

氏 名 (本 籍) 吉 崎 健 (京都府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 8 0 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 9 月 8 日

学 位 論 文 題 目 Protein Phosphatase-2C $\alpha$  as a Positive Regulator of Insulin Sensitivity  
through Direct Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1  
Adipocytes  
(3T3L1 脂肪細胞において、プロテインホスファターゼ2C $\alpha$ はフォスファチ  
ジルイノシトール3キナーゼを活性化しインスリン感受性を正に制御する)

審 査 委 員 主 査 教 授 大 久 保 岩 男

副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎

副 査 教 授 田 中 俊 宏

## 論文内容要旨

*整理番号	483	氏名 (よりがな)	よしざき たけし 吉崎 健
学位論文題目	Protein Phosphatase-2C $\alpha$ as a Positive Regulator of Insulin Sensitivity through Direct Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes (3T3L1 脂肪細胞において、プロテインホスファターゼ 2C $\alpha$ はフォスファチジルイノシトール 3 キナーゼを活性化しインスリン感受性を正に制御する)		
<p><b>[背景と目的]</b> 2型糖尿病の病態形成に重要と考えられるインスリン抵抗性の原因として、インスリン受容体以下のシグナル伝達系の異常が想定されている。インスリンシグナル伝達系はリン酸化酵素（キナーゼ）と脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）にて制御され、インスリンシグナル伝達におけるチロシンキナーゼおよびチロシンホスファターゼの役割についての報告はあるが、セリン・スレオニンホスファターゼ（PP）の役割についての報告は皆無に等しい。3T3-L1 線維芽細胞は脂肪細胞へ分化しインスリン応答性を獲得するが、我々はその脂肪細胞への分化の過程で、セリン・スレオニンホスファターゼ 2C（PP2C）の発現が増加することを発見した。そこで、PP2C のインスリンシグナル伝達系における役割を明らかにするために、以下の実験を行った。</p> <p><b>[方法]</b> 1) アデノウイルスを用いて 3T3-L1 脂肪細胞に PP2C を過剰発現させ、その発現量をウエスタンブロット (WB) 法で、その活性をリン酸パラニトロフェニルを基質として測定した。2) PP2C 過剰発現のインスリンによる糖取り込み促進作用への影響を<sup>3</sup>H 標識 2-デオキシグルコースを用いて測定した。3) インスリンシグナル伝達系への影響を調べるため、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 活性をその抗体を用いて測定した。また、その下流の Akt、GSK、PKC などのセリン・スレオニンキナーゼの活性化状態について抗リン酸化抗体を用いた WB 法で検討した。4) RNA 干渉を用いて内因性 PP2C の発現を抑制し、Akt のインスリンによるリン酸化作用について検討した。さらに、PP2C に対する RNA 干渉および抗 PP2C 抗体を脂肪細胞にマイクロインジェクションし、インスリンによる糖取り込みの律速段階である糖輸送担体 (GLUT4) の細胞膜への移行を免疫染色法にて検討した。5) 最後に PP2C による PI3K 活性化の分子機構を明らかにするため PI3K のリン酸化状態を<sup>32</sup>P 正リン酸ラベル法、gel mobility shift 法で検討し、さらに、脱リン酸化推定部位を変異させた PI3K (serine/alanine 608, S/A) と PP2C を共発現し、その PI3K のリン酸化状態を gel mobility shift 法で検討し、また PI3K 活性を測定した。</p> <p><b>[結果]</b> 1) アデノウイルスを用いて 3T3-L1 脂肪細胞に蛋白量で約 6 倍、活性で約</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、  
2 千字程度でタイプ等で印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

5倍増加のPP2C過剰発現を確認した。2) PP2C野生型(WT)過剰発現は糖取り込みを亢進し、さらにそのインスリン感受性を増強したが、PP2C活性欠失変異体(arginine/glycine 174, R/G)過剰発現はそれらに影響しなかった。3) WT過剰発現により、抗PI3K抗体による免疫沈降産物中PI3K活性はインスリン刺激の有無にかかわらず増強し、その下流のAkt、GSK、PKCのリン酸化も増強した。一方R/G過剰発現はどの段階の活性にも影響しなかった。4) RNA干渉法によりPP2Cの発現を40%に抑制すると、Aktのリン酸化が抑制された。RNA干渉およびPP2C抗体のマイクロインジェクションにより、GLUT4の細胞膜への移行が50%に低下した。5) WT過剰発現により、PI3Kのp85サブユニットは脱リン酸化されたが、R/Gの過剰発現では変化は認められなかった。WT過剰発現によるPI3K活性増強効果は脱リン酸化推定部位を変異させたPI3K p85(S/A)との共発現では認められなかった。

**【考案】** 脂肪細胞への分化の過程で認められるPP2C発現の増加は、脂肪細胞のインスリン応答性獲得に重要であることが示唆された。すなわち、インスリンシグナル伝達系がアデノウイルスを用いたPP2Cの過剰発現により正に、一方、RNA干渉およびPP2Cの特異的抗体を用いたPP2Cの機能抑制により負に制御された。すなわち、インスリン標的臓器である脂肪細胞において、PP2C活性の亢進はインスリンシグナル伝達系に促進的に作用し、PP2C活性低下はインスリン抵抗性の原因となりうる可能性が示唆された。さらにPP2Cによるインスリンシグナル伝達系促進の分子機構として、PI3Kのp85サブユニットを脱リン酸化することによりPI3Kを活性化し下流へのシグナル伝達を増強していることが示唆された。

**【結語】** 脂肪細胞の分化にともなって発現するPP2Cは、インスリンシグナル伝達系に促進的に作用し、PP2Cはインスリン抵抗性を改善する糖尿病治療薬の標的分子となる可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	483	氏名	吉崎 健
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>インスリン抵抗性の原因の一つとして、タンパク質ホスファターゼのうちセリン/トレオニンホスファターゼの機能異常が考えられている。本研究は、3T3-L1 脂肪細胞を用いて、脂肪細胞への分化におけるセリン/トレオニンホスファターゼ 2C(PP2C)の発現を検討し、更に過剰発現、また発現抑制により、PP2Cのインスリンシグナル伝達への影響とその機構について検討したものである。</p> <p>その結果、脂肪細胞の分化により発現増加する PP2C は PI3 キナーゼを負に制御しているリン酸化部位を脱リン酸化することで活性化し、その下流シグナルを増強し、糖取り込みのインスリン感受性を増強することが明らかになった。</p> <p>このように本論文は脂肪細胞の分化におけるインスリン情報伝達、ならびにその制御機構を解明したものであり、博士（医学）の学位論文に値するものと認める。</p>			
(平成16年8月26日)			