
原 著

インスリン受容体と三量体型 GTP 結合タンパク質 Gq 共役受容体シグナル伝達系間のクロストークに関する研究

大西哲生

徳島大学分子酵素学研究センター・分子遺伝学部門（主任：蛭名洋介教授）

（平成9年11月25日受付）

インスリンは、チロシンキナーゼ活性を持つ特異的レセプター¹⁾を介し、糖取り込み促進をはじめとする、多様な生理作用を発揮する^{2,3)}。一方、三量体型 GTP 結合タンパク質 (G-protein) は、各種リガンドのレセプターと共役して下流にシグナルを伝達する。今回、G-protein の中でも Gq と共役するブラジキニン B2 受容体⁴⁾を安定発現する CHO (Chinese hamster ovary) 細胞を確立、インスリンおよび Gq 共役受容体シグナル伝達系の相互作用を検討した。ブラジキニン存在下で、インスリンによる Akt キナーゼと PI3-キナーゼの活性化、グリコーゲン合成の促進が抑制された。このことは Gq シグナル伝達系がインスリンシグナル伝達系に対し、抑制的に働く分子メカニズムの存在を示している。それに対して、グルコーストランスポーターのトランスロケーションにおいて、ブラジキニンはインスリンの効果に部分的相加性を示した。

インスリンは細胞増殖因子の一種であるが、糖取り込みの促進、グリコーゲン合成の促進、脂肪分解の抑制などの多様な生理活性を持つホルモンである。インスリンレセプター¹⁾の細胞内ドメインには、チロシンキナーゼ活性を担う領域があり、インスリン刺激によりその酵素活性が上昇する。IRS-1⁵⁾、IRS-2⁶⁾、IRS-3⁷⁾、Shc⁸⁾ などの一連のアダプタータンパク質がその基質となり、チロシンリン酸化されたこれらの基質がさらに下流に情報を伝達する役割を果たしている。これらのアダプタータンパク質のリン酸化は、Ras/MAP キナーゼカスケードや p85/p110 型 PI3-キナーゼの活性化を引き起こす^{2,3)}。インスリンに特徴的な、細胞内への急速なグルコース取り込み促進作用は、細胞内小胞上の主にグルコーストランスポーター 4 型 (GLUT 4) が細胞膜に移行 (トランスロケーション) することによると考えられ

ているが、この過程には PI3-キナーゼが必須の役割を果たす^{9,10)}一方、Ras/MAP キナーゼカスケードは関与しない¹¹⁾ことが明らかにされている。さらに最近、PI3-キナーゼの下流でプロテインキナーゼ Akt (PKB, Rac-PK) が活性化され^{12,13)}、その活性化が GLUT 4 トランスロケーションに重要である可能性が示唆された¹⁴⁾。

一方、Kishi ら¹⁵⁾は、三量体型 G-protein の一種である Gq 共役受容体刺激によってインスリンと同様、GLUT 4 トランスロケーションが引き起こされること、一方、そのシグナル伝達にはインスリンと異なり PI3-キナーゼの活性化は必要でないことを明らかにした。

しかしながら、インスリンと Gq 共役受容体のシグナル伝達経路において、上流からの情報が何らかの分子に収斂しているのか、それぞれの経路がどのような相互作用をしているのかということについては、ほとんど調べられていない。そこで、両シグナル伝達の関係を明らかにする目的で、Gq に共役する 2 型ブラジキニンレセプターを強制発現させた CHO 細胞 (CHO-BK 2R) を確立し、インスリンレセプター及び IRS-1 のチロシンリン酸化、PI3-キナーゼの活性化、Akt 活性化、GLUT 4 トランスロケーション、グリコーゲン合成等について検討を加えたので、その結果を報告する。

方 法**1. 細胞**

CHO-BK 2R 細胞は、GLUT 4 myc を安定発現する Chinese hamster ovary 細胞 (CHO-GLUT 4 myc)¹⁶⁾へ、ヒト 2 型ブラジキニンレセプター (BK 2R) cDNA をリポフェクション法により安定導入して作製した。BK 2R を発現する複数の細胞クローンを分離、解析し同様の傾向を示すことを確かめた。確立した細胞を CHO-BK 2R と名付けた。細胞は 10% FCS (fetal calf serum) を

