

学 位 論 文 題 名

3T3-L1細胞の分化の過程における情報伝達系の解析

学位論文内容の要旨

Swissマウス由来3T3-L1細胞は線維芽様の形態を有しているが、インスリンなどのホルモンの刺激によって、脂質代謝系の諸酵素が誘導され、細胞内に脂肪滴の蓄積が起こり、形態は球状となり、白色脂肪細胞へと分化する。分化した3T3-L1脂肪細胞はホルモンに対する反応性が高く、均一な細胞であるため副睪丸由来の白色脂肪細胞のモデルとして、糖質および脂質代謝系の研究に汎用されている。しかし、脂肪細胞への分化を引き起こす情報伝達系および転写因子についてはいまだ不明な点が多い。

百日咳毒素（IAP）は3量体GTP結合蛋白質（G蛋白質）の α サブユニット（ $G_i\alpha$, $G_o\alpha$, $G_t\alpha$ ）をADP-リボシル化してその機能を消失させることが知られている。そこで、このIAPをプローブとして成長因子としてのインスリンによる細胞分化誘導に対する情報伝達機構を解析した。

グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GPDH）は脂肪合成系のkey enzymeであり、分化とともに活性化されるので脂肪細胞分化の指標となる酵素である。未分化の線維芽細胞ではGPDH活性はほとんど認められないが、分化した脂肪細胞ではその活性は約70倍に増加した。IAPを前処理した後に分化を誘導した細胞では対照の約50%にまで減少した。脂肪細胞に特有の反応の1つにインスリンによるグルコース取り込み活性の促進がある。事実、線維芽細胞ではインスリンによるグルコースの取り込みはほとんど起こらないが、脂肪細胞ではインスリンの濃度に依存して著しく上昇した。IAPを前処理した後に分化を誘導した細胞では対照の50%に減弱した。

これらの事実から3T3-L1線維芽細胞の脂肪細胞への分化の過程にIAP感受性G蛋白質が関与している可能性が示唆された。

未分化の線維芽細胞に分化誘導薬を添加するとc-fos mRNAの発現が起こったが、IAPはこの発現を濃度依存的に抑制した。この時、c-myc発現も分化誘導薬によってごくわずかに起こったが、IAP処理によって抑制されなかった。IAP感受性G蛋白質はfosの発現に関連しているのに対し、myc発現には関与していないことが分かった。

インスリンは多岐にわたる生理反応を引き起こすことが知られているが、その作用機序の1つにPhosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) の活性化がある。そこで、分化誘

導薬がPI-PLCを活性化し、その結果、Diacylglycerol (DG) および Phosphatidylinositol-glycan (PI-グリカン) 生成を介する経路が亢進されているかどうか検討した。インスリンによって産生されるDG量を測定したところ、刺激後、1分で細胞膜中のDGは約3倍に増加した。IAP前処理はインスリンによるDG産生をほぼ完全に抑制した。つぎに、PI-プロテオグリカンのイノシトール部から糖鎖部を認識する抗CRD抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。DGと同様にPI-プロテオグリカン産生もインスリン刺激後1分で認められた。さらにこの産生もIAPの前処理によって抑制された。これらのことより、インスリンの作用にはIAP感受性G蛋白質と関連したPI-PLCの活性化が一部関与していると推定した。

