

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 柴田 倫宏

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。本研究は、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し、続いて PI 3-kinase のアイソフォームの機能の共通点・相違点について解析、最後に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たもので、論文は、序論、本編が 3 章、そして総合討論よりなる。

まず、序章では、本研究の背景および意義を概説し、本研究の目的と本論文の構成について述べている。

第一章では、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なっているパラコート (PQ) で前処理した 3T3-L1 脂肪細胞をインスリンで処理後、インスリンシグナルおよび糖取り込み活性を検討している。その結果、インスリン依存的なインスリン受容体のチロシンリン酸化およびインスリン受容体基質、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、同時にその下流シグナルおよびインスリン依存的糖輸送体、GLUT4 の細胞膜への移行も抑制された。この際、PQ 処理により、インスリン依存的な糖取り込み活性が抑制されることも明らかにしている。その他の結果も併せ、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、PI 3-kinase 活性を抑制すると結論している。

第二章では、3T3-L1 脂肪細胞に発現している、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、p110 $\alpha$  と p110 $\beta$  がインスリン依存的な糖取り込みに果たす役割について調べている。その結果、通常の状態では主に p110 $\alpha$  がインスリン依存的な糖取り込みに関与しているが、p110 $\alpha$  の発現が抑制されると、p110 $\beta$  がこの機能を相補することがわかった。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ので、p110 $\alpha$  と p110 $\beta$  に相互作用するタンパク質を tandem affinity purification (TAP) 法で調べた。p110 $\alpha$  と p110 $\beta$  は、複

数種の異なるタンパク質との結合が観察され、このようなタンパク質によって、アイソフォーム間の機能の差異が生じるものと考察している。

第三章では、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ている。酸化ストレスによって p110 $\alpha$  と相互作用しているタンパク質には大きな変化は観察されなかった。一方、酸化による PI 3-kinase 活性発現修飾には、Cys-thiol の修飾が重要な役割を果たしていることを見出した。そこで、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 p110a 変異体 (CS 変異体) を作製、その活性を測定した結果、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が示された。

総合討論では、本研究の成果をまとめ、「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 $\alpha$  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」という作業仮説を提唱し、この新規性について論議している。

このように、本研究の成果は、酸化ストレスによるインスリン抵抗性の新しい発生機構を PI 3-kinase の活性抑制から明らかにしたもので、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位として価値あるものと認めた。