

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590254
 研究課題名（和文） GSK-3 β 活性による神経インスリン受容体シグナル分子群発現・リン酸化調節機構
 研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of expression and phosphorylation levels in neuronal insulin signaling molecules by GSK-3 β activity.
 研究代表者
 横尾 宏毅（YOKOO HIROKI）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授
 研究者番号：30332894

研究成果の概要：培養神経系細胞系において、Glycogen synthase kinase 3 β （GSK-3 β ）活性を抑制すると、インスリン受容体細胞膜発現が減少すること、一方、GSK-3 β 活性を回復させると受容体発現は増加に転じた。GSK-3 β 活性は、神経細胞において適正なインスリン受容体シグナルを保持するために不可欠なものであり、それによって細胞の構造・機能が保たれていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：薬理学、神経科学、シグナル伝達、発現制御、受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) に関する研究開始当初の背景
 神経細胞に豊富に存在するセリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素 GSK-3 β は、構成的活性を有し、シグナル伝達分子 (e.g. グリコーゲン合成酵素)、転写調節因子 (e.g. β -catenin)、翻訳開始因子 eIF2B、細胞骨格蛋白 (e.g. タウ蛋白質) 等、多くの基質蛋白質をリン酸化/不活性化している。しかし、インスリン、insulin-like growth

factor I (IGF-I)、Wnt など細胞外からのシグナルを受け、GSK-3 β Ser⁹ がリン酸化/不活性化されると、それまで抑制されていた多くの基質蛋白質は活性化し、多彩な生理作用を示すようになる [Jope and Johnson (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem Sci 29:95-102]。一方、GSK-3 β 構成的活性そのものも、細胞生存に不可欠であり、ノックアウトマウス表現型は、肝細胞のアポトーシスにより、胎生期致死を示す [Hoeflich et al. (2005) Requirement

for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. Nature 406:86-90.]. さらに、GSK-3 β 活性制御は、神経細胞の極性形成に必要である。胎生期ラットの培養海馬神経細胞において、GSK-3 β 恒常的活性化型変異体を過剰発現させると、通常細胞に生じる軸索は、形成されなかった。一方、活性阻害薬により GSK-3 β 活性を抑制すると、本来一本でなければならぬ軸索は、複数本形成された [Jiang et al. (2005) Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. Cell 120: 123-135.]. 以上のことから、GSK-3 β は、神経細胞が回路網を構築、機能を発揮するためには、適切な時期、適切な場所に局在し、適正な活性量を保持していることが、必要と考えられていた。

(2) 神経インスリン受容体シグナル変動に関する研究開始当初の背景
脳・神経細胞において、インスリン受容体シグナルは、軸索の伸長、髄鞘形成、シナプス形成など、神経回路網を構築し、学習・記憶能力を向上、細胞寿命を延伸させること [Wada et al. (2005) New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. J Pharmacol Sci 99:128-143]、インスリン受容体シグナル伝達分子の発現量と機能は、加齢、糖尿病 (Diabetic encephalopathy)、神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病など) において、低下していること [Gispes and Biessesles (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci 23:542-549; Carro and Torres-Aleman (2004) The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. Eur J Pharmacol 490:127-133] などが報告されていた。

(3) GSK-3 β は、インスリン受容体シグナル伝達分子群の一つ Akt によってリン酸化・制御されるが、Growth factor 等によって活性化された PKC、PKA、p90^{RSK} からのシグナルによっても、制御されている。ところが、各種シグナルを受けて活性が変動する GSK-3 β が、神経インスリン受容体シグナルそのものに及ぼす影響、特に、シグナル分子群の発現レベル・リン酸化レベルについての、時間・日単位の調節機序に関する研究は、未開拓の分野であった。

2. 研究の目的

(1) GSK-3 β 活性がインスリン受容体、Insulin-like growth factor I receptor、phosphoinositide 3-kinase/Akt 経路上のシグナル分子群の発現や活性に与える影響について、シグナル分子群の発現量の変化・リン酸化レベルの変化およびその調節機構の分子基盤を解析する。

