

平成21年 4月 8日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790623
 研究課題名（和文）ユビキチン・プロテアソーム系を介したインスリン受容体基質調節機構の
 解明
 研究課題名（英文）Regulation of insulin receptor substrate
 through ubiquitin-proteasome pathway
 研究代表者
 高橋 伸彦（TAKAHASHI NOBUHIKO）
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20372279

研究成果の概要：メタボリックシンドロームはインスリン抵抗性を背景にしばしば高インスリン血症を呈する。そして高インスリン血症は骨格筋細胞や脂肪細胞といったインスリン感受性臓器における代謝のkey playerである、インスリン受容体基質（IRS）をユビキチン・プロテアソーム系を介して量的に調節することが知られている。本研究はその分子メカニズムを明らかにすることが目的である。その結果、IRSに会合していると思われる分子を2種類同定したが、その意義については今後の課題となった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：代謝異常学

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性は、動脈硬化性疾患のリスクファクターである、メタボリックシンドロームや2型糖尿病の共通基盤となる重要な病態と認識されています。その分子機構を詳細に解明することが、有効な薬剤の開発につながり、国民の健康問題解決の一助になると考えます。

インスリン抵抗性とはインスリン感受性臓器、つまり、骨格筋細胞、脂肪細胞、肝細胞におけるインスリンの感受性が低下した病態であり、メタボリックシンドロームにお

いては通常代償的に高インスリン血症を呈します。骨格筋細胞や脂肪細胞が高インスリン血症に長期間暴露された場合、細胞内ではどのようなことが起きるのか、その分子動態を完全に解明することは重要な課題と考えます。

(1) [インスリン受容体基質の量的異常] インスリンは細胞表面のインスリンレセプターに結合し、そのシグナルはインスリン受容体基質（Insulin Receptor Substrate: IRS）

に伝達されます。IRS は4つのアイソフォームからなり、それぞれ IRS-1 から IRS-4 と名付けられています。インスリンは糖代謝、脂質代謝、細胞増殖など多彩な作用を發揮しますが、この IRS が機能調節の key molecule で、そのチロシンやセリン残基のリン酸化により多彩な機能を振り分けています。IRS はこのようなリン酸化による調節の他に、量的な調節も重要であるとわかって来ました。具体的には、インスリン感受性臓器において長時間のインスリン暴露により IRS-1 and/or 2 の蛋白量の低下が認められ、その機序にユビキチン・プロテアソーム系が関与していることが判明 (Sun et al., Diabetes 48:1359-1364, 1999) しました。また、インスリン抵抗性を惹起する炎症性 cytokine、TNF- α は、培養細胞に長時間作用させると IRS-1 の蛋白量を減少させることが知られています (Stephens et al., J Biol Chem 272:971-976, 1997)。さらに、C型肝炎ウイルスの感染はインスリン抵抗性を引き起こすことが知られていますが、その機序として肝臓の IRS-1、IRS-2 蛋白がユビキチン・プロテアソーム系で分解されることが判明しました (Kawaguchi et al., Am J Pathol 165:1499-1508, 2004)。以上の事実より、IRS がユビキチン・プロテアソーム系により分解され、量的に調節されることがインスリン抵抗性の一端を担っていると考えられます。

(2) [IRS とユビキチン・プロテアソーム] IRS のユビキチン化やプロテアソーム分解機序に関する主要な報告は、IRS-1-Ser307 のリン酸化が関与する (Green et al., J Biol Chem 278:8199-8211, 2003)、mTOR (mammalian Target of Rapamycin) が 3T3-L1 細胞の IRS-1 の分解に関与する (Haruta et al., Mol Endocrinol 14:783-794, 2000) などです。また炎症性 cytokine により誘導される SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) 蛋白が肝臓における IRS のユビキチン化を仲介するという報告 (Rui L et al., J Biol Chem 277:42394-42398, 2002) の一方、SOCS は 3T3-L1 脂肪細胞における IRS-1 の分解には関与しないとの報告 (He F, Stephens JM, Biochem Biophys Res Commun 344: 95-98, 2006) もあり見解は一定していません。現在、IRS が具体的にどのようなメカニズムでユビキチン化され、またプロテアソーム系での分解がどのように調節されているのか、その全貌は明らかにされていません。

