

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度  
 課題番号：19580324  
 研究課題名（和文）ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK） 活性阻害によるインスリン抵抗性解除機構  
 研究課題名（英文）Clearance of insulin resistance by inhibiting diacylglycerol kinase activity.  
 研究代表者  
 氏名（アルファベット）伯野史彦（HAKUNO FUMIHIKO）  
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
 研究者番号 30282700

## 研究成果の概要：

本研究では IRS と結合する DGK 活性が Glut4 の細胞膜移行を阻害するメカニズムを解明し、インスリン抵抗性の発生と IRS-1 結合性 DGK との関連を明らかにすることを目的としている。3T3-L1 adipocytes において、siRNA によって DGK をノックダウンすると、インスリン非依存的な糖取り込み量に変化は認められないが、インスリン依存的な糖取り込み量が有意に減少すること、さらにインスリン依存的なインスリンシグナル分子の活性化には全く影響しないことを明らかにした。続いて、阻害剤を用いて、DGK の活性を阻害したところ、インスリン依存的な糖取り込みが促進されることが明らかとなった。しかし、インスリン依存的なインスリンシグナル分子の活性化には全く影響を与えなかった。一方で、糖取り込み担体である GLUT4 の細胞膜移行はインスリン非依存的に促進されており、DGK 活性は GLUT4 の細胞膜移行を阻害していることが明らかとなった。これらの結果から、DGK は、複雑な機構によってこれまでに知られているインスリンシグナルとは異なる新規シグナルを介して、インスリン依存的な糖取り込みを制御していることが明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学/獣医学・応用動物科学

キーワード：生産機能制御

（インスリン、糖尿病、インスリン受容体基質（IRS）、DGK、脂質）

## 1. 研究開始当初の背景

インスリンは広範な生理活性を持った同化ホルモンで、特に糖代謝の制御に重要な役割を果たしている。一般に、インスリンが標的組織に存在する受容体を活性化すると、イン

スリン受容体基質（IRS）がチロシンリン酸化される。この IRS のチロシンリン酸化を認識して、様々なシグナル分子が結合し、種々の下流シグナルを活性化する。このようなシグナルの活性化がインスリンの広範な生理

活性、特に脂肪や筋でのインスリン依存的なグルコーストランスポーター (Glut) 4 の細胞膜移行、グルコースの細胞内への取り込みに必要であると考えられている。我々は IRS 結合タンパク質として同定されたジアシルグリセロールキナーゼ (diacylglycerolkinase) (DGK) のインスリンシグナルにおける役割を解析する過程で、「インスリン非存在下では、IRS-1 に DGK が結合して、Glut4 の細胞膜移行を阻害している。インスリン刺激によって DGK が IRS-1 から遊離すると、DGK による Glut4 の細胞膜移行阻害が解除され、替わって PI 3 kinase が IRS-1 に結合、Glut4 の細胞膜移行を促進する」という全く新しい作業仮説を提唱するに至った。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では IRS と結合する DGK 活性が Glut4 の細胞膜移行を阻害するメカニズムを解明し、インスリン抵抗性の発生と IRS-1 結合性 DGK との関連を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

次の 2 つの手法によって研究を進めた。

### 1) DGK 結合領域の同定

IRS-1、IRS-2、DGK の種々の deletion series と GST との融合タンパク質を大腸菌内で発現・精製した。それとは別に全長 DGK または IRS-1、IRS-2 を 293T 内で発現させ、pull-down assay によって DGK と IRS との結合を検出した。また、293T に IRS-1、IRS-2、DGK の種々の deletion series を過剰発現させ、それぞれの抗体で免疫沈降、沈降物を immunoblotting することによって共免疫沈降によって結合を検出した。

### 2) DGK の活性阻害や発現抑制によるインスリンシグナルおよび糖取り込みに及ぼす影響の解析

3T3-L1 にエレクトロポレーションによって DGK に対する siRNA を導入、DGK の発現を抑制した際の、インスリンシグナル活性、インスリンによる GLUT4 の細胞膜移行量、インスリンによる糖取り込み量を測定した。さらに 3T3-L1 脂肪細胞に DGK の阻害剤を加えた場合にも上記の活性を測定した。

## 4. 研究成果

### 1) DGK 結合領域の同定

IRS-1、IRS-2 の種々の deletion series と GST との融合タンパク質を大腸菌内で発現・精製した。それとは別に全長 DGK を 293T 内で発現させ、pull-down assay によって DGK との結合を検出した。その結果、DGK は IRS-1 の 224-861a.a. と結合することが明らかとなった。さらに逆に DGK を GST と融合させたタンパク質を大腸菌内で発現・精製し、IRS-1 を 293T 内で発現させ、同様に

pull-down assay を行うと、結合が全く検出できなかった。両方のタンパク質を 293T で発現させた、共免疫沈降では二つのタンパク質の結合は検出されたことから、DGK が大腸菌では行われない翻訳後修飾が細胞内でなされ、その修飾が結合に必須であることが示唆された。

### 2) DGK の活性阻害や発現抑制によるインスリンシグナルおよび糖取り込みに及ぼす影響の解析

3T3-L1 adipocytes において、electroporation により DGK をノックダウンすると、インスリン非依存的な糖取り込み量に変化は認められないが、インスリン依存的な糖取り込み量が有意に減少すること、さらにインスリン依存的なインスリンシグナル分子の活性化には全く影響しないことを明らかにした。続いて、DGK の活性を阻害する阻害剤を用いて、インスリン依存的な糖取り込み量、インスリンシグナルの活性化に与える影響を調べた。その結果、DGK の活性阻害によってインスリン依存的な糖取り込みが促進されることが明らかとなった。また、DGK 活性を阻害してもインスリン依存的な IRS-1、IRS-2 のチロシンリン酸化量、Akt の活性化、Erk の活性化に変化が認められなかった。一方で、糖取り込み担体である GLUT4 の細胞膜移行はインスリン非依的に促進されており、DGK 活性は GLUT4 の細胞膜移行を阻害していることが明らかとなった。このように複雑な機構によってこれまでに知られているインスリンシグナルとは関係ない新規シグナルを介して DGK はインスリン依存的な糖取り込みを制御していることが明らかとなった。

## 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) Fukushima T., Nedachi T., Akizawa H., Hakuno F. and Takahashi S-I. 2008 Distinct Modes of Activation of Phosphatidylinositol 3 kinase in Response to cAMP or IGF-1 Play Different Roles in Regulation of Cyclin D1 and p27Kip1 in FRTL-5 Cells. *Endocrinology* **149**: 3729-3742
- 2) Nagata S., Hakuno F., Takahashi S-I. and Nagasawa H. 2008 Identification of Bombyx mori Akt and its phosphorylation by bombyxin stimulation. *Comp Biochem Physiol. B Biochem Mol. Biol.* **151**: 355-360
- 3) Kabuta T., Take K., Kabuta C., Hakuno F., and Takahashi S-I. 2008 Differential