(2) 病態モデルにおける GSK-3 β 活性およびインスリン受容体シグナル分子群の発現・リン酸化レベルについて解析し、GSK-3 β 活性制御が生体内の神経回路網に対してどのような役割を果たしているのか、検討する。

3. 研究の方法

(1) ウシ副腎髄質クロマフィン細胞培養系を用いての解析
発生学的に神経堤に由来する細胞の培養系において、GSK-3 β 阻害薬 (lithium、valproic acid、SB216763、SB415286)、インスリン、成長因子など、GSK-3 β 活性に影響を及ぼす薬物及び生理活性物質をメディアウム中に添加し、短時間、及び長時間暴露させる。以後、インスリン受容体シグナル分子群の発現量、機能の変化を、解析していく。

① ¹²⁵I-Insulin 結合実験、¹²⁵I-IGF-I 結合実験を行い、細胞膜受容体の量的・質的変動、結合のカイネティクスを測定する。

② インスリン受容体シグナル分子について、蛋白質発現量およびリン酸化レベルを、ウェスタン・ブロット法および免疫沈降法を用いて解析する。

③ 蛋白質発現量に変化を認めたシグナル分子については、mRNA 量をノーザン・ブロット法を用いて測定する。また、mRNA 量に変化した場合は、nuclear run-on assay 法により遺伝子転写率を測定する。

(2) 病態動物モデルを用いての解析
全身性炎症マウスモデルにおいて、GSK-3 β 活性およびインスリン受容体シグナル分子群の発現量、リン酸化レベルを解析する。

① マウスに盲腸結紮穿孔術 (cecal ligation and puncture: CLP) を施行することで、臨床像に類似した多菌性敗血症病態を作成し解析を行う。

② モデルマウス作成後からの経過時間に伴い、脳神経を中心に各種臓器サンプルを作成する。また、抗炎症、抗インスリンシグナルを有する試薬は、適時腹腔内投与するなどして、シグナル伝達分子に及ぼす影響を解析していく

③ 上記(1)の細胞培養系での解析と同様に、

ウェスタン・ブロット法等の分子生物学的手法を用いて、コントロール群との比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) 培養副腎髄質クロマフィン細胞に各種 GSK-3 β 活性阻害薬処置を行うと、細胞膜インスリン受容体発現が減少した (図 1)。さらに、ウェスタン・ブロット解析を行うと、GSK-3 β 阻害薬処置により、インスリン受容体蛋白質発現量が、経時的にかつ阻害薬の濃度依存的に減少していた (図 2)。

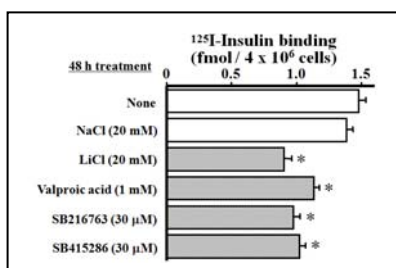


図 1

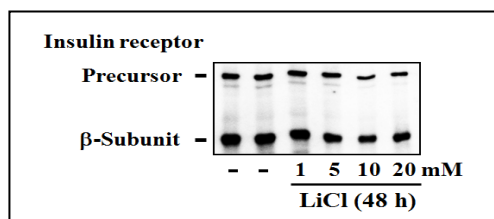


図 2

(2) 培養副腎髄質クロマフィン細胞に GSK-3 β 阻害薬であるリチウム処置を行うと、GSK-3 β セリン残基のリン酸化が生じ、GSK-3 β 活性が抑制されることが示唆された (図 3)。その際のインスリン受容体細胞膜発現量を解析すると、GSK-3 β のリン酸化増加とは対称的に、膜発現量は減少した (図 4)。さらに、リチウム処置細胞をノーマルメディアウムで洗浄・置換すると、GSK-3 β のリン酸化は減少し、GSK-3 β の活性が回復することが示唆されたが (図 3)、このときのインスリン受容体細胞膜発現量は、増加に転じていた (図 4)。GSK-3 β 活性が抑制されると細胞膜インスリン受容体発現が減少、インスリン受容体シグナルが減ることが示唆された一方で、GSK-3 β の構成的活性は、神経系細胞においてインスリン受容体細胞膜発現を保持することによって、細胞にとって適正なインスリン受容体シグナルを維持するという重要な役割をはたしていることが示唆された。