(3) [Troglitazone とユビキチン・プロテア

ソーム] 最近我々の研究グループは、主に癌細胞における核内転写因子 PPAR γ (Peroxisome Proliferator -Activated Receptor gamma) の研究を行い、PPAR γ のリガンドである troglitazone がプロテアソーム活性を抑制することを発見 (Takeuchi et al., Jpn J Cancer Res 93:774-782, 2002、Motomura et al., Int J Cancer 108:41-46, 2004) しました。この事実から、PPAR γ が IRS 蛋白のユビキチン・プロテアソーム系修飾に関与しているのではないかと考えるに至りました。

2. 研究の目的

本研究は IRS の量的調節を司る、ユビキチン・プロテアソーム系による調節機構の解明が目的です。これまでの知見から重要な課題を選択し、具体的目的は(1)-(3)の3点とします。

(1) チアゾリジン系薬剤のプロテアソーム抑制作用：IRS-1 との関係、その機序の解明

我々はインスリン抵抗性改善剤でチアゾリジン系薬剤の一種である troglitazone が癌細胞においてプロテアソーム活性を抑制することを見いだしています。そして、このプロテアソーム活性の抑制が、細胞周期を制御するユビキチン化蛋白 p27kip1 の蓄積を引き起こし、細胞増殖能の抑制につながることを報告しました。

そこで、チアゾリジン系薬剤が骨格筋細胞や脂肪細胞においてもプロテアソーム活性を抑制し、IRS-1 の蛋白量減少を防ぐのではないかと仮説を立て、現在検証を始めています。まず骨格筋細胞のインスリンによる IRS-1 の蛋白量低下モデルを作成しました。そして、preliminary な検討では、ある条件下で troglitazone が IRS-1 の蛋白量減少を防ぐのではないかという知見を得ています。今後はこの知見をさらに確認するための実験を行うこと、他のチアゾリジン系薬剤である pioglitazone や rosiglitazone も同様の作用をもつのか検討すること、さらにはプロテアソーム活性の抑制作用がどのようなメカニズムで起きているのか、チアゾリジン系薬剤の標的である核内転写因子 PPAR γ との関係や遺伝子発現、インスリンシグナルへの影響を検討することが目的となります。

(2) IRS-1 特異的ユビキチンリガーゼ (E3) の同定とその発現調節機構

ユビキチン・プロテアソーム系は、蛋白の翻訳後修飾を司るユビキチンシステムと蛋

白分解を司るプロテアソームシステムからなり、精巧に蛋白質の量的管理を行い、生体の生命現象に深く関与するシステムです。ユビキチン化とは標的蛋白質のリジン残基にユビキチンが結合する現象で、ユビキチンが結合を繰り返すとポリユビキチン鎖が形成され、通常プロテアソームはこのポリユビキチン鎖を認識します。

ユビキチン化にはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) といった一連の酵素群が作用します。通常細胞内には、E1 は 1 種類、E2 は約 40 種類以上存在していることが知られていますが、E3 はヒトゲノムでは約 1000 種類がコードされていることが明らかになっています。すなわち、標的の数に E3 の数が対応していると考えられています。そのため、IRS-1 に特異的な E3 が存在すると考えられますが、現在どのような分子であるのか同定されてはいません。そこで、第 2 の目的を IRS-1 特異的 E3 の同定とし、IRS-1 特異的 E3 が種々の代謝異常にどのようにかわるのか、その調節機構を検討します。

