



肝臓特異的PI3-キナーゼシグナル抑制 : マウスの解析

三宅, 一彰

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(3/4):101-109

(Issue Date)

2002-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317226>



肝臓特異的PI 3-キナーゼシグナル抑制

マウスの解析

三宅 一彰

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座

糖尿病代謝・消化器・腎臓内科

(指導：春日 雅人教授)

連絡先：三宅 一彰

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座

糖尿病代謝・消化器・腎臓内科

神戸市中央区楠町 7-5-1

phone: 078-382-5861

fax: 078-382-2080

(平成14年1月9日受付)

【要約】

PI 3-キナーゼはインスリンの代謝作用の重要な調節因子であるが、生体においてPI 3-キナーゼの活性抑制がどのような代謝状態の変化をもたらすかは明らかではない。本研究ではアデノウイルスベクターを用いて優位抑制型PI 3-キナーゼ ($\Delta p85$) をマウス肝に発現させることにより、肝特異的なPI 3-キナーゼ活性の抑制が生体の糖代謝に与える影響を検討した。 $\Delta p85$ をコードするアデノウイルスベクターの経静脈投与により肝特異的な $\Delta p85$ の発現が生じた。 $\Delta p85$ 投与マウスでは肝でのインスリン依存性のPI 3-キナーゼの活性化やPI 3-キナーゼの下流のエフェクターであるAktのリン酸化は著しく抑制されたが、骨格筋のPI 3-キナーゼ活性やAktのリン酸化には影響がなかった。 $\Delta p85$ 投与マウスは高インスリン血症が誘導され、経口糖負荷により著明な高血糖を呈した。また、経口糖負荷による肝のAkt, GSK3のリン酸化の増強及びグリコーゲン合成酵素の活性化は著明に抑制され、肝のグリコーゲン、グルコース-6-リン酸含量の増加も著しく抑制された。以上より、肝特異的なPI 3-キナーゼ活性の抑制により、高インスリン血症と経口糖負荷時の高血糖、及びグリコーゲンの著明な蓄積障害を呈することが明らかとなった。

【緒言】

インスリン抵抗性は糖尿病の発症、進展に関わる重要な要素の一つである。インスリン抵抗性はインスリン作用、特にその代謝調節作用が個体レベルで障害された状態であるが、インスリンの情報伝達機構のどの段階の障害により個体におけるインスリン抵抗性が生じるかは十分に明らかではない⁽¹⁾。インスリンは細胞内で様々な情報伝達分子を活性化するが、種々の細胞生物学的検討から脂質リン酸化酵素であるPI 3-キナーゼがインスリンの代謝調節作用の重要な制御因子として機能することが明らかとなっている^(2, 3)。また、糖尿病モデル動物やヒト糖尿病患者において、インスリン抵抗性状態ではPI 3-キナーゼの活性化が障害されることも報告されており^(4, 5)、インスリン抵抗性を誘導する主要な原因である可能性が示唆される。

近年、遺伝子相同組換え法により種々の遺伝子の欠損マウスが作製され、特定の遺伝子の生体の糖代謝における機能の検討が行われている。しかし、このようなモデルマウスでは、時に臓器の発生や発達の障害、また、他の情報伝達分子の代償性過剰発現などが生じ、その表現型の解釈が困難となる場合も多い。実際、肝臓特異的にインスリン受容体を欠損させたマウスでは、高インスリン血症、高血糖とインスリン感受性の低下を示すものの、肝重量の減少や肝臓の組織学的異常を伴う⁽⁶⁾ため、これらの代謝異常がインスリン作用の低下のみに起因するのか否かは明らかではない。また、

キーワード：PI 3-キナーゼ，糖代謝，肝，インスリン抵抗性

PI 3-キナーゼの調節サブユニットのひとつである p85 α 遺伝子を欠損したマウスや p85 α 遺伝子より遺伝子スプライシングにより産生される 3 種の調節サブユニット蛋白のうち p85 α 蛋白のみを欠損したマウスでは低血糖とインスリン感受性の増強が生じることも報告されているが^(7, 8), これらのマウスの糖代謝の変化も、臓器障害や他のサブユニット蛋白の代償的発現増加といった二次的な影響により誘導された可能性がある。

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入は、ゲノムに導入遺伝子が組み込まれない一過性の遺伝子導入であるが、静止期の細胞にも短時間のうちに強力な遺伝子発現が可能であるため、生体への外来性遺伝子導入に広く用いられている⁽⁹⁻¹²⁾。また、肝細胞はアデノウイルスベクターに対して最も感受性の高い細胞のひとつであることが知られており、本ベクターを経静脈的に投与することにより様々な蛋白を肝臓特異的に発現し得ることが報告されている⁽⁹⁻¹²⁾。そこで、本研究では肝臓における PI 3-キナーゼ活性の抑制がどのような代謝異常を招来するかを明らかにするため、アデノウイルスベクターを用いて優位抑制型 PI 3-キナーゼを肝臓特異的に発現させることにより、肝臓での PI 3-キナーゼの活性化を抑制したモデルマウスを作成し、その糖代謝状態の変化を解析した。

【方法】

抗体及び血糖、血中インスリン値の測定

抗 p85 抗体、抗 Akt 抗体、抗 IRS-1 抗体及び抗 IRS-2 抗体は Upstate Biotechnology 社より、Akt の 473 位リン酸化セリン残基特異的抗体、GSK3 の 9 位リン酸化セリン残基特異的抗体は Cell Signaling 社より、抗 GSK3 抗体は Transduction 社より購入した。ウシ p85 を認識し、マウス p85 を認識しないモノクローナル抗体 (G12) は既報の如く調整した⁽¹³⁾。血糖は静脈全血を用いてグルテストセンサー (三和科学) により、血中インスリン値は血漿を用いてインスリン ELISA キット (森永生科学) により測定した。

アデノウイルスベクターのマウスへの投与

優位抑制型 PI 3-キナーゼ変異体をコードするアデノウイルスベクター (AxC Δ p85) 及び β -ガラクトシダーゼをコードするアデノウイルスベクター (AxC ALacZ) は既報の如く調整した⁽¹⁴⁾。8-10 週齢の雄性 Balb/c マウスに 5×10^8 plaque-forming units (pfu) の AxC Δ p85 あるいは AxC ALacZ を尾静脈より投与し、投与後 3 日目に実験に供した。マウスを用いた実験は神戸大学大学院医学系研究科動物実験倫理委員会の承認の上、施行した。

PI 3-キナーゼ活性の測定

アデノウイルス投与マウスを 16 時間絶食の後、ネンブータル麻酔下でマウス体重 1kg あたり 5 単位のヒト速効型インスリンを尾静脈より投与し、2 分後に肝及び下肢骨格筋を摘出し、直ちに液体窒素中で凍結した。得られた各組織より、既報のごとく細胞可溶化分画を調整した後⁽¹⁴⁾、抗 IRS-1 抗体または抗 IRS-2 抗体による免疫沈降を行い、免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性を既報のごとく測定した⁽¹³⁾。

経口糖負荷試験

アデノウイルス投与マウスを 16 時間絶食の後、ネンブータル麻酔下でマウス体重 1kg あたり 2g のブドウ糖を含む蒸留水を経口的に投与した後、経時的に尾静脈より血液を採取し、血糖及び血中インスリン値を測定した。また、負荷開始 2 時間後に肝を摘出し、既報の方法によりグリコーゲン含量⁽¹⁵⁾、グルコース-6-リン酸 (G6P) 含量⁽¹⁶⁾及びグリコーゲン合成酵素活性⁽¹⁷⁾を測定した。

【結果】

アデノウイルスベクターの全身投与による優位抑制型 PI 3-キナーゼ (Δ p85) の発現

優位抑制型 PI 3-キナーゼあるいは β -ガラクトシダーゼをコードするアデノウイルスベクター (AxC Δ p85 あるいは AxC ALacZ) をマウス 1 匹あたり 5×10^8 pfu 投与し、投与 3 日後に各臓器を摘出し、イムノブロット法にて変異蛋白の発現を検討した。 Δ p85 はウシの p85 α cDNA より作製したが⁽¹³⁾、ウシの p85 を特異的に認識し、マウスの p85 は認識しないモノクローナル抗体を用いたイムノブロット解析により、 Δ p85 蛋白が肝臓にのみ発現することが確認された (図 1A)。また、ウシ及びマウスの p85 を共に確認する抗体を用いて、肝臓での Δ p85 の発現量を検討したところ、AxC Δ p85 投与マウスの肝臓では対照とした AxC ALacZ マウスと比較して p85 蛋白が 5 倍程度強発現していた (図 1B)。

インスリン依存性の PI 3-キナーゼの活性化及び Akt のリン酸化に対する Δ p85 の効果

次に Δ p85 の発現がインスリン依存性の PI 3-キナーゼの活性化及び Akt のリン酸化に与える効果を検討した。AxC Δ p85 あるいは AxC ALacZ を投与したマウスを 16 時間絶食の後、インスリンを尾静脈より投与し、インスリン投与 2 分後に肝臓、下肢骨格筋を摘出し実験に供した。対照とした AxC ALacZ 投与マウスでは、インスリン依存性に IRS-1 及び IRS-2 に共沈する PI 3-キナーゼの活性の著明な上昇が認められたが、

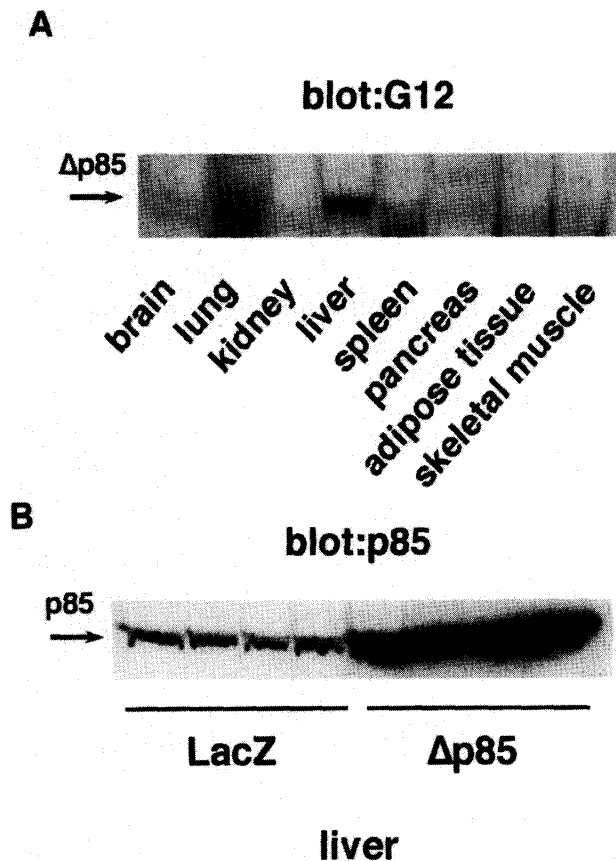


図1. 優位抑制型PI 3-キナーゼ(Δp85) の発現

(A) AxCA Δp85投与3日後にマウス各臓器を摘出し、細胞可溶化分画を、ウシ p85 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (G12) によるイムノブロットに供した。

(B) AxCA Δp85 (Δp85) あるいはAxCALacZ (LacZ) を投与したマウスの肝臓より細胞可溶化分画を抽出し、ウシ及びマウスの p85 を共に認識する抗体によるイムノブロットに供した。

AxCA Δp85投与マウスではインスリン依存性のPI 3-キナーゼの活性上昇はほぼ完全に抑制されていた (図 2A)。一方、骨格筋におけるIRS-1及びIRS-2に共沈するPI 3-キナーゼ活性は、AxCA Δp85投与マウス及びAxCALacZ投与マウスでインスリン刺激によりほぼ同程度に上昇した (図 2B)。

次に肝臓におけるPI 3-キナーゼシグナル伝達経路の抑制を確認するため、PI 3-キナーゼ依存性にリン酸化が生じることが知られているAktのインスリンによるリン酸化を検討した。抗リン酸化Akt抗体を用いたイムノブロットにより検討したインスリン依存性のAktのリン酸化は、AxCA Δp85投与マウスの肝臓では著明に抑制されていた (図 3A)。一方、骨格筋ではAxCA Δp85投与マウスにおいてもAxCALacZ投与マウスと同程度のインスリン依存性のAktのリン酸化が生じた (図 3B)。以上の結果から、AxCA Δp85の

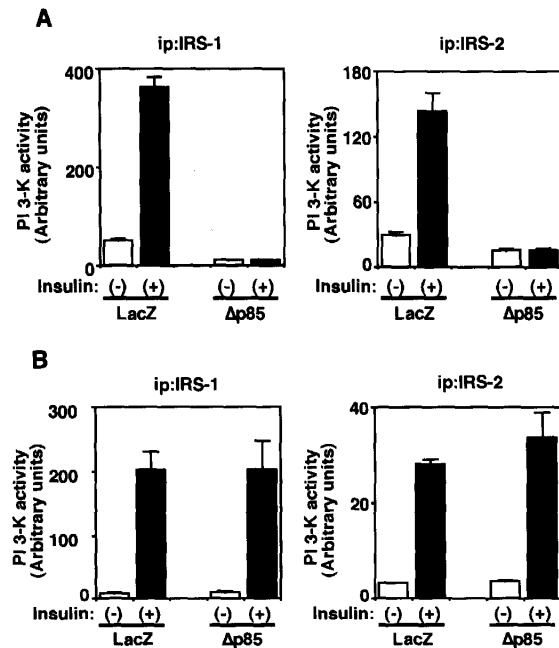


図2. インスリン依存性のPI 3-キナーゼの活性化に対するΔp85の効果

AxCA Δp85 (Δp85) あるいはAxCALacZ (LacZ) を投与したマウスを16時間絶食の後、インスリンを尾静脈より投与しインスリン投与2分後に肝臓(A) 及び下肢骨格筋(B)を摘出した。各々の臓器の細胞可溶分画を抗IRS-1、あるいはIRS-2抗体にて免疫沈降し、その免疫沈降分画を用いてPI 3-キナーゼ活性を測定した。数値は三回の実験で得られた結果の平均値±標準誤差で表示した。

全身投与により肝臓でのPI 3-キナーゼの活性化及びPI 3-キナーゼの下流のエフェクターであるAktのリン酸化が抑制されることが明らかとなった。

血糖及び血中インスリン値に対するΔp85の影響

AxCA Δp85マウスの空腹時血糖はAxCALacZ投与マウスに比して軽度の上昇を示したが、随時摂食時の血糖はAxCA Δp85投与マウスとAxCALacZ投与マウスで有意な差を認めなかった (表 1)。一方、AxCA Δp85投与マウスの空腹時、随時摂食時の血中インスリン値はAxCALacZ投与マウスの各々4倍、1.8倍に上昇していた (表 1)。さらに、AxCA Δp85投与マウスに経口糖負荷試験を行ったところ、対照としたAxCALacZ投与マウスと比べ著明な血糖の上昇を認めた (図 4A)。また、経口糖負荷試験時の血中インスリン値もAxCA Δp85投与マウスで高値であった (図 4B)。以上の結果から、肝臓におけるPI 3-キナーゼの活性化の抑制により、インスリン抵抗性が誘導され、経口的糖負荷により著明な高血糖を呈することが明らかとなった。

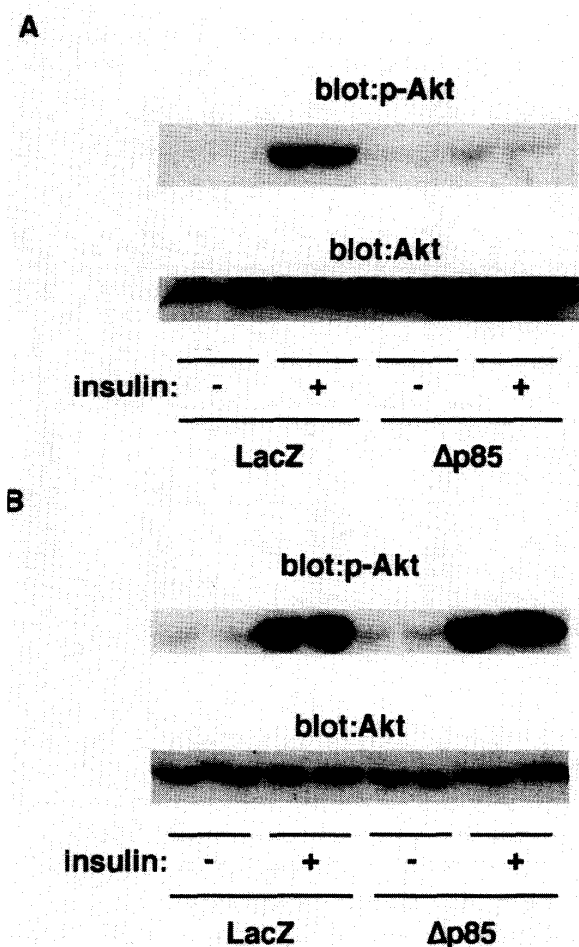


図 3. インスリン依存性のAktのリン酸化に対するΔp85の効果

AxCA Δp85 (Δp85)あるいはAxCALacZ (LacZ)を投与したマウスを16時間絶食の後、インスリンを尾静脈より投与し、インスリン投与2分後に肝臓(A)及び下肢骨格筋(B)を摘出した。各々の臓器可溶化分画を抗リン酸化Akt抗体及び抗Akt抗体によるイムノブロットに供した。

表 1. 絶食及び随時摂食時の血糖及び血中インスリン値に対するΔp85の影響

	LacZ	Δp85
空腹時		
グルコース (mg/dl)	44.8±2.2	52.4±2.6 *
インスリン (ng/ml)	0.37±0.08	1.50±0.18**
随時摂食時		
グルコース (mg/dl)	110.5±5.8	97.5±4.7
インスリン (ng/ml)	3.22±0.57	5.86±0.41**

数値は得られた結果(n=4-8)の平均値±標準誤差で表示した。統計学的解析にはStudent-t検定を用いた(*p<0.05, **P<0.01)。

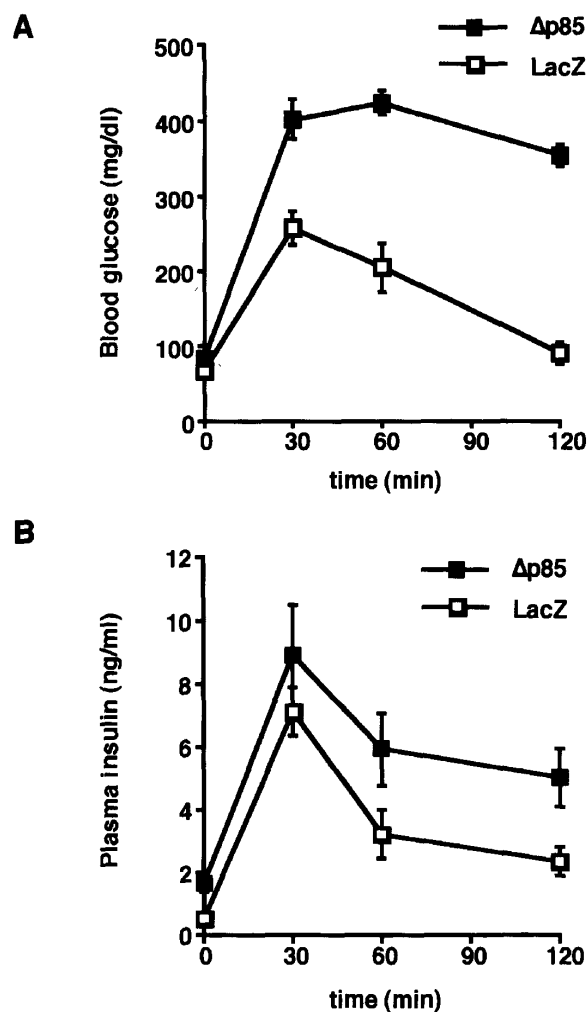


図 4. 経口糖負荷試験に対するΔp85の影響

AxCA Δp85 (Δp85)あるいはAxCALacZ (LacZ)を投与したマウスを16時間絶食後に、経口的糖負荷試験を行い、経時的に尾静脈より血液を採取し、血糖(A)及びインスリン値(B)を測定した。数値は三回の実験で得られた結果の平均値±標準誤差で表示した。

肝臓でのグリコーゲン蓄積に対するΔp85の影響

経口糖負荷によりAxCALacZ投与マウスにおける肝臓グリコーゲン含量は前値の約45倍に増加したが、AxCA Δp85投与マウスでは肝グリコーゲン含量の増加は著しく抑制されていた(図5A)。また、AxCA Δp85投与マウスの肝臓G6P含量は糖負荷前でAxCALacZ投与マウスと比較して約40%、負荷後で約80%の抑制を認めた(図5B)。

以上のことから、肝でのPI 3-キナーゼ活性の抑制により、経口的に摂取された糖の肝での利用、及び肝でのグリコーゲン蓄積が著明に障害されることが明らかとなった。

さらに経口糖負荷試験前後での種々の酵素活性に対するΔp85の影響を検討した。グリコーゲン合成酵素

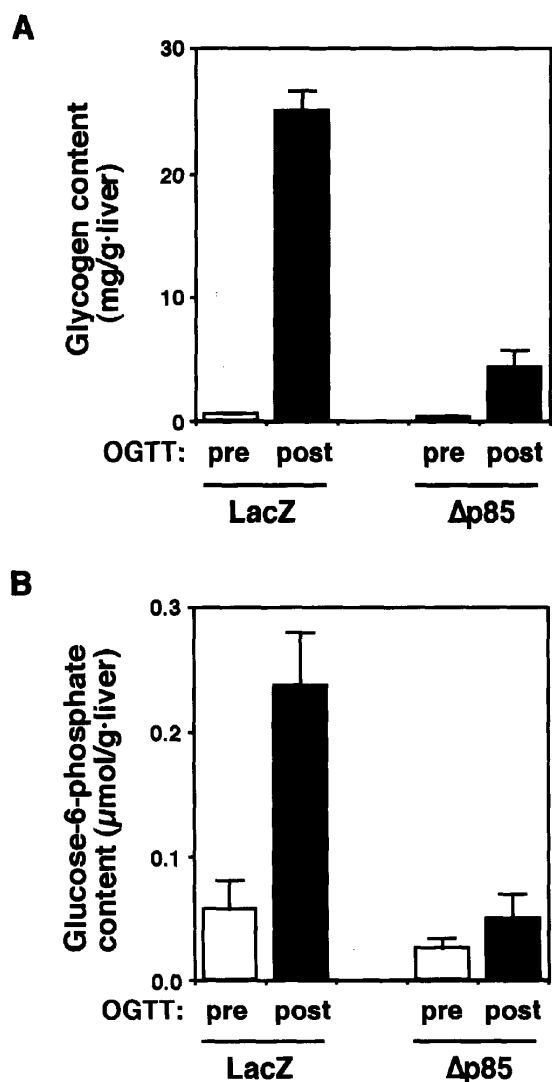


図 5. 肝臓のグリコーゲン蓄積に対する $\Delta p85$ の影響
AxCA $\Delta p85$ ($\Delta p85$) あるいは AxCALacZ (LacZ) を投与したマウス 16 時間絶食後(pre), あるいは経口糖負荷試験開始 2 時間後(post) に肝を摘出し, グリコーゲン含量(A), G6P含量(B)を測定した。数値は三回の実験で得られた結果の平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。

の活性化に関与すると考えられるAktとGSK3のリン酸化はAxCALacZ投与マウスで増強を認めたが, AxCA $\Delta p85$ 投与マウスでは経口糖負荷依存性のこれらのキナーゼのリン酸化が著しく抑制された (図 6A)。また, グリコーゲン合成の律速酵素であるグリコーゲン合成酵素の活性は AxCALacZ投与マウスでは経口糖負荷により約2.2倍増強した。AxCA $\Delta p85$ 投与マウスではグリコーゲン合成酵素の活性化は著明に抑制されていた (図 6B)。これらのことにより, 肝でのPI 3-キナーゼ活性の抑制により, 経口糖負荷依存性のグリコーゲン合成にかかわる酵素の活性化が阻害されることが明らかとなった。

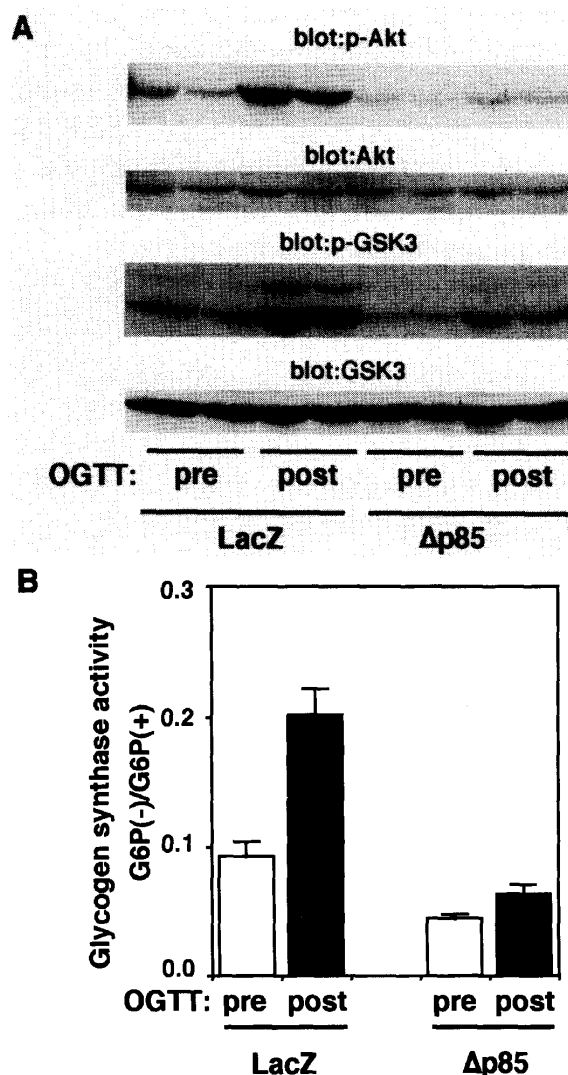


図 6. 経口糖負荷試験前後での種々の酵素活性に対する $\Delta p85$ の影響

AxCA $\Delta p85$ ($\Delta p85$) あるいは AxCALacZ (LacZ) を投与したマウスを 16 時間絶食後(pre), あるいは経口糖負荷試験開始 2 時間後(post) に肝を摘出し, 細胞可溶分画を調整し, 抗リン酸化Akt抗体, 抗Akt抗体, 抗リン酸化GSK3抗体, 抗GSK3抗体によるイムノブロット解析(A), あるいはグリコーゲン合成酵素活性測定(B) に供した。

【考察】

本研究ではアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入により, 肝臓特異的PI 3-キナーゼシグナルが抑制されたマウスの作製を試みた。AxCA $\Delta p85$ を経静脈的に投与したマウスでは肝臓にのみ変異蛋白の発現を認め, インスリン依存性のPI 3-キナーゼの活性化やAktのリン酸化は著しく阻害されたが, 骨格筋におけるPI 3-キナーゼの活性化やAktのリン酸化には影

響がなかった。すなわち、AxCA Δ p85投与マウスでは肝臓特異的なPI 3-キナーゼ経路の抑制が生じた。AxCA Δ p85投与マウスでは空腹時、随時摂食時の高インスリン血症と経口の糖負荷後の著明な高血糖を呈したことから、肝臓におけるPI 3-キナーゼの活性化は個体におけるインスリン感受性及び肝臓での糖処理に重要な機能を果たすことが明らかとなった。

PI 3-キナーゼはその調節サブユニットがSH2ドメインを介してチロシンリン酸化蛋白に結合することにより活性化される⁽³⁾。PI 3-キナーゼの調節サブユニットのひとつであるp85 α 遺伝子を欠損したマウスでは肝や骨格筋におけるインスリンによるPI 3-キナーゼの活性化が障害されているにもかかわらず、低血糖と低インスリン血症を呈することが報告されている⁽⁷⁾。しかし、このマウスでは肝臓や褐色脂肪細胞の壊死や筋線維の肥大など多数の臓器の異常を認め、多くのマウスは出生後比較的早い時期に死亡する⁽⁷⁾。このことから、p85 α 遺伝子欠損マウスで認める低血糖や低インスリン血症はインスリン作用の抑制による直接的な効果というより、むしろ多臓器の重篤な障害による二次的な影響である可能性が否定できない。

また、p85 α 遺伝子からは遺伝子スプライシングによりp85 α 、p55 α 、p50 α の3種の調節サブユニット蛋白が作られるが⁽³⁾、このうちp85 α 蛋白のみを欠損したマウスでも低血糖、低インスリン血症とインスリン感受性の増強を認める⁽⁸⁾。PI 3-キナーゼはフォスファチジルイノシトール 3, 4, 5-3リン酸を産生することにより種々のエフェクター分子の活性化を促す⁽³⁾。p85 α 蛋白欠損マウスから得られた細胞ではインスリン依存性のフォスファチジルイノシトール 3, 4, 5-3リン酸の産生やp55 α やp50 α 蛋白の発現量の増加が見られることから⁽⁸⁾、調節サブユニットのアイソフォーム比率の変化によりPI 3-キナーゼのシグナル伝達経路が増強している可能性がある。一方、 Δ p85の過剰発現細胞ではインスリンによるフォスファチジルイノシトール 3, 4, 5-3リン酸の産生低下が生じることから⁽¹³⁾、AxCA Δ p85投与マウスでは肝臓における Δ p85の過剰発現により、おそらくは全ての調節サブユニットのチロシンリン酸化蛋白への結合を阻害することによりPI 3-キナーゼのシグナル伝達経路が抑制され、インスリン抵抗性を生じたものと推察される。

AxCA Δ p85投与マウスでは肝臓のグリコーゲン蓄積の著しい障害が生じた。門脈より肝臓に流入したグルコースのグリコーゲンへの転換反応は、摂食後の糖処理の最重要な段階のひとつである⁽¹⁸⁾。また、糖尿病患者では肝臓におけるグリコーゲン蓄積障害が存在することも報告されており⁽¹⁹⁾、グリコーゲン蓄積の障害

は本モデルマウスにおける糖負荷後の血糖上昇の主要な要因の一つと考えられる。また、AxCA Δ p85投与マウスでは糖負荷依存性のAkt及びGSK3のリン酸化が著しく障害されること、また、グリコーゲン合成の律速酵素であるグリコーゲン合成酵素の活性化も強く抑制されることが明らかとなった。in vitroでの検討からインスリンによるグリコーゲン合成酵素の活性化にはPI 3-キナーゼ-Akt-GSK3によるシグナル伝達経路が関与することが示されているが^(20, 21)、本研究の結果はこのような仮説を支持するものと考えられる。また、G6Pはグリコーゲン合成酵素を直接活性化することが知られているが⁽¹⁵⁾、AxCA Δ p85投与マウスでは糖負荷依存性のG6Pの増加も強く障害されていた。このことから、AxCA Δ p85投与マウスにおけるグリコーゲン合成酵素の活性化障害は、Akt-GSK3シグナル伝達経路の抑制とともにG6P濃度の低下により生じた可能性も示唆される。

本研究では優位抑制型PI 3-キナーゼの肝臓特異的な過剰発現によりインスリン抵抗性及び肝臓での糖処理、グリコーゲン蓄積障害が誘導されることが明らかとなった。今回の報告はインスリンによるPI 3-キナーゼの活性化が生体においても糖代謝恒常性の維持に必須の機能を果たすことを示した最初の報告である。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は個体におけるインスリン作用の解析、特に、肝臓におけるインスリン作用と個体における糖代謝の関連を明らかにする上で有用な手段であると考えられる。

【謝辞】

本研究にあたり、ご指導を賜りました神戸大学大学院応用分子医学講座、糖尿病代謝・消化器・腎臓内科春日雅人教授に厚くお礼申し上げます。

【文献】

- 1) Kahn, C.R.: Diabetes. Causes of insulin resistance. *Nature*. 373:384-385, 1995.
- 2) Ogawa, W., Matozaki, T., Kasuga, M.: Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol. Cell. Biochem.* 182:13-22, 1998.
- 3) Shepherd, P.R., Withers, D.J., Siddie, K.: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333:471-490, 1998.
- 4) Folli, F., Saad, M.J., Backer, J.M., Kahn, C.R.: Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models

- of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 92:1787-1794, 1993.
- 5) Kim, Y.B., Nikoulins, S.E., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Kahn, B.B.: Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, With diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 104:733-741, 1999.
 - 6) Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., Kahn, C.R.: Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell.* 6:87-97, 2000.
 - 7) Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R., Cantley, L.C.: Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat. Genet.* 26:379-382, 2000.
 - 8) Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Nakajima, H., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Sekihara, H., Yin, Y., Barrett, J.C., Oda, H., Ishikawa, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Suzuki, M., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Kadowaki, T., et al.: Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* 21:230-235, 1999.
 - 9) Jaffe, H.A., Danel, G., Longenecker, G., Metzger, M., Setoguchi, Y., Rosenfeld, M. A., Gant, T.W., Thorgeirsson, S.S., Straford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M.: Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat. Genet.* 1:372-378, 1992.
 - 10) Kobayashi, K., Oka, K., Forte, T., Ishida, B., Teng, B., Ishimura-Oka, K., Nakamuta, M., Chan, L.: Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 271:6852-6860, 1996.
 - 11) Becard, D., Hainault, I., Azzout-Marniche, D., Bertry-Coussot, L., Ferre, P., Fougelle, F.: Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes.* 50:2425-2430, 2001.
 - 12) Desal, J.U., Slosberg, D.E., Boettcher, R.B., Caplan, L.S., Fanelli, B., Stephan, Z., Gunther, J.V., Kaleko, M., Connelly, S.: Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression. *Diabetes.* 50:2287-2295, 2001.
 - 13) Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T.R., et al.: 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:7415-7419, 1994.
 - 14) Sakaue, H., Ogawa, W., Takata, M., Kuroda, S., Kotani, K., Matsumoto, M., Sakaue, M., Nishio, S., Ueno, H., Kasuga, M.: Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone-or hyperosmolality-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 11:1552-1562, 1997.
 - 15) Hassid, W.Z., Abraham, S.: *Methods in Enzymology.* vol.3. Academic Press, New York, p.34, 1957.
 - 16) Lang, G., Michal, G.: *Method of Enzymatic Analysis.* vol.3. VCH Publishers. New York, p.1238-1242, 1974.
 - 17) Thomas, J.A., Schiender, K.K., Larner, J.: A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal. Biochem.* 25:486-499, 1968.
 - 18) Bollen, M., Keppens, S., Stalmans, W.: Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336:19-31, 1998.
 - 19) Hwang, J.H., Perseghin, G., Rothman, D.L., Cline, G.W., Magnusson, I., Petersen, K.F., Shulman, G.I.: Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion. A ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J.Clin. Invest.* 95:783-787, 1995.

- 20) Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjekovich, M., Hemmings, B.A.: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378:785-789, 1995.
- 21) Takata, M., Ogawa, W., Kitamura, T., Hino, Y., Kuroda, S., Kotani, K., Klip, A., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Kasuga, M.: Requirement for Akt (protein kinase B) in insulin-induced activation of glycogen synthase and phosphorylation of 4E-BP1 (PHAS-1). *J. Biol. Chem.* 274:20611-20618, 1999.

Metabolic alteration by inhibition of PI 3-kinase signaling in the liver

Kazuaki Miyake

Division of Diabetes, Digestive and kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine

Evidence has suggested that phosphatidylinositol (PI) 3-kinase plays a central role in metabolic actions of insulin. In this study, we have investigated metabolic impact of liver-specific inhibition of PI 3-kinase signaling with the use of adenovirus-mediated gene transfer. Systemic infusion of an adenovirus vector encoding a dominant negative PI 3-kinase (AxCA Δ p85) resulted in liver-specific overexpression of Δ p85 protein. In AxCA Δ p85-infused mice, insulin-induced activation and phosphorylation of PI 3-kinase and Akt, respectively, were almost abolished in the liver, but not in skeletal muscle. AxCA Δ p85 infused mice exhibited hyperinsulinemia and marked increase in blood glucose levels in response to oral glucose tolerance test (OGTT). OGTT-elicited phosphorylation of Akt and GSK3, activation of glycogen synthase as well as accumulation of glycogen and glucose-6-phosphate was greatly attenuated in the liver of AxCA Δ p85-infused mice. These data indicate that liver-specific inhibition of PI 3-kinase signaling resulted in whole body insulin-resistance and severe impairment of glycogen metabolism in the liver.