

機関番号：16010

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390095

研究課題名（和文） インスリンシグナル伝達の分子機構と糖尿病

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of
Insulin signal transduction and diabetes mellitus

研究代表者

蛭名 洋介 （ EBINA YOUSUKE ）

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：00112227

研究成果の概要（和文）：

AS160はインスリンシグナル伝達のAktの下流にあり、GLUT4のトランスロケーションに関与すると報告されている。我々は、GαqPCRの活性化によってもGLUT4のトランスロケーションが起こること、またGαqPCRの活性化はAMPKを介してAS160をリン酸化することを見出した。AS160はインスリン及びGαqPCR活性化により引き起こされるGLUT4トランスロケーションの共通のシグナル伝達因子である。

研究成果の概要（英文）：

Akt substrate of 160kDa (AS160) is a Rab GTPase activating protein (GAP) and was recently identified as a component of the insulin signaling pathway of glucose transporter type 4 (GLUT4) translocation. We and others, previously reported that the activation of Galphaq protein-coupled receptors (GalphaqPCRs) also stimulated GLUT4 translocation and glucose uptake in several cell lines. Here, we report that the activation of GalphaqPCRs also promoted phosphorylation of AS160 by the 5'-AMP activated protein kinase (AMPK). Rat 3Y1 cells lacking AS160 did not show insulin-induced GLUT4 translocation. The cells stably expressing GLUT4 revealed GLUT4 vesicles that were mainly localized in the perinuclear region and less frequently on the cell surface. After expression of exogenous AS160, GLUT4 on the cell surface decreased and GLUT4 vesicles were redistributed throughout the cytoplasm. Although PMA-induced or sodium fluoride-induced GLUT4 translocation was significantly increased in these cells, insulin did not affect GLUT4 translocation. These results suggest that AS160 is a common regulator of insulin- and GalphaqPCR activation-mediated GLUT4 distribution in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

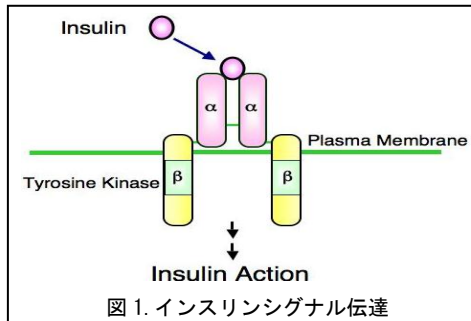
キーワード：分子病態学，インスリンシグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

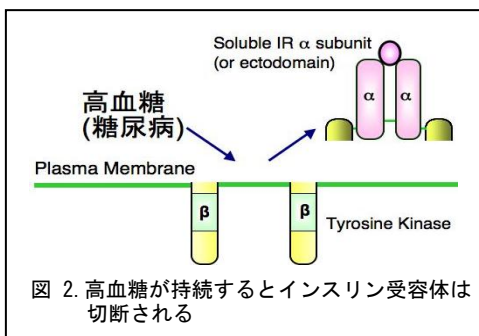
研究の背景

インスリンは生体必須のホルモンであり、その作用メカニズムを解明することは極めて重要な課題である。我が国には約 740 万人の 2 型糖尿病患者と約 880 万人の「糖尿病予備軍」がおり、4 大疾患の 1 つに指定されており、成人の 6 人に 1 人が糖尿病かその予備軍である。それは標的細胞のインスリン作用不全に 1 つの主な原因があると考えられており、その病因の解明が緊急の課題となっている。

申請者らは、世界に先駆け、インスリン受容体 cDNA を単離した(図 1)(Cell, 1985. Ebina *et al.*)。

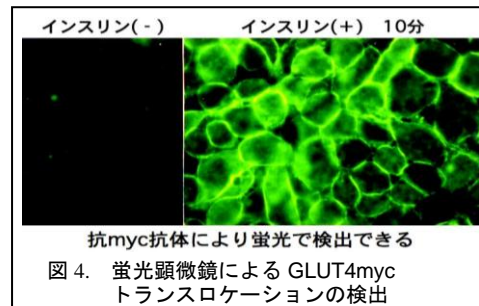
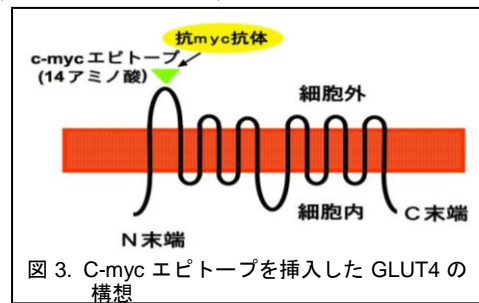


