

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790276

研究課題名（和文） PIP3 ホスファターゼ SKIP によるインスリン感受性制御機構の解析

研究課題名（英文） Modulation of insulin sensitivities by the PIP3 phosphatase, SKIP

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

研究成果の概要（和文）：骨格筋はインスリン依存的に血中から糖を取込むが、インスリン感受性の低下により糖取込み能が低下すると高血糖になり、糖尿病や動脈硬化を引き起こす原因となる。本研究で私は PIP3 ホスファターゼ SKIP が骨格筋でのインスリン感受性を制御する因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Insulin stimulates glucose uptake into skeletal muscle cells. Decreased insulin sensitivity caused hyperglycemia, which increases the risk for Type II diabetes and atherosclerosis. In this study, I have shown that the PIP3 phosphatase, SKIP, modulated insulin sensitivities in the skeletal muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：基礎医学

## 1. 研究開始当初の背景

ホスホイノシチド3リン酸 (PIP3) は、骨格筋におけるインスリンシグナルを伝達する分子である。その脱リン酸化酵素である PIP3 ホスファターゼ (図1) はインスリン作用を負に制御する。つまり、PIP3 ホスファターゼはインスリン抵抗性に対する標的分子であると言える。実際に、PIP3 ホスファターゼ PTEN や SHIP2 の発現と糖尿病との関連が示されている。私は、新規 PIP3 ホスファターゼ SKIP が骨格筋におけるインスリンシグナルを負に制御する因子であることを同定した

(Ijuin and Takenawa, Mol. Cell. Biol. 2003)。これらの PIP3 ホスファターゼの遺伝子欠損マウスは、いずれもインスリン感受性の亢進および高脂肪食によるインスリン抵抗性の誘導に対する耐性を示すことが示されている (Wijesekara et al. Mol. Cell. Biol. 2005, Sleeman et al. Nat. Med. 2005, and Ijuin et al. Mol. Cell. Biol. 2008)。これらの結果は、PIP3 ホスファターゼがインスリンシグナルの重要な制御因子であり、糖尿病治療や予防の標的分子となることを強く示唆している。

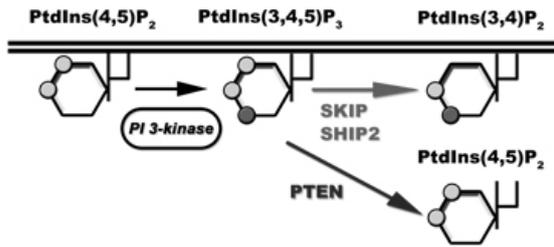


Fig.1 Schematic representation of PIP3 phosphatases

PTEN、SHIP2 および SKIP はインスリンシグナルを負に制御する共通点を持つ。上記の通りこれらのノックアウトマウスはいずれもインスリン抵抗性に対する耐性を示す。その一方で、PIP3 ホスファターゼ分子間でその表現型およびインスリンシグナルの制御機構に明らかな相違点が見られることが明らかになった。例えば、SHIP2 遺伝子欠損マウスでは摂食量の増加にも関わらず、代謝の上昇および体重の減少が認められるが (Sleeman et al, 2005)、SKIP の遺伝子欠損マウスでは、摂食、通常食における体重には全く変化が認められなかった (Ijuin et al. 2008)。また、SKIP のノックマウスでは、骨格筋におけるインスリン依存的な糖取り込みに顕著な増加が認められるものの、SHIP2 の欠損マウスでは認められない。これはインスリンシグナル制御において PIP3 ホスファターゼが互いに相補できない関係にあることを示唆している。しかしながら、SKIP による特異的なインスリンシグナル制御機構は明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

PIP3 ホスファターゼ PTEN、SHIP2 と SKIP は、酵素活性が同じでありながら、それぞれが空間的、時間的に制御を受けている。従って、細胞全体の PIP3 の動態を知るだけでは、PIP3 産生および分解の機構を理解することはできない。細胞内の局所的な PIP3 の動態とホスホイノシチド代謝酵素の動態を同時に観察することが、この時空間的な制御機構の直接的な証明になると考えられる。

本研究では、①PIP3 ホスファターゼの分子間のインスリンシグナルに対する影響の違いを明らかにすることと、②SKIP がインスリンシグナルを制御する分子機構を解明することによって、SKIP が生体内で血糖値をコントロールする分子であることの証明を目的と

する。

## 3. 研究の方法

本研究ではマウス由来の骨格筋細胞を用いて、以下の研究を行い、SKIP の機能を明らかにする。

- SKIP を含むタンパク質複合体による GLUT4 小胞輸送制御および細胞内 PIP3 調節機構の解析

SKIP によるインスリン刺激依存的な GLUT4 小胞輸送の制御機構を解明し、PTEN や SHIP2 にはない SKIP の機能を分子レベルで明らかにする。また、SKIP の GLUT4 小胞への局在に必要な領域を同定し、SKIP を含むタンパク質複合体の単離と複合体形成機構を解析する。

- 骨格筋細胞を用いた GLUT4、SKIP および PIP3 をはじめとするホスホイノシチドの動態の局所的な解析

本研究では、GLUT4 小胞と細胞膜の接触、融合におけるホスホイノシチドの動態を観察する。PIP3 は Grp1 の PH ドメインを、PI(3,4)P2 は TAPP1 の PH ドメイン、PI(3)P は Hrs1 の FYVE ドメインに GFP を融合させた蛍光プローブを用いてホスホイノシチドの可視化を行う。TIRF 型顕微鏡で細胞膜近傍における GLUT4 小胞の動態とホスホイノシチドの動態を同時に観察し、GLUT4 小胞の細胞膜への融合におけるホスホイノシチドの変化を可視化する。この際の、SKIP の動態も同時に明らかにする。

- SKIP によるインスリンシグナル特異的な制御機構の解析

SKIP によるインスリンシグナル特異的な機能を明らかにするために、SKIP とインスリン刺激依存的に結合する分子の同定を行う。その中から、シグナル伝達分子にターゲットを絞って、その結合メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究で、私は

- (1) SKIP と PTEN は細胞内で空間的に異なる PIP3 に働きかけている。SKIP は膜ラッピング部位に濃縮され、その部分の PIP3 量をコントロールしている。一方、PTEN は細胞膜全体の PIP3 量をコントロ

ールしていた。このことは SKIP と PTEN が細胞内の異なる PIP3 に働きかけていることを表している (図2)。

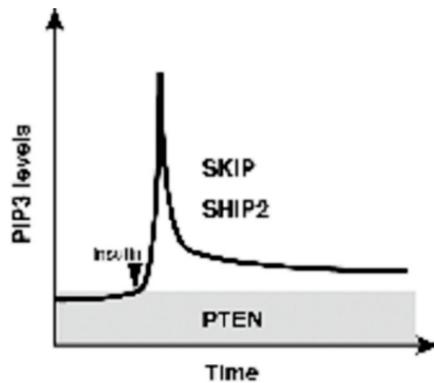


Fig. 2. Kinetic appearance of PIP3 ends by PIP3 phosphatase

(2) SKIP と PTEN は細胞内で異なる局在を示し、インスリンシグナルへの作用も異なる。SKIP はインスリン刺激依存的に細胞膜に局在し、効率よく PIP3 を脱リン酸化しているが、PTEN はインスリンシグナル依存的な動きは認められなかった。さらに、インスリン依存的な GLUT4 小胞の細胞膜への移行やそれにとまう細胞外からのグルコース取込みにおいても SKIP は PTEN よりも優位に影響を及ぼすことも明らかになった (図3)。

(3) SKIP が膜ラフリング部位で Akt と複合体を形成していることが明らかとなった。これはインスリン刺激依存的なものであった。これは (1) で示したように、SKIP が非常に効率的に Akt に結合する PIP3 を脱リン酸化することによって、インスリンシグナルを終結に向かわせていることを表している。

ことを明らかにした。その理由は、PIP3 ホスファターゼ分子の細胞内局在や結合分子の違いによる空間的制御の相違と、酵素自体の活性化の制御による時間的制御の相違によるものと考えられる。これは細胞レベルでの研究によっても裏付けられた。私は、骨格筋細胞におけるインスリン刺激時の細胞内 PIP3 量が、これらの PIP3 ホスファターゼによって異なる制御を受ける事を明らかにした。PTEN は細胞内 PIP3 量を恒常的に一定に維持する働きをする一方、SKIP や SHIP2 はインスリン刺激依存的に産生される PIP3 量を調節している (図2)。

さらにこの空間的な違いがインスリンシグナルに及ぼす影響に関して大きく左右することを明らかにした。SKIP がインスリンシグナルを効率よくコントロールする仕組

みが明らかとなった。この結果は SKIP の空間的な位置取りをコントロールすることによって、糖代謝が改善できる可能性を表している。

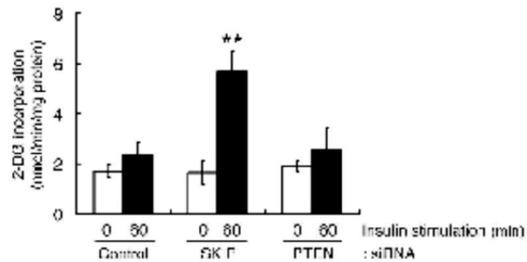


図3. Akt P による SHIP2 によるインスリン依存的な糖取込みへの影響

従って、本研究は、新たなインスリン依存的な糖代謝の制御分子 SKIP の分子メカニズムを知るだけでなく、SKIP の新しい糖尿病治療のターゲット分子としての可能性を探る意味をも有している。既に、ノックアウトマウスの解析結果から、SKIP はインスリン作用に対して極めて特異的に働きかけること、癌化への影響が少ないことが明らかになっており、本研究は今後の阻害剤の探索など創薬にも結びつく可能性を十分に有している。

従って、本研究はホスホイノシチド代謝酵素の機能解析だけではなく、新しいホスホイノシチド代謝機構やインスリンシグナル制御機構の解明など、様々な可能性を有する意義の大きな内容であると言えよう。

## 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1件)

① Wang F, Ijuin T, Itoh T, Takenawa T Regulation of IGF-1/PI3K/Akt signaling by the phosphoinositide phosphatase pharbin J. Biochem. 2011 Vol. 150: 83-93

〔学会発表〕 (計3件)

① 「PIP3 ホスファターゼ SKIP によるマウス骨格筋 C2C12 細胞の分化制御」  
第83回 日本生化学会 2010年12月7日～10日 神戸国際会議場

② 「PIP3 ホスファターゼ SKIP, PTEN による細

胞内 PIP3 の時空間制御」  
第 8 2 回 日本生化学会 2009 年 10 月 21 日  
～24 日 神戸ポートアイランド

③「PIP3 ホスファターゼ SKIP による PIP3 の  
時間的および空間的な制御機構」  
第 5 1 回 日本脂質生化学会 2009 年 7 月

〔図書〕(計 1 件)

①改訂 タンパク質実験ハンドブック  
(竹縄 忠臣、伊藤 俊樹 編集、2011 年 1  
月)

## 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：