

# 論文の内容の要旨

論文題目 脂肪組織におけるインスリンシグナル

伝達と糖・脂質代謝の分子機構

—インスリン受容体基質 -1 欠損マウス

と p85 $\alpha$  欠損マウスの解析から—

氏名 辻 雄貴

2 型糖尿病は膵 $\beta$ 細胞のインスリン分泌不全と、インスリン標的組織である肝臓、骨格筋および脂肪細胞におけるインスリン作用障害(抵抗性)といったインスリンの作用不足に起因し、高血糖を呈すると考えられている。インスリン受容体に結合したインスリンは、内在するチロシンキナーゼを活性化した後、インスリン受容体基質(Insulin receptor substrates: IRS)である IRS-1、IRS-2 および IRS-3、さらには Shc などの内因性基質をチロシンリン酸化し、Src homology (SH) 2 蛋白である PI3-kinase、Grb2/Ash、SHP-2 (Syp/PTPD1)、Csk などと結合することにより多様なインスリン作用を発揮する。糖の取り込み、糖産生抑制、グリコーゲン合成や蓄積、さらには脂肪分解抑制といった糖・脂質代謝を調節するインスリン作用はインスリンシグナル伝達上の PI3-kinase 経路の下流に存在していることが示されており、インスリン抵抗性発症時にはインスリンの受容体結合以降のシグナルが何らかの形で障害を受けていると考えられている。これまでもインスリン標的組織である肝臓、骨格筋および脂肪細胞などを材料に PI3-kinase 依存的な経路のシグナル伝達不全について様々な研究が進められてきているが、それらはインスリン刺激後の時間的(二次元的)なリン酸化レベルや活性レベルの変化について細胞全体のレベルでのみ検討されてきた。生体内ではインスリン刺激により PI3-kinase が活性化され

ると、細胞内の糖輸送担体 (glucose transporter: Glut) 4 の細胞膜へのトランスロケーションが促進され糖輸送能を活性化することにより血糖が低下すると考えられている。したがって、シグナル伝達によるインスリン作用機序を正確に理解するためには、インスリン作用に関与している分子の時間的のみならず空間的(三次元的)変化である細胞内局在とをあわせて理解することが重要であると考えられた。インスリンの標的組織の中で脂肪組織は、インスリンによる Glut 4 の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションによる糖取り込み機構を解明する上で優れた組織であるため、脂肪細胞を用いてインスリンシグナル伝達を検討することは興味深いと考えられた。さらには、これまでは培養細胞を用いてのインスリンの作用解析が進められることが多く、個体レベルでの 2 型糖尿病発症に関する報告はそれほど多くはなかった。近年、糖尿病領域においても遺伝因子の明確なインスリン抵抗性あるいはインスリン感受性モデル動物を用いた解析が広く普及してきており、個体レベルでのインスリン作用の解析が可能となってきている。本研究では、二種類の遺伝子欠損マウスについてインスリンの標的組織である脂肪組織を材料に、個体レベルでインスリンシグナル伝達と糖・脂質代謝作用について細胞分画という手法を利用しシグナル分子の細胞内局在という概念を加えてより詳細に検討した。

IRS-1 を欠損させたマウスは、耐糖能は正常であるものの比較的軽度なインスリン抵抗性を示す。このマウス由来の脂肪細胞を分画することにより IRS-2 や IRS-3 のシグナル伝達もより詳細にクローズアップすることを可能とした。マウス脂肪細胞においては IRS-1 や IRS-2 は細胞内の細胞質低密度: low density microsome (LDM) 画分も含め全ての画分において存在するが、一方で IRS-3 は細胞膜 plasma membrane (PM) 画分においてのみ存在しており、インスリン刺激にともないチロシンリン酸化されていた。その後、それぞれの画分で IRS 由来の PI3-kinase を活性化することにより、シグナルを伝達して様々な代謝作用発揮に関与している可能性を示唆した。その一例として、IRS-1 欠損マウスでは脂肪細胞における糖取り込み能の低下といった糖代謝作用の減弱のほかにも脂肪分解の亢進という脂質代謝異常を呈することを見出した。この際、IRS-1 欠損マウスでは脂肪分解の律速酵素であると考えられているホルモン感受性リパーゼ (hormone-sensitive lipase: HSL) の mRNA および蛋白量が亢進していることから、IRS-1 のシグナル伝達が HSL の転写・翻訳レベルでの発現調節を介し

