3) ジスルフィド結合の形成を阻害するもの、

(4) 小胞体からゴルジ体への輸送阻害するもの；ブルフェルジンAなど、

(5) 異常な高次構造の変異たんぱく質の発現

そのうちツニカマイシンを用いた実験でMTと小胞体ストレスの直接的な関係を示す第一番目の事実観察は、MT欠損細胞は小胞体ストレスが負荷されると野生型細胞に比較して細胞生存率が低いことが挙げられる。すなわち、小胞体ストレスを誘導するツニカマイシンを培地に添加すると、野生型繊維芽細胞に比べてMT欠損繊維芽細胞で細胞死はより進行する(未発表)。

MTと小胞体ストレスとの関係を示す第二番目の直接的な事実として、小胞体ストレス負荷がMTを誘導することをわれわれは見出している。¹³⁾ 上記に述べたような小胞体ストレスを誘導するツニカマイシンをマウスに投与すると、肝臓でMTたんぱく濃度が経時的に増大した(Fig. 4)。この増加は通常観察される時間に比べ遅延しており、MT濃度の増大のピークは48時間と極めて遅く、72時間でも高濃度を維持した。MTは急性期たんぱくと呼ぶべきたんぱく質で、¹⁴⁾ 一般に誘導時間は早いのが特徴で、亜鉛やカドミウムなどの皮下への重金属及びアンチマイシン投与によるミトコンドリアストレス負荷¹⁵⁾における肝臓でのMTたんぱく濃度は8—12時間に最大濃度を示すのが通例である。ツニカマイシンが投与され高次構造異常なたんぱくの蓄積が一定の時間後に起こり、さらにその小胞体ストレス負荷状態に応答してMTのmRNA発現が誘導されると考えられる。実際、ツニカマイシン投与はMT-1及びMT-2 mRNAの発現増大がみられ(Fig. 5)、

翻訳され MT たんぱく質が合成されることとなる (Fig. 4). これは小胞体ストレスが MT を誘導することを示していると同時に、このような時間経過から MT 最大濃度到達時間の遅延が起こっているのかもしれない。

肝臓中 MT の濃度増大がツニカマイシンによる直接的な誘導による可能性について検討した。それはツニカマイシン投与が局所的な炎症を惹起させ、免疫細胞から腫瘍壊死因子 TNF- α やインターロイキン-6 などのサイトカインを分泌することが考えられる。これらのサイトカインは MT を誘導するので、¹⁶⁾ そのため MT が誘導された可能性がある。一方、組織に取り込まれたツニカマイシンが小胞体ストレスを惹起し MT を誘導生合成する可能性があ

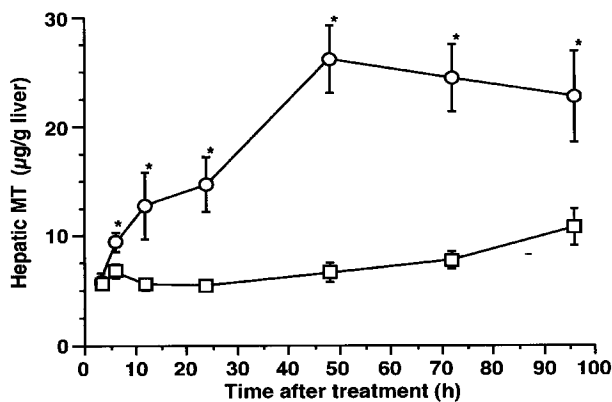


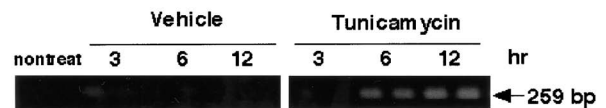
Fig. 4. Increases in Hepatic MT Levels Induced by Tunicamycin Administration¹³⁾

Hepatic HT levels were evaluated at the indicated times after administration of tunicamycin (1.0 mg/kg, s.c.). Values are means \pm S.E. ($n=4-6$). Significantly different from the vehicle-treated group ($p<0.05$).

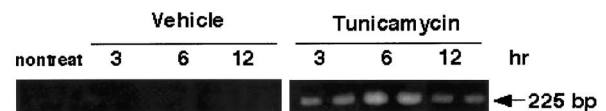
る。そこで、ツニカマイシンを培地に添加した繊維芽細胞中の MTmRNA 発現を検討すると経時的に顕著な増大がみられた (未発表)。このように小胞体ストレスに応答して MT 誘導発現が明らかになった。

さらに、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを野性型と MT 欠損型マウスに投与すると、野性型マウスでは 3 時間から 6 時間にかけて Bip/GRP78, glucose-regulated protein 78 mRNA の発現が誘導さ