加えたF12培地で維持した。

2. Akt キナーゼアッセイ

各種のリガンドで細胞を刺激後、1%Nonidet P-40を含むバッファーで破碎し、可溶性タンパク質を7%SDS-PAGEで分離し、抗Akt抗体とECL System (Amersham)を用いたウエスタンブロットを行った。抗Akt抗体は、ラットAkt2のC末端に対応するペプチド(SLELDQRTHFPQFSYSASIRE)をキャリアータンパク質KLH (keyhole lempet hemocyanin)に結合させたものでウサギを免疫することによって得た抗血清から、抗原ペプチドによるアフィニティー精製により分離した。

3. グリコーゲン合成アッセイ

0.2mM glucoseとトレーサー量の $[^3\text{H}]$ glucoseの存在下、各細胞を60分間種々のリガンドで刺激した。続いて、細胞内のグリコーゲンを20%KOH存在下、氷冷エタノールで沈殿させ、取り込まれた $[^3\text{H}]$ glucoseの量をシンチレーションカウンターにより測定した。

4. GLUT 4 myc トランスロケーションアッセイ

Kishiらがすでに報告している方法¹⁵⁾によった。24穴培養ディッシュ上の細胞を種々のリガンドで処理し、2%パラホルムアルデヒドで固定した後、抗c-mycウサギポリクローナル抗体に引き続き西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg抗体をそれぞれ加えて十分に洗浄した。結合抗体量を、ECL (Amersham)システムと化学発光測定装置(アトー)の組み合わせにより化学発光強度として測定し、細胞表面上のGLUT 4 mycの相対量とした。

5. PI 3-キナーゼアッセイ

各種のリガンドで細胞を処理した後、1%Nonidet P-40含有バッファーで細胞を破碎、遠心分離によりライセートを得た。ライセート(200 μg タンパク質相当量)に、抗リン酸化チロシン抗体PY-20もしくはp110 α のC末端20アミノ酸に対する抗ペプチド抗体と、Protein A-sepharose (Pharmacia)を使って免疫沈降を行い、0.2mg/ml phosphatidylinositol, 0.2mg/ml phosphatidylserine, 120 μM adenosine, 20mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM MgCl₂, 10 μM ATP, トレーサー量 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを含む反応バッファーを、十分に洗浄した免疫複合体に加え、30°Cで10分間反応させた。クロロフォルム/メタノール混合物で抽出したものを、薄層クロマトグラフィープレート上で展開しオートラジオグラフィ解析を行った。オートラジオグラム上の $[^{32}\text{P}]$ PI3-Pのスポット強度をPI3-キナーゼ活性とした。

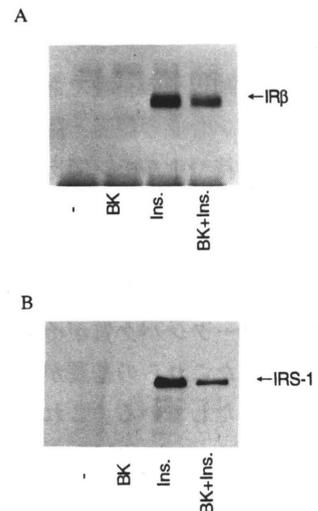
6. In vivo PI 3, 4, 5 P₃産生量の測定

細胞を25 μCi $[^{32}\text{P}]$ orthophosphoric acidで90分間ラベルした後、種々のリガンドで50秒刺激した。リン脂質をクロロフォルム/メタノール/1%過塩素酸(10:5:3.6)混合物で抽出し、methylamineにより脱アシル化したリン脂質を、陰イオン交換カラムSAX (Waters)を装着したHPLC (HITACHI)で展開し、各画分のシンチレーション測定を行った。in vitroで ^{32}P -標識したglyceroPI3, 4, 5-P₃を用い、あらかじめその保持時間を決定しておいた。0.04M-0.85M NH₄H₂PO₄, pH3.8, 82分間のグラジエント条件で分離した。

