



インスリンによるPhosphoenolpyruvate Carboxykinase遺伝子発現調節機構の検討

小谷, 光

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(4):197-201

(Issue Date)

1998-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177396>



インスリンによる Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

遺伝子発現調節機構の検討

神戸大学医学部内科学第2講座（指導：春日雅人教授）

小 谷 光

（平成10年1月8日受付）

要 約

糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) のインスリンによる遺伝子発現調節機構を検討した。PEPCK 遺伝子の転写調節領域と CAT レポーター遺伝子とを融合させたプラスミドを安定的に導入した肝培養細胞である HL1C 細胞を dexamethazone および 8CPT-cAMP で刺激すると PEPCK 遺伝子転写活性は約50倍の増強をみたが、この増強はインスリン処理により約75-90%抑制された。アデノウイルスベクターを用いた dominant negative phosphatidylinositol (PI) 3-キナーゼの導入により、このインスリン効果はほぼ完全に消失した。dominant negative Sos の導入により、インスリン依存性の MAP キナーゼの活性化は完全に抑制されたが、インスリンの PEPCK 遺伝子転写に対する効果は影響を受けなかった。さらに、constitutive active PI 3-キナーゼを導入するとインスリン非存在下でも PEPCK 遺伝子転写は抑制された。以上の結果より、インスリンの PEPCK 遺伝子転写抑制効果には PI 3-キナーゼの活性化が必要かつ充分であり、RAS により活性化される情報伝達経路はこれに関与しない可能性が示唆された。

緒 言

生体における糖の恒常性は筋、脂肪組織における糖取り込みと肝における糖放出により厳密に制御されている。肝の糖取り込み、放出は糖新生と解糖に代表される細胞内糖代謝酵素の活性により主要な調節を受ける。糖新生の律速酵素は phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) であるが¹⁾、本酵素を過剰発現したトランスジェニックマウスが糖尿病を呈することからも²⁾、肝での PEPCK 活性は生体での糖

代謝に重要な役割を担うと考えられる。インスリンが PEPCK 遺伝子の転写抑制によりその発現を減少させることは知られているが³⁾、このインスリン効果の分子機構の詳細は明らかではない。

インスリン作用はインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性により発揮される。インスリンの結合により活性化した受容体は IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) を初めとした内因性基質のチロシン残基をリン酸化する⁴⁾。リン酸化した IRS-1 には、2量体型 phosphatidylinositol (PI) 3-キナーゼの85 kDa 調節サブユニット (p85) や SHP-2, Grb2 などの SH2 ドメインを有する情報伝達分子が結合し、以後のシグナルが伝達される⁵⁾。p85の結合を介しては110kDa 触媒サブユニット (p110) を通じた PI 3-キナーゼの活性化が、また、Grb2 の結合を介してはグアニヌクレオチド交換刺激因子である Sos を通じた Ras の活性化が生じる⁶⁾。

本研究では2量体型 PI 3-キナーゼを特異的に阻害する dominant negative 型変異 p85および恒常的活性型と考えられる強制的細胞膜発現型 p110, さらに Ras の活性化を特異的に阻害する dominant negative 型変異 Sos を用いて、インスリンによる PEPCK 遺伝子の転写調節機構を検討した。

方 法

ラット肝癌細胞株である H4IIE 細胞に PEPCK 遺伝子の5'プロモーター領域 (-2100位から+69位) に CAT レポーター遺伝子を融合させた cDNA を安定的に発現させた細胞 (HL1C 細胞)⁷⁾ は Daryl K. Granner 博士から供与を受けた。

PEPCK 遺伝子の転写活性は HL1C 細胞を100nM インスリン存在、非存在下に0.1mM 8CPT-cAMP および500nM dexamethazone にて10時間刺激した後、

キーワード：インスリン, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)