そして、インスリン受容体のチロシンキナーゼ活性がインスリン作用発現に必須であることを証明し(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987.), 受容体遺伝子上でチロシンキナーゼドメインが欠失している糖尿病患者を発見した(Science, 1989)。また、インスリンの「細胞内へのグルコース取り込み促進」作用には、PI 3-キナーゼの活性化が必須であることを世界に先駆けて報告した(BBRC, 1993., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995.)。さらにその下流の Akt2 がこの作用発現に重要であることを RNAi の手法を用い明らかにした(J.Biol. Chem., 2003)。また、2 型糖尿病発症には、「肝臓におけるインスリン作用不全」が重要であることを見出した(Nature Genetics, 1998)。最近、糖尿病患者の血清中にはインスリン受容体の細胞外ドメイン (αサブユニット [イン



スリン結合ドメイン] と βサブユニットの一部) が切断され、遊離していることを世界で初めて発見した (図 2, Diabetes, 2007)。高血糖が持続すると血中に多くのインスリン受容体 αサブユニットが遊離され、それは血中インスリンと結合し、インスリン作用を阻害し、さらに糖尿病状態を悪化させると考えられる。この発見は糖尿病研究に全く新しい展開を与えるものである。

1) インスリン作用の中で最も重要なものの 1 つが、膜を 12 回貫通する GLUT4 (Glucose Transporter Type 4; インスリン反応性グルコーストランスポーター) のトランスロケーションと、その結果起こるグルコースの細胞内への取り込み促進である。申請者らは世界で初めて、GLUT4 のトランスロケーションを定量的に測定する画期的な方法を考案した(J.Biol.Chem., 1993) (図 3,4)。



この新しい方法論により GLUT4 トランスロケーションには、PI3-キナーゼと Akt2 の活性化が必須であること、GLUT4 はインスリンによりのみ制御されると考えられていたが、三量体 G タンパクの Gq を活性化するような生理活性物質によってもおこることを発見した (図 5) (J.Biol.Chem., 1996, Diabetes 1998)。申請者らは Gq 共役受容体刺激によって、AMP protein kinase (AMPk) が活性化されることを初めて見出した(B.B.R.C.2000)。この酵素はインスリン刺激によっては活性化されず、細胞内の高分子合成を抑制し、ATP を生産する方向に細胞内代謝を向かわせる key enzyme である。インス

リンにより取り込まれたグルコースは **anabolic** に (エネルギーの貯蔵)、**Gq** 共役受容体を介して取り込まれたグルコースは **catabolic** に (その臓器の機能のためのエネルギー源) 代謝され、同じ取り込まれたグルコースでもその代謝運命は異なると考えられた (図 6)。Akt の基質であり、GLUT4 のトランスロケーションに関与すると報告された AS160 (Akt Substrate 160kDa ; Rab GTPase activating domain を持つ) は、ノルエピネフリンやブラジキニン刺激でもリン酸化されることを、近年申請者らは発見した。AS160 がインスリンおよび Gq 活性化により共通のシグナル伝達因子となっている可能性が高いと考えられる (図 6)。

- 2) 申請者らは糖尿病患者ではインスリン受容体の細胞外ドメインが切断され、インスリン結合部位である α サブユニットが血清中に遊離され増量することを世界で初めて発見した (図 2) (Diabetes, 2007)。そしてこの現象は糖尿病モデルマウスでも起こる。この発見は糖尿病研究に全く新しい展開を与えるものであると考えられる。