(3) IRS-1 のユビキチン様蛋白修飾の探索とその病態意義の解明

蛋白質の翻訳後修飾はユビキチン化以外にも、SUMO 化、NEDD8 化など様々なユビキチン様蛋白修飾が存在し、SUMO 化はユビキチン化に拮抗するなど、病態形成への関与が報告されています。代謝領域では、SUMO 化が PPAR γ の転写活性を調節すること (Ohshima et al., J Biol Chem 279: 29551-29557, 2004)、GLUT4 (Glucose Transporter) がユビキチン様蛋白である sentrin の修飾により調節されていること (Giorgino et al., Proc Natl Acad Sci USA 97:1125-1130, 2000) が報告されています。しかし、IRS-1 に関しては、現在ユビキチン化以外のユビキチン様蛋白修飾の報告はありません。

そこで、本研究では IRS-1 がユビキチン様蛋白により修飾を受けるのか、もし受けるのなら、どのような病態で起こるのか、またインスリンシグナルに及ぼす影響も検討します。

3. 研究の方法

(1) チアゾリジン系薬剤のプロテアソーム抑制作用：IRS-1 との関係、その機序の解明
① 培養細胞に、インスリン単独、インスリン+troglitazone、および troglitazone 単独を添加し、Western 法にて IRS-1 の蛋白量を測定し、troglitazone の IRS-1 蛋白量への影響を検討します。

▶培養細胞は、脂肪細胞のモデルとして 3T3-L1 脂肪細胞を、骨格筋細胞のモデルとして C2C12 細胞または L6 細胞を用います。

▶IRS は特にユビキチン・プロテアソームが深く関与している IRS-1 に焦点をあてます。また、対象組織は、IRS-1 のノックアウトマウスで強い抵抗性を引き起こすことが知られている骨格筋組織、及び脂肪組織を中心に検討します。

▶インスリンの濃度は 1 nM から 1000 nM までの濃度とし、IRS-1 蛋白が低下する培養条件を決定します。申請者の検討では、C2C12 細胞において 12 時間の無血清培地培養の後、12 時間のインスリン添加にて IRS-1 の蛋白量は低下することを Western 法にて確認しています。培養条件や培養時間にもよりますが、3T3-L1 細胞では 50 nM の濃度で IRS-1 の低下を来します。

▶Troglitazone の濃度は 1-100 μ M の範囲とします。我々の癌細胞における検討では、troglitazone がプロテアソーム活性を抑制する濃度は 1 μ M から有意差がついています (Takeuchi et al., Jpn J Cancer Res 93:774-782, 2002) (Motomura et al., Int J Cancer 108:41-46, 2004)。

▶Troglitazone の他、pioglitazone、rosiglitazone についても検討します。

▶TNF- α などの cytokine による IRS-1 蛋白量の低下をチアゾリジン系薬剤が防ぐことができるのかを検討します。

② メカニズムの解析：チアゾリジン系薬剤が IRS-1 蛋白量減少抑制効果を持つ場合

▶プロテアソーム活性の抑制：癌細胞で認められているプロテアソーム活性の抑制が本実験系でも認められるのか、我々の既報に準じて検討します。

▶プロテアソーム活性の抑制が認められた場合、troglitazone が核内転写因子 PPAR γ のリガンドであることを考えると、プロテアソームの component の遺伝子発現抑制に起因する可能性が考えられます。そのため、プロテアソームの component である、19S や 20S などの遺伝子発現量に関して、Realtime-PCR 法を用いて検討いたします。もし、遺伝子発現抑制に起因しない場合、薬剤による直接的な抑制効果の有無につき、無細胞系にてプロテアソーム活性を測定し検討を進めます。

▶細胞内シグナルの変化や糖取り込み作用など機能的な変化に関して検討します。これら機能的解析は、申請者の既報に準じて行います。

(2) IRS-1 特異的ユビキチンリガーゼ (E3)

の同定とその発現調節機構

① IRS-1 特異的ユビキチンリガーゼ (E3) の同定:

