

博士論文

論文題目 LUBAC(linear ubiquitin chain assembly
complex)のインスリンシグナル伝達系における
役割の検討

氏 名 山本屋 武

LUBAC(linear ubiquitin chain assembly complex)の
インスリンシグナル伝達系における役割の検討

目次

	頁
目次	1
要旨	2
略語一覧	3
序文	5
方法	14
結果	19
考察	27
引用文献	33
謝辞	40

要旨

LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) は SHARPIN, HOIL-1L, HOIP より構成される約 600 kDa の複合体であり、NEMO を直鎖状ポリユビキチン化することで NF- κ B 活性を促進する。マウス肝でアデノウイルスベクターにて HOIL-1L を過剰発現させると、有意に耐糖能が改善した。また、培養細胞において HOIL-1L をアデノウイルスベクターにて過剰発現させると、Akt Thr308 および Ser473 リン酸化が亢進することを見出した。インスリン受容体や IRS-1 のチロシンリン酸化には差を認めず、PI3K 阻害剤の添加によりインスリンシグナル増強が消失することから、PI3K レベルでのインスリンシグナル増強であることが示唆された。HOIL-1L 単独での過剰発現では LUBAC 活性に変化を認めなかったことから、LUBAC を介さない HOIL-1L 分子単体による機序と推察された。

略語一覽

AS160	Akt substrate of 160 kDa
AUC	area under the curve
BAFF	B-cell activating factor
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma extra-large
BSA	bovine serum albumin
CD40L	CD40 ligand
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dsRNA	double-stranded RNA
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycotetraacetic acid
ER α	estrogen receptor α
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FoxO1	forkhead box containing protein O-1
GFP	green fluorescent protein
GK	glucokinase
GKRP	glucokinase regulatory protein
GLUT2	glucose transporter 2
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 β
HOIL-1	heme-oxidized IRP2 ligase-1
HOIP	HOIL-1L-interacting protein
HRP	horseradish peroxidase
I κ B	inhibitor of κ B
IKK	I κ B kinase
IL-1	interleukin-1
IL-1R	interleukin-1 receptor
IPGTT	intraperitoneal glucose tolerance test
IR	insulin receptor
IRS	insulin receptor substrate
ITT	insulin tolerance test
LPS	lipopolysaccharide
LT- β	lymphotoxin- β

LUBAC	linear ubiquitin chain assembly complex
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
NEMO	NF- κ B-essential modulator
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NIK	NF- κ B-inducing kinase
PBS	phosphate buffered saline
PDK1	3-phosphoinositide dependent kinase 1
PH domain	plekstrin homology domain
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PIP ₃	phosphatidylinositol 3,4,5-tri-phosphate
PKC	protein kinase C
PMSF	phenylmethane sulfonyl fluoride
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	polyvinylidene fluoride
RBCK1	RBCC protein interacting with protein kinase C1
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH2 domain	src homology-2 domain
SHARPIN	SHANK-associated RH domain interactor
SIPL1	SHANK-interacting protein-like 1
SOCS-6	suppressor of cytokine signaling-6
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TNFR	TNF receptor
TLR4	toll-like receptor 4
UBA domain	ubiquitin-associated domain
UBL domain	ubiquitin-like domain

序文

糖尿病はインスリン分泌低下とインスリン抵抗性が症例毎に様々な割合で寄与し合い、慢性的な高血糖を来す疾患である。他の多くの疾患と同様、その発症には遺伝因子と環境因子の両者が関与している [1] が、日本人を始めとする東アジア人は欧米人に比して遺伝的にインスリン分泌能が低く、肥満や脂肪肝などの内臓脂肪蓄積によって惹起されることが多い、インスリン抵抗性の寄与が軽度でもしばしば 2 型糖尿病を発症することが知られている [2]。近年の食生活の欧米化に伴う脂質摂取の増加や自家用車の普及などによる運動量の低下に伴い、日本における 2 型糖尿病の患者数は増加の一途であったが、最近、厚生労働省施行の平成 24 年国民健康・栄養調査において、糖尿病有病者と予備群の合計が初めて減少に転じたことが報告された [3]。しかし、依然として糖尿病が強く疑われる人 (HbA1c 6.5 %以上または糖尿病治療中の人) が約 950 万人、糖尿病の可能性を否定できない人 (HbA1c 6.0 %以上 6.5 %未満の人) が約 1,100 万人 [3] と、合わせると日本人の約 6 人に 1 人が耐糖能異常を有しているのが現状である。