3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化をIAPが抑制したことから、細胞増殖や分化に関与していると考えられている Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase, MAPK; extracellular signal-regulated kinase, ERK) に対するIAPの効果を検討した。MAPキナーゼ活性はインスリン刺激後10分で最大となり、さらには刺激後4時間でも無刺激時に比べ約3倍の活性を維持した。一方、IAP処理した細胞ではMAPキナーゼの活性化は抑制された。このことより、インスリンによる分化の過程にIAP感受性3量体G蛋白質が関与し、チロシンキナーゼ系→MAPキナーゼ系に対し何らかのクロストークを行っていることが示唆された。インスリンの作用点の解析を進めるためにさらに上流蛋白質の活性を測定した。インスリン刺激後の細胞についてMAPKKを免疫沈降し、この免疫沈降物のkinase-negative MAPKに対するリン酸化反応からMAPKK活性を測定したところ、インスリンによって活性化が起これ、IAP処理した細胞ではリン酸化能が有意に抑制されていた。つぎに、低分子量G蛋白質であるRasの活性に対するIAPの影響を調べた。インスリンはRas-GTP型を有意に増加させた。しかし、IAP処理した細胞ではこのRas-GTP型は検出されなかった。このことより、IAPの作用点はRasのさらに上流にあると考えられる。つぎに、受容体の基質蛋白質へのチロシンリン酸化反応を調べた。IRS-1は代表的な基質の一つであり、一分子中に多数のリン酸化部位がある。インスリン刺激後、細胞質画分を調製し抗IRS-1抗体で免疫沈降反応を行い、さらに抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロット解析を行った。IRS-1はインスリン刺激でチロシン残基がリン酸化されたが、IAP処理はこのリン酸化に何ら影響を与えなかった。このことはIAPは受容体キナーゼには作用しないこと、さらにその作用部位はIRS-1の活性化(リン酸化)からRas蛋白質間に存在することを示唆している。

インスリンの生理活性、とくにグルコース取り込み活性にはPI 3-kinase (PI3-K)の活性化が必要であり、PI3-Kは活性化されたIRS-1に結合してはじめて活性型となる。そこで、PI3-Kの特異的阻害薬であるWortmanninを用いてインスリンによるRas活性化までの情報伝達系について調べた。まず、WortmanninはIRS-1のリン酸化に影響を与えないことが分かった。つぎに、 $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ を添加し膜脂質のPhosphatidylinositol trisphosphate (PIP₃)の放射活性を測定すると、インスリンによって増加し、Wortmannin処理はこの増加を特異的に抑制した。このことはWortmanninがPI3-Kを抑制したことを意味している。Wortmannin処理はインスリンによるRasおよびMAPKの活性化も抑制した。

したがって、3T3-L1細胞ではPI3-Kの下流にRas、MAPKが存在していることが推定された。

さらに、IAPはインスリン刺激に伴うPI3-Kの活性化を一部抑制した。すなわち、IAPはインスリンの情報伝達系においてPI3-K活性を低下させることでその下流のシグナルを減少させ、細胞分化への情報伝達の抑制につながっていること結論した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	野 村 靖 幸
副 査	教 授	長 澤 滋 治
副 査	助教授	徳 光 幸 子
副 査	助教授	高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

3T3-L1細胞の分化の過程における情報伝達系の解析

申請者は、3T3-L1細胞の分化の過程における情報伝達系の機構を研究してきたが、今回、その分化の過程にインスリンが重要な役割を担っていることを見だし、インスリンの分化に対する作用機構を解明し、本学位論文として申請した。

マウス由来3T3-L1線維芽細胞はインスリン/I BMX/デキサメサゾン（分化誘導薬）によって脂肪細胞へと分化する。分化した3T3-L1脂肪細胞は白色脂肪細胞のモデルとして、糖質および脂質代謝系の研究に汎用されている。しかし、脂肪細胞への分化を引き起こす情報伝達系および転写因子についてはいまだ不明な点が多い。

百日咳毒素（IAP）は3量体GTP結合蛋白質（G蛋白質）の α サブユニットをADP-リボシル化してその機能を消失させる。そこで、このIAPをプローブとして成長因子としてのインスリンによる細胞分化誘導に対する情報伝達機構を解析した。

グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GPDH）は脂肪合成系のkey enzyme であり、分化とともに活性化される。線維芽細胞ではGPDH活性はわずかしき発現していないが、分化した脂肪細胞では約70倍に増加した。IAPを前処理した後に分化を誘導した細胞では対照の約50%にまで減少した。線維芽細胞ではインスリンによるグルコースの取り込みはほとんど起こらないが、脂肪細胞に分化するとインスリンによるグルコース取り込みは著しく

増加した。IAPを前処理した後に分化を誘導した細胞では対照の50%に減弱した。

これらの事実から、3T3-L1線維芽細胞の脂肪細胞への分化の過程にIAP感受性G蛋白質が関与している可能性が示された。

未分化の線維芽細胞に分化誘導薬を添加すると *c-fos* mRNAの発現が起こったが、IAPはこの発現を濃度依存的に抑制した。この時、*c-myc* 発現も分化誘導薬によってごくわずかに起こったが、IAP処理によって抑制されなかった。IAP感受性G蛋白質は *c-fos* の発現に関連しているのに対し、*myc* 発現には関与していないことが分かった。

インスリンの作用機序の1つにPhosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) の活性化がある。そこで、分化誘導薬が PI-PLC を活性化し、その結果、Diacylglycerol(DG)およびPhosphatidylinositol-glycan (PI-グリカン) 生成が亢進されているかどうか検討した。インスリンによって産生されるDG量は刺激後1分で3倍に増加した。IAP前処理はインスリンによるDG産生をほぼ完全に抑制した。つぎに、PI-プロテオグリカンウェスタンブロットによって解析した。DGと同様にPI-プロテオグリカン産生もインスリン刺激後1分で認められ、IAP処理は抑制した。これらのことより、インスリンの作用にはIAP感受性G蛋白質と関連したPI-PLCの活性化が一部関与していると推定した。

3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化をIAPが抑制したことから、細胞増殖や分化に関与していると考えられている Mitogen-activated protein kinase (MAPK) に対するIAPの作用を検討した。MAPK活性はインスリン刺激後10分で最大となり、さらには刺激後4時間でも無刺激時に比べ約3倍の活性を維持した。一方、IAP処理した細胞ではMAPKの活性化は抑制された。このことより、インスリンによる分化の過程にIAP感受性G蛋白質が関与し、チロシンキナーゼ系→MAPK系に対し何らかのクロストークを行っていることが示唆された。さらに、インスリンによる上流蛋白質の活性変化を調べた。インスリン刺激後の細胞のMAPKK活性を測定したところ、インスリンによって活性化が起こり、IAP処理した細胞では有意に抑制された。つぎに、Rasの活性に対するIAPの影響を調べた。インスリンはRas-GTP型を有意に増加さ

せ、IAP処理した細胞ではRas-GTP型は検出されなかった。このことより、IAPの作用点はRasのさらに上流にあると推定した。つぎに、受容体の代表的な基質蛋白質（IRS-1）へのチロシンリン酸化反応を調べた。IRS-1はインスリン刺激でチロシン残基がリン酸化されたが、IAP処理はこのリン酸化に何ら影響を与えなかった。このことはIAPは受容体キナーゼには作用しないこと、さらにその作用部位はIRS-1の活性化（リン酸化）からRas蛋白質間に存在することを示唆している。

インスリンの作用発現の1つに、PI 3-kinase (PI3-K) の活性化の経路がある。PI3-Kは活性化されたIRS-1に結合して活性型となる。そこで、PI3-Kの特異的阻害薬であるWortmanninを用いてインスリンによるRas活性化までの情報伝達系を調べるために、 $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ を添加し膜脂質のPIP3の放射活性を測定すると、インスリンによって増加し、Wortmannin処理はこの増加を抑制した。このことはWortmanninがPI3-Kを抑制したことを意味している。Wortmannin処理はインスリンによるRasおよびMAPKの活性化も抑制した。一方、IAPもインスリンによるPI3-Kの活性化を1部抑制した。

したがって、3T3-L1細胞ではPI3-Kの下流にRas、MAPKが存在していることが推定された。さらに、Wortmannin および IAP はインスリンの情報伝達系において、PI3-K活性を低下させることでその下流のシグナルを減少させ、細胞分化への情報伝達の抑制につながっていると結論した。

以上、審査委員会は、本論文を細胞の分化の過程における情報伝達系を解明するとともに成長因子、とくにインスリンの作用発現の機構に新知見を得た内容であると判定し、博士（薬学）の学位受けるに十分値するものと認めた。