

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

PTEN's roles and effects for insulin signal transduction

(インスリンシグナル伝達に対する PTEN の役割と効果)

指導教官

木村 哲 教授

東京大学大学院 医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小野 啓

緒言

インスリンが肝、筋、脂肪などの標的細胞に作用すると、これらの細胞にブドウ糖を取り込ませるという効果をもたらす。この仕組みには、イノシトール環の3位がリン酸化されたイノシトールリン脂質(3-phosphoinositides; 以後 3-PIs と略す)が重要な役割を担っていることが知られている(3-PIs は、phosphoinositide 3-kinase (PI 3-キナーゼ)という酵素によって作られるが、この酵素を薬物あるいは変異体の過剰発現によって阻害すると、インスリンの標的細胞にブドウ糖を取り込ませる効果が顕著に抑制され、また逆に、PI 3-キナーゼを過剰発現させるとインスリン非存在下でも標的細胞へのブドウ糖の取り込みが見られることから、このことが示されている)。また、その下流には 3-PIs によって活性化される Akt という蛋白が存在し、糖取り込みの経路を担っている可能性が示唆されているが、未だ議論の余地が多い。

PTEN は最近発見された癌抑制蛋白で、3-PIs の3位の脱リン酸化 (PI 3-キナーゼの逆作用) を触媒することから注目を集めている。また PTEN に欠損をも

つ細胞で Akt のリン酸化と活性化が認められることから、PTEN が PI 3-キナーゼ/Akt 経路に拮抗する役割を持つことが示唆されている。3-PIs の合成酵素である PI 3-キナーゼの重要性については確立されているが、分解酵素である PTEN のインスリンシグナル伝達における役割はいまだ不明である。そこで本研究では、PTEN が細胞内の 3-PIs、および Akt のリン酸化と糖取り込みといったインスリンの作用に対してどのように影響するかを、Sf9 昆虫細胞、およびインスリン標的培養細胞である 3T3-L1 細胞に、PTEN およびその変異体をウイルスベクターを用いて過剰発現させる実験系を用いて検討した。

方法

野生型 PTEN(WT)、酵素非活性型 PTEN(CS)、およびこのそれぞれの N 末端に myristoylation signal を付加したもの(myr-WT, myr-CS)を強制発現するバキュロウイルスおよびアデノウイルスを作製した。バキュロウイルスを Sf-9 昆虫細胞に、アデノウイルスを 3T3-L1 脂肪細胞に感染させ、それぞれの蛋白を強制発現させた。3T3-L1 脂肪細胞において、インスリン刺激・非刺激時の細胞内の 3-PIs を、HPLC を用いて定量した。Sf-9 においては、インスリン刺激の代わりに、PI 3-キナーゼの p110 サブユニットを PTEN および変異体と共発現させることによってこれを模した。また、3T3-L1 脂肪細胞において、3-PIs の下流にあるとされる Akt のリン酸化、および糖取り込みの指標となる 2-deoxyglucose 取り込みに関し、上記の PTEN および変異体がどのように影響を及ぼすかを調べた。

結果

両細胞において、インスリン非刺激時あるいは p110 非存在下では、PTEN および変異体は細胞内 3-PIs に有意に影響しなかった。3T3-L1 脂肪細胞をインスリン刺激、あるいは Sf-9 に p110 を過剰発現させると、PI(3,4)P2 および PI(3,4,5)P3 の 2 種の 3-PIs は有意に両細胞内で増加する。ここに WT を過剰発現させると、内因性 PTEN の 50 倍以上の過剰発現にもかかわらず 3-PIs の量に対する影響は小さかった。一方、myristoylation signal の付加によって膜に移動させられる myr-WT を過剰発現させると、PI(3,4)P2、PI(3,4,5)P3 は共に著明な減少を見た。逆に、酵素非活性型である CS、myr-CS を強制発現させると、インスリン刺激時あるいは p110 存在下での 3-PIs は著明に増加した。

次に、3T3-L1 脂肪細胞において、Akt のリン酸化部位に対する特異抗体を用いて、Akt のリン酸化に対する PTEN および変異体の影響を調べた。Akt の 2

カ所のインスリン応答性リン酸化部位のうち、Thr308 のリン酸化は、PTEN およびその変異体の過剰発現によって、3-PIs とほぼ並行して影響を受けた（すなわち、myr-WT によってリン酸化が著明に抑制され、また CS、myr-CS によって著明にリン酸化の増加が認められた）。一方、Ser473 のリン酸化は、myr-WT の発現によって一部抑制を受けたものの、CS、myr-CS の強制発現によって有意な上昇が認められなかった。