- subcellular localization of insulin receptor substrates depends on C-terminal regions and importin beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**: 741-746
- 4) Naoko Sasaki-Suzuki, Kiyoshi Arai, Tomomi Ogata, Kouhei Kasahara, Hideyuki Sakoda, Kazuhiro Chida, Tomoichiro Asano, Jeffrey E. Pessin, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. 2009 GH inhibition of glucose uptake in adipocytes occurs without affecting GLUT4-translocation through an IRS-2 PI-3 kinase dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **284**: 6061-6070
  - 5) Junko Morita, Fumihiko Hakuno, Naomi Hizuka, Shin-Ichiro Takahashi, Kazuo Takano. 2009 Growth hormone (GH) and Insulin-like growth factor (IGF)-1 represses 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1) mRNA expression in 3T3-L1 cells and its activity in their homogenates. *Endocrine J.* In press.
- [学会発表](計11件)
- 1) 松尾仁雄、武和巳、伯野史彦、高橋伸一郎 AP複合体が細胞内局在を決めている IRS-1はインスリンシグナル伝達に重要な役割を果たしている、日本生物学会年会、日本生化学会大会、合同大会 2007年12月13日(横浜)
  - 2) 緒形友美、新井清志、鈴木尚子、伯野史彦、高橋伸一郎 3T3-L1脂肪細胞では IRS-2を介したインスリンシグナルがグルコース輸送体(GLUT)4の活性化に必要である 日本生物学会年会、日本生化学会大会、合同大会 2007年12月14日(横浜)
  - 3) 金子元、山内瑤子、岡嶋裕志、長谷川高士、山内啓太郎、西原真杉、中江淳、伯野史彦、高橋伸一郎 インスリン受容体基質(IRS)-1の強制発現はL6筋芽細胞のFoxo1核局在および筋分化を阻害する 第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16-18日(青森)口頭発表
  - 4) Masao Matsuo, Kazumi Take, Tomohiro Kabuta, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Insulin receptor substrate (IRS)-1 around endosomes, sorted by adaptor protein (AP)-1, is essential for IGF-1-induced DNA synthesis in L6 myoblasts. 4<sup>th</sup> International Congress of GRS-IGF Society, September 16<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>, 2008 (Genova, Italy) Oral (Hakuno F)
  - 5) Toshiaki Fukushima, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Nedd4 interacts with insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 leading to enhancement of IGF signals through the PI 3 kinase pathway in a different manner. 4<sup>th</sup> International Congress of GRS-IGF Society, September 16<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>, 2008 (Genova, Italy) Oral (Fukushima T)
  - 6) Yoko Yamauchi, Gen Kaneko, Hiroshi Okajima, T. Kadowaki, Keitaro Yamanouchi, Jun Nakae, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Overexpression of IRS-1 suppresses initiation of myogenesis through exclusion of Foxo1 from the nucleus in the PI 3 kinase dependent mechanism. 4<sup>th</sup> International Congress of GRS-IGF Society, September 16<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>, 2008 (Genova, Italy) Oral (Yamauchi Y)
  - 7) Daisuke Yamanaka, Takeshi Akama, Toshiaki Fukushima, Chie Kawasaki, Taku Nedachi, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. p125, a novel PI 3 kinase associated protein (PITKAP) plays an essential role in cAMP dependent potentiation of IGF bioactivities in a thyroid cell line. 4<sup>th</sup> International Congress of GRS-IGF Society, September 16<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>, 2008 (Genova, Italy) Oral (Yamanaka D)
  - 8) Toshiaki Matsui, Hiroshi Okajima, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. The role of interaction of insulin receptor substrate (IRS) with Rabankyrin 5/Ankhn in vesicle transport. 日本分子生物学会年会、日本生化学会大会、合同大会 2008年12月12日(神戸)口頭発表(松井利晃)
  - 9) Toshiaki Fukushima, Hidehito Yoshihara, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Ubiquitination of insulin receptor substrate (IRS)-2 enhances its tyrosine phosphorylation induced by insulin-like growth factor (IGF)-1. 日本分子生物学会年会、日本生化学会大会、合同大会 2008年12月12日(神戸)
  - 10) 岡嶋裕志、松尾仁雄、伯野史彦、高橋伸一郎. ミトコンドリアに存在するインスリン受容体基質(IRS)の新しい機能。日本分子生物学会年会、日本生化学会大会、合同大会 2008年12月12日(神戸)
  - 11) 安藤康年、篠澤裕介、飯島由実、大井優子、綿中優介、矢中規之、伯野史彦、高橋伸一郎. GKAP (G-kinase-anchoring protein)を介したインスリン抵抗性の新しい発生機構の解明。日本農芸化学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

特になし

取得状況(計 0 件)

特になし

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伯野史彦 (HAKUNO FUMIHIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

(2) 研究分担者

太田昭彦 (H20 年度より連携研究者へ移行)

(3) 連携研究者

平成 20 年度より

太田昭彦 (OHTA AKIHIKO)

( 明治大学・農学部・准教授 )