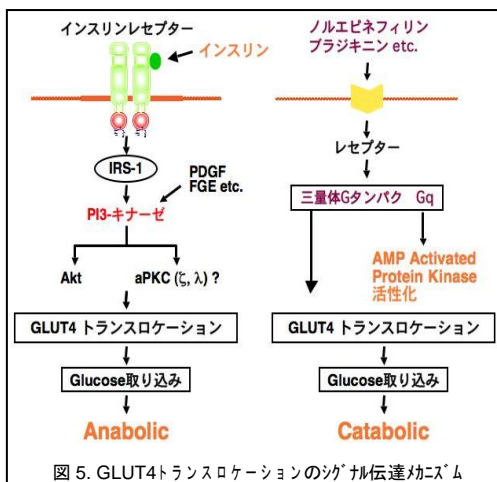


図 5. GLUT4トランスロケーションのシグナル伝達メカニズム

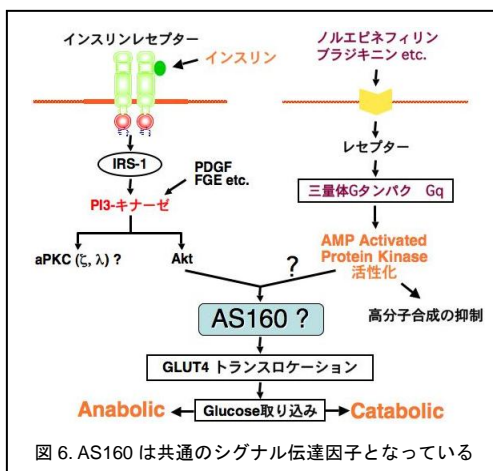


図 6. AS160 は共通のシグナル伝達因子となっている

2. 研究の目的

研究の目的

本研究は下記の事項を明らかにすることを目的とした。

1. インスリンにより活性化された Akt2 は、AS160 をリン酸化し、その先どのような分子メカニズムで GLUT4 のトランスロケーションを引き起こすのか明らかにする。
2. 三量体 G タンパクを介するグルコース取り込み促進作用 (GLUT4 トランスロケーション) は従来の Gq → PLCβ → PKC の経路を介さない。Gq 活性化による AS160 のリン酸化のシグナル伝達のメカニズムを明らかにする。
3. 高血糖になるとどのような分子メカニズムでインスリン受容体細胞外ドメインが切断されるのか解明し、また糖尿病悪化との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

AS160 欠失細胞 (3Y1 細胞) とセミインタクト細胞の手法を用いた、新たなインスリンシグナル伝達因子の発見。

申請者のグループは 1998 年、ラット 3Y1 細胞がインスリン刺激で GLUT4 のトランスロケーションが起こらないが、この細胞を NaF や PMA で刺激すると GLUT4 のトランスロケーションが起こることから、インスリンシグナル伝達因子の何かが欠失していると予想され報告した (J.Biol.Chem. 1998)。最近申請者らは、この細胞では Akt の基質であり GLUT4 のトランスロケーションに関与していると報告されている AS160 が欠失していることを見出した (図 7) (未発表)。

しかし、この細胞で AS160 を安定に発現させても [3Y1 (AS160) 細胞]、GLUT4 の細胞内局在が変化するが、インスリン刺激でトランスロケーションは引き起こされない事が判明した。3Y1 細胞は AS160 下流の因子、または新たなシグナル伝達因子の欠失が考えられた。

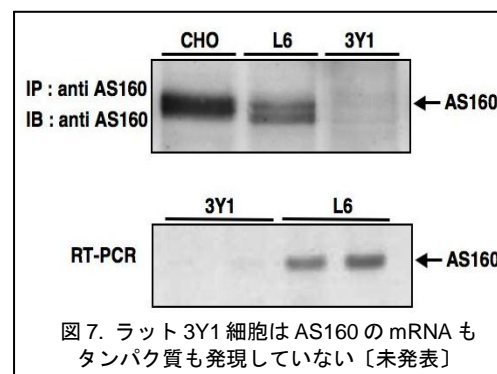


図 7. ラット 3Y1 細胞は AS160 の mRNA もタンパク質も発現していない [未発表]