結 果

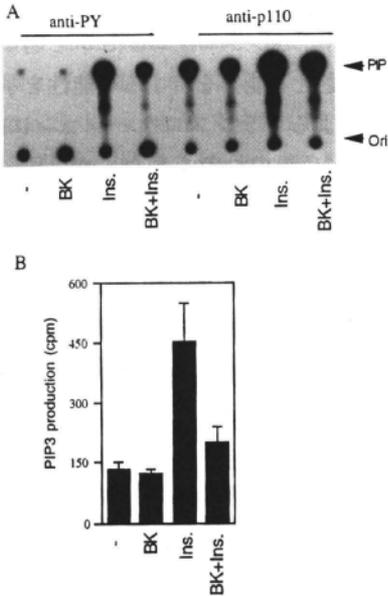
図1A, Bに示すように、インスリンはレセプター β サブユニット(IR β)内への自己リン酸化と、基質タンパク質の一つであるIRS-1 (insulin receptor substrate-1)のチロシンリン酸化を促進する。これらのリン酸化亢進はブラジキニン(BK)によっては起こらない。興味あることに、インスリン、BKの同時刺激においてはインスリン単独刺激に比べて、IR β , IRS-1のチロシンリン酸化がともに60%程度抑制されることがわかった。p110 α /p85型PI3-キナーゼはチロシンリン酸化されたIRS-1により活性化され、その酵素産物の一つPIP₃

図1 ブラジキニン、インスリン、ブラジキニンとインスリンの混合物刺激によるインスリン受容体 β サブユニット(IR β)、IRS-1チロシンリン酸化に及ぼす影響。



---細胞をバッファーのみ(-), $1 \times 10^{-7}\text{M}$ ブラジキニン(BK), $3 \times 10^{-7}\text{M}$ インスリン(Ins.), ブラジキニンとインスリンの混合物(それぞれ $1 \times 10^{-7}\text{M}$, $3 \times 10^{-7}\text{M}$)で5分間処理した。抗インスリンレセプター抗体(A), 抗IRS-1抗体(B)による免疫沈降物を、抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットで解析した。A, B共に複数の実験のうち典型的な結果を示した。

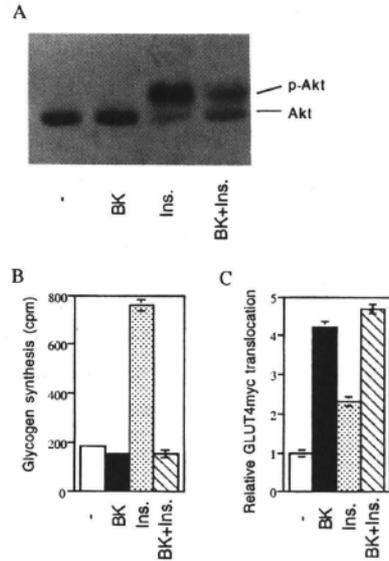
図2 プラジキニン, インスリン, プラジキニンとインスリンの混合物刺激による PI3-キナーゼ活性化とその酵素産物の蓄積に及ぼす影響。



---図1と同様に5分間細胞を処理した後、抗ホスホチロシン抗体または抗 PI3-キナーゼ p110 α サブユニット抗体で免疫沈降、その免疫沈降物中の PI3-キナーゼ活性を測定した (A)。矢印の先は薄層クロマトグラフィーにおける展開開始点 (Ori), phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP) の位置をそれぞれ示す。³²P 正リン酸で細胞を標識した後、図1と同様に50秒間処理した。抽出したリン脂質を SAX HPLC カラムで展開、PIP₃に取り込まれた³²Pの量を測定した (B)。A では複数の実験のうち典型的な結果を示し、B では3回の独立な実験の平均±標準誤差を示した。

(phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate) が細胞内に蓄積することが知られている。そこで各刺激による PI3-キナーゼの活性と、PIP₃の量についても検討を加えた。その結果、抗 p110-C 末端抗体と抗ホスホチロシン抗体による免疫沈降物中の PI3-キナーゼ活性化については、BK の単独での効果は見られないが、インスリンによる PI3-キナーゼの活性化を BK は部分的に抑制し (図2A)、インスリンによる PIP₃の蓄積も BK により抑制された (図2B)。Akt (PKB, Rac-PK とも呼ばれる)^{12,13}は PI3-キナーゼの下流因子の一つとして同定されたタンパク質セリン・スレオニンキナーゼの一種であり、活性化に伴いその分子内にリン酸化が引き起こされること、その結果として SDS-PAGE 上での移動度の減少が観察されることが報告されている。図3A に示すように、CHO-BK 2R 細胞においてもインスリンは、リン酸化型 Akt (p-Akt) を増大させ Akt の活性化を起こすことがわかる。しかしながら、BK 単独ではその効果が見られない一方、インスリンと共存させた場合

図3 プラジキニン, インスリン, プラジキニンとインスリンの混合物刺激による Akt キナーゼ活性, グリコーゲン合成, GLUT 4 トランスロケーションに対する影響。



---A には Akt の活性を抗 Akt-C 末端抗体によるウエスタンブロットにより解析した結果を示した。Akt は非リン酸化型、p-Akt はリン酸化型 Akt の位置を示す。B では図1と同様に D- [³H] glucose 存在下、細胞を60分間インキュベートしてグリコーゲン合成に対する効果を示した。C は図1と同様に細胞を10分間処理して GLUT 4 トランスロケーションに対する効果を示した。A は複数の実験のうち典型的な結果を示した。B, C は少なくとも3回の独立な実験での平均±標準誤差を示した。A は複数の実験のうち典型的な結果を示した。

インスリンによる Akt のリン酸化型の生成量が抑制され、その分だけ非リン酸化型 (Akt) が増加する。このことは、Akt キナーゼ活性においても、BK はインスリンの効果に対して抑制的に働くことを示している。

インスリンの重要な生理作用の一つにグリコーゲン合成促進がある。図3Bに示すように、CHO-BK 2R 細胞においてもインスリンにより4倍程度の合成促進が見られるが、BK にはその効果は見れない。IR β /IRS-1, PI3-キナーゼ, Akt の場合に見られるように、BK 存在下においてはインスリンによるグリコーゲン合成促進は抑制される。

インスリン刺激により、標的細胞内の細胞内膜画分に存在する4型グルコーストランスポーター (GLUT 4) は、細胞表面へ移行 (トランスロケーション) するが、このことがインスリンによる細胞内への急速なグルコース取り込み促進に中心的な役割を果たす。図3Cに示すように、CHO-BK 2R 細胞においてもインスリンはトランスロケーションを引き起こす。特徴的なのは、今回調べたかぎりの指標に影響を及ぼさなかった BK 単独処理によってもトランスロケーションが引き起こされること

である。さらに、インスリンの効果に対してBKは抑制作用を示さず、部分的ではあるが相加的な効果が見られた。

考 察

今回、Gqシグナル伝達系の作動により、インスリンレセプターキナーゼの部分的な活性抑制と、それに伴うIRS-1のリン酸化減少が引き起こされることを示した。このことは、インスリンによるPI3-キナーゼの活性化とその酵素産物の細胞内蓄積をBKが抑制することの一次的な原因と考えられ、さらにBKによるAktの活性化抑制も同様に説明できる。インスリンによるグリコーゲン合成促進の分子メカニズムについては、長年多くの研究がなされてきたが、グリコーゲン合成酵素の活性を直接制御する酵素であるGSK-3 (glycogen synthase kinase-3)がAktの基質となり、インスリン刺激によりGSK-3の酵素活性が抑制され、結果としてグリコーゲン合成が促進される¹⁷⁾ことが明らかにされている。BKがインスリンによるAkt活性化を抑制することは、BKの持つグリコーゲン合成の抑制作用を少なくとも部分的には説明できる。

