

【別紙1】

論文の内容の要旨

論文題目 糖尿病モデルマウスにおける mTOR シグナルのインスリン感受性への影響

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院 医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

瀨織 優子

[背景]

Mammalian target of rapamycin (mTOR) は、phosphatidylinositol (PI) kinase 関連 protein kinase family に属するセリン/スレオニン kinase であり、細胞増殖や代謝機構を調節する。mTOR シグナルネットワークは2つの主要な系列からなり、それぞれが特異的な mTOR 複合体 (mTORC) によってシグナルが下流に伝達される。Rapamycin-sensitive な mTORC1 は mTOR、Raptor、mLST8 からなり、S6K1 や 4E-BP1 のような effector を通して細胞増殖を調節する。Rapamycin-insensitive な mTORC2 は mTOR、Rictor、mLST8 からなり、Akt を通じた細胞増殖、プロテインキナーゼ C α や small GTPase である Rho、Rac を通じた細胞骨格構築を調節する。

Raptor は種で保存されたN端、幾つかの HEAT リピート、C 端の7つの WD40 リピートから成る、150kDa の巨大な蛋白である。多くのグループが Raptor は p70S6K や 4E-BP1 を mTOR に動員するアダプターの役割を果たしていると報告している。最近の研究では、栄養感受性の TSC-mTOR-S6K1 経路から、上流のイン

スリン応答性の IRS-PI3K-PDK1-Akt 経路への負のフィードバック回路が存在することが示されている。S6K1 ノックアウトマウスは β 細胞塊が縮小することにより低インスリン血症となり、更には S6K1 から IRS1 への負のフィードバック回路が無くなることでインスリン感受性が増大し、加齢や食餌による肥満を防ぐことが報告されている。一方、*K/KAy* や *ob/ob* マウスのような遺伝的肥満モデルにおいて、IRS-1 の Ser307 や Ser636/639 のリン酸化は亢進し、インスリンシグナルは抑制されている。こうしたマウスでは IRS-1 のセリン残基をリン酸化する JNK や ERK、mTOR/S6K1 の活性は亢進しているといわれている。

今回の研究では、mTORC1 の寄与を明らかにする為に、ドミナントネガティブ Raptor (C 端を欠損させた Raptor (Raptor- Δ CT)) をアデノウイルス遺伝子導入を使って *K/KAy* マウスの肝臓へ過剰発現させた。Raptor- Δ CT は S6K に結合するが mTOR には結合しないため、Raptor- Δ CT の過剰発現によって mTOR/S6K シグナルは阻害される。こうした条件のもとで、私はシグナル伝達だけでなく耐糖能における mTORC1 経路の寄与を評価することを目的に、以下の実験を行った。

【方法】

Dominant-negative Raptor である Raptor- Δ CT (アミノ酸 1-905) は、Raptor の C 端を欠損した構成であり、コンストラクトは N 端に Myc タグと Flag タグを含むよう設計した。ベータガラクトシダーゼ (LacZ) や C 端を欠損させた Raptor (Raptor- Δ CT) を発現させた組換えアデノウイルスを作製し、塩化セシウム超遠心法を使って精製、濃縮した。LacZ をコードするアデノウイルスをコントロールとして使った。9 週齢のオス *K/KAy* マウス尾静脈よりアデノウイルスを静注し、4 日後に以下の実験を行った。マウスを 14 時間絶食とした後糖の腹腔内投与 (2g/kgBW) を行った。糖負荷前後各時間ごとに尾静脈より採血、血糖を測定し、Raptor- Δ CT マウスとコントロールマウスを比較した。また、アデノウイルス静注 4 日後に、心臓よりインスリン注入を行い、肝臓でのインスリ

ンシグナル伝達分子のタンパク量と、インスリン刺激によるリン酸化状態を免疫沈降ウエスタンブロット法で解析し、また PI3K、S6K のキナーゼ活性を測定した。また、体重、各種臓器の重量、血清インスリン、血清脂質も測定し両群で比較した。