(1) AS160 下流の新規必須因子の同定

(a) セミンタクト細胞の調製

AS160 下流因子、または新たなインスリンシグナル伝達因子欠損 3Y1 (AS160) 細胞をストレプトリシン-O で処理し細胞膜を透過性としたセミンタクト細胞を調製する。GLUT4 トランスポーターを担う細胞内膜輸送機構を維持した状態で膜透過処理を行うことが本研究における鍵となるが、このセミンタクト細胞調整条件についてはすでに決定している。

(b) 白色脂肪細胞細胞質成分の分画

インスリン刺激下の白色脂肪細胞より調製した細胞質成分をゲルろ過により分画する。さらに分画が必要な場合には、ゲルろ過画分をショ糖密度勾配遠心分離またはイオン交換クロマトグラフにより分画を行い精製度を上げる。

(c) 必須因子の同定

(b)で調整した各々の画分を 3Y1 (AS160) 細胞より調整した細胞抽出液に加え、この混合物をセミンタクト細胞に加えた後、インスリン刺激を加える。このとき、GLUT4 トランスポーターが起こる画分には白色脂肪細胞に由来する AS160 下流の必須因子、または新たなインスリンシグナル伝達因子が含まれている。この画分より必須因子の同定を行う。そして、画分に含まれる蛋白質を MASS スペクトロメトリーにより同定し、各々の組換え蛋白質を作成する。最終的には、各組換え蛋白質を 3Y1 (AS160) 細胞の細胞抽出液に加え、上記のようにインスリン刺激によるトランスポーターの有無を見ることにより新規必須因子を同定する。

インスリン受容体 α サブユニットの血中への遊離メカニズムの解明。

インスリン受容体は生体内すべての組織で発現しているが、特にインスリン標的組織である骨格筋、心筋、脂肪細胞、肝臓では発現量が多い。どのような分子メカニズムで、膜タンパクであるインスリン受容体の α サブユニットのみが血中に遊離するのか解明する(図 2)。申請者は膜上のタンパク分解酵素の活性化が関与すると考えている。申請者が確立した ELISA 測定系はヒトインスリン受容体 α サブユニットを特異的に測定するもので、マウスなど他のレセプターは全く認識しない。そこで、ヒトインスリン受容体を安定に発現させた CHO 細胞(PNAS, 1985, Ebina et al.) およびヒトインスリン受容体を全身で発現したトランスジェニックマウスを作製している(Gene, 1994, Nature Genet., 1998, Diabetes, 2007)この 2 種を用い、何が引き金となりどのよう

なプロテアーゼが関与しどのような分子メカニズムで膜タンパクであるインスリン受容体の α サブユニットが遊離するのか検討する。一般的に膜タンパクは ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain)ファミリープロテアーゼにより切断(shedding)を受けることが知られている。実際に ADAM 全般を阻害する阻害剤を用いるとインスリン受容体の切断が阻害される。特に EGF 受容体や TNF 受容体など膜貫通型の受容体は ADAM10, ADAM17(TACE)による細胞外ドメインの切断を受けることが知られている。

我々は、まずペプチドライブラリーのスクリーニングに基づく各 ADAM ファミリープロテアーゼのペプチド配列嗜好性のデータを下にサーチエンジンを用いインスリン受容体細胞外ドメインをバイオインフォマティカルに検索した。ADAM10 に関しては明らかな至適配列は見いだせなかったが、ADAM17/TACE に関しては非常に切断の可能性の高いペプチド配列が見出された(aa890-900: PGNYS ^VRIRA)。このことによりインスリン受容体細胞外ドメインが TACE により切断される可能性が高まった。まず、本当に TACE が関与しているかどうかをスクリーニングするために TIMP (anti-tissue inhibitor of metalloproteinase)を用いる。TACE は TIMP3 のみにより抑制され、ADAM10 は TIMP1, 3 に抑制される。他の ADAM は TIMP1,2,3 全てにより抑制される。この性質を利用しスクリーニング後、siRNA を用い、TACE を特異的にノックダウンする事により確認する。また、TACE 特異的阻害剤の使用やバキュロウイルスを用いた精製 ADAM 蛋白質を用いて無細胞系或いは昆虫細胞にての再構成のシステムを用い傍証を得る。このように、システムバイオロジーの技術を駆使して証明を行う。インスリン受容体 α サブユニットはインスリンと結合するので、血中の実質的なインスリン濃度を下げ、血中グルコース濃度が高くなる(高血糖)(BBRC, 2003, Kanazaki, Obata et al.)。従って、血中遊離インスリン受容体 α サブユニットの増加は、**糖尿病発症の増悪因子となる可能性**がある(図 8)。

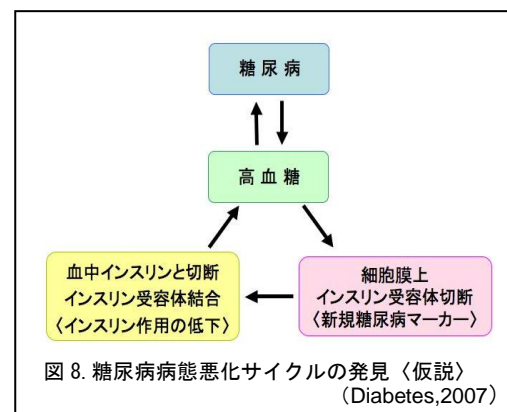


図 8. 糖尿病病態悪化サイクルの発見 (仮説) (Diabetes,2007)

何らかの引き金で細胞表面上で活性化されたプロテアーゼによりレセプターが切断され、 α サブユニットが遊離し、血中に放出されている可能性がある。その分子メカニズムを明らかにすると、糖尿病改善薬の発見に結びつく可能性がある。申請者らは、ヒトインスリン受容体を全身で発現させたトランスジェニックマウスを既に確立しており(Diabetes, 2007)、このマウス個体を用い、糖尿病の時になぜ血中 $IR\alpha$ が増加するのか、その分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

1. インスリン刺激によるGLUT4トランスロケーションの分子メカニズム

インスリン作用の中で最も重要な物は血糖降下作用である。それは主に骨格筋において、通常は細胞内膜分画に存在するGLUT4が細胞表面上に出て、細胞外のグルコースを細胞内に取り込むことにより起こる。GLUT4を細胞内に滞留する分子としてTUG (Tether containing UBX domain for GLUT4) が報告されている(Nature, 2003, Bogan *et al.*)。我々はTUGがGLUT4小胞・Tubulinなどと複合体を形成していることを見出した。GLUT4小胞はこれらの分子が関与して、インスリン刺激により微小管上を移動し、細胞膜内へグルコースを取り込むと考えられた。しかし、インスリンシグナル伝達との関係を結ぶ因子は明らかになっていない。

2. 糖尿病になると、なぜ血中に切断されたインスリン受容体細胞外ドメイン【sIR; soluble insulin receptor(可溶性インスリン受容体)】が増加するのか？

我々は高血糖が続くと血中に sIR が増加してくることを報告した(Diabetes, 2007)。なぜ高血糖で血中 sIR が増加するのかその分子メカニズムを明らかにするため、ヒト培養細胞を用いて細胞培養系での再現を試みた。各種ヒト培養細胞を用いたところ、ある種の細胞のみが medium 中に sIR を放出していることが明らかになった。しかしその濃度は、ヒト血清中の 1/100 程度であるので、通常の sIR 測定 ELISA では測定できなかった。そこで、back ground を下げることにより超高感度 ELISA 測定系を作製することに成功した。この細胞を用い高グルコース存在下で培養すると medium 中 sIR が増加してくることが明らかとなった。現在その分子メカニズムを解析中である。