3T3-L1 脂肪細胞において、2-deoxyglucose 取り込みに対する PTEN および変異体の影響を調べたところ、myr-WT の発現によってインスリン刺激時の 2-deoxyglucose 取り込みは 40%程度の抑制を受けたが、その他のアデノウイルスの発現では有意な影響は認められなかった。

考察

これまでに発表された文献では、PTEN の 3-PIs に対する脱リン酸化作用は、*in vitro* assay によって、あるいは PTEN 遺伝子に変異を持つ腫瘍細胞に PTEN を再導入してその細胞内の 3-PIs を測定することによって、示されてきた。多くの文献では、細胞内の 3-PIs の測定においては薄層クロマトグラフィーを用いて PI(3,4,5)P3 のみを測定した結果の報告にとどまっている。本研究では、Sf-9 および 3T3-L1 脂肪細胞の両種の細胞において、PTEN を過剰発現させると、インスリン刺激、あるいは p110 の発現によって増加せしめられた PI(3,4)P2 および PI(3,4,5)P3 の 2 種の 3-PIs が共に有意に減少することを示すことが出来た。また、CS、myr-CS の酵素非活性型 PTEN の過剰発現により、PI(3,4)P2 および PI(3,4,5)P3 が増加することは、これらの酵素非活性型 PTEN が内因性 PTEN に対し dominant negative 効果を発揮しているためと考えられ、このことは内因性の PTEN がインスリン刺激時に細胞内で増加した 2 種の 3-PIs を分解する作用を担っていることを示している。

当初の予想に反し、myristoylation 非付加の野生型 PTEN は、細胞内 3-PIs に大きい影響を及ぼさなかった。これまでに、PTEN を欠失した腫瘍細胞において、野生型 PTEN を再導入すると細胞内 3-PIs が抑制されるという報告が複数ある。この結果の乖離は、本研究で用いた両細胞に存在する内因性 PTEN が、インスリン刺激時に増加した 3-PIs を分解するに既に十分量であって、さらなる過剰発現は著明な付加的効果をもたらさないためではないかと考える。これに、myr-WT の過剰発現によってインスリン刺激時の 3-PIs の増加が著明に抑制されたことを考え併せると、PTEN が膜に移動して初めて有効に作用することが示唆される。実際、PTEN の C 端には膜への結合に関与すると考えられる C2

ドメイン構造が存在することが最近報告されており、PTEN の膜への移動とその活性調節のメカニズムについてさらなる研究が望まれる。

インスリンシグナル伝達において、PI 3-キナーゼの活性化から糖取り込みに至るまでの細胞内シグナル伝達経路は、未だその多くが未知である。Akt はインスリン、PI3 キナーゼおよび 3-PIs によって活性化を受ける蛋白であり、また活性型 Akt を過剰発現させると糖取り込みなどのインスリン刺激と同様の効果が認められることから、この経路で重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

Akt はインスリン刺激によって Thr308、Ser473 の 2 アミノ酸残基がリン酸化されることにより活性化される。3-PIs は Akt、および Thr308 のリン酸化酵素である PDK1 を膜に移動させる役割を果たしていると考えられている。

上記の結果より、3-PIs、特に PI(3,4,5)P3 と Akt の Thr308 リン酸化の間には強い相関が認められる。このことは、Akt が PI(3,4,5)P3 によって膜に移動させられ、膜上で PDK1 が Akt の Thr308 部位をリン酸化するという仮説によく合致する。ところが、Akt の Ser473 に関しては、myr-WT の過剰発現によって部分的にそのインスリン刺激時のリン酸化が抑制されるものの、CS、myr-CS の過剰発現によって増強を受けない点が Thr308 の場合と大きく異なっており、この 2 つのリン酸化部位のリン酸化は別の機序によって調節されていることが示唆された。

インスリン刺激反応性の糖取り込みに関しては、これが PI 3-キナーゼの下流に存在することは異論のないものである。この糖取り込みに関し、本研究の結果からは、膜に移行する myristoylation signal 付加型の PTEN の過剰発現によってその一部が抑制をうけるものの、3-PIs に対する影響に比較すると部分的であり、また dominant negative 効果をもつ酵素非活性型の PTEN によって 3-PIs を増加させても全く糖取り込みの増強は認めなかった。このことから、内因性の PTEN は、インスリン刺激時の 3T3-L1 脂肪細胞の糖取り込みの機序に対して、大きい関与をしていない可能性があると考えられる。また、Akt の Ser473 のリン酸化が、2-deoxyglucose 取り込みとほぼ並行して影響されていることを考えると、Akt の Ser473 のリン酸化が糖取り込みに関与している可能性が考えられ、今後 Akt の Ser473 のリン酸化の機序に関するさらなる研究が望まれる。