



Phosphoinositide 3-Kinase Is Required for Insulin : Induced but Not for Growth Hormone- or Hyperosmolarity-Induced Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes

阪上, 浩

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2227

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002227>

※ 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。



氏名・（本籍） 阪 上 浩 （大阪府）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博ろ第1628号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成10年3月20日

学位論文題目 Phosphoinositide 3-Kinase Is Required for Insulin-Induced but Not for Growth Hormone-or Hyperosmolarity-Induced Glucose Uptake in 3T3 Adipocytes
 （3T3-L1脂肪細胞においてPI3-キナーゼはインスリンによる糖輸送活性化には必要であるが、成長ホルモン及び高浸透圧による糖輸送活性化には必要でない）

審査委員 主査 教授 春日 雅 人

教授 山村 博 平 教授 片岡 徹

論文内容の要旨

【緒 言】：

脂肪細胞や骨格筋における糖輸送の活性化はインスリンの主要な代謝作用の一つである。近年、ワルトマニンを用いた薬理学的検討や、phosphoinositide (PI)3-キナーゼがインスリン依存症の糖輸送活性化の主要な制御因子であることが示唆されている。一方、インスリン以外にも成長ホルモン、高浸透圧ショック等の様々な刺激が糖輸送を促進することが知られているが、その分子機構の詳細は明らかではない。本研究ではdominant negative型変異PI3-キナーゼ、dominant negative型変異SOS、dominant negative型変異低分子量G蛋白質Ras、dominant negative型変異低分子量G蛋白質Racをコードするアデノウイルスベクターを作成し、これらのウイルスベクターを用いてインスリンをはじめとした各種の刺激による糖輸送能の活性調節機構を3T3-L1脂肪細胞において検討した。

【成績及び考察】：

3T3-L1脂肪細胞はインスリンの代謝作用の検討に有用な培養細胞であるが、分化した脂肪細胞に高効率に遺伝子を導入することは困難である。そこで従来、前駆脂肪細胞に遺伝子を導入し脂肪細胞に分化させるという手法が用いられてきた。しかし、インスリン自身が分化誘導因子であることを考慮すると、インスリン情報伝達機構に影響を与える遺伝子の導入は、脂肪細胞への分化にも影響する可能性がある。そのため本研究では、アデノウイルスを用いて各種のdominant negative型変異遺伝子を分化した脂肪細胞に直接導入し、糖輸送の調節機構の検討を試みた。

PI3-キナーゼの85kDa調節サブユニットより110kDa触媒サブユニットとの結合部位を欠失させたdominant negative型変異PI3-キナーゼ ($\Delta p85$)、SOSよりグアニンヌクレオチド交換刺激活性を欠失させたdominant negative型変異SOS (ΔSOS)、dominant negative型変異低分子量G蛋白質Ras (Ras57Y) およびdominant negative型変異低分子量G蛋白質Rac (Rac17N) を各々コードするアデノウイルスベクターAxCA $\Delta p85$ 、AxCA ΔSOS 、AxCARas57Y、AxCARac17Nを作成し

た。これらのウイルスベクターを分化した3T3-L1脂肪細胞に種々のウイルス濃度（MOI：プラーク形成数／感染細胞数）で感染させた後、48時間後に各種の実験に供した。

まず、各種の刺激によるPI3-キナーゼの活性化を検討したところ、基礎値に比して、インスリンで約30倍、成長ホルモンでは約3倍の増加をみたが、ソルビトールによる高浸透圧刺激の刺激ではPI3-キナーゼの活性化を認めなかった。次に、これらの刺激による糖輸送能の活性化を検討したところ、いずれの刺激においても基礎値に比して5から8倍の活性化がみられた。dominant negative型PI3-キナーゼをコードするウイルスベクターAxCA Δ p85をMOI30にて感染させると、インスリン依存性のPI3-キナーゼ活性化は90%以上の抑制がみられ、インスリンによる糖輸送は60%抑制されたが、他の刺激による糖輸送には影響がなかった。

次に、AxCA Δ SOS及びAxCARas57YをMOI30で感染させるとインスリン依存症のMAPキナーゼの活性化は基礎値にまで低下し、AxCARac17NをMOI30で感染させるとインスリン依存症の膜ラフリング形成は完全に抑制された。しかし、これらのウイルスの感染によっては、いずれの刺激による糖輸送も影響を受けなかった。

さらに、インスリン、成長ホルモンおよびソルビトールによる高浸透圧刺激によって促進されるGLUT4の膜へのトランスロケーションを検討したところ、それぞれ非刺激時に比べインスリンで約20倍、成長ホルモン及び高浸透圧刺激で約10倍の増加を認めた。AxCA Δ p85の感染により、インスリンによるGLUT4の膜へのトランスロケーションはウイルス濃度に応じて抑制を認め、糖輸送能と同様にMOI30で約60%抑制されたが、成長ホルモン、ソルビトール刺激によるトランスロケーションには影響がなかった。PI3-キナーゼの阻害剤ワルトマニンを用いても同様で、インスリンによるGLUT4の膜へのトランスロケーションのみ抑制し、成長ホルモンやソルビトール刺激によるトランスロケーションには影響を与えなかった。また、インスリン、成長ホルモン及びソルビトールによる高浸透圧刺激はいずれも、PI3-キナーゼの下流に存在すると考えられているセリンスレオニンキナーゼAktを活性化させた。

以上の結果より、インスリン依存症の糖輸送はPI3-キナーゼにより制御を受けているが、Ras-MAPキナーゼ経路には依存しないことが示唆された。また、PI3-キナーゼの下流で機能すると考えられているRacを抑制しても、糖輸送は阻害されないことから、糖輸送はRacとは異なった経路で活性化されていると考えられた。さらに、成長ホルモンおよび高浸透圧刺激はPI3-キナーゼの活性化を誘導せず、これらの刺激による糖輸送は Δ p85やワルトマニンでは抑制されないという結果は、PI3-キナーゼに依存しない糖輸送活性調節機構が存在することを示唆する。PI3-キナーゼの下流に存在し、糖輸送活性化への信号を伝達する分子は未だ同定されていない。また、PI3-キナーゼ非依存症の糖輸送活性調節機構についても詳細は不明である。しかし、インスリン、成長ホルモンおよびソルビトールによる高浸透圧刺激のいずれによっても、Aktが活性化されたことは、Aktが全ての刺激に共通する糖輸送活性調節因子である可能性を示唆する。糖輸送の分子機構の解明のためにAktを含めPI3-キナーゼの下流に存在する情報伝達分子の機能の解明が今後の重要な検討課題であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

脂肪細胞や骨格筋における糖輸送の活性化はインスリンの主要な代謝作用の一つであるが、PI3-キナーゼがインスリン依存性の糖輸送活性化の主要な制御因子であることが示唆されている。一方、インスリン以外にも成長ホルモン、高浸透圧ショック等の様々な刺激が糖輸送を促進することが知られ

ているが、その分子機構の詳細は明らかではない。

本研究ではPI3-キナーゼ、グアニンヌクレオチド交換反応促進因子SOS、低分子量G蛋白質Ras、Racが、脂肪細胞において、各種の刺激における糖輸送能の活性調節に果たす役割を検討した。

PI3-キナーゼ、SOS、RasおよびRacの優位抑制型変異分子を作製し、各々をコードするアデノウイルスベクターを作成、3T3-L1脂肪細胞に感染させた後に、イムノブロットにて各々の分子の過剰発現を確認した。

インスリン刺激ではPI3-キナーゼは著明に活性化されたが、成長ホルモンではわずかに活性化するのみであった。ソルビトールによる高浸透圧刺激ではPI3-キナーゼの活性化を認めなかった。優位抑制型PI3-キナーゼの導入にて、インスリン依存症のPI3-キナーゼ活性化は著明に抑制され、インスリンによる糖輸送能の活性化も抑制された。しかし、優位抑制型PI3-キナーゼの導入にても成長ホルモン、ソルビトール刺激による糖輸送には影響がなかった。GLUT4の膜へのトランスロケーションも同様で優位抑制型PI3-キナーゼの導入により、インスリン刺激によるGLUT4の膜へのトランスロケーションのみが抑制され、成長ホルモン、ソルビトール刺激によるトランスロケーションには影響がなかった。

次に、優位抑制型変異SOS、優位抑制型変異Rasの導入では、インスリン依存性のMAPキナーゼの活性化は基礎値にまで低下し、優位抑制型変異Racの導入では、インスリン依存性の膜ラフリング形成は完全に抑制された。しかし、これらの変異分子によっては、いずれの刺激による糖輸送も影響をうけなかった。

また、インスリン、成長ホルモンおよびソルビトールによる高浸透圧刺激はいずれも、PI3-キナーゼの下流に存在すると考えられているAktキナーゼを活性化させた。

この研究により、インスリン依存症の糖輸送はPI3-キナーゼにより制御を受けているが、Ras-MAPキナーゼ経路には依存しないことが示唆された。また、PI3-キナーゼの下流で機能すると考えられているRacを抑制しても、糖輸送は阻害されないことから、糖輸送はRacとは異なった経路で活性化されていると考えられた。さらに、成長ホルモンおよび高浸透圧刺激による糖輸送は優位抑制型PI3-キナーゼでは抑制されないという結果は、PI3-キナーゼに依存しない糖輸送活性調節機構が存在することを示唆する。インスリン、成長ホルモンおよびソルビトールによる高浸透圧刺激により、Aktキナーゼが活性化されたことは、Aktキナーゼが全ての刺激に共通する糖輸送活性調節因子である可能性を示唆するものである。

本研究は、糖輸送能の活性調節機構について、細胞内情報伝達機構の役割を検討したものであるが、従来ほとんど不明であったインスリン、成長ホルモンおよび高浸透圧刺激によるPI3-キナーゼ、Ras及びRacによる情報伝達経路について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

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る。