

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790648
 研究課題名（和文） プロリル異性化酵素 Pin1 の糖尿病発症における役割の解明

研究課題名（英文） Role of the prolyl isomerase Pin1 in diabetes

研究代表者

中津 祐介 (Nakatsu Yusuke)
 広島大学・医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：20452584

研究成果の概要（和文）：IRS-1 結合蛋白としてプロリル異性化酵素 Pin1 を同定した。HepG2 に Pin1 を過剰発現させるとインスリンシグナルの亢進が認められ、ノックアウトすると抑制が認められた。さらに Pin1 KO マウスはコントロールマウスに比べてインスリン抵抗性を示し、糖尿病モデルマウスに Pin1 を過剰発現させると血糖値の改善が認められた。以上のことから Pin1 はインスリンシグナルの調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We identified prolyl isomerase Pin1 as IRS-1 binding protein. Pin1 overexpression enhanced insulin signaling, while pin1 knockdown suppressed. In addition, overexpression of Pin1 in ob/ob mouse liver elevated IRS-1 mediating insulin signaling, while Pin1 KO mouse exhibited insulin resistance and glucose intolerance. Taking all of these results together, we conclude that Pin1 plays an important role in the enhancement of IRS-1 mediating insulin actions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：Pin1, IRS-1, インスリンシグナル, KO マウス, ob/ob マウス

1. 研究開始当初の背景

細胞現象は、一般的に、多くのシグナル伝達タンパクと転写因子を多段階に介して誘導される。肝臓や筋肉の糖代謝の調節には、インスリン受容体→IRS-1/2→PI 3-キナーゼ→Akt の経路と、LKB1→AMPK を中心としたエネルギー感知の経路が特に重要である。

この経路の障害は糖尿病を引き起こすことから、申請者は、これらの経路に結合するタンパクを同定する目的で、Yeast two hybrid 法や cDNA expression library を進めてきた。その過程で、インスリンシグナルを形成する key molecule である、IRS-1 と IRS-2、さらに糖代謝に重要な転写因子に

prolyl isomerase 1 (Pin1)が結合することを発見した。Pin1は、リン酸化 Ser/Thr-Pro の motif に結合し、プロリンの構造を *cis* 体から *trans* 体に変化させることで、タンパクの立体構造を変化させ、その機能に影響を与える。また、この構造変化は、種々の protein kinase や phosphatase によるリン酸化や脱リン酸化の受けやすさにも影響を及ぼすことが、多くのタンパクについて知られている。具体的には、Pin1は細胞周期の調整、DNA 修復、免疫応答、神経生存など多くの細胞内機能に関与していることが報告されており、Pin1 ノックアウトマウスは加齢とともに、神経細胞の脱落、精巣の萎縮、視神経の減少などの症状が認められる。また、ガンや喘息、アルツハイマー等いくつかの病気に関与することも示唆されている。現在までに、Pin1の標的タンパク質として多くの重要なタンパクが報告されており、例えば p53、cyclin D1、NF- κ B、CDC25 などと Pin1 の結合は cell cycle や癌化、炎症などに非常に重要であることが報告されている。

しかし、一方、Pin1が代謝の調節に関わっていることは、未だ全く報告されていない。我々は、高脂肪食負荷マウスにおいて Pin1 の発現量が増加していることを見出し、Pin1が糖代謝に重要な役割を担っていると考えるに至った。

2. 研究の目的

Pin1 が IRS-1 に結合することにより、インスリンシグナルに影響を与えるかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) ①baitとなるPin1のcDNAをMEFタグ付きの発現ベクターのマルチクローニングサイトに挿入し、N末端にMEFタグが取り付けられた融合タンパク発現ベクターを作成する。さらに、初代培養脂肪細胞に効率的には発現させるために、アデノウイルスを作成する。

