

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11479

研究課題名(和文) PRIP が制御するインスリンシグナルの解明

研究課題名(英文) The role of PRIP in the Regulation of Insulin Signaling

研究代表者

高 靖 (Gao, Jing)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40585882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシグナル分子 PRIPのインスリンシグナル伝達経路における役割の解明を目指した。PRIPは脂肪細胞におけるインスリン受容体(IR)のインターナリゼーションを抑制し、IRが細胞膜で適切な発現量を保つために働く。また、インスリンシグナル経路の負の制御に関わる主要な機構であるインスリン受容体基質(IRS)-1のセリン/スレオニンリン酸化の脱リン酸化がPRIPにより促進されることも分かった。以上の結果より、PRIPはインスリンシグナル経路の調節に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病などのメタボリック症候群は健康寿命の延伸と密接に関わり、その軽減と解消が課題となる。また、メタボリック症候群は歯周病の増悪とも密接に関わることが明らかにされ、歯学からの情報発信も臨床基礎を問わずに期待されるようになった。しかし、発症基盤であるインスリンシグナル伝達経路の異常の分子メカニズムについては、未だ不明な点も多い。本研究によりインスリンシグナル伝達経路の調節機構に新規分子PRIPが登場させ、その分子メカニズムの一つが解明された。本領域疾患の病態解明、治療方法の確立や創薬技術の発展に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have elucidated the role of a signaling molecule PRIP in the insulin signaling pathway. It was found that PRIP suppressed the internalization of insulin receptor (IR) in adipocytes and maintained the appropriate expression level of IR in the cell membrane. We also found that PRIP promoted the dephosphorylation of serine/threonine phosphorylation of the insulin receptor substrate (IRS) -1, which is a major mechanism involved in the negative regulation of the insulin signaling pathway. These results suggest that PRIP plays an important role in the regulation of insulin signal pathway.

研究分野：生化学

キーワード：PRIP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血糖降下作用を有する唯一のホルモンであるインスリンは、肝臓、筋肉(骨格筋、心筋)や脂肪組織などインスリンに感受性のある器官に作用して、ブドウ糖の細胞内への取り込み、エネルギー源としての利用、グリコーゲンや脂肪としての貯蔵、タンパク質合成などを促進する。インスリン作用の発現はインスリン受容体のチロシンキナーゼが活性化することから始まる。その作用はIRS-PI3K-AKTなどの伝達分子を介して細胞内に伝えられ、さまざまなシグナル伝達の活性化リレーを促す。標的細胞のインスリンに対する感受性が低下するとインスリン抵抗性の状態になり、内臓脂肪肥満と合わせてメタボリックシンドロームの原因の根幹をなす。インスリン抵抗性の分子機序については、インスリンシグナルカスケードの障害として認識され、多くの研究があるが、未だ不明な点も多い。

本研究で対象とする分子PRIPとは申請者の所属する研究室でイノシトール 1,4,5-三リン酸 [Ins(1,4,5)P₃]結合性タンパク質として発見され、ホスホリパーゼCと高い相同性を有するが、PLC酵素活性を持たないことからPhospholipase C-related but Catalytically Inactive Protein (PRIP)と名付けられた分子である。これまでにPRIPに関して、GABARAP、PP1、PP2Aやt-SNARE種々の結合分子を同定し、これを手がかりとしてCa²⁺シグナリング、GABA_A受容体機能やSNARE複合体機能に関わる役割の研究で成果を発表してきた。

2. 研究の目的

肥満や糖尿病などのメタボリック症候群は認知症をはじめとする様々な慢性疾患の発症と深く関わることが知られており、健康寿命の延伸を目指すためには、その軽減と解消が課題となる。しかし、発症基盤であるインスリンシグナル伝達経路異常の分子メカニズムについては、未だ不明な点も多い。

これまでの研究から、PRIPは様々な分子のリン酸化制御に関わることが明らかにされている。また、インスリンに制御される分子は多岐にわたるが、キー分子であるAktはPRIPの結合分子であることが明らかにされている。そこで本研究では、インスリンシグナル伝達経路におけるPRIPによるリン酸化制御の役割を明らかにし、インスリンによる糖代謝制御にPRIPがどう関わっているのを調べた。