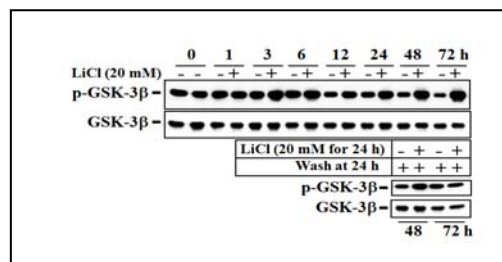


図 3

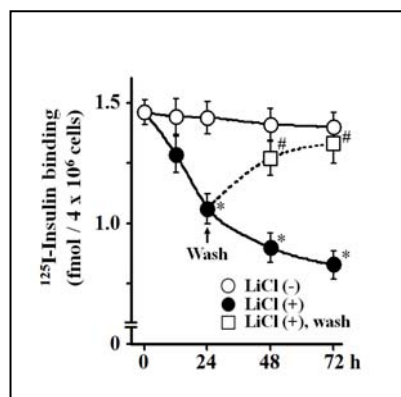


図 4

(3) 培養副腎髄質クロマフィン細胞における GSK-3 β 阻害薬リチウム処置がインスリン受容体発現を減少させる細胞内メカニズムを探索するために、インスリン受容体 mRNA 量の変化を、ノーザン・ブロット法等を用いて解析した。インスリン受容体 mRNA 量は、時間経過とともに減少した (図 5)。また、遺伝子転写率測定には影響なかったことから、GSK-3 β 活性は、インスリン受容体 mRNA 量の安定性に関与して、インスリン受容体発現を調節していることが示唆された。

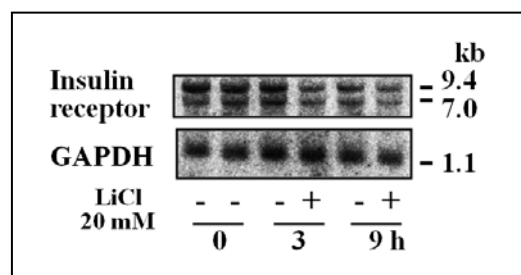


図 5

(4) GSK-3 β 活性阻害はインスリン受容体発現を減少させるが、実際にインスリン受容体シグナルを減少させているのかについて、GSK-3 β 阻害薬処置細胞とコントロール細胞とにおいて、インスリン刺激による受容体リン酸化レベルを比較解析した。GSK-3 β 阻害

薬処置細胞では、インスリン刺激インスリン受容体リン酸化レベルは減少していた(図6)。

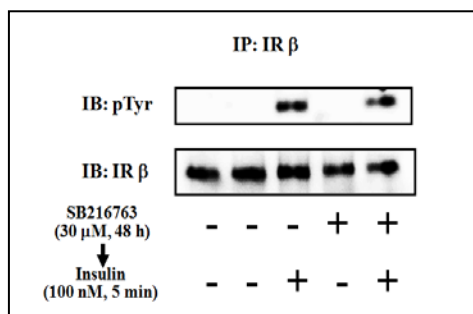


図6

(5) 全身性炎症マウスモデル、CLP マウスにおける解析。
各種病態において、GSK-3β 活性およびインスリン受容体シグナルとの間には、どのような関係があるか、動物モデル脳組織におけるGSK-3β をはじめとするインスリン受容体シグナル分子のリン酸化レベルを検討した。CLP マウスモデル脳組織においては、Akt、GSK-3β といったシグナル分子のリン酸化は、CLP 施術後に増加した(図7)。一方、心臓、血管といった末梢組織では、インスリン受容体シグナルは減少していた。全身性病態モデルについては更なる解析を必要とするが、脳組織は末梢組織と異なり GSK-3β はリン酸化/不活性化されており、それによって、炎症反応から組織を保護する機構が備わっている可能性が示唆された。

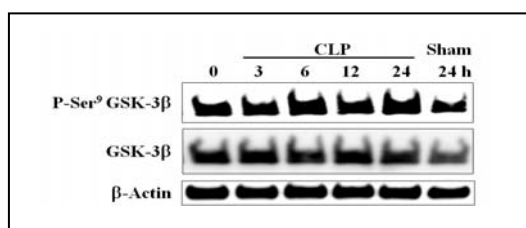


図7

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 4 件)

- ①_r Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol. Ther.* 120: 333-339, 2008, 査読有.