Gq共役受容体がどのようにしてインスリン受容体の活性を抑制するののかについては、興味ある問題である。Gqのエフェクターの一つとしてphospholipase C β (PLC β)が同定されている¹⁸⁾が、PLC β の活性化はPIの代謝回転を亢進させ、その結果プロテインキナーゼC (PKC)の活性化がおこる¹⁹⁾。さらに、インスリンによるインスリン受容体脱感作にはPKCによる受容体のリン酸化が関与することが指摘されている²⁰⁾。したがって、BKによるインスリン受容体活性化抑制作用もPKCの活性化に依存している可能性がある。しかしながら、ホルボールエステルPDBu (phorbol 12, 13-dibutylate)による長時間処理で細胞内からPKCを消失(ダウンレギュレーション)²¹⁾させても、BKの効果は抑制されない(データは示していない)ことから、その可能性は低いと考えられる。その他の可能性として何らかの分子メカニズムによる細胞膜表面のインスリン受容体分子自体の減少や、インスリン受容体を脱チロシンリン酸化する酵素の活性化、リン酸化を含むレセプター自身の分子内修飾などがあげられるが、これからは検討課題である。

CHO-BK2RをBK刺激することによりトランスロケーションが観察されたが、すでにKishiらは、CHO細胞に加え3T3-L1脂肪細胞においても、Gqと共役

する α 1-アドレナリン受容体のアゴニスト刺激がGLUT4トランスロケーションをひき起こすことを報告している¹⁵⁾。これらのことは、Gq共役受容体は、その種類に依存せずトランスロケーションを起こすシグナル伝達系を作動させる能力を有する可能性を示している。インスリンによるトランスロケーションにおいてはPI3-キナーゼが必須の役割を果たすが、BKによるトランスロケーションはPI3-キナーゼ阻害剤wortmanninに対して非感受性である(データは示していない)。このことにより、BK刺激ではPI3-キナーゼ活性化もその酵素産物の蓄積も起こらないことと併せて、BKによるトランスロケーションにはPI3-キナーゼが関与しないことが示唆される。最近、G-proteinのエフェクターの一つとしてp110 γ 型PI3-キナーゼ²²⁾が同定されているが、CHO細胞においてその活性は検出されないし、BK刺激によってもその酵素産物の蓄積が起こらない。さらに、インスリン刺激時にBKを共存させると、トランスロケーションに対して部分的ではあるが相加的に働くことが示された。このこともインスリンによるGLUT4のトランスロケーションと、BKによるGLUT4のトランスロケーションが別々の経路を介していることを示唆している。

最後に、Gqシグナル伝達系がインスリンシグナル伝達系に対して抑制的に働く分子機構が存在することは、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)に見いだされる末梢組織でのインスリン抵抗性²³⁾の発症機構に、何らかのG-proteinと共役するレセプターと、そのリガンドが関与している可能性を示唆するものかも知れない。

謝 辞

金沢大学医学部東田陽博教授には、ヒトブラジキニンレセプターcDNAを快く御供与頂きました。また、今研究は王立宏助手および大学院生の萩彰文と黄陸平の両氏の多大なご協力なしには成立しませんでした。その他の分子遺伝学部門の方々にも大変お世話になりました。最後になりましたが、御指導頂いた蛸名洋介教授、林日出喜助教授の両氏に特に感謝申し上げます。

文 献

1. Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., et al.: The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 40: 747-758, 1985