▶アフィニティーキャプチャー法、つまりユビキチン化された状態の IRS-1 を免疫沈降し、共沈する蛋白を解析します。

▶IRS-1 が減少した状態での培養細胞を溶解し、抗 IRS-1 抗体で免疫沈降を行い、共沈された蛋白を二次元電気泳動にて分離します。対照はユビキチン化されていない状態の IRS-1 が必要であり、インスリン無添加のサンプル、インスリン添加直後のサンプル、さらにはインスリン添加+ユビキチン化阻害剤 (E1 の阻害剤として Himeic Acid A) を添加したサンプルを用いるなど工夫を凝らします。

▶プロテオソーム解析: ユビキチン化された IRS-1 に特異的に共沈する蛋白 spot を抽出し、ゲル内で酵素消化を行い、ペプチドを抽出します。抽出されたペプチドについて、まずマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF) を用いて質量分析を行い、そのデータをもとに Mascot や MS-Tag などのデータベース検索を行い、分子を同定します。MALDI-TOF 施行に当たり、多少の技術が必要ですが、本学専任技官の協力が得られます。検索結果より、IRS-1 特異的 E3 の他に、多くの既知分子が見つかること考え、十分に検討します。また、このデータベースにて特定できない蛋白は、IRS-1 特異的 E3 の可能性があり、ペプチドシークエンス (HPLC にてペプチドを例えばエドマン分解法を用いアミノ酸配列を決定) を行い、得られたアミノ酸配列をデータベース検索し、その蛋白を同定します。

▶ユビキチンリガーゼ (E3) はその構造より、HECT 型、RING 型、U-box 型に大別されます。IRS-1 分解には SOCS の関与が言われていますが、この SOCS には elongin 結合部位が存在します。Elongin は RING 型 E3 (複合体型) の構成要素であり、IRS-1 特異的 E3 は RING 型 E3 の可能性があります。RING 型 E3 は elonginB/C、Skp1、Rbx1 の基本構成要素と、基質特異性を決定する F-box 蛋白より構成されます。この場合 IRS-1 特異的 E3 の同定は IRS-1 特異的 F-box 蛋白の同定と同義になります。IRS-1 がユビキチン化されている状態で、この elonginB/C、Skp1、Rbx1 の抗体を用いて、共沈してくる蛋白を同定し、IRS-1 で共沈する蛋白と比較することも一つの確認方法です。

② IRS-1 特異的ユビキチンリガーゼ (E3) の確認:

▶データベースサーチから、塩基配列も同定されますので、まずは RNAi 法を用いて遺伝子 knock down を行います。そしてインスリン/TNF- α による IRS-1 の分解を認めない RNAi の遺伝子が IRS-1 特異的 E3 である可能性が高いため、PCR 法にてその遺伝子を cloning します。IRS-1 特異的 E3 としての機能評価のため、過剰発現実験や、無細胞系のユビキチン化反応 (Hino et al., Mol Cell Biol 25:9063-9072, 2005) を用いて、IRS-1 のポリユビキチン化を確認します。

▶抗体を作成し、蛋白レベルでの発現を確認します。

③ IRS-1 特異的 E3 発現機構の解析、病態意義の解明

▶インスリン、TNF- α 、チアゾリジン系薬剤など、インスリン感受性・抵抗性に影響を与える物質が IRS-1 特異的 E3 の発現にどのように影響を及ぼすのか、遺伝子レベル、蛋白レベルにて検討を行います。

▶E3 を抑制すると、インスリンシグナルが増強するのではないかと予想されますが、インスリンシグナル (PI3K、PDK、AKT など) の解析、糖取り込み実験にて検証します。この検証実験手技は、現在申請者が常用している手技 (Takahashi et al., J Hepatol 41:391-398, 2004) です。また脂肪細胞においては、adiponectin、leptin、MCP-1 など adipocytokine への影響も検討します。

