

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18977

研究課題名(和文) 脳KATPチャネルによる脂肪組織のインスリンシグナル制御

研究課題名(英文) Adipose insulin signaling regulated by brain KATP channel

研究代表者

小倉 康平 (OGURA, KOHEI)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・感染症制御研究部・上級研究員

研究者番号：00586612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々な細胞の代謝センサーであるATP感受性カリウムチャネル(KATPチャネル)を欠損させたマウスにおける、脂肪組織インスリン依存的糖取り込みの亢進について解析を進めた。欠損マウスの脂肪組織へのインスリン刺激により、Aktと未知タンパク質との結合が誘導されることを見出した。活性化Aktと未知タンパク質との結合は、インスリン濃度依存的に増大した。欠損マウス脂肪細胞内インスリン応答には、Akt2が主に寄与することが示された。マス解析により未知タンパク質の同定を試み、14-3-3タンパク質ファミリーがその候補として挙げられた。

研究成果の概要(英文)：ATP-sensitive potassium (K(ATP)) channel is critical in metabolism control. Previous reports showed that insulin-dependent glucose uptake is enhanced in adipose tissues of KATP channel knockout (KO) mice compared with that in wild-type mice. Insulin stimulated in vivo interaction of Akt and unknown factor in adipose tissues. The interaction was enhanced dependent on amount of injected insulin. Akt2 mainly played role for the interaction in adipose tissues of KO mice. Mass spectrometry analysis showed 14-3-3 family proteins are candidates for the interaction with Akt2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：グルコース取り込み インスリン応答 KATPチャネル

1. 研究開始当初の背景

ATP は生体の重要なエネルギー源であるが、 K_{ATP} チャンネルは細胞内 ATP 濃度を感知することで様々な細胞の応答センサーとして機能している。研究協力者のグループは、 K_{ATP} チャンネルが膵細胞のインスリン分泌や、脳や心筋細胞の細胞保護を司ることを報告していた[1-4]。これらの解析の過程で、 K_{ATP} チャンネル欠損 (KO) マウスではインスリン標的組織である骨格筋と脂肪組織の糖取り込みが亢進していることを発見した (図 1)。 K_{ATP} チャンネルが欠損した脂肪細胞内でなぜインスリン応答依存的に糖取り込みが亢進されるのかについては明らかにされていなかった。

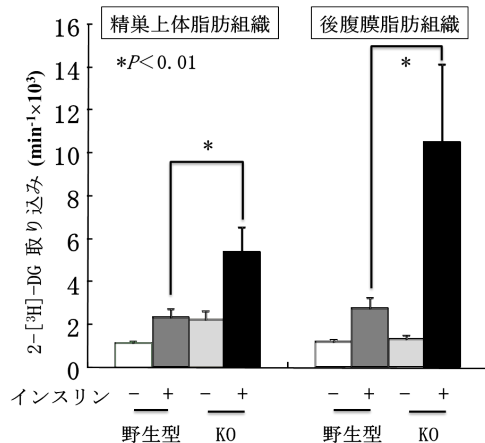


図 1. KOマウス脂肪組織ではインスリンシグナル依存的な糖取り込みが亢進される

引用文献

- Miki et al, (2001) Nat Neurosci 4:507-12.
- Liss et al (2005) Nat Neurosci 8:1742-1751.
- Suzuki et al (2003) Circulation 107:682-5.
- Miki et al (2002) Am J Physiol Endocrinol Metab 283:E1178-84.

2. 研究の目的

本研究は、 K_{ATP} チャンネルが脂肪組織インスリンシグナルを制御する分子メカニズムと生体でのシグナルネットワークの解明を目的とした。

脳のインスリンシグナルは肝臓や脂肪組織の糖・脂質代謝制御に関与することが報告され、また脳 K_{ATP} チャンネルも中枢のインスリン作用に必要であることが明らかにされていた。これらのことから申請者は、脳 K_{ATP} チャンネルが脳インスリンシグナルを制御し、神経性制御を介して脂肪組織のインスリン作用を調節している組織連関モデルを着想した (図 2)。