②上記のアデノウイルスは、HepG2細胞や不死化されたヒト肝細胞に導入し、発現させた後、核分画と細胞質分画を分離する。

③両分画を界面活性剤を含む緩衝液で溶解し、MEFタグ融合Pin1を含む抽出液を調整する。

④抽出液から、以下のMEF法を用いて、高度に精製されたPin1含有複合体を回収する。

(a)抽出液に、myc-抗体を結合させたセファロースビーズを加えて、免疫沈降を行う。

(b)ビーズを洗浄後、MEF-蛋白を含む複合体を、TEVプロテアーゼを用いた切断反応により、ビーズから解離させて

上清に回収する。

(c)上清にFLAG-抗体を結合させたセファロースビーズを加えて、再度、免疫沈降を行う。

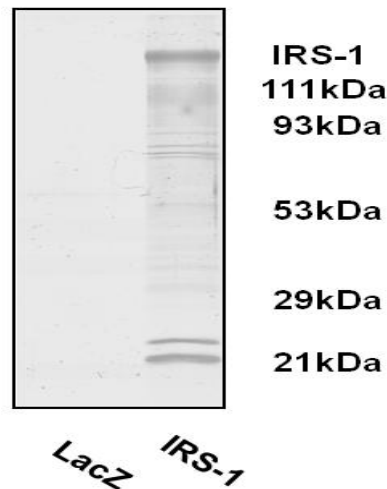
(d)ビーズを洗浄後、MEF-蛋白含有複合体をFLAG合成ペプチドを加えて、ビーズから解離させる。

⑤回収したタンパク質をSDS-電気泳動(銀染色)で分析する。また、検出したタンパク質バンドをトリプシン処理し、ダイレクトナノフローLC-MS/MSシステムにより分析する。また、回収したタンパク質を全体として評価するために、試料を溶液状態のまま(SDS-電気泳動を行わずに)トリプシン消化し、消化物をLC-MS/MS分析する。結合蛋白の同定に加え、Pin1との結合に関与するセリンリン酸化の部位についても検討する。

⑥得られたMS/MSスペクトルを、データベース(Mascot)に照合し、タンパク質を同定する。

⑦必要に応じて、同定したタンパク質をMEFタグで標識し、リバースタグ法やダブルタグ法を併用することでデータの信頼性を検証する。

Silver staining



(2) Pin1 のインスリンシグナルへの影響。Pin1 アデノウイルスを用い、HepG2 に Pin1 を過剰発現させた後、インスリンを添加し、一定時間後サンプルを回収する。siRNA によりノックダウンを行い、同様にサンプルを回収する。ウエスタンブロッティングにより IRS-1 Tyr リン酸化や Akt のリン酸化への影響をみる。また、Pin1 KO マウスや糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスを用い、GTT や ITT を行い、マウスでの糖代謝への影響を検討した。

(3) Pin1 の糖新生系への影響

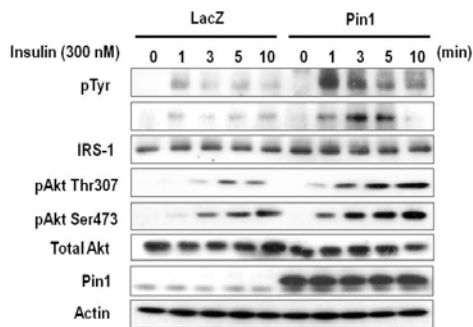
アデノウイルスにより HepG2 に Pin1 を過剰発現させたのち、フォロスコリン刺激を行い、CRE 活性への影響を検討する。また、CREB と CRTC2 の結合や Chip assay を行う。

4. 研究成果

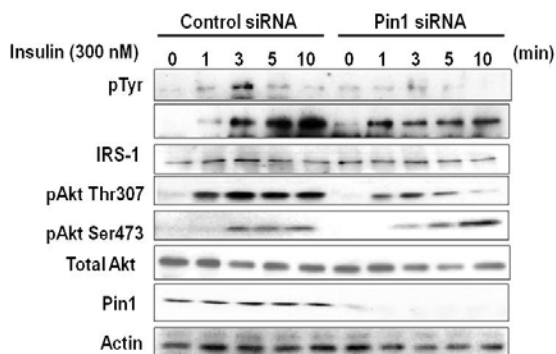
(1) 方法 (1) により、IRS-1 結合蛋白の同定を試みたところ、銀染色により下の図に示すように、複数のバンドが確認でき、さらに Mass 解析により、Pin1 が同定できた。Pin1 と IRS-1 の結合を確認するために、Pin1 と IRS-1 のバキュロウイルス及びアデノウイルスを作成し、Sf9 及び HepG2 での過剰発現系により、検討したところ両細胞において Pin1 と IRS-1 の結合が確認できた。