▶インスリン抵抗性を示す高脂肪食負荷マウスや ob/ob マウスなど代謝異常マウスにおいて、骨格筋や脂肪細胞での IRS-1 特異的 E3 の発現がどのように変化するかを、遺伝子レベル、蛋白レベルにて検討を行い、その病態意義を検討します。

(3) IRS-1 のユビキチン様蛋白修飾の探索とその病態意義の解明:

▶IRS-1 蛋白質の翻訳後修飾の解析として、ユビキチン様蛋白修飾の解析を行います。

▶培養細胞を用い、インスリン添加、TNF- α 、adiponectin、leptin、メトフォルミン、チアゾリジンなどで処置した場合に、IRS-1 にユビキチン様蛋白修飾が起こるのか、また、どのような病態と関連があるのかを検討します。

▶抗 SUMO、NEDD8 抗体など、主だったものは次々に市販されてきており、これらを用いて検討を行います。

▶目的(1)で作成済みの sample が本研究目的(3)に流用できるため、効率的に研究が進められます。

▶IRS-1 にユビキチン様蛋白修飾が認められなかった場合、IRS-1 に限定せず、他の IRS ファミリー、PI3K、AKT など、インスリンシグナル分子にまで検討範囲を広げることで、インスリンの多彩な代謝機能調節系におけるシグナル蛋白翻訳後修飾の役割を包括的に解明することができます。

4. 研究成果

(1) チアゾリジン系薬剤のプロテアソーム抑制作用：IRS-1 との関係、その機序の解明
前述の研究方法にしたがって、チアゾリジン系薬剤 (TZD) が IRS-1 蛋白量に変化を及ぼすのか、検討を行った。その結果 TZD が有意に再現性をもって IRS-1 量に影響を及ぼす結果は得られなかった。

(2) IRS-1 特異的ユビキチンリガーゼ (E3) の同定とその発現調節機構：

培養細胞にインスリンを長時間暴露させることで IRS-1 量を低下させ、得られた蛋白サンプルを抗 IRS-1 抗体にて免疫沈降を行った。沈降した蛋白を SDS-PAGE で展開し得られた蛋白スポットをゲル内消化、質量分析を行い、data base 検索 (Mascot) を行った。その結果、2つの蛋白分子を同定した。一つは細胞骨格に関わる分子、もう一つは細胞内輸送に関わる分子であった。これらの分子が実際に IRS に associate しているのかどうか、また、E3 として働くのかどうか、さらにはどのような役割を担っているのかどうかに関して、今後の課題となった。本研究結果は、持続高インスリン血症により低下する IRS-1 分子にどのような蛋白が associate しているのか明らかにすることで、新たな IRS-1 の調節分子を発見する可能性を秘めている。これは、本研究目的である、メタボリックシンドロームの病態解明や治療標的に結び付くものであると考えられる。

(3) IRS-1 のユビキチン様蛋白修飾の探索とその病態意義の解明

近年、ユビキチン様蛋白の修飾により蛋白の機能調節が行われる事が知られている。そこで、本研究では、SUMO-1、SUMO-2, 3、NEDD-8といったユビキチン様蛋白が、インスリン作用の中核をなすIRSを修飾するのか、また、機能を調節するのか検討を行った。実際にはWestern Blot法による検討で、SUMO化は検出されなかった。しかし、検出感度の問題から最終結論を導くためには更なるアッセイ系の検討が必要であ

ると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, Motomura W, Kohgo Y, Okumura T. A diacylglycerol kinase inhibitor, R59022, stimulates glucose transport through a MKK3/6-p38 signaling pathway in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 360: 244-250, 2007. (査読有)

② Tsuchiya Y, Takahashi N, Yoshizaki T, Tanno S, Ohhira M, Motomura W, Tanno S, Takakusaki K, Kohgo Y, Okumura T. A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 382: 348-352, 2009. (査読有)

[その他]

ホームページ：

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/hospital/gencli/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 伸彦 (TAKAHASHI NOBUHIKO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20372279

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし