

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏 名 安藤 康年
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おける
インスリン受容体基質相互作用タンパク質 GKAP42 の新規機能

世界中で罹患者が急増している II 型糖尿病は、血中に十分量のインスリンがあるにも関わらずインスリンの作用が十分に発現されない「インスリン抵抗性」を主因とするメタボリックシンドロームである。一般にインスリンは、標的細胞の細胞膜上に存在するインスリン受容体に結合すると、受容体に内蔵されているチロシンキナーゼを活性化し、インスリン受容体基質 (IRS) をはじめとした細胞内基質をリン酸化する。チロシンリン酸化された基質を認識して、PI 3-kinase (PI3K) などのシグナル分子が相互作用し、これを起点として下流シグナル経路が活性化、広範な生理活性を発揮する。特に、脂肪組織や筋肉におけるインスリン依存性糖取り込みについては、PI3K 経路のセリン/スレオニンキナーゼ Akt が活性化されると、糖輸送担体 (GLUT) 4 を含む小胞が細胞膜に移行し、糖取り込みが誘導される。この際、他の細胞外因子によってインスリンシグナル伝達のいずれかの段階が阻害されると、「インスリン抵抗性」に陥ることになる。

我々は、インスリンの生理活性の修飾機構を解析している過程で、IRS が複数のタンパク質 (IRS-associated proteins; IRSAP) と結合し、巨大なシグナル分子複合体を形成していることを見出した。そして、IRSAP が他の因子や生理状態の変化に応答して

ダイナミックに変動し、インスリンシグナル伝達や生理活性を変化させていることを明らかにしてきた。そこで本研究では、複数種存在する IRS のうち IRS-1 を bait とした酵母 two-hybrid screening によって同定された IRSAP、42-kDa cGMP-dependent protein kinase anchoring protein (GKAP42) に着目し、GKAP42 がインスリンのシグナル伝達や生理活性発現に果たす役割を検討すると共に、「インスリン抵抗性」発生への関与を明らかにすることを目的とした。

インスリン受容体基質と相互作用する分子 GKAP42 がインスリンシグナル伝達および糖取り込みに果たす役割

GKAP42 は、これまで精巢のみで組織特異的な発現が認められると報告されてきたが、今回、インスリン標的細胞の一つである脂肪細胞においても発現していることが確認された。GKAP42 の発現量は脂肪細胞の分化の進行と共に増加していることから、分化後の脂肪細胞で機能を発揮するタンパク質と考えられた。また、3T3-L1 脂肪細胞を用いた共免疫沈降実験で、内在性の GKAP42 と IRS-1 との相互作用が確認された。そこで、siRNA 法により 3T3-L1 脂肪細胞の内在性 GKAP42 を発現抑制し、インスリンシグナルおよびインスリン依存的な糖取り込みに与える影響を解析した。その結果、GKAP42 の発現抑制はインスリン受容体の自己リン酸化に変化を与えないものの、インスリン刺激に応答した IRS-1/2 のチロシンリン酸化を抑制し、同時に IRS-1/2 と相互作用する PI3K のタンパク量及び活性も減少させた。更に、PI3K 経路下流のセリン/スレオニンキナーゼ Akt では、活性を反映する 473 番目のセリン残基のリン酸化の減少が観察された。これに加え、GKAP42 を発現抑制した 3T3-L1 脂肪細胞では、インスリン刺激に応答した GLUT4 の細胞膜移行量および糖取り込みが有意に阻害された。一連の結果から、GKAP42 はインスリン依存的な IRS のチロシンリン酸化および下流の PI3K 経路のシグナルを維持することで糖取り込み能を発揮していると結論した。

GKAP42 と IRS-1 との相互作用がインスリンシグナル伝達および GLUT4 の細胞膜移行に及ぼす影響

続いて、GKAP42 の種々の欠損変異体を用いて IRS-1 との結合領域を検討し、GKAP42 の N 末端領域 (a.a. 1-95、以下、この領域を GKAP42-N と呼ぶ) が相互作用に必要であることを明らかにした。GKAP42-N を HEK293T 細胞に過剰発現したところ、IRS-1 と GKAP42 との相互作用が競合的に阻害された。更に、GKAP42-N を過剰発現し IRS-1 と GKAP42 の相互作用を抑制した CHO 細胞では、IRS-1 のインスリン依存的なチロシンリン酸化が減少したのに対して、GKAP42 を過剰発現し IRS-1 と

