

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏 名 柴田 倫宏
指導教員名 高橋 伸一郎

論文題目 インスリン抵抗性発生に関わる PI 3-kinase の新しい活性制御機構の解明

肥満、老化、高血糖などの生理状態では様々な組織において活性酸素種の産生が亢進し、酸化ストレスが生じることが知られており、近年、この酸化ストレスが、インスリン抵抗性の発生や糖尿病の病態に深く関与していることが示唆されている。したがって、酸化ストレスによるインスリンシグナルの修飾機構を明らかにする研究は、インスリン抵抗性の発生から糖尿病の発症までの一連のメカニズムを理解する上で、極めて意義深いといえることができる。

本研究では、脂肪細胞の細胞モデルとして汎用されている 3T3-L1 脂肪細胞を用い、まず、酸化ストレスがインスリン生理活性およびインスリンシグナルに及ぼす影響を解析した。その結果、脂質リン酸化酵素である Ia 型 phosphatidylinositol 3'OH-kinase (PI 3-kinase) の活性が酸化ストレスにより抑制され、インスリン依存性糖取り込みが抑制されることが明らかになった。続いて、酸化反応に応答した PI 3-kinase の活性調節機構を分子レベルで検討し、PI 3-kinase のシステイン (Cys) 残基の修飾が PI 3-kinase の活性を制御しているという新しいメカニズムの存在を見出した。

酸化ストレスに応答したインスリン抵抗性発生機構の解明

パラコート (PQ) は、細胞内で活性酸素種を発生させ酸化ストレスを与えることが明らかにされている。そこで、PQ で前処理した 3T3-L1 脂肪細胞をインスリンで処理後糖取り込み活性を測定したところ、PQ 処理群では未処理群に比べインスリン依存的な糖取り込み活

性が抑制されることが明らかとなった。以後、このモデル細胞を用いて酸化ストレスによるインスリンシグナル抑制機構を詳細に解析した。

一般に、脂肪細胞をはじめとしたインスリンの標的細胞では、インスリンが細胞膜上のインスリン受容体 (IR) に結合すると、IR に内蔵されたチロシンキナーゼが活性化され、インスリン受容体基質 (IRS) などの基質がチロシンリン酸化される。次いで、IRS のリン酸化チロシン残基を認識して SH2 ドメインを有した PI 3-kinase p85 調節サブユニットが結合し、p110 触媒サブユニットが活性化される。この IRS-PI 3-kinase 経路の活性化は、シグナル系下流のセリン・スレオニンキナーゼ Akt の活性化などを引き起こし、糖輸送担体である glucose transporter 4 (GLUT4) が細胞質内の小胞から細胞膜表面上へ移行、糖取り込みが促進されることが考えられている。

まず、PQ 前処理がインスリンの細胞内シグナルに及ぼす影響を解析したところ、インスリン依存的な IR・IRS のチロシンリン酸化および IRS に結合する PI 3-kinase 量は、PQ 前処理により変化しなかった。ところが、インスリン依存的な IRS 結合性 PI 3-kinase の活性化は PQ 処理により抑制され、同時に Akt のインスリン依存的なリン酸化および GLUT4 の細胞膜への移行も抑制されることを発見した。

続いて、インスリンシグナルにおける酸化ストレスの作用点をより詳細に明らかにするため、アデノウイルスベクターを用いて myristoylated Akt (myr-Akt) 発現させた 3T3-L1 脂肪細胞を用いた解析を行った。myr-Akt はミリスチル化部位を付加した Akt 変異体であり、生体膜上に局在化して恒常的に活性型となる。myr-Akt を発現した 3T3-L1 脂肪細胞では、インスリン非存在下でも Akt の下流のシグナルが伝達される結果、糖取り込みが促進されたが、この細胞を PQ 前処理しても myr-Akt 依存的な GLUT4 の細胞膜移行および糖取り込みは抑制されない、つまり PQ は Akt の下流のシグナル伝達および、糖取り込み活性を抑制しないことが明らかとなった。

これら一連の結果より、PQ 処理によって生じた酸化ストレスは、チロシンリン酸化 IRS と PI 3-kinase の相互作用以降の段階で、何らかの機構を介して PI 3-kinase 活性を抑制することが明らかとなった。

Ia 型 PI 3-kinase の新しい活性調節機構の解明

酸化ストレスによる PI 3-kinase の活性制御機構を明らかにするため、標的となる PI 3-kinase のアイソフォームの同定、酸化ストレスにより PI 3-kinase と相互作用しキナーゼ活性を抑制するタンパク質の存在の可能性の検討、そして酸化反応による PI 3-kinase の Cys 残基の修飾がキナーゼ活性に及ぼす影響の解析を進めた。