3. 研究の方法

(1)インスリンシグナル伝達経路の標的分子のリン酸化の検討:野生型及びPRIP-KOマウスの精巢上体周囲の脂肪組織を器官培養し、インスリン刺激によるインスリンシグナル伝達経路の標的分子のリン酸化レベルの変化を野生型とPRIP-KOマウスで比較した。個体レベルでは、マウスにインスリンを腹腔内注射し、5分後に脂肪組織、骨格筋および肝臓を摘出し、Western Blottingで標的分子のリン酸化レベルを調べた。

(2)MEF細胞(マウス胎児線維芽細胞)を用いた実験:野生型及びPRIP-KOマウスより調製したMEFを脂肪細胞に分化誘導させ、細胞からサイトカインの分泌、細胞内のタンパク質の発現量とリン酸化レベルをWestern Blottingで調べた。細胞表面ビオチン化アッセイを行い、GLUT4の細胞膜へのトランスロケーションを検討した。同じように分化した脂肪細胞を用い、インスリン依存性の[³H]-deoxyglucoseの細胞内取り込み実験を行い、脂肪細胞のグルコースの取り込み能力を検討した。また、IRの細胞膜へ発現の変化を調べるために免疫蛍光染色、細胞分画や細胞表面ビオチン化アッセイなどを行い、IRのセリンリン酸化をWestern Blottingで調べた。3T3-L1細胞から分化誘導した脂肪細胞でも同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) PRIP欠損マウスの脂肪組織においてインスリンシグナリングが抑制される：脂肪細胞に分化させたMEF細胞をインスリンで刺激したところ、インスリン受容体(IR)、インスリン受容体基質(IRS)-1のチロシン残基のリン酸化及びその下流分子AKTのリン酸化がPRIP-KOマウスのMEF由来の脂肪細胞で抑制されていることが分かった。また、マウスの脂肪組織の器官培養でも同様に、インスリン刺激で引き起こされる前述の各インスリンシグナリング伝達分子のリン酸化がPRIP-KOマウス由来の脂肪組織では低下していた。マウスにインスリンを腹腔内注射した後に摘出した脂肪組織でも同様な結果だった。脂肪細胞に分化させたMEF細胞を用いて細胞表面ビオチン化アッセイを行ったところ、インスリンの刺激によるGLUT4の細胞膜へのトランスロケーションがPRIP-KO脂肪細胞では野生型脂肪細胞と比べて抑制されていることが分かった。上記の脂肪細胞やマウスの脂肪組織の器官培養を用いてインスリン刺激によるグルコースの取り込みを調べたところ、PRIP-KO脂肪細胞ではグルコースの取り込みが野生型と比べて低下していることが分かった。以上の結果より、PRIP欠損マウスの脂肪組織ではインスリンシグナリングが抑制されることが示唆された。

(2) PRIPがIRのインターナリゼーションを抑制する：脂肪細胞に分化させたMEF細胞を用いて細胞表面ビオチン化アッセイを行ったところ、PRIP-KO由来脂肪細胞でのIRの細胞膜発現量が野生型と比べて減少していることが分かった。siRNAを用いて、IRのインターナリゼーションに関わる分子であるクラスリンやRAB5の発現を抑制すると、PRIP-KO由来脂肪細胞で減少していたIRの膜発現量が野生型と同等まで回復した。また、HepG2細胞にPRIPを過剰発現すると、PRIPがIRと共局在し、インスリンの刺激によるIRのインターナリゼーションがPRIPの過剰発現によって抑制された。つまり、細胞膜へのIRの発現量の減少はPRIPの欠損によってIRのインターナリゼーションが促進されたことによると考えられる。免疫沈降を行ったところ、PRIPがIRと結合することも分かった。以上の結果より、PRIPはIRと結合して、IRのクラスリンを介したインターナリ