【結果】

肝臓での Raptor と Raptor- Δ CT の内因性発現レベルを調べるために、抗 flag タグ抗体と抗 Raptor 抗体を使ってウエスタンブロットを行った。Raptor- Δ CT 発現は、抗 flag タグ抗体を使ったウエスタンブロットでは Raptor- Δ CT 過剰発現マウスにおいてのみ同定され、コントロールマウスでは認められなかった。抗 Raptor 抗体を用いたウエスタンブロットでは内因性 Raptor と過剰発現した Raptor- Δ CT の両方が同定され、Raptor- Δ CT の発現レベルは内因性 Raptor より約 2-5 倍であった。次に Raptor- Δ CT 過剰発現の S6K 活性に対する影響を調べた。インスリン刺激による S6K の活性が Raptor- Δ CT 過剰発現マウスの肝臓では有意に抑制されることがわかった。両群マウスの体重や主要な臓器の重量、血清インスリン、脂質を示した。体重、臓器の重量、血清インスリン、脂質において、アデノウイルスの投与前と投与 4 日後ともに両群間で有意な違いは認められなかった。糖負荷試験では、糖負荷後 30 分、60 分で Raptor- Δ CT マウスの血糖値がコントロールに比べ有意に低値であり、空腹時、90 分、120 分の血糖値も Raptor- Δ CT マウスにおいて低値であった。また、肝臓での IRS-1 タンパクの発現量は両群間で違いはなかった。インスリン刺激によって IRS-1 チロシンリン酸化が Raptor- Δ CT マウスにおいて有意に亢進し、一方 IRS-1 セリン 636/639 リン酸化は有意に抑制された。インスリン刺激によるチロシンリン酸化関連 PI3K 活性と IRS-1 関連 PI3K 活性がともにコントロールマウスの約 2 倍亢進していた。インスリン刺激による Akt リン酸化も Raptor- Δ CT マウスにおいて有意に亢進していた。

【考察】

インスリン抵抗性は、肥満や高脂肪食、不十分な運動、高血圧、他様々なホルモンを含む多くの要因によって引き起こされる。こうした要因の中で、過剰栄養摂取によって起こる肥満は、糖尿病の発症にもつながり、最も頻度も高く重要なものと考えられている。筋肉や肝臓でのインスリン感受性に影響を与えるアディポサイトカインの発現の変化が、肥満によって起こるインスリン抵抗性の基礎にある分子メカニズムと関係していることが報告されている。一方、栄養状態が、脂肪細胞から分泌される蛋白と関係なく、AMPK/mTOR 経路を直接調節するという事も報告されている。

肥満動物では、IRS 蛋白との結合による PI3-kinase 活性は抑制され、その抑制は、IRS-1 のセリンリン酸化の亢進によって引き起こされることが報告されている。実際、肥満モデル動物の一つである *K/K^{AY}* マウスでは、IRS-1 Ser307 と Ser636/639 リン酸化が亢進している。IRS-1 のセリン残基のリン酸化は、IRS-1 分解においても報告があり、IRS-1 蛋白の減少によりインスリン抵抗性が進展する。これまで、いくつかのセリン/スレオニンキナーゼが IRS-1 のセリン残基をリン酸化し、インスリン抵抗性を惹起することが報告されている。脂肪細胞に由来する TNF α や、レジスチン、遊離脂肪酸は、JNK を活性化し IRS-1 のセリンリン酸化を亢進させる。一方、過栄養は mTOR や S6K を活性化することで、IRS-1 もリン酸化する。今回の研究で、遺伝的肥満によるインスリン抵抗性を示す *K/K^{AY}* マウスのインスリンシグナル抑制や耐糖能障害において、mTOR の寄与が実際に重要であるかどうかを調べた。

Raptor は、S6K や 4E-BP1 を mTOR へ動員するアダプターとしての役割を果たす。Raptor と mTOR は多数の結合部位をもつと考えられているが、S6K は Raptor と、Raptor の N 端部位で選択的に結合することが報告されている。このため、C 端を欠損した Raptor (Raptor- Δ CT) は、S6K と結合することは出来るが

mTOR とは結合できず、mTOR/S6K シグナリングにとって dominant-negative 蛋白として働く。本研究では、Raptor- Δ CT の肝臓での過剰発現によってインスリン刺激による S6K 活性が顕著に抑制され、耐糖能が改善された。重要なこととして、Akt リン酸化がインスリン刺激時だけでなく、インスリン刺激前の状態でも有意に亢進したことが挙げられる。IRS-1 の Ser636/639 リン酸化が抑制されたことや、その結果 IRS-1 のチロシンリン酸化が亢進したこと、それに続いておこる PI3 キナーゼ活性亢進がインスリン刺激時の Akt リン酸化の亢進に貢献することが考えられる。しかし、このメカニズムはインスリン刺激前の基礎の Akt リン酸化を有意に亢進させることを説明するには十分ではないと考えられる。他のメカニズム、例えば、PDK や Rictor の活性の亢進、あるいは Akt の脱リン酸化の抑制といったことが、基礎の Akt リン酸化の亢進に関与している可能性がある。実際、Raptor/mTOR 複合体と Rictor/mTOR 複合体は逆方向に Akt リン酸化を調節しており、mTORC1 は Akt リン酸化を抑制することが報告されている。これらの報告を考慮し、私は現在 TORC1 から Akt 活性への別の経路が存在するのではないかと考え研究を続けている。

以上の結果より、私は糖尿病モデルマウスにおいて肝臓での S6K 活性を抑制させると、インスリン刺激前と後の両方での Akt リン酸化が亢進することにより、耐糖能が改善することを示すことができた。インスリン刺激前の基礎の Akt リン酸化を亢進させる分子メカニズムを明らかにするには更なる研究が必要と考えられるが、mTORC1 の抑制が肥満関連の糖尿病の治療に有効である可能性がある。