

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790212  
 研究課題名（和文） ホスホイノシチドホスファターゼによるイノシトールリン脂質の時空間制御  
 研究課題名（英文） Temporal and special regulation of phosphatidylinositol by phosphoinositide phosphatases  
 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： 細胞増殖や細胞内物質輸送など様々な細胞内シグナル伝達を司るホスファチジルイノシトール3リン酸（PIP3）は、PIP3の脱リン酸化酵素であるSKIPやPTENによって細胞内において時間的にも空間的にも精緻に制御されていることを明らかにした。この結果はがんや糖尿病の一要因を知る上で有力な手がかりとなると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：イノシトールリン脂質、PIP3、SKIP、PTEN

## 1. 研究開始当初の背景

(1) PIP3ホスファターゼは哺乳類に9種類存在する。PTENは多くのがん細胞で変異が認められ、がん細胞の増殖やがん化に関与することが知られているが、PTEN以外のものについて生理的な意義は不明であった。これまでに細胞内での過剰発現系を用いた実験が数多く行われ、多くの知見が得られているが、どのPIP3ホスファターゼに関しても同じような結果だけが得られてきた。

(2) これまで、SHIP2やSKIPなどのPIP3ホスファターゼに関しては、インスリンシグナルへの関与が示唆されてきた(Wada et al.

Mol. Cell. Biol. 2001, Ijuin et al. Mol. Cell. Biol. 2003)。その分子機構に関しては明らかになっていなかった。特にSKIPに関しては全く知見がなかった。

従って、PIP3ホスファターゼの機能に関しては、どれもPI3キナーゼシグナルの負の制御を行っており、その機能は似ているものと考えられていた。

(3) PTENの骨格筋特異的な遺伝子ノックアウトマウスおよびSHIP2のノックアウトマウスの論文が報告され(Clement et al. Nature, 2001. Wijesekara et al. Mol. Cell. Biol., 2005)、PTENやSHIP2のインスリンシグナル

への関与が示唆された。後に、SHIP2 の遺伝子ノックアウトマウスについては、全身の代謝の向上が認められるとの報告がなされた (Sleeman et al. Nat Genet., 2005)。

(4) SKIP に関しては、私が単離した PIP3 ホスファターゼである (Ijuin et al. J. Biol. Chem., 2000)。SKIP は骨格筋に多く存在し、インスリンシグナルをホスファターゼ活性依存的に抑制すること、インスリン依存的に小胞体から細胞膜への移行が認められることが明らかになった (Ijuin et al. Mol. Cell. Biol. 2003)。

## 2. 研究の目的

(1) PIP3 を脱リン酸化する酵素が多様に存在することは、それぞれが他の分子と異なる特異的な機能を持つ可能性を示唆している。PIP3 ホスファターゼ SKIP、SHIP2 の細胞内での生理的意義を明らかにし、PIP3 脱リン酸化における PTEN との相違を証明する。

(2) SKIP 遺伝子欠損マウスの表現型の解析を行い、より生理的に PTEN や SHIP2 との機能の相違を明らかにする。特に、PTEN や SHIP2 はインスリン抵抗性や糖尿病との関連が知られており、その表現型を解析することは、これらの理解にとっても大切であると考えられる。

(3) PTEN や SHIP2 のノックアウトマウスの解析の結果は、PIP3 ホスファターゼが糖尿病予防の標的となる可能性を示唆している。骨格筋における SKIP のインスリンシグナルを介した糖代謝における役割を解析することによって、将来的に SKIP を始めとする PIP3 ホスファターゼが糖尿病治療の薬剤ターゲットとなる可能性を明らかにすることができると思われる。

## 3. 研究の方法

(1) SKIP が実際の生体内でインスリンシグナルおよび糖代謝を制御していることを証明する目的で、SKIP 遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型の解析を行った。特に糖代謝に関する解析を行い、高脂肪食摂食時におけるインスリン抵抗性惹起の検討や、インスリン感受性の検討を行った。その結果と PTEN や SHIP2 の遺伝子欠損マウスの結果と比較検討を行った。

(2) SKIP は骨格筋に多い PIP3 ホスファターゼである。そこで、SKIP 遺伝子欠損マウスのインスリン感受性の向上は骨格筋に由来するものであることを確認する目的で、SKIP 遺伝子欠損マウス由来の骨格筋を用いて、インスリンシグナルの検討および骨格筋における糖代謝の検討を行った。

(3) SKIP がそれ以外の PIP3 ホスファターゼと比較して優位にインスリンシグナルを調節していることを証明する目的で、マウス骨格筋由来の C2C12 細胞を用いて SKIP、SHIP2、PTEN の発現抑制系を作製して、個々のホスファターゼがインスリンシグナルに及ぼす影響について検討を行った。インスリン刺激依存的な PI3 キナーゼシグナルの活性化を比較検討した。その結果を、ノックアウトマウスの結果と照合し、SKIP がインスリンシグナル特異的に制御するかどうかについて検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) SKIP は骨格筋に多く発現する分子であり、PIP3 を脱リン酸化し、PIP2 を産生する。従って、インスリン刺激依存的な PI3 キナーゼシグナルを負に制御する。本研究では、SKIP 遺伝子欠損マウスを作製した。ホモ遺伝子欠損マウスは胎生致死であった。SKIP 遺伝子ヘテロ欠損マウスは、他の PIP3 ホスファターゼ遺伝子の発現に影響を与えることなく、SKIP の発現のみを抑制していた。このマウスは外見に異常は認められず、正常な発育をした。同じ PIP3 脱リン酸化酵素である PTEN の欠損や変異は癌化を引き起こすことが知られている。実際、臓器特異的な PTEN 欠損マウスは様々ながんを引き起こす。しかしながら、SKIP ヘテロ欠損マウスでは、がんは認められなかった。これは、SKIP ががんの原因遺伝子でないこととも一致している。

(2) SKIP ヘテロ欠損マウスを用いて、インスリン感受性、高脂肪食依存的なインスリン抵抗性の惹起に関する実験を行った。SKIP ヘテロ欠損マウスは、体重に差は認められなかったが、骨格筋の質量の増加が認められた。定常時の血糖値、血中インスリン値および中性脂肪値には、SKIP ヘテロ欠損マウスで異常は認められなかったが、糖負荷実験およびインスリン負荷実験の結果、このマウスでは顕著な血糖値の低下が認められた。血中インスリン濃度は正常であったため、SKIP ヘテロ欠損マウスでは、骨格筋における糖代謝

能が亢進していることが示唆された。さらに clamp 実験によって、生体内における代謝の上昇(図1、Pps/+マウス、Rd 値)などが見られ、SKIP ヘテロ遺伝子欠損マウスにおける糖代謝の亢進が裏付けられた。

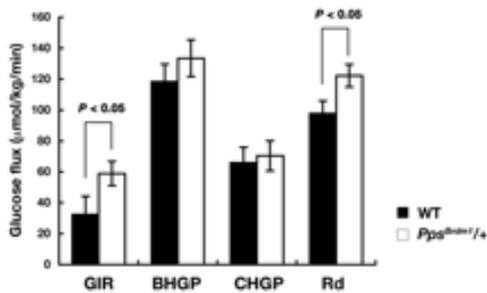


図1. SKIP ヘテロノックアウトマウスにおける糖代謝能の上昇

(3) SKIP は骨格筋におけるインスリンシグナルを制御することが示唆された。そこで、SKIP ヘテロ遺伝子欠損マウスから骨格筋を単離し、インスリン応答性および、インスリン依存的な糖取り込み能を検討した。その結果、SKIP ヘテロノックアウトマウスでは、Akt/PKB のリン酸化および、組織内へのグルコース取り込みが顕著に亢進していた。この結果は、SKIP が生理的にインスリン刺激依存的な糖代謝を制御することを表している。

PTEN や SHIP2 のノックアウトマウスは、通常時のインスリン感受性には影響を与えないこと、高脂肪食や薬剤によるインスリン抵抗性を誘導した時に、それに対する抵抗性(インスリン感受性の上昇)を起こすことが知られている。本研究の結果は、SKIP が恒常的に生体内でインスリンシグナルを調節していることを表しており、これは他の PIP3 ホスファターゼにはない表現型である。SKIP ヘテロノックアウトマウスが、筋肉の質量の上昇が認められることから、SKIP は糖尿病予防の遺伝子ターゲットとして有効であると考えられる。

さらに、このマウスは高脂肪食による、インスリン抵抗性の誘導に対しても顕著な抵抗性を示し、体重の低下、インスリン感受性の向上が認められた(図2、Pps/+マウス)。これは、SKIP が他の PIP3 ホスファターゼと同様に、糖尿病の治療の薬剤ターゲットとして有効である可能性を示唆している。PTEN や SHIP2 と違い、SKIP の場合はヘテロ遺伝子欠損、つまり 50%のタンパク質の減少によって、十分な糖代謝能の改善、インスリンシグナルの向上が認められたことから、他のホスファターゼと比較しても十分に有効な糖尿病治療のターゲットなる可能性を持つと期待さ

れる。

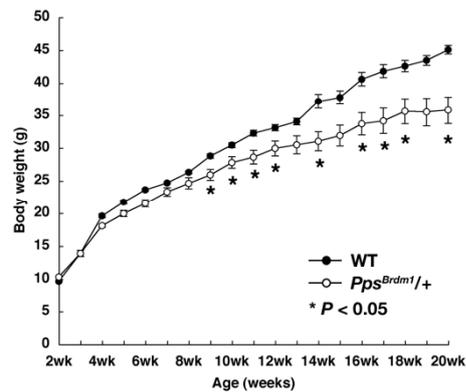


図2. SKIP ヘテロノックアウトマウスにおける、高脂肪食投与時の体重増加

さらに、SKIP ヘテロ遺伝子ノックアウトマウスは PTEN 遺伝子欠損マウスのように癌を形成していなかったことは SKIP が副作用の少ない薬剤ターゲットとなる可能性を示している。このように、SKIP は様々な点から考えて、非常に有効な糖尿病治療の新しいターゲット分子であると考えられ、今後、SKIP の活性の阻害剤の開発、細胞膜局在の阻害剤の開発など、さらに大きく発展していく研究であることは間違いない。

(4) マウス C2C12 細胞において SKIP, PTEN および SHIP2 がインスリンシグナルに及ぼす影響について検討を行った。PTEN の発現抑制によって、定常状態の PIP3 量が上昇し、一方 SKIP ではインスリン刺激依存的な PIP3 産生が顕著に上昇した。さらにインスリンシグナルの強弱は PIP3 量に相関していることも明らかになった。従って、SKIP はインスリン刺激依存的な PIP3 産生を制御することによって、インスリンシグナルをコントロールしていることが明らかになった。

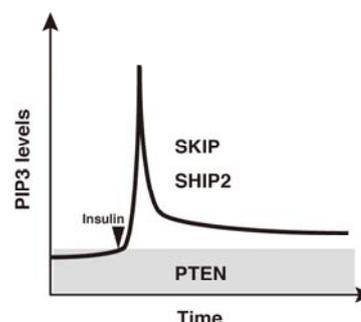


Fig. 2 Differential regulation of PIP3 levels by PIP3 phosphatases

図3. PIP3 ホスファターゼによる細胞内 PIP3 量の調節

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 3 件)

1. Ijuin T, Yu YE, Mizutani K, Pao A, Tateya S, Tamori Y, Bradley A, Takenawa T. Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. Mol Cell Biol. Vol. 28, No. 17:5184-5195, 2008 査読有り

2. Kanzaki N, Ogita H, Komura H, Ozaki M, Sakamoto Y, Majima T, Ijuin T, Takenawa T, Takai Y. Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. J Cell Sci. Vol. 121 No. 12:2008-2017. 2008 査読有り

3. Sbrissa D, Ikononov OC, Fu Z, Ijuin T, Gruenberg J, Takenawa T, Shisheva A. Core protein machinery for mammalian PtdIns(3,5)P2 synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport: Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. J Biol Chem. Vol. 282 No. 33:23878-23891. 2008 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

①伊集院 壮、竹縄 忠臣  
細胞内 PIP3 調節とインスリン依存的糖代謝  
BMB2008, 2008 年 12 月 9~12 日、神戸

②伊集院 壮、竹縄 忠臣  
ホスホイノシチドホスファターゼによるインスリン刺激依存的な GLUT4 の膜移行の制御  
日本細胞生物学会、2008 年 6 月 29~7 月 1 日、横浜

③伊集院 壮、竹縄 忠臣  
ホスホイノシチドホスファターゼファミリー分子による特異的なインスリン、IGF-1 シグナル伝達機構の調節  
BMB2007, 2007 年 12 月 13 日、横浜 (招待講演)

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

(3) 連携研究者