た脂肪分解制御に関与することも示唆された。一方で IRS-1 欠損マウスにおいてはインスリンによる脂肪分解抑制作用には変化が認められないことから、本作用は IRS-3 あるいは IRS-2 のシグナル伝達による作用の一つであること、特に PM 画分における IRS-3 由来の作用である可能性が高いことも示唆した。これらのことから、インスリン受容体基質によって制御する糖・脂質代謝作用が異なることが示唆され、その作用発揮には特定の細胞内画分におけるシグナル伝達が重要である可能性が考えられた。

さらに、p85 $\alpha$  欠損マウスは骨格筋や脂肪組織などの抹消組織における糖取り込み能が亢進し、インスリン抵抗性を発症せずにインスリン感受性が良好となることを見出した。この際、p85 $\alpha$  欠損マウスの脂肪組織 PM 画分に存在する Glut4 蛋白量はインスリン非刺激時および最大刺激時ともに野生型マウスに比べ有意に増加しており、p85 $\alpha$  欠損マウス脂肪組織で認められた糖輸送活性増加には Glut4 の量的増大あるいはインスリン刺激後の細胞膜への移動の増加が関連していると考えられた。p85 $\alpha$  欠損マウスの脂肪組織ではその代替蛋白として p50 $\alpha$  が強く発現しており、LDM 画分においてインスリン刺激後に認められる IRS-1 と p50 $\alpha$  の結合が、野生型マウスで認められる IRS-1 と p85 $\alpha$  の結合に比べて、より早く解離していた。さらには p85 $\alpha$  欠損マウスの脂肪細胞においては PI3-kinase 活性の生成産物である phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) の産生増加が生じていることを見出した。PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> は p85 $\alpha$  や p50 $\alpha$  などの SH2 領域を有する蛋白と結合し IRS-1 のようなチロシンリン酸化蛋白と PI3-kinase との結合を解離する性質を有するため、p85 $\alpha$  欠損マウス脂肪細胞で認められた PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の産生増加が LDM 画分において IRS-1 と p50 $\alpha$  との早期解離を引き起こし、Glut4 のトランスロケーションを促進し糖取り込み能亢進や血糖低下を来す要因であると考えられた。

このように脂肪組織では、インスリンシグナル伝達において重要な役割を担うインスリン受容体基質や PI3-kinase 調節サブユニットといった分子が、それぞれが存在する画分(細胞内局在)で特異的に作用を伝達する可能性が考えられた。実際にインスリン抵抗性患者の標的組織においてもインスリンシグナル伝達が障害されていることが知られており、詳細に検討すればヒトの病態組織においても、細

胞内のある特定の細胞内画分におけるシグナル伝達障害がインスリンの作用不足を引き起こしインスリン抵抗性発症の要因となっているのかもしれない。

以上により、遺伝子欠損マウス由来の脂肪細胞を材料にインスリンシグナル伝達分子の役割を糖・脂質代謝作用と絡めながら細胞内局在という空間的な理解も加えて個体レベルで詳細に検討することができた。今後は、インスリンシグナル伝達について検討する際には細胞内局在個々におけるシグナルと作用を把握しながら、シグナル活性を時空間的に理解していくことが必要である。本研究から見出された知見にヒントを得て、インスリン感受性臓器においてシグナル分子の作用を特定の細胞内画分において変化させることができれば(例えば、p85 $\alpha$  調節サブユニットの発現をある程度抑制することや特定の細胞内画分においてシグナル活性を変化させるなど)、インスリン感受性の増大や糖代謝作用亢進による抗糖尿病効果が期待でき、そこをターゲットとする薬剤開発などを含め糖尿病の治療につながる可能性もあると考えられた。