2. Myers, M.G.Jr., Sun, X.J. and White, M.F. : The IRS-1 signaling system. *Trends. Biochem. Sci.*, 19 : 289-293, 1994
3. White, M.F. and Kahn, C.R. : The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.*, 269 : 1-4, 1994
4. Yokoyama, S., Kimura, Y., Taketo, M., Black, J.A., et al. : B2 bradykinin receptors in NG108-15 cells : cDNA cloning and functional expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200 : 634-641, 1994
5. Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., et al. : Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352 : 73-7, 1991
6. Patti, M.E., Sun, X.J., Bruening, J.C., Araki, E., et al. : 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 270 : 24670-24673, 1995
7. Lavan, B.E., Lane, W.S. and Lienhard, G.E. : The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.*, 272 : 11439-11443, 1997
8. Yamauchi, K., and Pessin, J.E.I. : Insulin receptor substrate-1 (IRS1) and Shc compete for a limited pool of Grb2 in mediating insulin downstream signaling. *J. Biol. Chem.*, 269 : 31107-31114, 1994
9. Kanai, F., Ito, K., Todaka, M., Hayashi, H., Kamohara, S., et al. : Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195 : 762-768, 1993
10. Kamohara, S., Hayashi, H., Todaka, M., Kanai, F., et al. : Platelet-derived growth factor triggers translocation of the insulin-regulatable glucose transporter (type 4) predominantly through phosphatidylinositol 3-kinase binding sites on the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 1077-81, 1995
11. Todaka, M., Hayashi, H., Imanaka, T., Mitani, Y., et al. : Roles of insulin, guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate and phorbol 12-myristate 13-acetate in signalling pathways of GLUT4 translocation. *Biochem. J.*, 315 : 875-882, 1996
12. Franke, T.F., Yang, S.J., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., et al. : The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 81 : 727-36, 1995
13. Burgering, B.M., and Coffey, P.J. : Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376 : 599-602, 1995
14. Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R. A. : Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 271 : 31372-31378, 1996
15. Kishi, K., Hayashi, H., Wang, L., Kamohara, S., et al. : Gq-coupled receptors transmit the signal for GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *J. Biol. Chem.*, 271 : 26561-26568, 1996
16. Kanai, F., Nishioka, Y., Hayashi, H., Kamohara, S., et al. : Direct demonstration of insulin-induced GLUT4 translocation to the surface of intact cells by insertion of a c-myc epitope into an exofacial GLUT4 domain. *J. Biol. Chem.*, 268 : 14523-14526, 1993
17. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. : Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378 : 785-789, 1995
18. Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O., and Sternweis, P.C. : Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*, 251 : 804-807, 1991
19. Nishizuka, Y. : Studies and perspectives of protein kinase C. : *Science*, 233 : 305-312, 1986
20. Haring, H.U., Kirsch, D., Obermaier, B., Ermel, B., et al. : Tumor-promoting phorbol esters increase the Km of the ATP-binding site of the insulin receptor kinase from rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 261 : 15767-15771, 1986
21. Rodriguez-Pena, A., and Rozengurt, E. : Disappearance of Ca²⁺-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3

- T 3 cells. : Biochem. Biophys. Res. Commun.,
120 : 1053-1059, 1984
22. Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., et al. :
Cloning and characterization of a G protein-
activated human phosphoinositide-3 kinase.
Science, 269 : 690-693
23. Beck-Nielsen, H., Henriksen, J.E., Vaag, A., Hother-
Nielsen, O., et al. : Pathophysiology of non-
insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM).
Diabetes Res. Clin. Pract. Suppl : S13-25, 1995

Studies on the crosstalk between insulin-and G-protein-coupled receptor-mediated signal transduction pathways

Tetsuo Ohnishi

Division of Molecular Genetics, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima

(Director : Prof. Yousuke Ebina)

SUMMARY

Insulin exerts diverse physiological effects, which are mediated by its specific receptor with intrinsic protein tyrosine kinase activity. On the other hand, heterotrimeric G-proteins, consisting of α , β and γ subunits, are coupled to specific receptors for many ligands, and transmit the signal to the downstream effectors. Kishi et al. have already reported that stimulation of Gq-coupled receptors can induce GLUT 4 (glucose transporter type 4) translocation to the cell surface in an insulin-independent manner in CHO cells and 3T3-L1 adipocytes. In this study, we have established CHO (Chinese hamster ovary) cells stably expressing Gq-coupled bradykinin receptors, in order to examine crosstalks between insulin- and G-protein-coupled receptor-mediated signal transduction pathways.

Insulin enhanced insulin receptor kinase activity, IRS-1 (insulin receptor substrate-1) tyrosine phosphorylation, PI 3-kinase and Akt kinase activities, and glycogen synthesis, and induced GLUT 4 translocation in this cell line. Bradykinin treatment inhibited the insulin-stimulated receptor kinase activity, IRS-1 phosphorylation, PI 3-kinase and Akt kinase activities, and glycogen synthesis, while bradykinin itself had no effects on the insulin receptor kinase, IRS-1, PI 3-kinase, Akt kinase, and glycogen synthesis. These results showed that Gq signaling interferes insulin receptor signaling at least in the early step (s) including insulin receptor kinase activation. The Gq-mediated inhibition of insulin signal may explain some insulin resistant states appeared in non-insulin-dependent diabetes mellitus.

Key words : insulin receptor, G-protein, crosstalk, glucose transporter, glycogen synthesis