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. Umehara Asako, Nishioka Mamiko, Obata Toshiyuki, Ebina Yousuke, Shiota Hiroshi, Hashida Seiichi, A novel ultra-sensitive enzyme immunoassay for soluble human insulin receptor ectodomain and its measurement in urine from healthy subjects and patients with diabetes mellitus., *Clinical biochemistry*, Vol.42, No.13-14, pp.1468-1475, Jun. 2009. 査読有
2. Yuasa Tomoyuki, Uchiyama Keiji, Yuko OGURA, Kimura Masafumi, Kiyoshi TESHIGAWARA, Hosaka Toshio, Yoshinori TANAKA, Obata Toshiyuki, Hiroyuki SANO, Kishi Kazuhiro, Ebina Yousuke, The Rab GTPase-Activating Protein AS160 as A Common Regulator of Insulin- and Gq-Mediated Intracellular GLUT4 Vesicle DistributionA, *Endocrine Journal*, Vol.56, No.3, pp.345-359, Jun. 2009. 査読有

[学会発表] (計11件)

1. Yuasa Tomoyuki, Nagaya Hisao, Hashida Seiichi, Asako Umehara, Yokota Ichiro, Obata Toshiyuki, Ebina Yousuke, Soluble insulin receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes., XI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INSULIN RECEPTORS AND INSULIN ACTION, Naples, Oct. 28-30 2010.
2. Uchiyama Keiji, Ebina Yousuke, Role of BIG2, a Guanine-Nucleotide Exchanging Factor for ADP-Ribosylation Factors, in Insulin-Regulated Glucose Transporter Translocation, 第32回日本分子生物学会年会, Yokohama, Dec. 9-12 2009.
3. 湯浅 智之, 小畑 利之, 横田 一郎, 岡本 英治, 長屋 寿雄, 橋田 誠一, 前川 聡, 柏木 厚典, 松本 満, 松本 俊夫, 岸 和弘, 蛭名 洋介, 可溶性インスリン受容体細胞外ドメイン(sIR α)は高血糖に相関して血中濃度が高まる, 第7回1型糖尿病研究会, 日光, 2009年11月7日.
4. Yuasa Tomoyuki, Yano Seiji, Nishioka Yasuhiko, Kubo Yoshiaki, Takahashi Masayuki, Nakatsuji Hiroyoshi,

- Nagaya Hisao, Kanayama Hiro-omi, Arase Seiji, Sone Saburo, Ebina Yousuke, Soluble insulin receptor ectodomain in the plasma is a possible broad-spectrum tumor marker, 第 68 回 日本 癌学会 学術 総会 記事, pp.450-450, Yokohama, Oct. 1-3 2009.
5. 湯浅 智之, 小畑 利之, 矢野 聖二, 岡本 英治, 西岡 安彦, 久保 宜明, 高橋 正幸, 中達 弘能, 長屋 寿雄, 金山 博臣, 荒瀬 誠治, 曾根 三郎, 蛭名 洋介, 可溶化インスリン受容体細胞外ドメイン(sIR)は癌患者血清中で増加している, 第 29 回 日本分子腫瘍マーカー研究会, 横浜, 2009 年 9 月 30 日.
6. Yuasa Tomoyuki, Obata Toshiyuki, Yokota Ichiro, Okamoto Eiji, Kanazaki Yoshiko, Maegawa Hiroshi, Hirota Fumiko, Kishi Kazuhiro, Hashida Seiichi, Nagaya Hisao, Yuko Ogura, Kazuhiko Masuda, Matsumoto Mitsuru, Matsumoto Toshio, Kashiwagi Atsunori, Ebina Yousuke, Soluble insulin receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes., The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum, Osaka, Aug. 20 2008.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: インスリンレセプター α サブユニットの測定方法

発明者: 岡本英治、蛭名洋介、小畑利之

権利者: (株)医学生物学的研究所、蛭名洋介、小畑利之

種類: 特許

番号: 第 4530286 号

取得年月日: 2010 年 6 月 18 日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蛭名洋介 (EBINA YOUSUKE)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号: 0 0 1 1 2 2 2 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

内山圭司 (UCHIYAMA KEIJI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号: 6 0 2 9 4 0 3 9

湯浅智之 (YUASA TOMOYUKI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号: 5 0 3 0 4 5 5 6

長屋寿雄 (NAGAYA HISAO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号: 6 0 4 6 4 3 4 3

小倉有子 (OGURA YUKO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・研究員

研究者番号: 9 0 4 6 4 3 5 4