GKAP42 の相互作用を増加させた CHO 細胞では、IRS-1 のインスリン依存的なチロシンリン酸化が増加した。また、GKAP42-N を過剰発現した 3T3-L1 脂肪細胞では、インスリン依存的な GLUT4 の細胞膜への移行が阻害された。これら一連の結果は、GKAP42 と IRS-1 の相互作用により、IRS-1 のインスリン依存的なチロシンリン酸化および GLUT4 の細胞膜移行が維持されていることを示唆している。

TNF- α により誘導されるインスリン抵抗性への GKAP42 の関与

多くのサイトカインは、IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化の抑制を介して糖取り込みを阻害、すなわち、「インスリン抵抗性」を誘導する。そこで、3T3-L1 脂肪細胞において、サイトカインの一つ、tumor necrosis factor (TNF) - α がインスリン抵抗性を発生する機構に GKAP42 が関与するかを検討した。まず、TNF- α で 3T3-L1 脂肪細胞を種々の時間処理し、GKAP42 のタンパク量の変動を調べた。その結果、GKAP42 が TNF- α の処理時間に依存してプロテアソーム系によって分解されることが明らかとなった。GKAP42 は cGMP-dependent kinase (cGK)-I α と相互作用しているので、次に cGK-I α が TNF- α 処理に応答した GKAP42 のタンパク量の減少に関与するかを調べることにした。まず、siRNA 法により 3T3-L1 脂肪細胞の内在性 cGK-I α を発現抑制し、この細胞を TNF- α で 24 時間処理後、GKAP42 のタンパク量、インスリンシグナル伝達及び糖取り込みを解析した。cGK-I α の発現抑制は、TNF- α 処理によって起こる GKAP42 のタンパク量の減少を回復させ、同時に TNF- α 処理によって抑制されるインスリン依存的な IRS-1 のチロシンリン酸化および糖取り込みを有意に増加させることを見出した。TNF- α 処理が cGK-I α の活性を上昇させる結果も併せ、「TNF- α は cGK-I α を活性化し、この活性の増加は GKAP42 の分解を促進する。これにより IRS-1 を介したインスリンシグナル伝達が抑制され、インスリン依存的な糖取り込みが阻害される」という新しいインスリン抵抗性発生機構が稼働していると考えられた。

サイトカインによるインスリン抵抗性モデル動物における GKAP42 タンパク量の変動

最後に、種々のサイトカインの増加によって IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化および下流のインスリンシグナルが抑制され、インスリン抵抗性誘導が報告されている動物モデル、高脂肪食給餌マウス及びリポ多糖 (LPS) 投与ラットの脂肪組織における GKAP42 のタンパク質レベルを解析した。これらのモデル動物の脂肪組織では予想に反して GKAP42 のタンパク量が増加していた。これらの結果は、個体レベルではサイトカインによるインスリン抵抗性が誘導される過程で、GKAP42 のタンパク量を増加させ、インスリンシグナルを維持することによって物質代謝の恒常性を維持する

仕組みが存在している可能性を示している。

これまでの研究で、TNF- α をはじめとしたサイトカインによって誘導されるインスリン抵抗性の発生機構として、IRS のタンパク量が低下する、あるいは、IRS のセリンリン酸化により IRS がインスリン受容体チロシンキナーゼによってチロシンリン酸化されにくくなることが報告されている。本研究で私は、IRS と相互作用する GKAP42 が IRS のインスリン依存性チロシンリン酸化を維持する機能を有しており、TNF- α によって誘導されるインスリン抵抗性の少なくとも一部は TNF- α 刺激に応答した cGK-I α の活性化を介した GKAP42 のタンパクレベルの低下によって引き起こされることを明らかにした。今後、GKAP42 がどのような機構を介して IRS のチロシンリン酸化を維持するのかなどを解明することにより、GKAP42 をはじめとした IRS と相互作用するタンパク質を標的とした糖尿病の新しい発生機構の解明や、新規治療法・抗糖尿病薬の開発に直結するものと確信している。