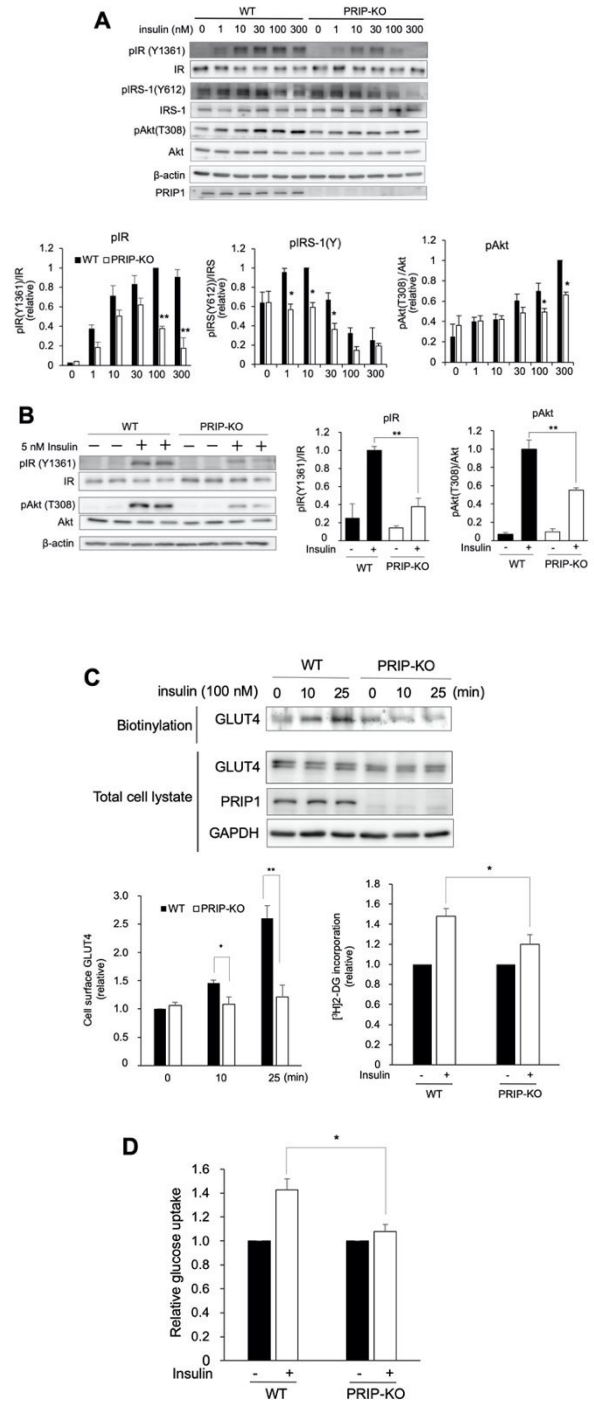


図1. PRIP 欠損マウスの脂肪組織においてインスリンシグナリングが抑制される

ゼーションを抑制することが示唆された。

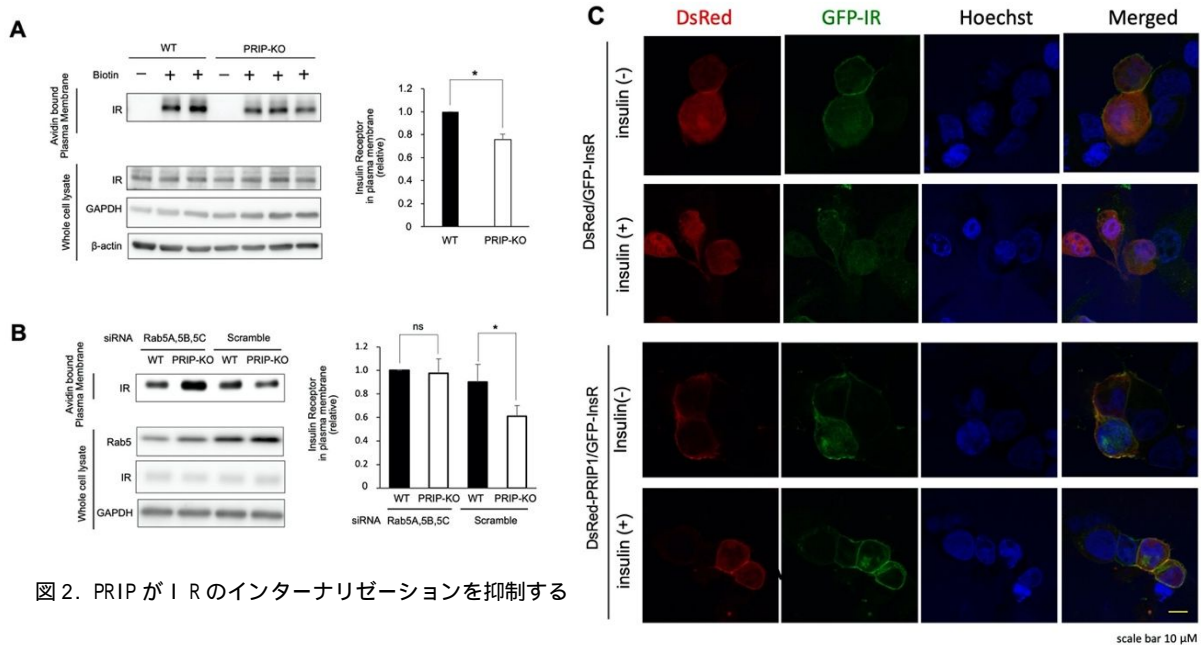


図 2. PRIP が I R のインターナリゼーションを抑制する

(3) PRIPがIRS-1のセリン・スレオニンリン酸化の脱リン酸化を促進する：インスリン受容体基質 (IRS)のセリン/スレオニンリン酸化は、インスリンシグナル経路の負の制御に関わる主要な機構である。最近、IRSのセリン/スレオニンリン酸化はIRのインターナリゼーションを促進することが明らかにされた。そこで野生型および KO マウス由来の MEF 細胞を長時間インスリン刺激すると、KO マウス由来のMEFにおいてIRSのセリン/スレオニンリン酸化が亢進することが分かった。脱リン酸化酵素プロテインホスファターゼ 1 (PP1)とプロテインホスファターゼ2A (PP2A)の阻害剤であるCalyculin A で処理すると、野生型MEFではIRS-1のセリンリン酸化レベルが上昇したが、PRIP-KO MEFではリン酸化レベルに変化は見られなかった。さらに、in situ Proximity Ligation Assay (PLA)を行ったところ、野生型MEFではIRS-1とPP2Aの結合が観察されたが、その結合のシグナルはPRIP-KO MEFでは顕著に減少することがわかった。以上の結果より、PRIPがIRS-1のセリン・トレオニンリン酸化の脱リン酸化を促進することが明らかになった。

以上の結果から、PRIPは IRS-1 のインターナリゼーションの抑制、IRS-1 のセリン・スレオニンリン酸化の脱リン酸化促進の2つの機構によって脂肪細胞におけるインスリンシグナル調節に重要な役割を担っていることが明らかになった。

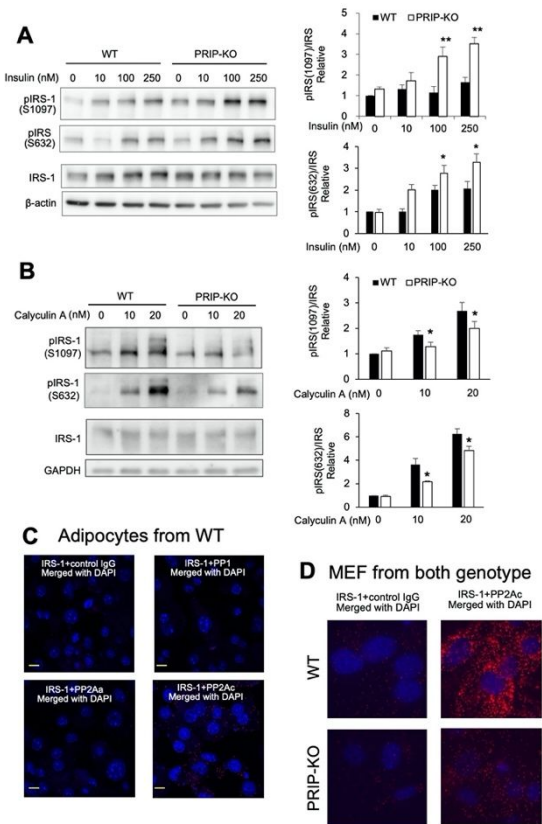


図 3. PRIP が IRS-1 のセリン・トレオニンのリン酸化の脱リン酸化を促進する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yaginuma T, Gao J, Nagata K, Muroya R, Fei H, Nagano H, Chishaki S, Matsubara T, Kokabu S, Matsuo K, Kiyoshima T, Yoshioka I, Jimi E.	4. 巻 -
2. 論文標題 p130Cas induces bone invasion by oral squamous cell carcinoma by regulating tumor epithelialmesenchymal transition and cell proliferation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizokami A, Mukai S, Gao J, Kawakubo-Yasukochi T, Otani T, Takeuchi H, Jimi E, Hirata M.	4. 巻 244
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The journal of endocrinology	6. 最初と最後の頁 285-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-19-0288.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Touyama K, Khan M, Aoki K, Matsuda M, Hiura F, Takakura N, Matsubara T, Harada Y, Hirohashi Y, Tamura Y, Gao J, Mori K, Kokabu S, Yasuda H, Fujita Y, Watanabe K, Takahashi Y, Maki K, Jimi E.	4. 巻 120
2. 論文標題 Bif-1/Endophilin B1/SH3GLB1 regulates bone homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 18793-18804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29193.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asano Satoshi, Taniguchi Yuri, Yamawaki Yosuke, Gao Jing, Harada Kae, Takeuchi Hiroshi, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Suppression of cell migration by phospholipase C-related catalytically inactive protein-dependent modulation of PI3K signalling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-05908-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Mizokami, DaGuang Wang, Mitsuru Tanaka, Jing Gao, Hiroshi Takeuchi, Toshiro Matsui, Masato Hirata	4. 巻 80
2. 論文標題 An extract from pork bones containing osteocalcin improves glucose metabolism in mice by oral administration	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2176-2183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2016.1214530.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jing Gao, Mikiko Hirata, Akiko Mizokami, Jin Zhao, Ichiro Takahashi, Hiroshi Takeuchi, Masato Hirata	4. 巻 28
2. 論文標題 Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinases A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis in PC12 cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 425-437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2015.12.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高靖、溝上顕子、竹内弘、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題 脂肪細胞のインスリンシグナリングの調節におけるPRIPの役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室屋 龍佑、高 靖、中富 千尋、藤井 慎介、清島 保、自見英治郎
2. 発表標題 唾液腺の形態形成及び機能発現における p130Cas の役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jing Gao, Akiko Mizokami, Hiroshi Takeuchi, Ejiro Jimi and Masato Hirata
2. 発表標題 PRIP is involved in the regulation of insulin signaling mediated by internalization of insulin receptor in adipocyte
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室屋 龍佑、高 靖、中富 千尋、藤井 慎介、清島 保、自見英治郎
2. 発表標題 The physiological role of p130Cas in salivary gland development and function
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jing Gao, Akiko Mizokami, Hiroshi Takeuchi, Ejiro Jimi and Masato Hirata
2. 発表標題 A novel molecule involved in the regulation of insulin signaling mediated by internalization of insulin receptor in adipocyte
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高靖、溝上顕子、竹内弘、自見英治郎 平田雅人
2. 発表標題 インスリン受容体基質のリン酸化制御におけるPRIPの役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jing Gao, Akiko Mizokami, Masato Hirata
2. 発表標題 Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP is involved in the regulation of insulin signaling via IRS1/Akt pathway by modulating serine phosphorylation of IRS-1
3. 学会等名 ASCB 2016 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Jing Gao, Akiko Mizokami, Hiroshi Takeuchi, Masato Hirata
2. 発表標題 Differential role of SNAP-25 phosphorylation by Protein Kinase A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis
3. 学会等名 The 23rd General Meeting of the Japanese Association for Dental Science (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高靖、平田牧子、溝上顕子、竹内弘、平田雅人
2. 発表標題 SNARE複合体形成と開口分泌調節におけるSNAP-25リン酸化の役割
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Aya Nishikawa, Jing Gao, Akiko Mizokami, Makiko Hirata, Masato Hirata
2. 発表標題 Involvement of Phospholipase C-related but Catalytically Inactive Protein, PRIP in the Regulation of Insulin Signaling
3. 学会等名 The 9th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----