

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790928

研究課題名(和文) インスリン受容体基質のモノユビキチン化を介したインスリン活性調節機構の解明

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of insulin activity through IRS monoubiquitination

研究代表者

福島 俊明 (Fukushima, Toshiaki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：70543552

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)：インスリンとインスリン様成長因子(IGF)は互いに類似した構造のホルモンで、インスリンは血糖値の調節に、IGFは細胞増殖や個体成長に重要な役割を果たします。私達は、これまでにインスリンやIGFの細胞内情報伝達を担うタンパク質の一つ「インスリン受容体基質」がモノユビキチン化という種類の分子修飾を受けるとインスリンやIGFの作用が強まることを見つけており、今回の研究によってその詳細な分子機構を明らかにすることが出来ました。また、肝臓では細胞が受け取る栄養量が変化すると、この新しい機構を介してインスリンへの応答性が変化することも明らかになり、糖尿病発症機構の理解にとっても重要な発見と考えられました。

研究成果の概要(英文)：Insulin is a hormone that regulates blood glucose levels. Insulin-like growth factor (IGF) is another hormone similar in molecular structure to insulin, and IGF promotes cell proliferation and body growth. We previously found that insulin receptor substrate (IRS), a protein that mediates insulin/IGF intracellular signaling, is functionally changed by its modification called as "monoubiquitination", and it leads to the enhancement of insulin/IGF signaling and induction of their bioactivities. In this study, we elucidated the detailed molecular mechanisms underlying the enhancement of insulin/IGF signaling by IRS monoubiquitination. Furthermore, we found that, when the amounts of nutrition given to hepatocytes are changed, hepatic insulin sensitivity also changed through this novel mechanism. This finding is thought to be important for understanding pathogenic mechanism of diabetes.

研究分野：インスリンやインスリン様成長因子の細胞内シグナル伝達機構の研究

キーワード：インスリン インスリン様成長因子 インスリン受容体基質 糖尿病 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

インスリンとインスリン様成長因子(IGF)は互いに類似した構造のペプチドホルモンで、インスリンは糖代謝の調節に中心的な役割を果たし、IGFは細胞の増殖や個体の成長を促進する役割を果たす。インスリンやIGFの生理活性は、これらのホルモンの刺激に反応して活性化した受容体チロシキナーゼによるインスリン受容体基質(IRS)のリン酸化、および、これを引き金とする細胞内シグナル伝達を介して誘導される。IRSを介したシグナルの異常は様々な疾病と関連しており、例えばこれが過度に抑制されるとインスリン抵抗性が発症、II型糖尿病を含むメタボリックシンドロームの主因になると考えられている。従って、IRSを介したインスリン・IGFシグナルの調節機構の解明は急務である。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに、インスリン/IGFシグナルを仲介するIRS-2にユビキチンリガーゼNedd4が結合すると、IRS-2がモノユビキチン化され、インスリン/IGFに反応したIRS-2のチロシンリン酸化が促進、インスリン/IGF活性が増強することを見出してきた。本研究では、この現象の分子機構を解明し、インスリン・IGF活性の調節におけるこの現象の生理的意義を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) IRS-2とNedd4の結合の分子機構を調べるため、IRS-2やNedd4の種々の領域を欠いた変異体をHEK293細胞に発現、共免疫沈降法で解析した。また、これらの変異体を大腸菌で産生し、セルフリー結合実験を行なった。
- (2) IRS-2とNedd4の結合の制御機構を明らかにするため、H4IIE肝細胞を種々の条件で培養し、IRS-2とNedd4の結合や、インスリンに反応したIRS-2のチロシンリン酸化に及ぼす影響を解析した。
- (3) Nedd4によるIRS-2のユビキチン化部位を同定するため、IRS-2に存在する39個のリジン残基を種々の組み合わせでアルギニン残基に置

換した変異体とNedd4をHEK293T細胞に発現し、IRS-2を免疫沈降後、イムノブロット法によりIRS-2のユビキチン化量を調べた。また、IRS-2とNedd4を共発現した細胞からIRS-2を免疫沈降し、プロテアーゼで限定分解した後、ユビキチン化されているペプチドを濃縮、質量分析によって定量的に解析し、Nedd4の発現によってIRS-2のどのリジン残基のユビキチン化が増加するか調べた。さらに、同定したユビキチン化部位が変異したIRS-2とNedd4をHEK293細胞に発現し、IGF-Iに反応したIRS-2のチロシンリン酸化を解析した。

(4) モノユビキチン化されたIRS-2を認識するタンパク質を同定するため、ユビキチン結合ドメインを有するいくつかの候補タンパク質とIRS-2の結合を共免疫沈降法で解析した。実験の結果、Epsin1がモノユビキチン化IRS-2に結合することがわかったので、IRS-2とEpsin1の変異体を用いてこれらの結合領域を調べるとともに、Epsin1の発現抑制がIRS-2のチロシンリン酸化に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) まず、IRS-2とNedd4の結合の分子機構を調べた。その結果、Nedd4はC2ドメイン・WWドメイン・HECTドメインからなるタンパク質構造を有するが、C2ドメインを介してIRS-2と結合することがわかった。一方、IRS-2はPHドメインとPTBドメインを有するが、これらのドメインがNedd4と結合することも明らかとなった。さらに、Nedd4のC2ドメインとHECTドメインは分子内で相互作用することが知られているが、Nedd4のHECTドメインとIRS-2がNedd4のC2ドメインに対して競合的に結合することがわかった。また、Nedd4と類似構造を持つNedd4-2はIRS-2に結合せず、Nedd4はIRS-1をユビキチン化しないことを確認した。以上の結果から、「Nedd4のC2ドメインとHECTドメインの分子内相互作用が解除されることにより、Nedd4とIRS-2の相互作用が可能となる」という新しい制御機構が存在すると考えられた。

(2) IRS-2 と Nedd4 の結合の制御機構を明らかにするため、肝細胞をグルコースやアミノ酸が欠乏した培地で培養したところ、Nedd4 に何らかの分子修飾が起こり IRS-2 の PH-PTB ドメインに対する親和性が上昇、Nedd4 と IRS-2 の結合量が増加し、インスリンに応答した IRS-2 のチロシン酸化が増強することが明らかとなった。

(3) Nedd4 による IRS-2 のユビキチン化部位を同定するため IRS-2 のリジン残基の変異体を作製し解析した結果、IRS-2 の C 末端側の複数のリジン残基がユビキチン化部位であることが明らかとなった。さらに、定量的質量分析によって、特に 1331 番目のリジン残基が Nedd4 によって最もユビキチン化を受けやすいことが示された。HEK293 細胞に Nedd4 を過剰発現すると IGF 刺激に応じた IRS-2 のチロシン酸化が増強するが、ユビキチン化される部位が変異した IRS-2 ではチロシン酸化の増強が見られないことから、Nedd4 による IRS-2 のチロシン酸化の増強効果にはこのユビキチン化部位が必要であることが確認された。

(4) モノユビキチン化された IRS-2 を認識するタンパク質を同定するため解析を行なった結果、Nedd4 を発現した HEK293 細胞では、IRS-2 と Epsin1 の共免疫沈降量が増加することがわかった。Epsin1 はユビキチン結合モチーフを有するタンパク質で、細胞膜のクラスリン被覆小胞形成部位に集積することが知られている。IRS-2 や Epsin1 の変異体を用いた結合解析から、IRS-2 の C 末端付近に付加されたユビキチンに Epsin1 のユビキチン結合モチーフが結合することがわかった。さらに、Epsin1 を発現抑制すると、Nedd4 による IRS-2 のチロシン酸化の増強効果が消失した。

以上の研究結果を総合し、「Nedd4 によってユビキチン化された IRS-2 は Epsin1 と相互作用することにより細胞膜にリクルートされ、そこに存在するインスリン/IGF 受容体キナーゼによってチロシン酸化されやすくなり、インスリン/IGF シグナ

ルが増強する」という全く新しい分子機構が存在すると結論した。また、肝細胞は低栄養状態に置かれると何らかの仕組みで Nedd4 と IRS-2 の複合体形成が促進し、明らかとした機構を介してインスリン感受性が増強する、一方、過栄養状態では Nedd4 と IRS-2 の複合体が減少し、インスリン抵抗性発症の一因となる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Fukushima T, Yoshihara H, Furuta H, Hakuno F, Luan J, Duan C, Saeki Y, Tanaka K, Iemura SI, Natsume T, Chida K, Nakatsu Y, Kamata H, Asano T, Takahashi S. Nedd4-induced mono-ubiquitination of IRS-2 enhances IGF signaling and mitogenic activity. *Nat Commun*. 2015;6:6780. doi: 10.1038/ncomms7780. 査読あり
2. Ozoe A, Sone M, Fukushima T, Kataoka N, Chida K, Asano T, Hakuno F, Takahashi S. Insulin receptor substrate-1 associates with small nucleolar RNA which contributes to ribosome biogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:24. doi: 10.3389/fendo.2014.00024 査読あり
3. Kawashima Y, Hakuno F, Okada SI, Hotsubo T, Kinoshita T, Fujimoto M, Nishimura R, Fukushima T, Hanaki K, Takahashi S, Kanzaki S. Familial short stature is associated with a novel dominant-negative heterozygous insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) mutation. *Clinical Endocrinology*. 2014;81(2):312-314. doi: 10.1111/cen.12317 査読あり
4. Okubo H, Sakoda H, Kushiya A, Fujishiro M, Nakatsu Y, Fukushima T, Matsunaga Y, Kamata H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against non-alcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013. 305(12):G911-918. doi: 10.1152/ajpgi.00198.2014 査読あり
5. Ozoe A, Sone M, Fukushima T, Kataoka N, Arai T, Chida K, Asano T, Hakuno F, Takahashi S. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) forms a ribonucleoprotein complex associated with polysomes. *FEBS Lett*. 2013;587(15):2319-2324. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.066 査読あり
6. Zhang J, Nakatsu Y, Sinjo T, Guo Y, Sakoda H, Yamamotoya T, Otani Y, Okubo H, Kushiya A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Katagiri

- H, Takahashi SI, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Par14 associates with IRS-1, thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *J Biol Chem.* 2013;288(28):20692-20701. doi: 10.1074/jbc.M113.485730 査読あり
7. Kushiyama A, Sakoda H, Oue N, Okubo M, Nakatsu Y, Ono H, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kikuchi T, Fujishiro M, Nishiyama K, Aburatani H, Kushiyama S, Iizuka M, Taki N, Encinas J, Sentani K, Ogonuki N, Ogura A, Kawazu S, Yasui W, Higashi Y, Kurihara H, Katagiri H, Asano T. Resistin-Like Molecule β Is Abundantly Expressed in Foam Cells and Is Involved in Atherosclerosis Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):1986-1993. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301546 査読あり
 8. 高橋伸一郎、伯野史彦、亀井宏泰、Leonard Girnita、Ignacio Torres-Aleman、東祐輔、福嶋俊明、柴野卓志、尾添淳文、山中大介。インスリン様活性と高齢化社会で克服すべき疾病。 *化学と生物* 2013;51(6):389-399. doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.51.389 査読なし
 9. Otani Y, Nakatsu Y, Sakoda H, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiyama A, Okubo H, Ohno H, Nishimura F, Kamata H, Katagiri H, Asano T. Integrator complex plays an essential role in adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(2):197-202. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.029 査読あり
 10. Iwashita M, Nakatsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima T, Kumamoto S, Shinjo T, Kamata H, Nishimura F, Asano T. Valsartan restores inflammatory response by macrophages in adipose and hepatic tissues of LPS-infused mice. *Adipocyte.* 2013;2(1):28-32. doi: 10.4161/adip.21837 査読あり
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. Haruka Furuta, Hidehito Yoshihara, Toshiaki Fukushima, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Tomoichiro Asano, Kazuhiro Chida, Fumihiko Hakuno, and Shin-Ichiro Takahashi. The deubiquitinating enzyme, USP9X positively regulates IGF-I-dependent cell growth by inhibition of degradation of insulin receptor substrate (IRS)-2 in cancer cells. Gordon Research Conference: IGF and Insulin System in Physiology and disease, Ventura, CA, USA, 2015.3.8-13
 2. Toshiaki Fukushima, Hidehito Yoshihara, Haruka Furuta, Fumihiko Hakuno, Yasushi Saeki, Yusuke Nakatsu, Hideaki Kamata, Shin-Ichiro Takahashi, Tomoichiro Asano. Molecular mechanisms by which ubiquitin ligase Nedd4 enhances IRS-2-mediated IGF signaling. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2014.11.25-27
 3. Yasuka Matsunaga, Yusuke Nakatsu, Yasuyuki Seno, Aya Katasako, Ryuhei Kanaokam Toshiaki Fukushima, Hideaki Kamata, Tomoichiro Asano. Xanthine oxidase inhibitor febuxostat improves nonalcoholic steatohepatitis. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2014.11.25-27
 4. Yusuke Nakatsu, Keiichi Mori, Yasuka Matsunaga, Toshiaki Fukushima, Hideaki Kamata, Ken Yamaguchi, Hisamitsu Ishihara, Tomoichiro Asano. Roles of prolyl isomerase Pin1 in pancreatic beta cell function. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2014.11.25-27
 5. Toshiaki Fukushima, Hidehito Yoshihara, Haruka Furuta, Fumihiko Hakuno, Yasushi Saeki, Yusuke Nakatsu, Hideaki Kamata, Tomoichiro Asano, and Shin-Ichiro Takahashi. Novel Mechanisms by which Nedd4-IRS-2 Complexes Enhance IGF-I signals, and their Roles in IGF-I Action in Prostate Cancer Cell Proliferation. The International Congress of the GRS and the IGF Society, Singapore, 2014.10.15-18
 6. Haruka Furuta, Hidehito Yoshihara, Toshiaki Fukushima, Yasushi Saeki, Akihiro Ito, Claire Worrall, Leonard Girnita, Keiji Tanaka, Minoru Yoshida, Tomoichiro Asano, Kazuhiro Chida, Fumihiko Hakuno, and Shin-Ichiro Takahashi. The deubiquitinating enzyme, USP9X positively regulates insulin-like growth factor (IGF)-dependent cell growth by inhibition of degradation of IGF-I receptor (IGF-IR) and insulin receptor substrate (IRS)-2 in cancer cells. The International Congress of the GRS and the IGF Society, Singapore, 2014.10.15-18
 7. Toshiaki Fukushima, Hidehito Yoshihara, Haruka Furuta, Fumihiko Hakuno, Kazuhiro Chida, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Yusuke Nakatsu, Hideaki Kamata, Shin-Ichiro Takahashi, Tomoichiro Asano. Nedd4-IRS2 complex: mechanisms of the complex formation and its roles in prostate cancer cell proliferation. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2013.12.3-6
 8. Haruka Furuta, Hidehito Yoshihara, Toshiaki Fukushima, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Tomoichiro Asano, Kazuhiro Chida, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. The deubiquitinating enzyme, USP9X positively regulates insulin-like growth factor (IGF)-dependent cell growth by inhibition of degradation of IGF-I receptor (IGF-IR) and insulin receptor substrate (IRS)-2 in cancer cells. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2014.11.25-27

- Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2013.12.3-6
9. Yosuke Yoneyama, Junichi Inobe, Yukako Kida, Toshiaki Fukushima, Shiori Sekine, Tomoichiro Asano, Kazuhiro Chida, Kohsuke Takeda, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. PGAM5, a mitochondrial protein phosphatase, regulates the serine/threonine phosphorylation status and stability of insulin receptor substrates. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2013.12.3-6
 10. Toshiaki Fukushima
Ubiquitin-conjugation to IRS by ubiquitin ligase Nedd4 drives Insulin/IGF signaling. Core-to-Core Project sponsored by JSPS “New Insights into the Molecular Basis of Prevention of Diseases in the Aging Society Caused by Modulation of Insulin-Like Activities” (FY2012-FY2017) INTERNATIONAL OPEN WORKSHOP, Stockholm, Sweden, 2013.8.13
 11. Junichi Inobe, Toshiaki Fukushima, Akihiro Ito, Yukako Kida, Kazuhiro Chida, Minoru Yoshida, Tomoichiro Asano, Kousuke Takeda, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Phosphoglycerate-mutase 5 (PGAM5) is involved in dephosphorylation of insulin receptor substrates (IRSs) and controlling insulin-like activities. Gordon Research Conference: Insulin like growth factors in physiology and disease, Ventura, CA, USA, 2013.3.17-22
 12. Hidehito Yoshihara, Toshiaki Fukushima, Fumihiko Hakuno, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Shunichiro Iemura, Tohru Natsume, Tomoichiro Asano, Kazuhiro Chida, Leonard Girnita, Shin-Ichiro Takahashi. A deubiquitinating enzyme, USP7, is associated with insulin receptor substrate (IRS)-2 forming a negative feedback loop in insulin/IGF signaling The International Congress of the GRS and the IGF Society, Munich, Germany, 2012.10.17-20
 13. Toshiaki Fukushima, Hidehito Yoshihara, Fumihiko Hakuno, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Kazuhiro Chida, Hideyuki Sakoda, Tomoichiro Asano, Shin-Ichiro Takahashi. Ubiquitin ligase Nedd4 interacts with insulin receptor substrate (IRS)-2 in response to humoral/nutritional stimuli, thereby enhancing IRS-2-mediated IGF/insulin signals through a novel mechanism. The International Congress of the GRS and the IGF Society, Munich, Germany, 2012.10.17-20
 14. Toshiaki Fukushima
Molecular mechanisms of the modulation of insulin-like activities in diabetes: Roles of insulin receptor substrates (IRSs)-associated proteins. Core-to-Core Project sponsored by JSPS “New Insights into the Molecular Basis of Prevention of Diseases in the Aging Society Caused by Modulation of Insulin-Like Activities” (FY2012-FY2017) INTERNATIONAL SEMINAR, Tokyo, 2012.8.25-26
 15. Yasuka Matsunaga, Yusuke Nakatsu, Toshiaki Fukushima, Hiroshi Okubo, Yuichiro Otani, Zhang J, Hideyuki Sakoda, Hideaki Kamata, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai, Tomoichiro Asano. Impairment of LUBAC formation in non-alcoholic steatohepatitis. Annual Meeting of the Japan Diabetes Society, Yokohama, 2012.5.17-19
 16. Toshiaki Fukushima, Hidehito Yoshihara, Fumihiko Hakuno, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Yusuke Nakatsu, Hideyuki Sakoda, Hideaki Kamata, Shin-Ichiro Takahashi, Tomoichiro Asano. Nedd4 potentiates IRS-2-mediated insulin/IGF signals and bioactivities. Annual Meeting of the Japan Diabetes Society, Yokohama, 2012.5.17-19
 17. Daisuke Yamanaka, Takeshi Akama, Toshiaki Fukushima, Shiro Minami, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. A novel PI 3-kinase-associated protein PITKAP/XB130 is required for the synergistic proliferation of thyroid cells induced by TSH and IGF. Japan Endocrine Society's Annual Meeting, Nagoya, 2012.4.19-21
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ikagaku/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
福嶋 俊明 (FUKUSHIMA TOSHIAKI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：70543552