

氏名(本籍)	清水 真也 (京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第438号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Mechanism for Differential Effect of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B on Akt Versus Mitogen-Activated Protein Kinase in 3T3-L1 Adipocytes (プロテインチロシンホスファターゼ1Bの3T3L1脂肪細胞におけるAktとMAPキナーゼに対する抑制作用相違の分子機構)
	審査委員 主査 教授 堀池 喜八郎 副査 教授 山路 昭 副査 教授 犬伏 俊郎

論文内容要旨

【目的】

近年チロシン残基の脱リン酸化を触媒するチロシンホスファターゼの活性亢進とインスリン抵抗性の連関が報告されている。インスリンシグナル伝達系は主に細胞増殖に作用するMAPキナーゼ系と代謝系に作用するPI3キナーゼ系の2系統に分岐している。最近我々はL6筋細胞、Fao肝細胞にチロシンホスファターゼ1B (PTP1B) を過剰発現させると、インスリンシグナル伝達が抑制されることを報告した。またその抑制の程度がMAPキナーゼ系でより強いこと、さらに3T3-L1脂肪細胞では他の細胞に比しPI3キナーゼ系の抑制が軽度であることを見出した。今回、細胞種間でのPI3キナーゼ系抑制の程度の相違、およびPTP1BがPI3キナーゼ系よりMAPキナーゼ系に対する抑制が高度である分子機構を明らかにするために、以下の実験を行った。

【方法】

1) L6筋細胞、3T3-L1脂肪細胞、さらにインスリン受容体を強発現させたRat1繊維芽細胞(HIRc)にアデノウィルスを用いてPTP1Bを過剰発現させた。2) 各細胞におけるインスリン受容体、インスリン受容体基質(IRS-1)、の発現量をウエスタンブロット(WB)法で検討した。3) PTP1Bの発現量をWB法で、その活性を*p*-nitrophenyl phosphateを基質として測定した。4) インスリン受容体、IRS-1、Shc、MAPキナーゼおよびPI3キナーゼ系の指標であるAktのリン酸化についてリン酸化抗体を用いたWB法で検討した。5) 3T3-L1脂肪細胞においてインスリンの糖取り込み促進作用を2-deoxyglucoseを用いて測定した。6) Platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体、Shc、MAPキナーゼのリン酸化についてL6筋細胞で検討した。

【結果】

1) アデノウィルスによる遺伝子導入によりPTP1Bの発現量増加と同程度の活性増加を認めた。2) インスリン受容体およびIRS-1の発現量は3T3-L1脂肪細胞やHIRc細胞では多く、L6筋細胞、Fao肝細胞では少なかったが、PTP1Bの過剰発現により、インスリン受容体およびIRS-1のインスリンによるリン酸化は全ての細胞で50%抑制された。しかしAktのリン酸化は、L6筋細胞では50%抑制されたが、3T3-L1脂肪細胞やHIRc細胞では20%しか抑制されず、また3T3-L1脂肪細胞のインスリンによる糖取り込み促進作用も20%しか抑制されなかった。3) PTP1Bの過剰発現により、3T3-L1脂肪細胞におけるMAPキナーゼのリン酸化は他の細胞と同様に80%以上抑制された。4)

MAPキナーゼ系はIRS-1を介する系とShcを介する系により活性化されることが知られている。HIRc細胞ではPTP1Bの過剰発現により、Shcのインスリンによるリン酸化が抑制された。これがインスリン受容体のリン酸化の抑制によるものか、直接ShcがPTP1Bにより脱リン酸化されたのかを検証するため、Shcを介する系のみにてMAPキナーゼを活性化することが知られているPDGF刺激を用いた。L6筋細胞においてPTP1B過剰発現によりPDGF受容体のリン酸化は影響されなかったが、ShcおよびMAPキナーゼのリン酸化は抑制された。

【考 察】

各種培養細胞間におけるPTP1B過剰発現によるPI3キナーゼ系の抑制作用の相違については、上流に存在するシグナル分子の蛋白発現量の違いによる可能性が考えられた。すなわち3T3-L1脂肪細胞やHIRc細胞ではインスリン受容体およびIRS-1の発現量が多いため、PI3キナーゼ系の抑制が軽度であるが、L6筋細胞、Fao肝細胞ではそれらの発現量が少ないため、PI3キナーゼ系の抑制が強いと考えられた。PTP1Bはインスリン受容体およびIRS-1のチロシン残基の脱リン酸化を行っているが、これだけではMAPキナーゼ系の抑制がPI3キナーゼ系より強いことを説明できない。今回の検討ではPTP1Bの過剰発現はPDGF受容体のリン酸化には影響を与えずに、Shcのリン酸化を抑制したことから、PTP1Bが直接Shcの脱リン酸化をしているものと考えられた。よってMAPキナーゼ系ではPTP1BによりIRS-1を介する系及びShcを介する系が共に抑制されるため、強い抑制作用が現れると考えられた。

【結 語】

PTP1Bはインスリン受容体、IRS-1、さらにShcの脱リン酸化を行うことでPI3キナーゼ系よりMAPキナーゼ系をより強く抑制すること、さらにPTP1BのPI3キナーゼ系への抑制作用はインスリン受容体等の上流シグナルの蛋白発現量により規定されている可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

インスリン抵抗性の発症原因の一つとして、タンパク質ホスファターゼのうちチロシンホスファターゼの活性亢進が考えられている。本研究は、L6筋細胞・3T3-L1脂肪細胞・Fao肝細胞・線維芽細胞（HIRc）を用いて、チロシンホスファターゼ1B（PTP1B）を過剰発現させて、PTP1B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。

その結果、PTP1Bはインスリン受容体・IRS-1・Shcの脱リン酸化を介してPI3キナーゼ系よりもMAPキナーゼ系を強く抑制すること、PTP1BのPI3キナーゼ系に対する抑制作用の強弱はインスリン受容体など上流側のシグナル伝達タンパク質の発現量によって決まることを明らかにした。

このように本論文はインスリンシグナルの伝達・制御機構ならびにインスリン抵抗性の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。

なお、本学位授与申請者は平成15年2月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。