

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究【スタートアップ】

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890279

研究課題名（和文） 過栄養が引き起こすインスリン抵抗性分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism of insulin resistance induced by overnutrition

研究代表者

堤 理恵 ( TSUTSUMI RIE )

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・学術研究員

研究者番号：80510172

研究成果の概要（和文）：

肝臓はインスリンの三大作用組織のひとつであると同時に、アミノ酸のたんぱく質合成経路をもつ点においても重要である。その転写の鍵となるのが p70 reosomal protein kinase 1 (S6K1)であり、この分子が過剰栄養などで異常に活性化されることでインスリン抵抗性が引き起こされる。S6K1 の活性化はインスリン抵抗性などの病態において重要であるが、その上流のメカニズムは明らかにされておらず、本研究において申請者らは栄養センサーとして知られる Rheb/mTOR、その上流分子の Vps34 が重要ではないか、さらにその活性化機構には Rheb がトランスロケーションを生じるのではないかと仮説を立てて、研究を行った。結果、アミノ酸刺激により Vps34 および Rheb の発現量は増し、アミノ酸除去で発現は消失した。また、アミノ酸刺激によって Vps34 は Rab と複合体を形成することが示唆された。さらに、栄養刺激することで Rheb は mTOR へのエンドソームトラフィッキングを生じさせ、Rheb トランスロケーションが mTOR の活性化を引き起こしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Liver has the critical role in amino acids uptake and protein synthesis from amino acid as well as some insulin actions. p70 reosomal protein kinase 1 (S6K1) is the key regulator of translation and its over activation induces insulin resistance by negative feedback to IRS1. However, its regulation of S6K1 has not be clear yet. In this study, we hypothesized that Vps34 and Rheb play a role of mTOR-S6K1 signaling as a nutrient sensor and GTP-bound Rheb induces endosome trafficking to activate mTOR. There results indicate Vps34 and Rheb, which is activated by nutritional uptake, regulate S6K1 and translocation of Rheb is critical for activation of mTOR-S6K1 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：mTOR 栄養 Rheb 肝臓 インスリン抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は飽食・過食の時代を迎えたわが国で最も大きな健康障害のひとつであり、その患者の QOL の向上や急増する患者数の抑制には適切な予防・治療法の確立が急務とされる。分子メカニズムを解明する研究は、従来糖代謝に小弟をあてて行われてきたが、近年アミノ酸によるインスリン受容体を介さない経路とインスリン抵抗性の関与も注目され、申請者が行った研究でもタンパク質合成経路とインスリン抵抗性の関与は示唆された。これは糖のみでなくアミノ酸（タンパク質）の過剰摂取によってもインスリン抵抗性が生じることを示唆するが、これまでそのメカニズムは明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸供給の過不足が S6K1 の異常な活性化によるインスリン抵抗性を引き起こすメカニズムを解明することを目的とした。アミノ酸が Class III PI3 kinase である hVps34 経路を介して Rheb endosomal trafficking が生じ、これによって mTOR-S6K1 signaling が活性化されると仮説立て、それを確かめることを試みた。

### 3. 研究の方法

#### 1) Rheb/mTOR トランスロケーションモデルの確立

Rheb-pcDNA3 を神戸大学医学部より享受され、EGFP を融合させ、GFP 融合 Rheb DNA を作成した。この DNA を HEK293 細胞にトランスフ

ェクションし、蛍光顕微鏡にてその局在を確認した。

#### 2) hVps34-Rheb 活性化に対する栄養シグナルの同定

HEK293 細胞を用いてアミノ酸刺激した際の Vps34 および Rheb の発現の有無を調べた。アミノ酸刺激にはロイシンの単独投与と細胞培養用のアミノ酸カクテルを用いて刺激した。Vps34 および GTP-bound Rheb の発現量をウェスタンブロットで確認した。次に Rheb siRNA を用いてノックアウトした HEK293 細胞にアミノ酸刺激を行い、Vps34 および Rheb の発現量を確認し、VVps34ga Rheb の上流に存在するか否かを確認した。さらに培養液からアミノ酸を除去し Vps34 の発現が消失することを確認した。

また、この Vps34 は Rab と複合体を形成することから、アミノ酸刺激群、刺激なし群で免疫沈降アッセイし、アミノ酸が複合体形成にどのように影響するのかを検討した。

#### 3) 糖尿病マウスにおいて S6K1 活性が上昇しているメカニズムの解明

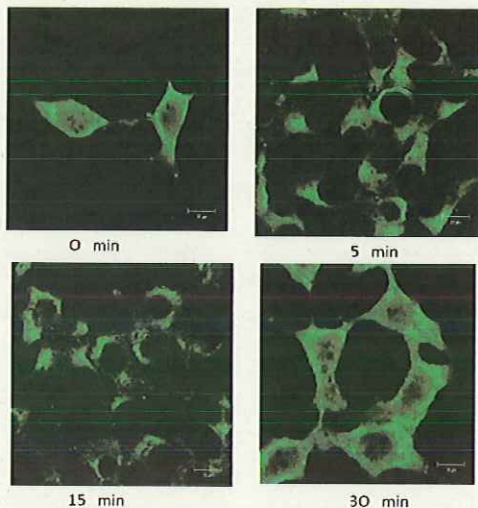
本実験では、異なるマウス群（db/db 糖尿病マウス、高脂肪摂取マウス、コントロールマウス）における S6K1 の活性化の相違を検討した。Vps34, Rheb, mTOR, S6K1 それぞれの活性化をウェスタンブロットにて確認した。さらに、S6 kinase assay を行い活性レベルの差を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) Rheb/mTOR トランスロケーションモデルの確立

GFP-Rheb を HEK293 細胞にトランスフェクションし、アミノ酸刺激 (0, 5, 15, 30, 60, 120 分) を行い蛍光顕微鏡で観察した。0 分 (刺激なし) では膜近辺が強く蛍光を発していたが、5 分、15 分では細胞質に蛍光が移動した。細胞質での蛍光は 30 分で減弱し (図 1)、60 分、120 分で膜へと戻った。さらに、生細胞を用いてリアルタイムでの細胞内トランスロケーションを追うことを試みたが、移行する過程を観察することは不可能であった。Rheb-pcDNA3 をトランスフェクションし、上記と同様のタイムコースでロイシン刺激し、免疫染色を試みたが、結果は同様であった。さらに、刺激した細胞を超遠心分離し、細胞質、細胞膜に分けてその分画を用いてウェスタンブロットを行った。結果、Rheb のみの発現が変化し、15 分刺激のみが細胞質分画に、0 分、30 分では膜分画に発現が多く見られたが、完全な移行ではなく、どの分画にも Rheb の存在が確認された。

図 1

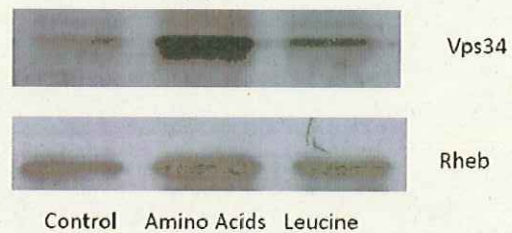


##### 2) hVps34-Rheb 活性化に対する栄養シグナルの同定

HEK293 細胞を用いてアミノ酸刺激した

際の Vps34 および Rheb の発現の有無を調べた。アミノ酸刺激し、ウェスタンブロットで確認したところ Vps34 および GTP-bound Rheb は発現量が増した (図 2)。次に Rheb siRNA を用いてノックアウトした細胞にアミノ酸刺激を行うと Rheb の発現は減少したが、Vps34 の発現量には変化がなく Vps34 は Rheb の上流に存在することが示唆された。さらに培養液からアミノ酸を除去し Vps34 の発現が消失することを確認した。また、この Vps34 は Rab と複合体を形成する。アミノ酸刺激群、刺激なし群で免疫沈降アッセイしたところ、アミノ酸刺激下において複合体を形成している一方、非刺激下では形成されていない。このことからアミノ酸刺激によって Vps34 は Rab と複合体を形成することが示唆された。

図 2



##### 2. 糖尿病マウスにおいて S6 キナーゼ活性が上昇しているメカニズムの解明

本実験では、異なるマウス群 (db/db 糖尿病マウス、高脂肪摂取マウス、コントロールマウス) における S6K1 の活性化の相違を検討したが、上記にあげる順で活性が強い結果であり、その上流である mTOR の活性化と一致していた。Rheb の発現量については、過食である db/db マウスにのみ高く、高脂肪食群とコントロール群には差がなかった。現在さらに詳細に検討中である。

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)

①RIE TSUTSUMI & NICHOLAS J.G. WEBSTER,  
GnRH pulsality, the pituitary response and  
reproductive dysfunction. Endocrine  
Journal, 56(6), 729-737, 2009, 査読有

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 理恵 ( TSUTSUMI RIE )

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・学術研究員

研究者番号:

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし