

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

Regulation of Glucose Transporter Expression by MKK6/3 and p38 Pathway Activation

和訳

MKK6/3-p38 経路の活性化による糖輸送蛋白発現の調節

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 藤城 緑

多くの哺乳動物はブドウ糖を主なエネルギー源として利用し、そのための糖輸送蛋白を有している。このうち GLUT4 は筋肉と脂肪細胞にのみ発現しており、非刺激下では細胞内に存在しているが、インスリンなどの刺激に反応して細胞表面上に移動する。一方 GLUT1 は普遍的に発現しており、刺激とは無関係に主に細胞表面上に存在する。従って GLUT1 は basal での糖取り込みの維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

これまでに、GLUT4 の細胞膜上への移動を介したインスリンによる糖取り込み上昇に、PI3 キナーゼの活性化が重要であることが明らかとなっているが、その下流のメカニズムはいまだ解明されていない。一方、古典的 MAP キナーゼ、すなわち ERK は細胞の形質転換において重要な役割を担っており、GLUT1 を増加して糖取り込み能を上昇させることが報告されている。

近年同定された p38 MAP キナーゼは、インスリンなどのストレスを誘発する種々の刺激によって活性化される。興味深いことに最近、p38 MAP キナーゼの特異的阻害薬である SB203580 を用いた実験結果から、p38 MAP キナーゼの活性化は GLUT4 の細胞膜上への移動へは影響を与えないが、細胞膜上の GLUT4 の内在性活性を増強する可能性が示唆された。一方、p38 MAP キナーゼを活性化する TNF α 、IL-1 や高浸透圧などの様々なストレス刺激はインスリン抵抗性を惹起することが報告されている。

そこで本研究では、p38 MAP キナーゼ経路が糖取り込み能の制御にどのような役割を果たしているかを、インスリンの主要な標的臓器である脂肪細胞と骨格筋細胞を用いて検討した。

<方法>

不活性型 p38 MAP キナーゼ (p38-AF)、不活性型 (AA-) および活性型 (EE-) MKK6、活性型 MKK3 (EE-MKK3)、さらにこれらとの比較のために活性型の MEK1 (DE-MEK1) および MKK7 (DED-MKK7) cDNA を作製し、これらをアデノウイルスに導入して、3T3-L1 脂肪細胞と L6 筋肉細胞に過剰発現させた。また、コントロールとして LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスをこれらの細胞に感染させた。さらに TNF α 、IL-1 β および 200mM ソルビトールなどのストレス刺激を 3T3-L1 脂肪細胞に負荷した実験も行った。

これらの細胞を用いて糖取り込み実験や、p38 MAP キナーゼアッセイ、p38 MAP キナーゼリン酸化の程度、GLUT1 や GLUT4 の蛋白および mRNA 発現量などを比較した。

<結果>

1. p38 MAP キナーゼ活性

LacZ、p38-AF、AA- および EE-MKK6 を過剰発現させた 3T3-L1 脂肪細胞に 100nM インスリンを 5 分間負荷した後、抗リン酸化 p38 MAP キナーゼ抗体で免疫沈降し、続いて抗リン酸化 ATF2 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ATF2 は p38 MAP キナーゼの標的蛋白の一つである。コントロールの細胞においてインスリンが確かに p38 MAP キナーゼを活性化することを確認した。p38-AF および AA-MKK6 の過剰発現によりこのインスリンによる p38 MAP キナーゼの活性化は強く抑制された。一方、EE-MKK6 の過剰発現により p38 MAP キナーゼは顕著に活性化された。

2. 糖輸送活性

上述のアデノウイルスを感染させた 3T3-L1 脂肪細胞に 100nM wortmannin を 15 分負荷した後、前述の方法でインスリン刺激し [H^3]ラベルした 2-デオキシ-D-グルコースの取り込み能を比較した。これまでに報告されているように、コントロール細胞でインスリン刺激により糖取り込み能は増強した。p38-AF および AA-MKK6 はこのインスリンによる糖取り込み能上昇を抑制せず、むしろこれをさらに増強した。一方 EE-MKK6 の過剰発現により糖輸送活性は約 30 倍増加した。Wortmannin はインスリン刺激により増加した糖取り込み活性は抑制したが、EE-MKK6 の過剰発現による増加は抑制しなかった。

次に、活性型の MKK3、MKK6、MEK1、MKK7 および Akt を 3T3-L1 脂肪細胞と L6 筋肉細胞にそれぞれ過剰発現させ、糖輸送活性を比較した。活性型 MKK3、

MKK6、MEK1 および Akt の過剰発現によりいずれの細胞においても糖輸送活性は増加したが、活性型 MKK7 の過剰発現は糖取り込み能に影響を与えなかった。

3. 糖輸送蛋白

活性型 Akt による糖輸送活性の増加はこれまでに報告されているように、GLUT4 の細胞膜表面への移動が関与していると考えられる。MKK6 および MEK1 による糖輸送活性の増加の機序を調べるため、これらを過剰発現させた 3T3-L1 脂肪細胞を用いて subcellular fractionation と RNase protection assay を行い、GLUT1 および GLUT4 の蛋白および mRNA 発現量を検討した。活性型 MKK6 および MEK1 の過剰発現により、細胞膜 (PM) および細胞内 (LDM) いずれにおいても GLUT1 蛋白量は著増し、GLUT4 蛋白量は激減した。mRNA レベルでも同様の変化が見られた。

4. SB203580 の影響

活性型 MKK3 および MKK6 による糖輸送活性や GLUT1 および GLUT4 への影響が p38 MAP キナーゼを介しているかを検討するために、SB203580 を用いた実験をおこなった。10 μ M の SB203580 を短時間負荷しただけでは MKK6 による糖取り込み能の増加は抑制されなかったが長時間負荷すると抑制され、その効果は時間経過に比例して増大した。しかし、活性型 Akt による糖輸送活性の増加は SB 長時間負荷によっても抑制されなかった。MAP キナーゼファミリー間で比較すると、SB 長時間負荷は MKK3 および MKK6 の効果を抑制したが、MEK1 および MKK7 には影響を与えなかった。

5. TNF α 、IL-1 β 、200mM ソルビトールの影響

最後に、種々のストレス刺激の影響を検討するため、3T3-L1 脂肪細胞に 10ng/ml の TNF α および IL-1 β 、200mM のソルビトールを負荷した。これらを 30 分負荷することにより、希釈した EE-MKK6 と同程度に p38 MAP キナーゼリン酸化の増強が見られたが、糖取り込み活性には変化が見られなかった。しかし、24 時間負荷することにより糖輸送活性の上昇、GLUT1 蛋白の増加および GLUT4 蛋白の減少が見られ、これらは希釈した EE-MKK6 と同様の結果であった。

<考察>

本研究では、3T3-L1 脂肪細胞において不活性型の p38 MAP キナーゼおよび MKK6 の過剰発現は、インスリンによる糖取り込み能の上昇を抑制せず、むしろ増強した。さらに、SB203580 10 μ M の負荷により p38 MAP キナーゼ活性は抑制されたが、インスリンによる糖取り込みの上昇は約 30%しか抑制されなかった。100 μ M の SB203580 ではこれが抑制されたが、この濃度では Akt の活性も抑制された。以上から、p38 MAP キナーゼの活性化はインスリンによる GLUT4 を介した糖取り込み上昇には重要でないと考えられる。

p38 MAP キナーゼの上流蛋白である MKK6/3 の活性型変異体を 3T3-L1 脂肪細

胞や L6 筋肉細胞に過剰発現することにより、GLUT1 の増加および GLUT4 の減少が見られた。これらに伴い basal での糖輸送活性は上昇する一方で、インスリン刺激に伴う糖取り込み能の上昇の程度は減少した。SB203580 負荷によりこれらの変化は復元され、これらの現象において p38 MAP キナーゼが重要であることが示唆された。

また、活性型 MEK1 の過剰発現により MKK6/3 と同様の結果が得られた。MEK1-ERK 経路の活性化による GLUT1 増加やそれに伴う basal の糖取り込み上昇は、細胞の形質転換や増殖に重要である可能性がある。一方、GLUT4 の発現は脂肪や骨格筋の分化に関与することが知られている。しかし本研究では、様々な MAP キナーゼファミリー変異体を過剰発現させても、脂肪細胞の分化の程度には変化が見られなかった。従って、MKK6/3 や MEK1 の活性化に伴う GLUT4 減少は細胞の分化とは無関係であることが示唆される。GLUT1 と GLUT4 は多くの場面で逆の制御を受けている。これまでの報告から考察すると、これらの制御は独立した現象と考えられるが、今後さらなる研究が必要である。

TNF α 、IL-1 β や高浸透圧などのストレス刺激についての検討では、これらの刺激を長時間作用させると、糖取り込み能の上昇、GLUT1 の増加、GLUT4 の減少がみられた。これらの変化は SB203580 の作用で復元され、p38 を介した効果であることが示唆された。

本研究の結果から、MKK6/3-p38 MAP キナーゼ経路は TNF α 、IL-1 β や高浸透圧などのストレス刺激により活性化されることが確認された。さらに脂肪細胞や筋肉において、MKK6/3-p38 MAP キナーゼ経路が活性化されると、GLUT1 が増加して basal の糖取り込み能が上昇し、一方で GLUT4 は減少して、インスリン刺激への反応性も低下した。これらの現象が、ストレスによるインスリン抵抗性発生機序の一因である可能性が示唆された。