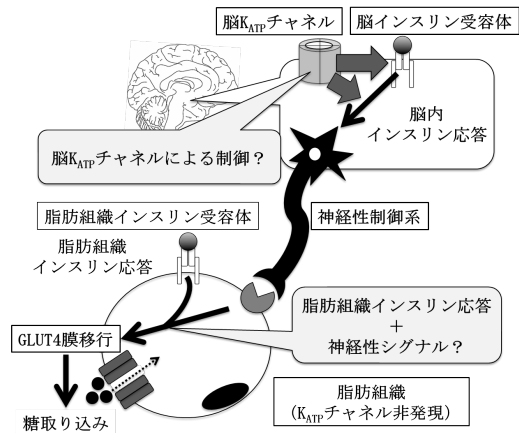


図 2. 脳 K_{ATP} チャンネルによる脂肪組織インスリンシグナル制御 (本研究で提唱するモデル)

3. 研究の方法

K_{ATP} チャンネルによるインスリンシグナル制御機構解明のため、脂肪組織インスリン依存的糖取り込み機構への脳特異的 K_{ATP} チャンネルの関与、リン酸化 Akt と結合する未知タンパク質の同定と機能解析、KO マウスの脂肪組織におけるインスリン作用の解析、ならびに課題 4. インスリンシグナルの多様性獲得の分子メカニズムを検証することとした。

セリン/スレオニンキナーゼ Akt は、インスリン刺激による Thr308 ならびに Ser473 のリン酸化を介して活性化され、様々な標的タンパク質の活性を制御する、インスリンシグナルの要となるシグナル分子である。興味深い事に、KO マウスの脂肪組織へインスリン刺激を加え、Akt Ser473 のリン酸化を解析したところ、非還元泳動条件下 (-ME 未添加)でのみ通常のリン酸化Aktより移動度の小さい新規のバンドが検出され、また同バンドは還元条件下で消失した (図 3)。このことから本バンドは、リン酸化Aktと未知タンパク質の複合体であり、本複合体が KO マウスでの脂肪組織におけるインスリン作用亢進に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、本Akt結合タンパク質の同定と機能解析を行うこととした。

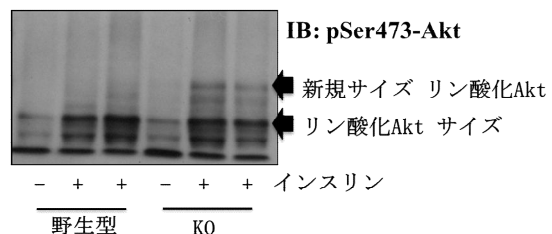


図 3. KOマウスインスリン刺激により出現する新規サイズのリン酸化Aktバンド

4. 研究成果

【1年目の研究成果】

ATP感受性カリウムチャンネル(KATPチャンネル)は様々な細胞の代謝センサーであるが、KATPチャンネル欠損マウス(本マウス)では本来KATPチャンネルの発現がない脂肪組織でインスリン依存的糖取り込みが亢進していた。本研究では、KATPチャンネルが脂肪組織インスリンシグナルを制御する分子メカニズムと生体でのシグナルネットワークの解明を目的としている。本年度は、本マウスの脂肪組織へのインスリン刺激により誘導される、Aktと未知タンパク質との結合を解析した。インスリン刺激したマウスから脂肪細胞を取得し、活性化Akt抗体を用いたウエスタンブロッティングに供したところ、本マウス脂肪細胞ではAktサイズから約20kDaほど上部(該当サイズ)に、未知のバンドが検出されることを確認した。活性化Aktと未知タンパク質との結合は、インスリン濃度依存的に増大した。この結合は、-ME存在下では消失した。活性化Akt抗体結合ビーズを用いた免疫沈降後、SDS-PAGEゲル上の該当サイズ箇所を抽出し、LC-MS/MSに供した。その結果、本マウスサンプル内にAkt2が検出された。このことから、該当サイズバンドは、抗体の非特異性によるものではなく、Akt2と未知タンパク質との複合体であることが強く示唆された。現在、その候補タンパク質として、14-3-3タンパク質ファミリー等がリストアップされた。