(2) Pin1 と IRS-1 の結合部位を同定するために、Pin1 の WW domain と PPIase を含む GST 融合蛋白を作成し、IRS-1 との pull down assay を行ったところ、WW domain が IRS-1 と結合することが明らかとなった。また、IRS-1 の deletion mutant を作成し、Pin1 との免疫沈降を行ったところ SAIN domain が Pin1 との結合に必要であった。さらにこの領域に含まれる Ser/Pro 配列を Ala に置換した point mutant を作成し、検討したところ IRS-1 の Ser434 が Pin1 との結合に必要であることが明らかとなった。

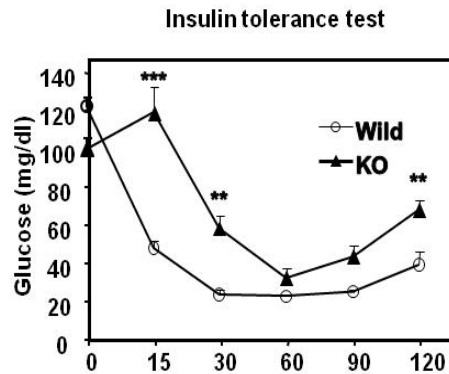
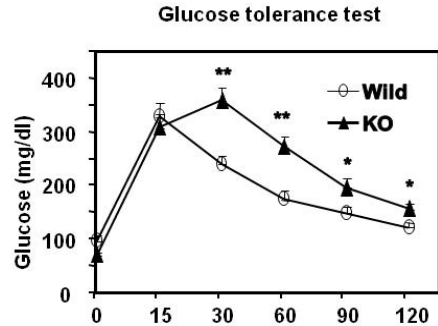
(3) Pin1 のインスリンシグナルへの影響を検討するために、HepG2 細胞に Pin1 を過剰発現させ、インスリン刺激を行ったところ、Pin1 によりインスリンシグナルの亢進が認められた。



一方 siRNA により Pin1 をノックダウンするとインスリンシグナルの抑制が認められた。



(4) Pin1 ノックアウトマウスはコントロールマウスに比較してインスリン抵抗性を示し、糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスに Pin1 を過剰発現させると、耐糖能が改善された。以上のことから Pin1 は IRS-1 と結合し、インスリンシグナルに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



(5) Pin1 の糖新生系に対する影響を検討するために HepG2 細胞に Pin1 過剰発現後、フォロスコリン刺激により、CRE 活性への影響を検討した。Pin1 過剰発現により CRE 活性は抑制され、ノックダウンにより促進した。また、Pin1 過剰発現により CRTC2 と CREB との結合、CRTC2 のプロモーターへのリクルートは抑制された。これらのことより Pin1 は CRTC2 と結合することにより糖新生系を制御していると考えられる。

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 4 件)

(1) Cui X, Kushiya A, Yoneda M, Nakatsu Y, (著者 19 人) Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. Diabetes Res Clin Pract. 2010 87(1):57-63. 査読有

(2) Nakatsu Y, Kotake Y, Takishita T, Ohta S. Long-term exposure to endogenous levels of tributyltin decreases GluR2 expression and increases neuronal vulnerability to glutamate. Toxicol

Appl Pharmacol. 2009;240(2):292-298. 査読有

(3) Egawa M, Kamata H, Kushiya A, Sakoda H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Nakatsu Y, (著者14人) Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo cells. Placenta. 2008 Dec;29(12):1003-1008. 査読有

(4) Nakatsu Y, Kotake Y, Hino A, Ohta S. Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;230(3):358-363. 査読有

[学会発表] (計 4件)

(1) 中津 祐介 プロリン異性化酵素Pin1はTORC2と結合しCRE活性を抑制することで、肝の糖新生系を制御する。生化学会2009, 2009年10月23日 神戸ポートアイランド

(2) Yusuke Nakatsu

Pin1 binds to IRS-1, and functions as a nutrient-sensing enhancer of insulin signaling アメリカ糖尿病学会 2009 2009年6月25日 アメリカ

(3) 中津 祐介 Pin1はIRS-1と結合し、インスリンシグナルを促進する。第52回日本糖尿病学会学術集会 2009年5月21日 大阪

(4) 中津 祐介 プロリン異性化酵素Pin1はIRS-1のSer/Pro配列を認識し、結合する。第81回日本生化学会・分子生物学会合同大会 2008年12月15日 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中津 祐介 (Nakatsu Yusuke)
広島大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20452584

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：