



肝臓特異的3-phosphoinositide-dependent protein kinase1 (pdk1) 欠損マウスの作成とその糖代謝異常の解析

西澤, 昭彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Date of Publication)

2013-05-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2822

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002822>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 108 】

氏名・(本籍) 西澤 昭彦 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1503号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

肝臓特異的 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)
欠損マウスの作成とその糖代謝異常の解析

審査委員

主査 教授 春日 雅人

教授 千原 和夫

教授 南 康博

【緒言】

Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K)は、インスリンの代謝調節作用の発現に重要な機能を果たす脂質リン酸化酵素であることが明らかとなっており、その下流では Akt、p70S6 キナーゼ、atypical PKC などの蛋白リン酸化酵素がインスリン作用のエフェクター分子として機能すると考えられている。

PI3-K は細胞膜に存在する phosphatidylinositol(PI)4,5-2 リン酸のイノシトール環の D3 位をリン酸化し、PI3,4,5-3 リン酸を生成する。3-phosphoinositide dependent protein kinase1(PDK1)は、PI3,4,5-3 リン酸存在下に活性化される蛋白リン酸化酵素として同定された。PDK1 は、Akt などの蛋白リン酸化酵素のキナーゼ活性ドメインに存在するセリン・スレオニン残基を PI3,4,5-3 リン酸の存在下にリン酸化し、活性化することが知られている。実際、PDK1 遺伝子を欠失した胚性幹細胞ではインスリンをはじめとした増殖因子依存性の Akt、p70S6 キナーゼなどの蛋白リン酸化酵素のリン酸化や活性化がほぼ完全に阻害され、atypical PKC を含む PKC アイソフォームの安定性や活性が障害されることが報告されている。しかし、PDK1 遺伝子を欠損したマウスは胎生期に死亡するため、PDK1 の欠損が個体レベルでのインスリン作用にどのような影響を及ぼすかは不明である。また、PDK1 の活性が正常の 20%程度にまで低下した遺伝子改変マウスでは、インスリン依存性の Akt などの活性化がほぼ正常に生じるとの報告もあり、実際に個体レベルでも PI3-K の下流のエフェクター分子の活性化機構に PDK1 が必須であるか否かについては明らかではない。

本研究では、PI3-K 依存性蛋白キナーゼの活性化における PDK1 の必要性和インスリンの代謝調節作用における PDK1 の生理的意義を明らかにするため、Cre-LoxP システムを用いて、肝臓特異的に PDK1 を欠損するマウスを作成し、その表現型を解析した。

【方法】

遺伝子相同組み換えにより PDK1 遺伝子の第 3、第 4 エクソンの両側に loxP 配列を挿入したマウス(PDK1flox/+)を作成した。本マウスを CAG プロモーターにより Cre リコンビナーゼを胚性に発現するトランスジェニック(Tg)マウスと交配させ PDK1 ヘテロ欠損マウス(PDK1+/-)を作成し、

PDK1+/-同士の交配から PDK1 ホモ欠損マウス(PDK1-/-)の作成を試みた。また、PDK1flox/+同士の交配により PDK1 遺伝子両側アレルに loxP 配列を有するマウス(PDK1flox/flox)及び両側アレルに野生型 PDK1 遺伝子を有するマウス(PDK1+/+)を得て、両者の各種代謝パラメータを比較した。PDK1flox/+と、アルブミンプロモーターにより Cre リコンビナーゼを肝臓特異的に発現する Tg マウスとの交配により、PDK1 遺伝子片側アレルに loxP 配列を有し、かつ肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス(PDK1flox/+;AlbCr)を得た。そして PDK1flox/+;AlbCr と PDK1flox/flox との交配により、PDK1 遺伝子両側アレルに loxP 配列を有し、かつ肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス [PDK1flox/flox;AlbCr(L-PDK1KO)] を得た。さらに、PDK1flox/flox と L-PDK1KO との交配を行い、得られた PDK1flox/flox と L-PDK1KO の代謝パラメータを比較検討した。

【結果】

PDK1+/-同士の交配から PDK1-/-は出生せず、PDK1 の全身での欠損は胎生期において致死的事実であることが示唆された。

PDK1flox/+同士の交配から得られた PDK1+/+ と PDK1flox/flox について比較した。出生後 8 週までの観察で、体重、各臓器の PDK1 蛋白発現量、耐糖能及びインスリン感受性に関して差を認めなかった。以上の結果から、PDK1 遺伝子座への loxP 配列の挿入は、少なくとも検討した項目に関して影響を及ぼさないことが示唆された。

次に PDK1flox/flox と L-PDK1KO の交配により、両遺伝子型のマウスを得てそれらを比較することにより肝臓特異的な PDK1 の欠損がマウスに与える影響を検討した。両遺伝子型のマウスはメンデルの法則に従って出生した。体重を 12 週齢まで観察したが、差を認めなかった。肝臓における PDK1 蛋白の発現量は、L-PDK1KO では PDK1flox/flox に比し 5%以下に低下していたが、他の臓器では差を認めなかった。

肝重量は、随時摂食下において L-PDK1KO で PDK1flox/flox に比し約 20%低下していた。組織学的検討で、L-PDK1KO では肝細胞においてグリコーゲン蓄積の著明な減少が示唆され、細胞のサイズも小さかった。

Akt の 308 位のスレオニン残基は PDK1 によりリン酸化されると考えら

れている。インスリンによる肝臓での Akt のリン酸化を検討したところ、L-PDK1KO では Akt の 308 位のリン酸化は著明に抑制されていたが、PDK1 非依存性にリン酸化を受けると考えられている 473 位のリン酸化の程度には影響がみられなかった。この結果から、肝臓において PDK1 蛋白の発現量低下により、PDK1 依存性のシグナル伝達の抑制が生じていることが示唆された。

L-PDK1KO の空腹時血糖は PDK1^{flox/flox} に比して、約 1.4 倍に上昇していた。随時摂食時の血糖は L-PDK1KO で高い傾向を示したが、有意差はなかった。L-PDK1KO のインスリン値は、PDK1^{flox/flox} に比し空腹時で約 8 倍に、随時摂食時で約 6.5 倍に増加していた。また、L-PDK1KO に経口糖負荷試験を施行したところ、著明な高血糖を呈した。L-PDK1KO の外来性インスリンに対する血糖降下反応は PDK1^{flox/flox} に比して有意に減弱していた。

【考察】

本研究ではインスリンシグナル伝達機構及び糖代謝恒常性の維持機構における PDK1 の重要性を個体レベルで明らかにするため PDK1 を欠損したモデルマウスの作成を試みた。PDK1 遺伝子を全身で欠損したマウスは 9.5 日齢で死亡することが報告されているが、本研究においても PDK1^{+/-}同士の交配から PDK1^{-/-}は得られなかった。そこで Cre-loxP システムにより肝臓特異的に PDK1 を欠損するマウス (L-PDK1KO) を作成した。L-PDK1KO の肝臓における PDK1 蛋白発現量は対照の 5%以下まで低下していたが、ほぼメンデルの法則に従って出生し、生後の成長障害も認めなかった。

L-PDK1KO では、随時摂食下の肝重量の減少を認めた。また組織学的検討からグリコーゲン含量の減少が示唆され、肝細胞のサイズも低下していた。PI3-K 依存性のシグナルは肝臓のグリコーゲン蓄積に重要な機能を果たすことが知られており、L-PDK1KO の随時摂食下の肝重量及び肝細胞のサイズの低下は、PDK1 依存性のシグナル伝達機構の障害によるグリコーゲン含量の低下に起因するのかもしれない。一方、いくつかの遺伝子改変マウスの解析から PI3-K シグナルは臓器サイズの決定に関与することが示唆されている。胚の段階から PDK1 の発現量が正常の 20%程度に低下したマウスにおいても肝臓を含め全身の臓器サイズが縮小することが報告されている。このような

知見を踏まえるに、PDK1 は細胞の増殖や肥大のシグナルに関与しており、PDK1KO の肝臓重量の低下も、その一部は、増殖・肥大シグナルの抑制による可能性も否定できない。

L-PDK1KO ではインスリン依存性の Akt308 位のリン酸化が著明に減弱しており、PDK1 が Akt のリン酸化に必須の因子であることが明らかとなった。PDK1 遺伝子を完全に欠失した胚性幹細胞では増殖因子依存性の Akt のリン酸化や活性化がほぼ完全に抑制されるものの、PDK1 の発現量が 20%程度にまで低下したマウスでは肝臓をはじめとした各種の臓器でインスリン依存性の Akt のリン酸化・活性化がほぼ正常に生じることが報告されている。このような知見と本研究で得られた結果を考えあわせると、PDK1 は Akt のリン酸化には必須の分子であるものの、細胞内では PDK1 は過量に存在しており、減少してもある一定の蛋白量が残存していれば、下流へのシグナルを十分に伝達できるものと考えられる。L-PDK1KO では PDK1 蛋白量が著明に減少するため、Akt の 308 位のリン酸化が抑制されると推測される。

L-PDK1KO は空腹時血糖及び糖負荷時の血糖上昇反応が対照に比べ有意に増強していた。空腹時及び随時摂食時の血漿インスリン値が高値であったこと、外来性のインスリン投与による血糖の降下反応が低下していたことから、L-PDK1KO の耐糖能障害はインスリン抵抗性によるものと考えられた。このような代謝パラメータの変化は、優位抑制型 PI3-K をアデノウイルスベクターを用いて発現することにより作成された肝臓特異的 PI3-K 活性抑制マウスと類似している。このことは肝臓における糖代謝調節機構において PDK1 は PI3-K のシグナルの主要な部分を担うことを示唆するものである。今後、肝臓でのグリコーゲン合成や分解に関わる情報伝達分子・酵素の発現量や活性の変化、また、各種の糖脂質代謝関連遺伝子の発現量や誘導の変化の解析が、PDK1 の個体レベルでの機能を明らかにするためには重要であろう。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1492号	氏名	西澤 昭彦
論文題目	肝臓特異的 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)欠損マウスの作成とその糖代謝異常の解析		
審査委員	主 査	春日 雅人	
	副 査	千原 和夫	
	副 査	南 康博	
審査終了日	平成 15年 3月 3日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

本論文は Cre-LoxP システムを用いて肝臓特異的に 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase1(PDK1)を欠損したマウスを作成し、その糖代謝調節機構への関与を検討したものである。インスリンの糖・脂質代謝における作用はその多くが PI3-キナーゼを介する経路によって伝達されることが知られている。PI 3-キナーゼ依存性に活性化される PDK-1 は、PI 3-キナーゼの下流のエフェクター分子である Akt、p70 S6 キナーゼ、atypical PKC などの蛋白リン酸化酵素の活性化に関与することが示唆されており、PI 3-キナーゼシグナル伝達経路において主要な役割を担う可能性の有る蛋白リン酸化酵素として注目されている。また、インスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）は糖尿病の発症、進展において最も重要な因子であり、インスリン抵抗性の発症に PI 3-キナーゼシグナル伝達経路の障害が関与する可能性が示唆されている。さらに、近年種々の遺伝子改変マウスを用いた成績から、肝臓における糖代謝障害とインスリン抵抗性の関係性が注目されている。以上の点を踏まえると、肝臓特異的 PDK1 欠損マウスの解析は糖尿病の発症、進展機構を理解する上で重要な知見をもたらすものと考えられる。

本研究では、まず、PDK1を全身で欠損したマウスが致死的であることを明らかにし、インスリン依存性の代謝調節作用への PDK1 の関与を検討するために、肝臓特異的に PDK1を欠損したマウスを作成している。本マウスでは肝臓におけるインスリン依存性の Akt のリン酸化が著しく抑制されており、PDK1 シグナルの特異的な低下が確認されている。本マウスでは肝臓のグリコーゲン蓄積の低下を認めるとともに、耐糖能障害とインスリン抵抗性を呈する。また、空腹時血糖の上昇、随時摂食下及び空腹時の血清インスリン値の上昇がみられ、また経口血糖負荷試験での血糖上昇反応の増強、インスリン負荷試験での血糖低下反応の減弱がみられたことから、本マウスにおける耐糖能障害は、インスリン抵抗性によるものと考えられる。以上のことから、PDK1 は肝臓において、糖代謝調節機構において重要な役割を担っており、PI 3-キナーゼシグナル伝達の主要な部分に関与することが明らかとされた。

本研究は、肝臓における PDK1 の糖代謝調節機構への関与を検討し、肝臓特異的な PDK1 の欠損がインスリン抵抗性及び耐糖能障害をもたらすことを初めて明らかとしたものである。これは従来十分に知られていなかった PDK1 の糖代謝調節機構における意義を個体レベルで明らかにした点において価値ある知見の集積と認められる。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認められる。