

氏名(本籍)	森野 勝太郎(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位授与の要件	博士第416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14年3月25日
学位論文題目	Insulin-Induced c-Jun N-Terminal Kinase Activation Is Negatively Regulated by Protein Kinase C $\delta$ (インスリンによるJNK活性化がPKC $\delta$ によって負の制御を受ける)
	審査委員 主査 教授 大久保 岩 男 副査 教授 松 浦 博 副査 教授 佐 伯 行 一

## 論文内容の要旨

### 【目的】

インスリンは糖・脂質代謝の調節に重要な役割を果たしている。その細胞内情報伝達経路としてPI3 kinase活性化を介することが報告されている。更に、インスリンは増殖シグナルであるMAP kinase経路も活性化する事が報告されている。最近、MAP kinase familyの一つであるc-JunN-terminal kinase (JNKと略す)が紫外線・浸透圧といったストレス刺激だけでなく、インスリンにより活性化される事が見出された。しかし、その活性化の程度は細胞・組織により様々であり、その調節機構についても不明である。そこで我々はインスリンによるJNK活性化の分子機構と細胞特異性について検討した。

### 【方法】

ヒト・インスリン受容体を過剰発現したrat-1線維芽細胞(HIRc)を用いて以下の項目を検討した。

1. JNK活性はGST-c-Junを基質としたsolid phase kinase assayとリン酸化特異抗体(pJNK)を用いたWestern blot法を用いて測定した。
2. インスリンによるJNK活性化の分子機構を検討するために、wortmanin (PI3-kinase阻害薬)、PD98059 (MEK阻害薬)、GF109203X (Protein kinase C (PKC) 阻害薬)、rottlerin (PKC $\delta$  阻害薬)、LY333531 (PKC $\beta$ 阻害薬)、TPA (PKC活性化剤)、をそれぞれ10分間前孵置した後に100nMインスリンで10分間刺激し、各薬剤の効果を検討した。
3. インスリンのJNK活性化に対するPKCの影響を検討するために、PKC各アイソザイムの遺伝子導入による過剰発現を行い、インスリンによるJNK活性化への影響を検討した。遺伝子導入法にはlipofectamine法とadenovirus vector法を用いた。
4. インスリンのJNK活性化調節の作用点を検討するために、JNKの上流に存在し、その活性化を行うSAPK/ERK kinase 1 (SEK1)のインスリンによる活性化をWestern blot法で検討した。
5. インスリンによるJNK活性化の細胞特異性をPKC $\delta$ 現量との関係で説明するために、L6筋細胞、3T3L1脂肪細胞、HepG2肝細胞におけるJNK活性とPKC $\delta$ の発現量をWestern blot法で検討した。

### 【結果】

#### インスリンによるJNK活性化機構について

1. インスリンによるJNK活性化は用量依存的であった。その時間経過は10分をピークとし以後源弱した。
2. PI3 kinaseの阻害薬であるwortmaninやMEKの阻害剤であるPD98059はインスリンによるJNK活性化に影響を与えなかった。

3. PKCの阻害薬であるGF10902XはインスリンによるJNK活性化を用量依存的に増強し、PKC活性化薬であるTPAは逆に抑制した。

4. TPAを長時間作用させると、PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ のアイソザイムがdown regulationし、インスリンによるJNK活性化を増強した。

上記の結果からPKCがインスリンによるJNK活性化を抑制的に制御していることが想定され、その候補アイソザイムとしてPKC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ の関与が示唆された。

#### インスリンによるJNK活性化に対するPKC $\delta$ の影響について

1. PKC $\delta$ に比較的特異的な阻害薬であるrottelerinを用いて検討したところ、インスリンによるJNK活性化は増強された。一方、PKC $\beta$ に比較的特異的な阻害薬であるLY333531は影響しなかった。

2. PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ の過剰発現を試み、インスリンによるJNK活性化に対する影響を検討した。インスリンによるJNK活性化は野生型PKC $\delta$ 過剰発現で抑制されたが、活性を消失させた変異型PKC $\delta$ の過剰発現やPKC $\beta$ の過剰発現では変化を認めなかった。PKC $\alpha$ については、内因性のPKC $\alpha$ が多く過剰発現できなかった。

3. PKC $\delta$ による抑制効果の作用点を検討するために、インスリン受容体、インスリン受容体基質(IRS)のチロシンリン酸化の程度をホスフォチロシン抗体を用いて検討したが、対照群と差がなかった。

4. JNKをリン酸化し活性化する酵素であるSEK1はPKC $\delta$ 過剰発現により抑制された。

5. L6筋細胞、3T3L1脂肪細胞、HepG2肝細胞におけるPKC $\delta$ の発現量とインスリンによるJNK活性化の程度を検討した。PKC $\delta$ の発現量はHepG2肝細胞>3T3L1脂肪細胞>L6筋細胞の順に多く、インスリンによるJNK活性化の程度はL6筋細胞>3T3L1脂肪細胞>HepG2肝細胞の順に強かった。

#### 【考 察】

インスリンは種々の細胞においてJNKを活性化したが、その程度には大きな差があり、PKC $\delta$ の発現量と負の相関を認めた。すなわちPKC $\delta$ 発現量の多い細胞ではJNKの活性化は軽微で、PKC $\delta$ 発現量の少ない細胞ではJNKの活性化が顕著であった。抑制の作用点は不明であるが、IRSより下流でSEK1より上流であると考えられる。

#### 【結 論】

インスリンによるJNK活性化には細胞特異性があり、PKC $\delta$ の発現量がインスリンによる活性化の抑制因子として作用していた。

## 論文審査の結果の要旨

ストレスで活性化されるc-Jun N-terminal kinase (JNK) がインスリンにより活性化されるか否かについては、議論はされているものの定説が存在しない。本研究は、インスリンによるJNK活性化の制御機構を検討したものであり、以下の結果を得ている。

[1]インスリンによるJNKの活性化はprotein kinase C (PKC) 阻害剤により増強され、PKC活性化剤で抑制されたことからPKCが抑制因子であることが判明した。

[2]過剰発現による実験から、PKCアイソザイムのうちのPKC $\delta$ が抑制因子であり、その作用点はJNKの上流分子であるSAPK/ERK kinase 1 (SEK1) 近傍であることが示唆された。

[3]インスリンの標的臓器である肝臓・脂肪・筋肉のモデル細胞において、インスリンによるJNK活性化とPKC $\delta$ の発現量との間に負の相関が認められ、これまで議論されてきたインスリンによるJNK活性化の臓器多様性の一端を説明しうることが明かとなった。

本研究はインスリンの細胞内情報伝達機構について新たな知見を与えるものであり、博士(医学)の学位論文に値する。申請者は平成14年2月14日の学位論文審査と試問を受け、合格と認められたものである。