

学位論文題名

Activation of SH2-Containing Proteins by Insulin in Proliferating Mouse Parotid Gland Acinar Cells

(インスリンによる耳下腺細胞のSH2含有蛋白質の活性化)

学位論文内容の要旨

[緒言]

唾液は歯科と医科の両領域に重要な関連をもつにもかかわらず、血液などに比較すると生化学的な研究が遅れていた。とくに唾液腺の機能と成長に及ぼすインスリンなどの多機能因子の影響については、これまでほとんど報告がなかった。本研究は耳下腺細胞に対するインスリンの作用機構に着目したものである。インスリンの機能は血糖降下作用以外に多種類の細胞活動の活性化能および増殖能が明らかになりつつある。これらの作用はいずれも標的細胞表面のインスリンレセプターを介して発現しており、その発現はチロシンキナーゼが活性化（リン酸化）することによって開始される。その後の情報伝達のメカニズムについては、現在、次のような点が明らかになりつつある。すなわち、活性化したチロシンキナーゼは、IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) と呼ばれる蛋白質と結合してそのチロシンをリン酸化する。そしてこの活性化したIRS-1、さらにSH2 (Src Homology2) と呼ばれる配列をもつ一群の蛋白質 (Src Homology2含有蛋白質) と結合して複合体となり、次段階の反応を触媒すると考えられている。この一群のSH2含有蛋白質については、PI3K (PI3キナーゼ) のみが結合するというWhiteらの説が、一般に認められてきたが、他のSH2含有蛋白質については十分には確認されていない。

さて、近年著者らのグループは唾液腺細胞の細胞膜にインスリンレセプターの存在を発見し、そしてインスリンが唾液腺細胞の増殖を促進する働きがあることを報告した。そこで本研究では、すでに著者らが確立したマウスの唾液腺の細胞増殖実験系を用いて、耳下腺細胞に対するインスリンの情報伝達機構を解明することを目的とした。研究を進めるにあたって次の2点を作業仮説とした。(1) インスリンは、EGF (上皮成長因子)、

PDGF（血小板由来成長因子）と同様にチロシンキナーゼ活性をもち、リガンドの結合によりチロシン残基の自己リン酸化を生ずるので、このことからEGF、PDGFの系におけるレセプター以降のシグナル伝達様式がインスリンの系でもそのまま当てはまるものと予想されること。（2）したがってインスリン・レセプターに結合するIRS-1には、従来知られていたPI3K以外のSH2含有蛋白質（PLC γ ：ホスホリパーゼCガンマ、GAP：グアノシン三リン酸活性促進蛋白質）とも結合する可能性があり、それぞれのSH2含有蛋白質がシグナル伝達経路やインスリン作用の多様性に関与している可能性が高いと考えられること。以上の目的と作業仮説に基づき実験を進めた。

[材料と方法]

1. 実験動物

BALB/c系のマウスを用い、1回につき50 μ molのインスリンを筋肉内注射にて反復投与した。すなわち、インスリン投与群を4群に分け、15分、60分、24時間、72時間の系で実験に供した。インスリンは15分、60分の系は1回、24時間および72時間の群では、それぞれ計3回および7回、12時間間隔で反復投与された。

2. 試料作製

インスリン投与後摘出した耳下腺は、遠心分離法で細胞を分画した。この方法を用い細胞画分と細胞質画分を分離した。

3. チロシンリン酸化蛋白質の検出

耳下腺細胞画分からウエスタンブロット法で抗リン酸化チロシン抗体を用いてリン酸化する蛋白質を検出した。すなわち、試料をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に展開し、一次抗体として抗リン酸化チロシン抗体と反応させ、2次抗体としてProteinA-ALPで反応させ発色させた。

4. 抗IRS-1抗体を用いた免疫沈降法

免疫沈降法で耳下腺細胞質内に存在するチロシンでリン酸化する蛋白質とIRS-1とを結合させた。免疫反応物をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に展開し、さらにウエスタンブロット法で抗PLC γ 、抗GAPおよび抗PI3K抗体との反応を¹²⁵IラベルプロテインAによるオートラジオグラフィー上で観察した。そして各々の特異的バンドの濃度をデンシトメトリーにて比較定量した。

5. PKC（プロテインキナーゼC）活性の測定

PLC γ 活性のマーカーとしてのPKC活性の測定はGIBCO/BRL社の

「 γ - ^{32}P 」ATPを用いたプロテインキナーゼCエンザイムアッセイシステムを使用した。

[結果および考察]

1. チロシンリン酸化蛋白質の検出

細胞画分を抗リン酸化チロシン抗体を用いてリン酸化蛋白質のウエスタンブロット法で試みた結果、耳下腺細胞からさまざまなリン酸化チロシン含有蛋白質が検出された。現在までの報告では80-150 kDaの領域に存在するバンドは、インスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性化により影響を受ける可能性のある情報伝達物質が多いといわれているが、本実験結果からもインスリン投与群には80-150 kDaの領域に複数のバンドが検出され、PI3K (85kDa), GAP (120kDa), PLC γ (140kDa)と考えられるバンドの位置に特異的な反応がみられた。そこで、これらの蛋白を正確に同定するために細胞質画分を一旦、抗IRS-1抗体によって免疫沈降物を得、その中に抗PI3K, GAP, PLC γ 抗体と反応するバンドを追及した。

2. 抗IRS-1抗体を用いた免疫沈降法

抗IRS-1抗体による沈殿物中には、抗PI3K, GAP, PLC γ 抗体と反応するバンドが明らかに検出され、これら3種の酵素の存在が確認された。それらは、インスリン刺激に伴い、IRS-1と結合する3種の酵素 (PI3K, GAP, PLC γ) は増加傾向を示すバンドを呈した。そして、 ^{125}I ラベルプロテインAによるオートラジオグラフィ上で各々の特異的バンドの濃度をデンストメトリーにて比較定量した結果、3種ともすべて増加傾向が、刺激15分直後からはじまり24時間まで継続した。以上の分析結果からPLC γ , GAPは24時間まで増加し、72時間では減少した。これはインスリン刺激に伴うレセプター数の減少か、あるいはインスリンとの反応応答が鈍くなったことが考えられた。一方、PI3Kに限っては72時間まで一定していた。

3. PKC活性の測定

PKC活性を測定した理由はインスリンがレセプターに結合し、チロシンキナーゼが活性化され、さらにIRS-1とPLC γ のもつSH2部位に結合しPLC γ が活性化され、さらにPKCが活性化されるという考えに基づく。結果はインスリン刺激に伴い、PKC活性値は増加傾向を示した。この変化は先に示した免疫沈降、ウエスタンブロット法によってIRS-1とPLC γ が結合を証

明したオートラジオグラフィーをデンストメーターで分析した値の傾向に一致していた。この結果は、IRS-1がPLC γ と複合体を形成し、それを介してPKCが活性化されて、シグナルが伝達することを示す重要な証拠を提供するものである。

[結論]

本研究においては、既に著者らがインスリンによる増殖を確認した耳下腺細胞を実験系として用い、IRS-1と結合するSH2含有蛋白質には、著者らが最初に提案した作業仮説どおりにPI3Kの他に、GAPとPLC γ があることを確認し、新しいインスリンの情報伝達経路を見い出した。これらの新しい情報伝達経路は耳下腺細胞の細胞増殖などに影響を与える可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 宏
副 査 教 授 久保木 芳 徳
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Activation of SH2-Containing Proteins by Insulin in Proliferating Mouse Parotid Gland Acinar Cells (インスリンによる耳下腺細胞のSH2含有蛋白質の活性化)

論文審査は、主査および副査全員の出席のもとで、まず、申請者に論文の概要の説明を求めた後、各委員から本論文の内容とその関連事項について口頭により試問した。

唾液は口腔の健康や機能の維持にとって重要な役割を果たしている体液であり、歯科と医科の両領域にまたがる重要な体液であるにもかかわらず、血液などに比較すると生化学的研究は遅れていた。とくに唾液腺の成長と機能に及ぼすインスリンなどの多機能因子の影響については、これまでほとんど報告がなかった。

本研究は、唾液腺におけるインスリンの作用機構を解明することを目的として行われた。インスリンの機能は血糖降下作用以外に多種類の細胞活動の活性化能および増殖能が明らかになりつつある。インスリンの作用はいずれも標的細胞表面のインスリンレセプターを介して行われ、そのチロシンキナーゼを活性化することによって開始される。その後の情報伝達のメカニズムについては、活性化したチロシンキナーゼは、IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) というタンパク質のチロシンをリン酸化し、IRS-1 はSH2 と呼ばれるアミノ酸配列をもつ一群のタンパク質 (Src Homology 2含有タンパク質) と結合して

複合体となり、次の反応を触媒すると考えられている。この一群の SH2 含有タンパク質については、これまでに PI3 キナーゼ (PI3K) のみが知られていたが、本研究では、すでにインスリンによる増殖を確認した唾液腺の実験系を用いて、その他の SH2 含有タンパク質も関与するとの作業仮説をたて、グアノシン三リン酸活性タンパク質 (GAP) フォスホリパーゼ C γ (PLC γ) について検討した。

実験は、BALB/c系マウスの筋肉内に、インスリンを反復投与し、まず、細胞画分を抗リン酸化チロシン抗体を用いてチロシンリン酸化タンパク質をウエスタンブロット法にて PI3K、GAP、PLC γ の分子量に相当するバンドを検出している。次に、細胞質画分を抗 IRS-1 抗体を用いて免疫沈降させ、沈降画分を抗 PI3K、抗 GAP および抗 PLC γ 抗体を用いてウエスタンブロットを行って、PI3K、GAP および PLC γ の存在と、IRS-1 との結合を確認している。さらに PLC γ の活性化の指標となる PKC 活性値を測定し、インスリン投与に伴う PLC γ の活性が増大することを確認している。

本研究において、すでに申請者らがインスリンによる増殖を確認した実験系の耳下腺細胞を用い、IRS-1 と結合する SH2 タンパク質には初めに立てた仮説どおりに PI3K の他に、GAP と PLC γ があることを確認し、新しいインスリンの情報伝達経路の存在を示唆した。このことはこの分野における進歩発展に寄与するところ極めて大きく、本研究は高く評価され、また、これらの新しい情報伝達経路は耳下腺細胞の細胞増殖などに影響を与える可能性を示唆している点においても興味深い。

質問は、1) 唾液腺細胞においてインスリンの作用機構を追及した理由、2) 本実験系に用いたインスリン投与量について、3) 唾液分泌について、4) リン酸化について、など多岐にわたった。概要の説

明、本研究の意義、発展および関連分野に関する質問にも、満足すべき解答が得られた。以上の結果から、本論文は歯科医学の進歩、発展に寄与するところ大であり、本学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるに十分値するものと認めた。