【2年目の研究成果】

ATP感受性カリウムチャンネル(KATPチャンネル)は様々な細胞の代謝センサーであるが、KATPチャンネル欠損マウス(本マウス)では本来KATPチャンネルの発現がない脂肪組織でインスリン依存的糖取り込みが亢進していた。本研究では、KATPチャンネルが脂肪組織インスリンシグナルを制御する分子メカニズムと生体でのシグナルネットワークの解明を目的としている。昨年度、活性化Akt抗体結合ビーズを用いた免疫沈降から、Akt2と14-3-3タンパク質ファミリーが見出された。ウエスタンブロッティングによる解析から、本マウス脂肪細胞では、Akt1よりもAkt2がインスリン刺激によりSer473ならびにThr384のリン酸化が誘導されること、すなわち本マウス脂肪細胞内インスリン応答にはAkt2が主に寄与することが示された。昨年度の免疫沈降ならびにマス解析を再実験した結果、14-3-3タンパク質ファミリーのうち14-3-3sigmaペプチドのみが検出された。しかし、結合サンプルのウエスタンブロッティング解析の結果、14-3-3sigmaはAkt2と複合体を形成していないことが示唆された。また、14-3-3以外の新たな候補として、Transketolaseが見出されたが、ウエスタンブロッティングでは検出できなかった。インスリン非刺激状態での本マウス脂肪細胞をSDS-PAGEに供した結果、対照のC57BL/6Jと比較して、異なるバンド

様式が観察された。このことから、本マウス脂肪細胞では、細胞内タンパク質の量比が大きく変化していることが示され、その変化がインスリン応答糖取り込み機構の差異に関連している可能性が示された。

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 5件)

1. Ogura K, Terasaki Y, Miyoshi-Akiyama T, Terasaki M, Moss J, Noda M, Yahiro K. *Vibrio cholerae* Cholix toxin-induced HepG2 cell death is enhanced by tumor necrosis factor-alpha through ROS and intracellular signal-regulated kinases. **Toxicological Science** 156(2), 451 S (2017).
2. Nihira NT, Ogura K, Shimizu K, North BJ, Zhang J, Gao D, Inuzuka H, Wei W. Acetylation-dependent regulation of MDM2 E3 ligase activity dictates its oncogenic function. **Science Signaling** 10(466). pii: eaai8026 (2017).
3. Shimizu K, Fukushima H, Ogura K, Lien EC, Nihira NT, Zhang J, North BJ, Guo A, Nagashima K, Nakagawa T, Hoshikawa S, Watahiki A, Okabe K, Yamada A, Toker A, Asara JM, Fukumoto S, Nakayama KI, Nakayama K, Inuzuka H, Wei W. The SCF he SCF K, Inuzuka H, Wei W. The SCF The SCF SCF SCF ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis. **Science Signaling** 10(460). pii: eaah4117 (2017).
4. Tsutsuki H, Yahiro K, Ogura K, Ichimura K, Iyoda S, Ohnishi M, Nagasawa S, Seto K, Moss J, Noda M.

Subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces stress granule formation. **Cellular Microbiology** 18(7):1024-40 (2016).

5. Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Blenis J, Cantley LC, Toker A, Su B, Wei W. PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. **Cancer Discovery** 5(11):1194-209 (2015).

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 小倉康平, 秋山 徹. Studies on relationship between *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection and diabetes mellitus. 第 90 回日本細菌学会総会
2. 小倉康平, 八尋錦之助, 秋山 徹, 野田公俊. *Vibrio cholerae* Cholix toxin induces hepatocyte apoptosis through ROS production and MAPK activation. 第 89 回日本細菌学会総会
3. 小倉康平, 寺崎泰弘, 秋山 徹, 八尋錦之助, 野田公俊. コレラ菌由来 ADP-リボシル化毒素 Cholix toxin による肝細胞致死機構. 第 63 回トキシシンポジウム

〔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
小倉 康平 (OGURA, Kohei)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター
ー 研究所 感染症制御研究部
研究者番号 : 00586612

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者