

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560397

研究課題名(和文) 糖尿病病態における解糖系代謝物の関与：新規インスリン抵抗性獲得モデルの立証

研究課題名(英文) Involvement of glycolytic metabolite in pathogenic mechanism of diabetes: verification of new model of insulin-resistance development

研究代表者

野村 亘 (Nomura, Wataru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60724292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系の代謝物であるメチルグリオキサルは、糖尿病との関連が指摘されているが、その因果関係はよくわかっていない。インスリン抵抗性の要因のひとつにIRS-1(インスリン受容体基質)のSer/Thr残基のリン酸化がある。本研究では、脂肪細胞においてメチルグリオキサルがmTORC1-S6K経路を介してIRS-1のリン酸化を亢進することを見出すとともに、メチルグリオキサールの前処理は、インスリンによるインスリンシグナル伝達経路の活性化を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：It is pointed out that the methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis, is involved in diabetes, although the correlation between pathogenic mechanism of diabetes and methylglyoxal is unclear. The phosphorylation at Ser/Thr residues of IRS-1 (insulin receptor substrate) is one of the causes of insulin resistance. In this study, I found that the phosphorylation of IRS-1 is enhanced following treatment with methylglyoxal in adipocytes, and the pretreatment with methylglyoxal attenuates the activation of insulin signaling pathway.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：メチルグリオキサル インスリンシグナル インスリン抵抗性 IRS-1 mTORC1

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病患者の約95%は2型糖尿病である。2型糖尿病の主な要因の一つとして『インスリン抵抗性』がある。インスリン抵抗性とは、インスリンの標的細胞においてインスリンに対する感受性が低下している状態を指す。インスリンシグナル伝達経路において、インスリン刺激はインスリン受容体によるIRS-1(インスリン受容体基質)のTyr残基のリン酸化を亢進し、PI3キナーゼ、ならびにPDKの活性化を介してAktを活性化する。Aktはグルコース輸送体GLUT4の細胞膜輸送を引き起こすとともに、mTORC1-S6K経路を活性化し、タンパク質合成を促進する。

メチルグリオキサール(MG、CH<sub>3</sub>COCHO)は解糖系から派生する典型的な2-オキソアルデヒドであり、解糖系を有する生物種において広くその存在が認められている。以前からMGと糖尿病との関連が指摘されており、2型糖尿病患者では血中のMGレベルが健常者の4~6倍に上昇している。しかしながら、MGと糖尿病病態との因果関係、ならびにMGの作用機構に関わる詳細なメカニズムについては、未だ不明な部分が多い。

私はこれまでに、主に酵母を用いた解析により、MGが細胞内のシグナル伝達経路の活性化に関わることを見出している。そこで本研究では、MGのシグナルイニシエーターとしての機能が、糖尿病病態の増悪化に及ぼす影響について、特にインスリン抵抗性への関与に着目して検討することにした。

## 2. 研究の目的

細胞内シグナル伝達機構は、細胞の恒常性を維持するために、その活性化は厳密に制御されている。インスリンシグナル伝達経路においても、長期にわたる過度な活性化を抑制するために、負のフィードバック機構が存在することが知られている。インスリンシグナル伝達経路における負のフィードバック機構の一つとして、mTORC1-S6K経路によるIRS-1のSer/Thr残基のリン酸化がある。IRS-1のSer/Thr残基のリン酸化は、IRS-1とインスリン受容体との結合を阻害することでインスリンシグナル伝達経路の遮断に関与する。

私は、代謝性のシグナル因子としてのMGの機能を解析している過程で、MGがS6KのThr389のリン酸化を亢進することを見出し、MGがmTORC1-S6K経路を活性化することを発見した。

これらのことから、『高MGレベルが常態化している2型糖尿病患者では、mTORC1-S6K経路の恒常的な活性化を介してインスリン抵抗性になっているかもしれない』という着想に至った。そこで本研究では、MGによるmTORC1-S6K経路の活性化

