

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460365

研究課題名(和文) 骨格筋におけるインスリン抵抗性惹起を引き起こす分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms underlying induction of insulin resistance in skeletal muscle

研究代表者

伊集院 壮 (IJUIN, TAKESHI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00361626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病は骨格筋をはじめとする末梢組織でのインスリン抵抗性の誘導とそれともなう糖代謝能の低下が原因で起こる疾患である。本研究では、ホスホイノシチドホスファターゼSKIPが、骨格筋において小胞体ストレスとインスリンシグナル、そしてインスリン抵抗性を結ぶ分子であることを初めて明らかにした。さらに、SKIPによるインスリンシグナル制御は小胞体内腔のシャペロンであるGRP78との結合に大きく依存していることを明らかにした。これはPI3キナーゼシグナルと小胞体ストレスが非常に密接に機能していることを示す全く新しい発見である。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance is characterized as a pathogenic factor in Type 2 diabetes. Here we show that skeletal muscle and kidney-enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP), a phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) phosphatase, and glucose-regulated protein 78 (GRP78) are implicated in inhibition of insulin-dependent PI 3-kinase signaling in skeletal muscle. We also show that SKIP links ER stress to insulin resistance in skeletal muscle. SKIP expression was increased due to ER stress, and was higher in the skeletal muscle isolated from high fat diet-fed mice and db/db mice than that from wild-type mice. Mechanistically, ER stress promotes activating transcription factor 6 (ATF6) and X-box binding protein 1 (XBP1)-dependent expression of SKIP. These findings underscore the specific and prominent role of SKIP in the development of insulin resistance in skeletal muscle.

研究分野：脂質シグナル

キーワード：SKIP 骨格筋 インスリンシグナル インスリン抵抗性 小胞体ストレス GRP78

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は末梢組織でのインスリン依存的な糖代謝能の顕著な低下による血糖値の上昇を引き起こす病気であり、現代では最も患者数の多い疾患の一つであると言える。糖尿病は高脂血症など多くの合併症を伴うが、遊離脂肪酸を低下させる薬剤が開発され、これらの合併症に対する治療は一定の効果が得られている。

骨格筋は全身の7割以上の糖代謝を担うことから、糖尿病の治療標的として最も適していると考えられるが、この組織でインスリン抵抗性が誘導される仕組みは明らかではなかった。他の組織では小胞体ストレスなどによりインスリンシグナル低下は顕著である一方、骨格筋ではその仕組みが機能していないことが考えられた。

SKIPは骨格筋に多く発現するPIP3ホスファターゼであり、インスリンシグナルを制御する分子である。SKIPのノックアウトマウスでは骨格筋でのインスリンシグナルの上昇と糖代謝の増加が認められる。さらにこのマウスは高脂肪食によるインスリン抵抗性の惹起に対して抵抗性を示した。従って、SKIPは骨格筋をターゲットとするインスリン抵抗性の改善に貢献する分子標的となることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、SKIPが骨格筋におけるインスリンシグナル制御を行う主要な分子であることを明らかにし、骨格筋におけるインスリンシグナル改善のターゲットとなる方法を開発することを目標に、SKIPの細胞局在制御および発現制御機序の解明を行った。

さらに、SKIPを標的とする糖代謝改善の試みを骨格筋細胞で行った。

3. 研究の方法

マウス骨格筋由来C2C12細胞およびラット骨格筋由来L6細胞を用いて、SKIPおよびGRP78の過剰発現やノックダウンの系を用いて、SKIPの細胞内局在・インスリンシグナルの活性化を免疫染色やウエスタンブロットリング法を用いて検討した。さらに、インスリン依存的な糖取り込みは取り込まれた2-デオキシグルコースはELISA法で定量する方法を用いて行った。

4. 研究成果

293F細胞にFLAGタグ付きのSKIPを過剰発現させ、FLAGタグで免疫沈降した結果、GRP78が一番多く共沈した。そこでSKIPとGRP78の組換えタンパク質を単離したところ、これらは直接結合していた(伊集院ら, *Genes Cells* 2016)。マウス骨格筋C2C12細胞で、