A. MT-I



B. MT-II



C. GAP

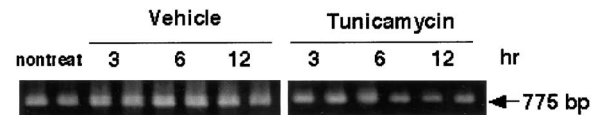
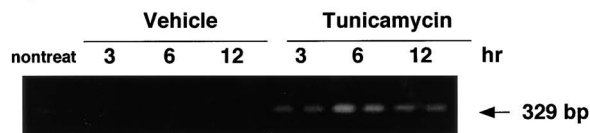


Fig. 5. RT-PCR Analysis of Hepatic MT-I and MT-II mRNA Levels of Tun-injected Mice¹³⁾

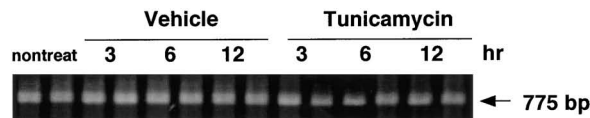
Total RNAs were extracted from livers with a vehicle or tunicamycin (1.0 mg/kg, s.c.).

A. Normal

Bip/GRP78

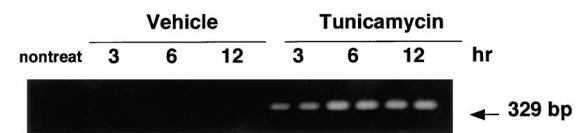


GAPDH



B. MT-KO

Bip/GRP78



GAPDH



Fig. 6. MT Attenuates the Expression of Bip/GRP78 mRNA by Tunicamycin¹³⁾

Wild-type (Normal) and MT-null mice (MT-KO) were injected s.c. with Tun (1.0 mg/kg, s.c.). Data are representative of three independent experiments ($n=2$).

れた。一方、MT欠損型マウス肝臓では野性型マウスに比べてBip/GRP78のmRNA発現がより顕著に観察された (Fig. 6)。すなわち、MTが小胞体ストレス発現を抑制していることを示している。

7. 今後の課題

これらは肝臓で得られた結果であるが、肥満に関与する脂肪組織や筋肉等でどのような役割を果たしているかの解析が今後の課題である。過剰エネルギー摂取の肥満状態では小胞体ストレス状態となるがこの状態からインスリン耐性を経てII型糖尿病へ進展するが、MTが小胞体ストレスを脂肪細胞で制御可能であれば肥満抑制に係わる可能性がある。

本稿では取り上げなかったが、アルツハイマー病やパーキンソン病では小胞体ストレスとアポトーシスの関連性が明らかになりつつあり、その中で脳に存在するI, II, III型MTの関与する可能性を検討することが今後の課題となる。

REFERENCES

- 1) Fukada J., "Stress in the Body," 1-38, Gak-kaisyuppancenter, 2000.
- 2) Kenyon C., *Cell*, **120**(4), 449-460 (2005).
- 3) Sato M., Kondoh M., *Tohoku J. Exp. Med.*, **196**, 9-22 (2002).
- 4) Ozcan U., Cao Q., Yilmaz E., Lee A.-H., Iwakoshi N. N., Ozdelen E., Tuncma G., Gorgun C., Glimcher L. H., Hotamisligit G. S., *Science*, **306**, 457-461 (2004).
- 5) Oyadomari S., Koizumi A., *J. Clin. Invest.*, **109**(4), 525-532 (2002).
- 6) Sheuner D., Mierde D. V., Song B., Flamez D., Creemers J. W. M., Tsukamoto K., Ribick M., Schuit F. C., Kaufman R. J., *Nature Med.*, **11**, 757-764 (2005).
- 7) Apostolova M. D., Choo K. H., Michalaska A. E., Tohyama C., *J. Trace Elem. Med. Boil.*, **11**(1), 1-7 (1997).
- 8) Beattie J. H., Wood A. M., Newman A. M., Bremner I., Choo K. H., Michalska A. E., Duncan J. S., Trayhurn P., *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.*, **95**, 358-363 (1998).
- 9) Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8428-8430 (1998).
- 10) Ellis C. D., Wang F., MacDiamid C. W., Clark S., Lyons T., Eide D. J., *J. Cell Biol.*, **166**, 325-355 (2004).
- 11) Sato M., Mehra R. K., Bremner I., *J. Nutr.*, **114**, 1683-1689 (1984).
- 12) Araki E., Oyadomari S., Mori M., *Seikagaku*, **75**(10), 1324-1331 (2003).
- 13) Kondoh M., Tsukada M., Kuronaga M., Takiguchi M., Higashimoto M., Himeno S., Watanabe Y., Sato M., *Toxicol. Lett.*, **148**, 133-139 (2004).
- 14) Sato M., "in Metallothionein III," eds. by Suzuki K. T., Kimura M., Imura N., Birkhauser-Verlag, Switzerland, 1993, pp. 122-140.
- 15) Kondoh M., Inoue Y., Atagi S., Futakawa N., Higashimoto M., Sato M., *Life Sci.*, **69**, 2137-2146 (2001).
- 16) Sato M., Sasaki M., Hojo H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**, 738-744 (1995).