3T3-L1 脂肪細胞には、Ia 型 PI 3-kinase の触媒サブユニットの複数のアイソフォームのう

ち、主に p110 α と p110 β が発現している。そこで、各アイソフォームの siRNA によるノックダウンがインスリン依存的な糖取り込みに及ぼす影響を調べた。その結果、p110 α に対する siRNA を 3T3-L1 脂肪細胞に導入した際には、インスリン依存的な糖取り込みが顕著に抑制されたが、p110 β に対する siRNA を導入した際には p110 α ノックダウンのような大きな効果は観察されなかった。この結果から、通常の状態では p110 α がインスリン依存的な糖取り込みに重要な役割を果たしていると結論した。

PI 3-kinase の活性は、チロシンリン酸化 IRS や ras などのタンパク質との相互作用によって修飾されることが明らかになっている。そこで、酸化ストレスに応答して PI 3-kinase に相互作用するタンパク質が PI 3-kinase の活性を抑制している可能性を検討するため、PQ 処理後の 3T3-L1 脂肪細胞において PI 3-kinase と相互作用しているタンパク質を精製、可視化することにした。まず、3T3-L1 脂肪細胞はどのような手法を用いても遺伝子導入効率が低いため、coxsackie and adenovirus receptor (CAR) を安定的に発現した CAR 発現 3T3-L1 脂肪前駆細胞を作製、アデノウィルスによる遺伝子導入効率を上昇させた。一方、PI 3-kinase と相互作用するタンパク質は、PI 3-kinase p110 α cDNA に 2 つの tag を融合したタンパク質を 3T3-L1 脂肪細胞に発現、その tag を用いて 2 段階の精製を行う、tandem affinity purification (TAP) 法で精製した。すなわち、CAR 発現 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化させた後、TAP 法に用いる tag を融合した p110 α を発現する組換えアデノウィルスに感染、PQ 処理をした後、p110 α に結合するタンパク質を TAP 法によって精製した。精製したタンパク質を SDS-PAGE に供した後、銀染色により可視化、PQ 未処理群の p110 α と相互作用しているタンパク質と比較したが、PQ 処理によって p110 α に相互作用するタンパク質のパターンは大きく変化しなかった。

活性酸素種は、多くの酵素のシステイン残基のチオール基 (Cys-thiol) を酸化し、その活性を修飾する。そこで、p110 α の Cys-thiol の修飾が PI 3-kinase 活性に及ぼす影響を解析することにした。その結果、①PI 3-kinase を免疫沈降で精製した後、*in vitro* で H₂O₂ 処理すると PI 3-kinase の活性が抑制される、②還元剤である dithiothreitol を PI 3-kinase の免疫沈降物に作用させると PI 3-kinase 活性は上昇する、③Cys-thiol のアルキル化剤である N-ethylmaleimide で細胞抽出液を処理した後、PI 3-kinase を免疫沈降で精製し、PI 3-kinase 活性を測定したところ、その活性は著しく抑制されるなどの結果を得た。これらの結果は、酸化による PI 3-kinase 活性発現修飾には Cys 残基が重要な役割を果たしていることを示している。次に、p110 で種間・アイソフォーム間で良く保存されている 12 個の Cys 残基をそれぞれ Ser に置換した p110 α 変異体 (CS 変異体) を作製し、HEK293T 細胞に発現させた後、免疫沈降によって CS 変異体を精製、*in vitro* でその活性を測定した。その結果、主にキナーゼドメイン付近の複数の CS 変異体では、PI 3-kinase 活性が野生型 p110 α と比較して抑制さ

れることが明らかとなった。これらの結果は、複数の特異的な部位の Cys-thiol の酸化により PI 3-kinase の酵素活性が抑制される可能性を強く示している。

本研究の成果より、「脂肪細胞においては、酸化ストレスは、糖取り込み促進に重要な PI 3-kinase の p110 α 触媒サブユニットのキナーゼドメイン付近のシステイン残基のチオール基を酸化し、その結果 PI 3-kinase の活性が抑制される。この抑制は、GLUT4 の細胞膜移行の阻害を引き起こし、インスリン依存性糖取り込みを抑制、インスリン抵抗性が起こる」という作業仮説が考えられた。高齢化が急速に進む現代社会において、寿命延長に伴う酸化ストレス増加が種々の代謝性疾病を引き起こし、これらが大きな問題になりつつある。今回、明らかとなった PI 3-kinase の新しい活性修飾機構は、これらの問題の解決に新しい観点を提供するものと期待している。