- ②_r Kamiyama K, Matsuda N, Yamamoto S, Takano Y, Yamazaki H, Takano K, Kageyama S, Yokoo H, Nagata T, Hatakeyama N, Tsukada K, Hattori Y. Modulation of glucocorticoid receptor expression, inflammation, and cell apoptosis in septic guinea-pig lungs using methylprednisolone. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295: L998-L1006, 2008, 査読有.
- ③_r 山崎夕、薄井勲、横尾宏毅、服部裕一、戸邊一之、新時代の糖尿病学(1)-病院・診断・治療研究の進歩-B. 糖尿病基礎研究の進歩 I. 糖代謝とその調節、臓器における糖代謝とその調節、中枢神経、日本臨牀、66: 300-303, 2008, 査読無.
- ④_r Yokoo H, Nemoto T, Yanagita T, Satoh S, Yoshikawa N, Maruta T, Wada A. Glycogen synthase kinase-3β: homologous regulation of cell surface insulin receptor level via controlling insulin receptor mRNA stability in adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 103: 1883-1896, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 横尾宏毅、富田賢吾、Wu Qiang、高野健一、山本誠士、薄井勲、山崎弘美、戸邊一之、服部裕一: 多菌性敗血症マウスモデルにおいて、中枢インスリンシグナル機構は増大している. 第82回日本薬理学会年会. 2008. 3. 18. (会期16~18日) 横浜市.
- ② 高野健一、富田賢吾、山本誠士、横尾宏毅、高野康雄、服部裕一: マウス多菌性敗血症モデルにおいて、ピタバスタチンは肺炎を軽減させ、生存予後を改善する. 第82回日本薬理学会年会. 2008. 3. 16. (会期16~18日) 横浜市.
- ③ Kageyama S, Matsuda N, Kageyama N, Yamamoto S, Takano K, Fukuoka J, Yokoo H, Hattori Y. Up-regulation of death receptors contributes to high glucose-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells. The 6th Korea-Japan Joint Symposium on vascular Biology and The 16th Annual Meeting of Japan Vascular Biology and Medicine Organization JOINT MEETING 2008. 12. 3-5. Kanazawa, Japan.
- ④ 影山俊一郎、松田直之、影山夏子、山本誠士、高野健一、福岡順也、横尾宏毅、服部裕一: ヒト冠状動脈内皮細胞の高血糖によるアポトーシス誘導にはデスレセプター高発現が関与する. 第18回日本循環薬理学会. 2008. 11. 21. 千葉市.

- ⑤ 高野健一、富田賢吾、山本誠士、横尾宏毅、高野康雄、服部裕一：敗血症性急性肺損傷の組織学的変化に対するスタチンの効果. 第59回日本薬理学会北部会. 2008. 9. 27. 仙台市.
- ⑥ 横尾宏毅、鄔強、高野健一、富田賢吾、山本誠士、薄井勲、戸邊一之、服部裕一：敗血症モデルマウス脳組織におけるインスリンシグナル変動. 第59回日本薬理学会北部会. 2008. 9. 27. 仙台市.
- ⑦ 神山公希、松田直之、山本誠士、高野健一、影山俊一郎、山崎弘美、横尾宏毅、長田拓哉、梶山登、塚田一博、服部裕一：モルモット急性肺傷害におけるグルココルチコイド受容体の発現. 敗血症性肺傷害に対する大量ステロイド療法の弊害. 第58回日本薬理学会北部会. 2007. 9. 29. 札幌市.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 宏毅 (YOKOO HIROKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学) ・
准教授

研究者番号：30332894