GRP78をノックダウンしたところ、インスリン依存的なSKIPの細胞膜への移行は顕著に抑制され、その結果インスリンシグナルが亢進した。これは小胞体ストレス応答の主要な分子であるGRP78が、インスリンシグナルを直接的に制御する新しい結果である(伊集院ら, *Biochem. Biophys. Acta.* 2015)。さらにGRP78はSKIPが小胞体に局在するのに必須であったことから、GRP78がSKIPの局在を制御することによってインスリンシグナルをコントロールしていることを明らかにした(図1)。

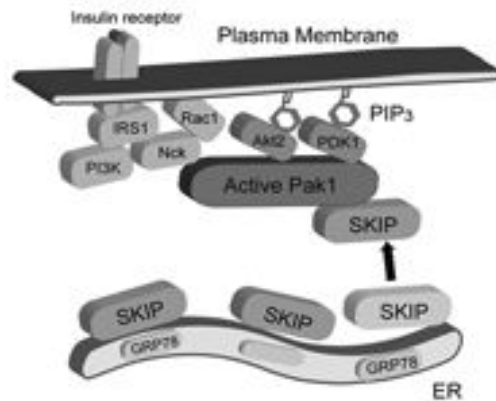


図1 SKIPとGRP78によるインスリンシグナルの制御機構

SKIPは細胞膜でアダプター分子であるPAK1と直接結合することによって、PIP3のエフェクターであるAkt2やPDK1と複合体を形成し、これらの分子を不活性化(伊集院ら, *Mol. Cell. Biol.* 2012)。そこでPAK1とSKIPとの最小限必要な結合領域である11アミノ酸を同定し、この部分を含むペプチドを細胞内に導入して、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を検討した結果、約10%のインスリンシグナルおよび糖取り込みの上昇が認められた。10%の糖取り込み能の上昇が10%の骨格筋量の上昇に匹敵するものであるため、このペプチドの導入は糖代謝能改善の非常に有効なツールとなることが期待される(伊集院、竹縄, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015)。

さらに、SKIPの発現制御メカニズムに関する検討を行った。まず、小胞体カルシウムを枯渇させて小胞体ストレスを誘導するタプシガルギンや、培地中への過剰な遊離脂肪酸の添加による小胞体ストレス誘導によって、SKIPの発現が誘導されること、高脂肪食を長期間摂取したマウスや糖尿病モデルマウスの骨格筋においてSKIP発現の増加が認められることから、SKIPは小胞体ストレス誘導によって発現が顕著に上昇することが明らかとなった。SKIP遺伝子発現に關与する転写因

子をクロマチン免疫沈降法や転写因子のノックダウンの系を用いて検討した結果、小胞体ストレス応答に關与するXBP1、ATF6がSKIPの遺伝子発現をコントロールしていることが明らかとなった。これはSKIPが骨格筋で、小胞体ストレスとインスリンシグナルをつなぐ分子であることを示唆している(伊集院ら、Mol. Cell. Biol. 2016)(図2)。

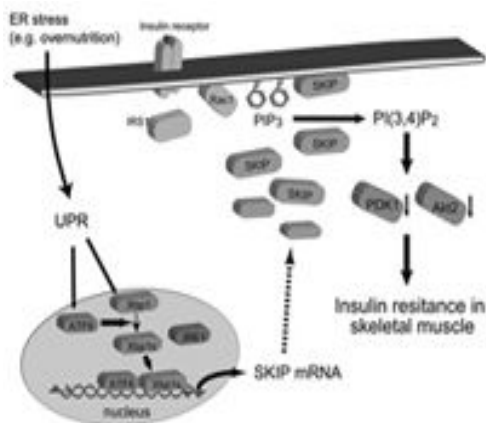


図2 小胞体ストレス依存的なSKIPの発現誘導機構

以上の結果から、SKIPが骨格筋に特有なインスリンシグナルの制御分子であり、この組織でのインスリン抵抗性と小胞体ストレスを結びつける新しい分子であることが明らかとなった。また、本研究の結果はSKIPが骨格筋のインスリン抵抗性を示す新しい指標であり、SKIPが骨格筋における糖代謝を維持するための分子標的となることを表している。PI3キナーゼシグナルと小胞体ストレスは糖尿病に限らず、がんや神経変性疾患などの病態を引き起こす際に大きく変動する因子であり、その変化は病態自体を引き起こすと言える。従って、2型糖尿病に止まらず、SKIPは新しいがん治療の標的となる可能性があり、その病態との関連も注目される。そういう意味においても本研究は非常に発展が期待できると言える。

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 7件)

田守 義和、楯谷 三四郎、伊集院 壮、西本 祐希、中島 進介、小川 渉
Negative-charged residues in the polar carboxy-terminal region in FSP27 are indispensable for expanding lipid droplets
FEBS Lett. 2016 Mar;590(6):750-9. doi: 10.1002/1873-3468.12114.

伊集院 壮、波多野 直哉、竹縄 忠臣
Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP₃ phosphatase SKIP and determines its localization
Genes Cells 2016 Mar 4. doi: 10.1111/gtc.12353

伊集院 壮、細岡 哲也、竹縄 忠臣
A PIP₃ phosphatase SKIP links endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle to insulin resistance
Mol. Cell. Biol. 2016: Vol. 36: 108-118 doi: 10.1128/MCB.00921-15.

安東 英明、広瀬 松美、Gainche L、河合 克宏、Bonneau B、伊集院 壮、伊藤 俊樹、竹縄 忠臣、御子柴 克彦
IRBIT Interacts with the Catalytic Core of Phosphatidylinositol Phosphate Kinase Type Iα and IIα through Conserved Catalytic Aspartate Residues
PLOS One 2015: 10, e0141569. doi: 10.1371/journal.pone.0141569.

伊集院 壮、波多野 直哉、細岡 哲也、竹縄 忠臣
Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP₃ phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78
Biochim. Biophys. Acta. 2015: Vol. 1853: 3192-3201. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.009.

伊集院 壮、竹縄 忠臣
Improvement of insulin signaling in myoblast cells by an addition of SKIP-binding peptide within Pak1 kinase domain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015 Vol. 456, No.1:41-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.031.

徳田 恵美、伊藤 俊樹、長谷川 純矢、伊集院 壮、竹内 由紀子、入野 康宏、福本 未記、竹縄 忠臣
Phosphatidylinositol 4-phosphate in the Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion and invasive cell migration in human breast cancer.
Cancer Res. 2014: Vol. 74, No. 11:3054-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2441.

〔学会発表〕(計 10件)

伊集院 壮、竹縄 忠臣 PIP₃ホスファターゼSKIPによるPak1を介したPIP₃の効率的な脱リン酸化機構
第55回日本脂質生化学会、2013.6.6 松島大観荘(宮城県)

伊集院 壮、竹縄 忠臣 Pak1のscaffold機能を介したPI3キナーゼシグナルの終結機構
第65回日本細胞生物学会、2013.6.19 ウィンク愛知(愛知県)

伊集院 壮、竹縄 忠臣 骨格筋におけるインスリンシグナルの時空間制御
第 86 回日本生化学会、2013.9.11 パシフィコ横浜（神奈川県）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 インスリンシグナル終結におけるプロテインホスファターゼとホスホイノシチドホスファターゼの時空間的な制御
第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.21 三重大学（三重県）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 ホスホイノシチドホスファターゼによる骨格筋におけるインスリンシグナルの空間的な制御機構
第 56 回日本脂質生化学会、2014.6.8 近畿大学（大阪府）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 Pak1 acts as a scaffold function of protein phosphatases and phosphoinositide phosphatase in the negative regulation of growth factor signaling
第 11 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス、2014.11.12 東北大学（宮城県）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 ホスホイノシチドホスファターゼ SKIP による新しい PI(4)P 産生経路の解明
第 57 回日本脂質生化学会、2015.5.28 一橋大学一橋講堂（東京都）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 細胞表面に存在する分子シャペロン GRP78 による PI3 キナーゼシグナル制御機構
第 67 回日本細胞生物学会、2015.6.30 タワーホール船堀（東京都）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 PAK1 キナーゼドメイン中の PIP3 ホスファターゼ SKIP 結合領域ペプチドを用いたインスリン感受性改善への試み
BMB2015、2015.12.4 神戸国際会議場（兵庫県）

伊集院 壮、竹縄 忠臣 ホスホイノシチドホスファターゼ SKIP は骨格筋でのインスリン抵抗性を惹起する
第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2016.1.30 自然科学研究機構（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊集院 壮 (IJUIN, Takeshi)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00361626

(2) 研究分担者

()
研究者番号：
(3) 連携研究者
()
研究者番号：