既報の方法に従い CAT 活性を測定することにより検討した⁹⁾。

PI 3-キナーゼ活性は細胞可溶化分画を抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) で, MAP キナーゼ活性は細胞可溶化分画を抗 MAP キナーゼ抗体にて免疫沈降し, 各々の免疫沈降分画中の活性を既報の方法に従い測定した^{9, 10)}。

dominant negative 型 PI 3-キナーゼ ($\Delta p85$)⁹⁾, dominant negative 型 Sos (Δ Sos)¹¹⁾ をコードするアデノウイルスベクター (AxCA $\Delta p85$, AxCA Δ Sos) は既報の如く調整した^{12, 13)}。また, 恒常的活性型 PI 3-キナーゼ (Myrp110) は, PI 3-キナーゼの触媒ドメインである p110 のアミノ末端に myristoylation signal を, C 末端に Myc-tag を付加することにより作成した。HL1C 細胞を48時間各種のアデノウイルスで感染させ, 10時間刺激後に CAT アッセイを行うことにより, インスリンによる PEPCK 遺伝子の転写調節機構を検討した。

結 果

HL1C 細胞を8-CPT-cAMP および dexamethazone で処理すると, CAT アッセイ法にて検討した PEPCK 遺伝子の転写活性は約50倍に増加した。この活性増加はインスリンの添加により, 約75–90%の抑制が認められた (図1–3)。細胞を Ras の活性化を阻害する AxCA Δ Sos で感染させると, Δ Sos の発現量はウイルス濃度 (MOI: 重複感染度/細胞数) 依存性に増加し (図1A 上段), インスリンによる MAP キナーゼの活性化は MOI 依存性に低下し, MOI10では基礎値まで低下し (図1A 下段), この時, インスリンの PEPCK 遺伝子転写抑制効果には影響がなかった (図1B)。

次に, インスリンの PEPCK 遺伝子転写抑制効果における PI 3-キナーゼの役割を検討した。dominant negative 型 PI 3-キナーゼ (AxCA $\Delta p85$) を HL1C 細胞に同様に導入すると, MOI 依存性に抗リン酸化チロシン抗体に共沈する PI 3-キナーゼ活性は抑制され, MOI10では基礎値にまで低下した (図2A)。インスリンによる PEPCK 遺伝子転写抑制効果は AxCA $\Delta p85$ によってやはり MOI 依存性に抑制され, MOI10ではこのインスリン効果は90%以上抑制された (図2B)。

さらにアデノウイルスベクターを用いて Myrp110 を導入すると抗 Myc 抗体免疫沈降中 PI 3-キナーゼ活性は上昇し (図3A), インスリン非存在下でも PEPCK 遺伝子の転写促進作用が抑制された (図3B)。

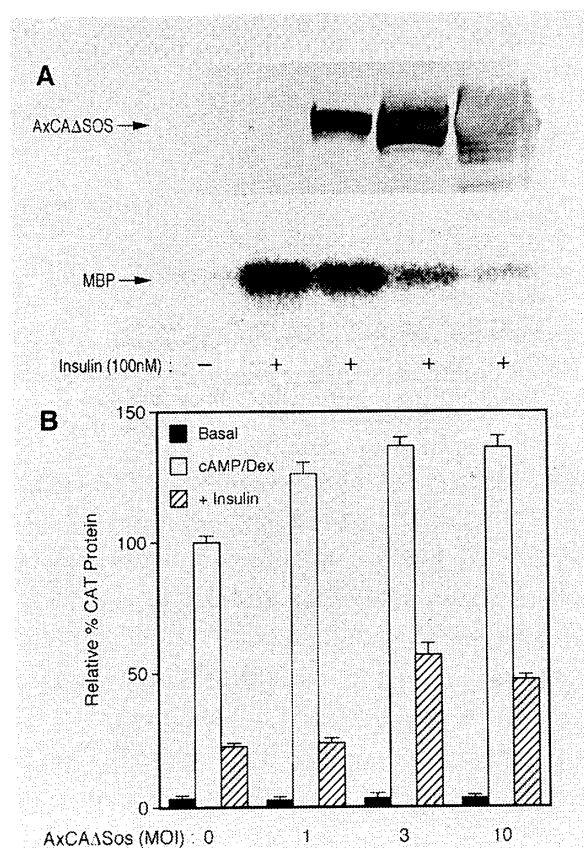


図1 Δ Sos の MAP キナーゼ活性と PEPCK 遺伝子転写活性に対する影響

- A. HL1C 細胞に各種ウイルス濃度 (MOI) で Δ Sos を感染させた後, 100nM インスリンで5分刺激し, total lysate を抗 Sos 抗体を用いたイムノブロット (上段) および抗 MAP キナーゼ抗体免疫沈降分画中の MAP キナーゼ活性を MBP を基質として測定した。 (下段)
- B. A と同様の MOI で Δ Sos を感染させた後, 100nM インスリン存在 (+Insulin), 非存在下 (cAMP/Dex) に0.1mM 8CPT-cAMP 及 500nM dexamethazone にて10時間刺激した後, CAT 活性を測定した。

考 察

近年, ワルトマニンや LY294002などの阻害剤を用いた薬理的検討により, 糖取り込み, 脂肪分解抑制, グリコーゲン合成酵素の活性化, 蛋白合成の促進といったインスリンの種々の生物学的作用に PI 3-キナーゼの関与が推察されている^{14, 15)}。薬理的阻害剤は比較的短期間に認められる作用の解析には有用であるものの, 分化誘導や遺伝子の転写調節といった比較的長期間に亘る効果の解析においては, これらの阻害剤の細胞内での安定性が不明であること, また阻害剤との長期間の孵置によりしばしば細胞障害性が発現することなどからその評価が困難となる。

インスリンによる PEPCK 遺伝子転写抑制作用に

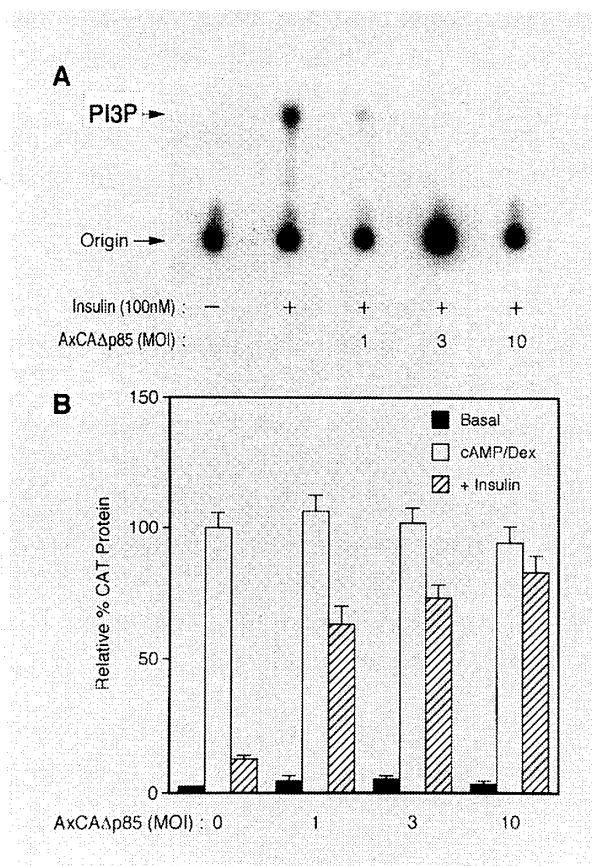


図2 Δp85のPI 3-キナーゼ活性とPEPCK遺伝子転写活性に対する影響

A. AxCΔp85をHL1C細胞に各MOIで感染させた後100nMインスリンで5分刺激し、抗リン酸化チロシン抗体免疫沈降分画中のPI 3-キナーゼ活性を測定した。

B. Aと同様のMOIでΔp85を感染させた後、図1Bと同様にCAT活性を測定した。

対するワルトマニンの効果に関しては、部分的に阻害するという成績¹⁶⁾と阻害作用が認められない¹⁷⁾という異なった成績の報告が存在する。また、ある種の細胞ではワルトマニンによりMAPキナーゼ活性が阻害されることから、PEPCK遺伝子発現調節に対するワルトマニンの効果は部分的にMAPキナーゼ経路を介している可能性も考えられる。本研究結果は、このインスリン作用にPI 3-キナーゼ活性化が必要かつ充分であること、またMAPキナーゼを始めとしたRasにより活性化される情報伝達経路は本作用には関与しないことを示唆するものである。本研究での結果と以前の報告との差異は、8時間から18時間といった比較的長時間の孵置により細胞内でのワルトマニン効果が減弱するためかもしれない。実際、最近、Gabbyらは培養液中に数時間毎にワルトマニンを添加することにより、インスリンによるPEPCK遺伝子転写抑制作用が阻害されることを報告している¹⁸⁾。

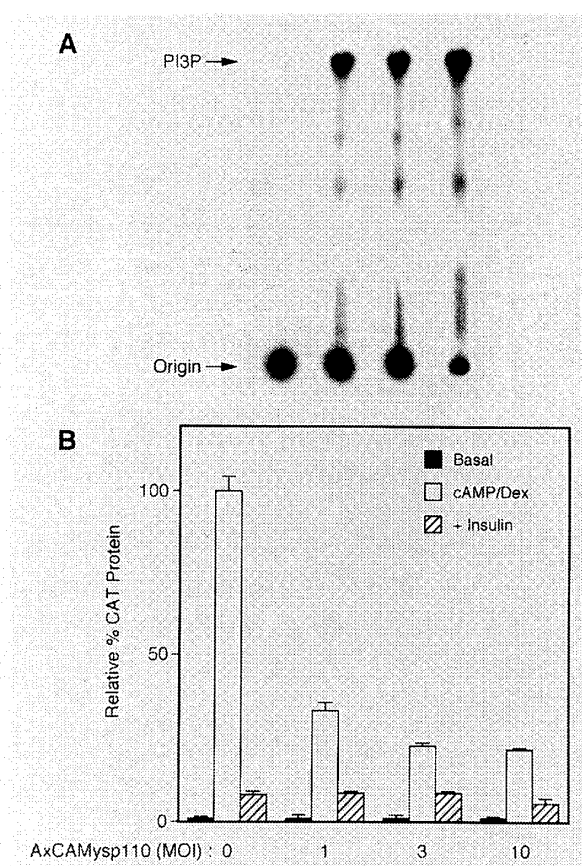


図3 Myrp110のPEPCK遺伝子転写活性に対する影響

A. Myrp110をHL1C細胞に各MOIで感染させた後抗Myc抗体免疫沈降分画中のPI 3-キナーゼ活性を測定した。

B. Aと同様のMOIでMyrp110を感染させた後、図1Bと同様にCAT活性を測定した。

PI 3-キナーゼの下流で機能し、PEPCK遺伝子の転写抑制に至るシグナルを担う情報伝達分子は明らかではない。近年、Aktやatypical PKCがPI 3-キナーゼの下流のエフェクター分子として、糖取り込みや蛋白合成促進への情報を伝達する可能性が示唆されている^{19, 20)}。dominant negative型Aktやdominant negative型atypical PKCを導入することにより、より詳細なPEPCK遺伝子転写調節機構が明らかになるものと期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導を賜りました春日雅人教授に心から謝意を表します。また、直接御指導頂きました小川渉博士、ならびに御協力頂いた内科学第二講座の先生方に深く感謝いたします。

文 献

- 1) O'Brien RM, Granner DK. *Diabetes Care* 13, 327-339, 1990
- 2) Valera A, Pujol A, Pelegrin M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 9151-9154, 1994
- 3) O'Brien RM, Granner DK. *Physiol Rev* 76, 1109-1161, 1996
- 4) White, M. F., and Khan, C.R. *J. Biol. Chem.* 269, 1-4, 1994
- 5) Stephens, L. R., Jackson, T. R., and Hawkins, P.T. *Biochem. Biophys. Acta.* 1179, 27-75, 1993
- 6) Baltensperger, K., Kozma, LM., Cherniack, AD., Klauland, JK., Chawla, A., Banerjee, U., and Czech, MP. *Science* 260, 1950-1952, 1993
- 7) Claude D. Forest, Richard M. O'Brien, Peter C. Lucas, Mark A. Magnuson, and Granner DK, *Mol. Endocrinol* 4, 1302-1310, 1990
- 8) Nordeen SK, Green III, PP, Fowlkes DM, *DNA* 6, 173-178, 1987
- 9) Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T. R., Hawkins, PT, Dhand, R., Clark, A. E., Holman, GD, Waterfield, MD, and Kasuga, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7415-7419, 1994
- 10) Ando, A., Momomura, K., Tobe, K., Yamamoto-Honda, R., Sakura, H., Tamori, Y., Kaburagi, Y., Koshio, O., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kasuga, M., and Kadowaki, T. *J. Biol. Chem.* 267, 12788-12796, 1992
- 11) Sakaue, M., Bowtell, D., and Kasuga, M. *Mol. Cell. Biol.* 15, 379-388, 1995
- 12) Kanegae, Y., Lee, G., Tanaka, M., Nakai, M., Sakai, T., Sugano, S., and Saito, I. *Nucl. Acids. Res.* 23, 3816-3821, 1995
- 13) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C., and Saito, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1320-1324, 1996
- 14) Sakaue, H., Hara, K., Noguchi, T., Matozaki, T., Kotani, K., Ogawa, W., Yonezawa, K., Waterfield, M. D., and Kasuga, M. *J. Biol. Chem.* 270, 11304-11309, 1995
- 15) Mendez, R., Myers. Jr., M. G., White, M. F., Rhoads, R. E. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2857-2864, 1996
- 16) Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. *J. Biol. Chem.* 270 : 15501-15506, 1995
- 17) Yang SH, Dickson AJ. *Biochem. J.* 310 : 375-378, 1995
- 18) Gabby RA, Sutherland C, Gnudi L. *J. Biol. Chem.* 271 : 1890-1897, 1996
- 19) Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. *J. Biol. Chem.* 272 : 30075-30082, 1997
- 20) Kohn, AD, Kobacina, KS, and roth, RA. *EMBO J.* 14, 4288-4295, 1995

Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by insulin

Ko Kotani

Second Department of Internal Medicine

Kobe University School of Medicine

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) is a key enzyme that regulates gluconeogenesis in the liver. Insulin decreases PEPCK activity in the liver by inhibiting its transcription, subsequently results in the inhibition of gluconeogenesis. Regulatory mechanism of the inhibitory effect of insulin on PEPCK gene transcription was investigated with the use of adenovirus vectors encoding a dominant negative or a constitutively active mutants of phosphoinositide (PI) 3-kinase, or a dominant negative mutant of Sos, an activator for RAS. Insulin treatment resulted in the inhibition of PEPCK gene transcription promoted by 8CPT-cAMP and dexamethazone. Overexpression of a dominant negative mutant of PI 3-kinase almost completely abolished the insulin's effect on PEPCK gene transcription. A dominant negative mutant of Sos did not affect PEPCK gene transcription whereas the mutant Sos abolished insulin-induced MAP kinase activation. Moreover, a constitutively active mutant of PI 3-kinase mimicked insulin's effect; overexpression of this mutant lead to the inhibition of PEPCK gene transcription in the absence of insulin. These data indicated that PI 3-kinase is necessary and sufficient for insulin's inhibitory effect on PEPCK gene transcription, and the signaling pathways initiated by RAS is not involved in this event.