が、インスリン抵抗性様の作用を引き起こすかどうかを検証することで、解糖系代謝物であるMGによる新しいインスリン抵抗性獲得機構の存在を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪細胞の培養

マウスの前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化は、従来の方に従って行った(J. Lipid. Res. 52, 873-884, 2011)。すなわち、コンフルエントになった3T3-L1細胞を2日間培養した後、10 µg/ml insulin、0.25 µM dexamethasone、0.5 mM isobutylmethylxanthineを含む分化誘導培地で48時間培養を行った。その後、2日ごとに5 µg/ml insulinを含む分化促進培地で培地交換を行うことで脂肪細胞へと分化させた。

### (2) タンパク質サンプルの調製

分化させた脂肪細胞を5時間の血清枯渇条件下に置いた後、MGあるいはインスリンなどを添加した後、lysis bufferを用いて細胞を回収し、遠心上清をタンパク質サンプルとして、ウェスタンブロッティング解析に使用した。

## 4. 研究成果

### (1) IRS-1のSer/Thr残基のリン酸化レベルに及ぼすMGの影響

MGがインスリンシグナル伝達経路の負のフィードバック機構を活性化するかどうかについて、IRS-1のSer残基のリン酸化を指標にして解析した。

インスリンシグナル伝達経路の負のフィードバック機構において、mTORC1-S6K経路はIRS-1のSer307やSer632をリン酸化することによりIRS-1を負に制御する(Nature 431, 200-205, 2004)。そこで、培地へのMGの添加により、IRS-1の各Ser残基のリン酸化が亢進するかどうか、それぞれのリン酸化特異的抗体を用いて検討した。その結果、MGの添加によりIRS-1のSer307、Ser632のリン酸化レベルが亢進することを見出した。

また、mTORC1の阻害剤として知られるラパマイシンの添加により、MGによるS6KのThr389のリン酸化レベルの亢進は起こらなくなるとともに、MGによるIRS-1のSer307およびSer632のリン酸化レベルの亢進も抑制された。これらのことから、MGはmTORC1-S6K経路の活性化を介して、IRS-1のSer残基のリン酸化を亢進することが明らかとなった。

### (2) MGの前処理がインスリン刺激によるシ

### グナル伝達経路の活性化に及ぼす影響

4-1の結果より、MGが負のフィードバック機構を活性化させていることが示唆された。そこで次に、MGの前処理がインスリン刺激によるインスリンシグナル伝達経路の活性化に及ぼす影響について検証することにした。

インスリンシグナル伝達経路の活性化の指標としては、インスリン刺激に応答することが知られるAktのSer473、およびFoxO1/3のThr24/32のリン酸化レベルを用いた。MGの前処理による影響を検討した結果、インスリン刺激によるAktおよびFoxO1/3のリン酸化レベルの亢進は、MGの前処理により抑制された(図1)。このことから、MGはインスリン抵抗性様の作用を引き起こすことが示唆された。さらに、このインスリン抵抗性様の作用は、ラパマイシンの添加によって回復したことから、MGが引き起こすインスリン抵抗性様の作用において、MGによるmTORC1-S6K経路の活性化が必要であることが示唆された。

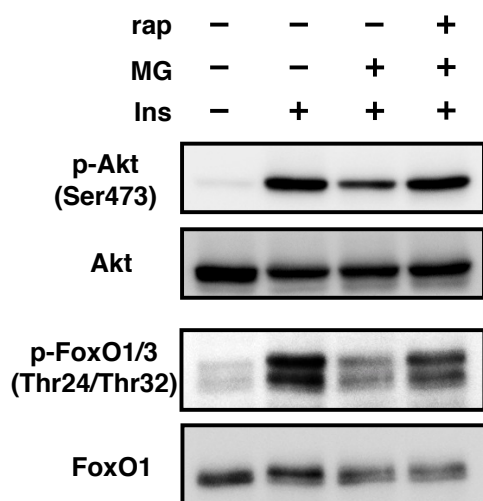


図1. MGの前処理がインスリン刺激によるインスリンシグナル伝達経路の活性化に及ぼす影響

(Ins: インスリン、rap: ラパマイシン)

### (3) MGによるmTORC1-S6K経路の活性化機構の探索

mTORC1-S6K経路の活性化機構としては、インスリン等の成長因子によるAktを介した経路や、アミノ酸によるRag/Ragulatorを介した経路などが存在する。

私はこれまでに、MGがmTORC2-Aktシグナル経路を活性化することを見出している。そこで、MGがどのようにしてmTORC1-S6K経路を活性化しているのかについて、まず始めにAktを介した経路に着目して解析を行った。Aktの阻害剤であるAkt inhibitor VIIIを用いた結果、期待に反してAkt阻害剤は、MGによるS6KのThr389の

リン酸化の亢進に影響を及ぼさなかった。また、Aktを介したmTORC1-S6K経路の活性化は、TSC2のThr1462のリン酸化を伴うことが知られているが、MGはTSC2のThr1462のリン酸化を亢進することはなかった。インスリン等の刺激はPDK1およびmTORC2を介してAktの活性化を引き起こすが、MGの場合はmTORC2経路のみを活性化していると考えられる。すなわち、MGによるmTORC2-Akt経路の活性化は、mTORC1-S6K経路の活性化に寄与していないと考えられた。

次に、アミノ酸によるmTORC1-S6K経路の活性化機構に着目した。これまでに、アミノ酸によるmTORC1-S6K経路の活性化機構には、hVPS34と呼ばれるクラスIIIのPI3-キナーゼが関与することが知られている。そこで、クラスIIIのPI3-キナーゼを阻害するwortmanninを用いて検討した結果、MGによるS6KのThr389のリン酸化の亢進は、wortmanninの添加によって抑制されることが認められた。このことから、MGはhVPS34の関わる機構を介して、mTORC1-S6K経路の活性化を引き起こしている可能性が考えられた。

以上のことから、MGはmTORC1-S6K経路の活性化依存的にIRS-1のSer残基をリン酸化することで、インスリン刺激によるインスリンシグナル伝達経路の活性化を抑制し、インスリン抵抗性様の作用を引き起こすことが示唆された。これらのことは、MGと糖尿病との関連において、MGが糖尿病病態の増悪化に関わる可能性を示唆しているが、今後、マウスなどを用いた個体解析などを行うことで、個体レベルでMGがインスリン抵抗性に及ぼす影響について検証する必要がある。

### 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 2件)

- ① 野村 亘、井上善晴 (2016) 代謝ストレスによるTORシグナルの活性化 化学と生物、査読有、54、273-280
- ② Nomura, W., and Inoue, Y. (2015) Methylglyoxal activates target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 査読有、35、1269-1280  
DOI: 10.1128/MCB.01118-14.

[学会発表] (計 4件)

- ① 野村 亘、井上善晴  
「Protein kinase C-dependent

phosphorylation of Rho GTPase-activating protein Rgd1 in yeast」、第 38 回日本分子生物学会年会  
第 88 回日本生化学会大会 合同大会、  
2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸

(3) 連携研究者  
該当なし

- ② 野村 亘、井上善晴  
「Pkc1 のリン酸化状態における turn motif の役割」、酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会、2015 年 8 月 31 日～9 月 2 日、広島大学
- ③ 福井健人、野村 亘、井上善晴  
「酵母 Pkc1 の構成的活性化変異体の過剰発現が細胞死とキチン含量に及ぼす影響」、第 62 回日本生化学会近畿支部例会、2015 年 5 月 16 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス
- ④ 野村 亘、河田照雄、井上善晴  
「TORC2-Pkc1 シグナル経路の DNA 損傷応答への関与」、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会、2014 年 9 月 1 日～3 日、東京大学

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村 亘 (NOMURA, Wataru)  
京都大学・大学院農学研究科・研究員  
研究者番号： 6 0 7 2 4 2 9 2

### (2) 研究分担者

該当なし