インスリンは生体における唯一の血糖降下ホルモンであり、骨格筋や脂肪細胞における糖取り込みを促進する他、肝臓ではグリコーゲン分解・糖新生を抑

制し、グリコーゲン合成や脂肪酸合成を促進する作用を有する。インスリン受容体 (insulin receptor : IR) はチロシンキナーゼ型受容体であり、インスリンが結合するとチロシンキナーゼ活性が亢進し、受容体自身をチロシンリン酸化するとともに、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate : IRS) をチロシンリン酸化する。チロシンリン酸化された IRS に src homology-2 (SH2) domain を有する phosphoinositide 3 kinase (PI3K) p85 サブユニットが結合すると、p110 サブユニットのキナーゼ活性が上昇し、細胞膜近傍にて phosphatidylinositol 3,4,5-tri-phosphate (PIP₃) が産生される。これにより plekstrin homology (PH) domain を有する 3-phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1) と Akt が細胞膜近傍に引き寄せられ、PDK1 によって Akt Thr308 がリン酸化される。それに加えて mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) により Akt Ser473 がリン酸化されることで、Akt が活性化し、glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), Akt substrate of 160 kDa (AS160), forkhead box containing protein O-1 (FoxO1) など下流の分子に作用し多岐にわたるインスリンの代謝作用が発揮されることとなる [4,5] (**Figure 1**)。

近年、糖尿病・耐糖能異常の病因であるインスリン分泌低下およびインスリン抵抗性の双方に炎症が関与していることが明らかとなってきた [6,7]。

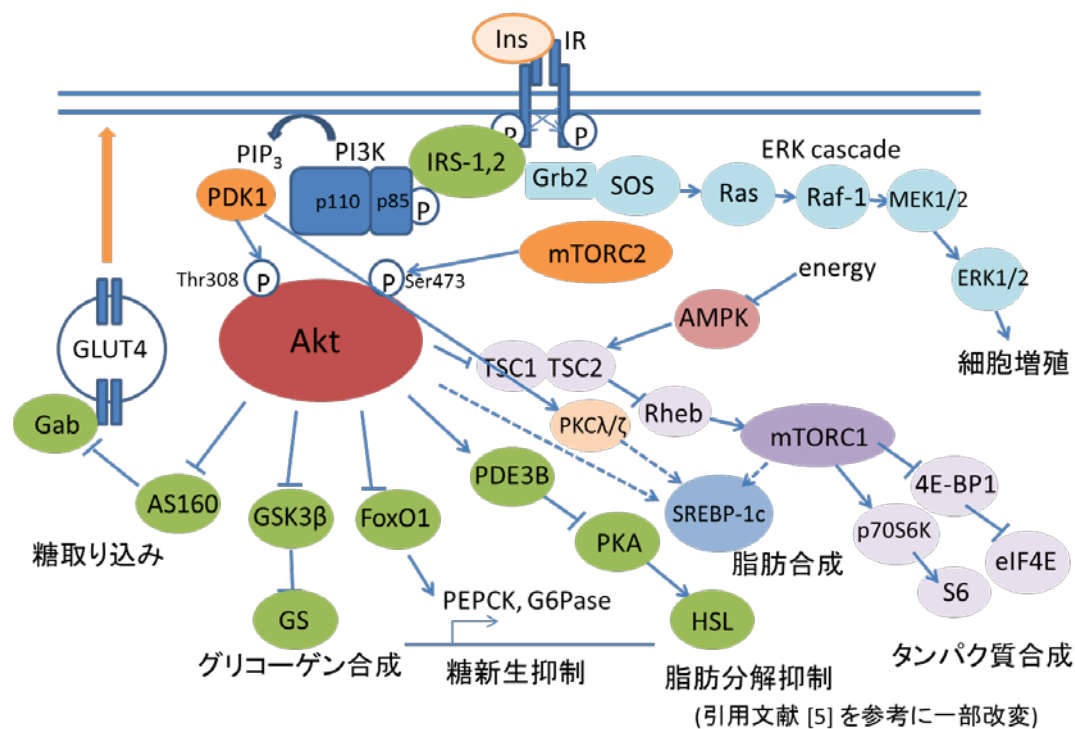


Figure 1. インスリンシグナル伝達系の概略図

インスリンが受容体に結合すると、IR のチロシンキナーゼ活性が亢進し、受容体自身をチロシンリン酸化するとともに、IRS をチロシンリン酸化する。そこから下流は extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade を活性化し細胞増殖を促す経路と糖代謝に関わる経路の大きく 2 つに分かれる。糖代謝に関わる経路については、チロシンリン酸化された IRS に SH2 domain を介して PI3K p85 subunit が結合することで PI3K が活性化し、細胞膜近傍で PIP₃ が産生される。これにより PH domain を有する PDK1, Akt が細胞膜近傍に引き寄せられ、PDK1 により Akt Thr308 がリン酸化される。さらに mTORC2 によって Akt Ser473 がリン酸化されることで Akt が活性化し、Akt が様々な下流の分子に作用することで多岐にわたるインスリンの代謝作用が発揮されることとなる。

肥満はインスリン抵抗性を引き起こし、耐糖能を悪化させることが知られているが、1993 年に脂肪組織において tumor necrosis factor- α (TNF- α) が多く発現していることが報告されて以来 [8]、肥満状態では主に脂肪組織において慢性的な炎症が起こっており、全身的なインスリン抵抗性の原因となることが

明らかとなってきた。肝臓への異所性脂肪の蓄積によって生じる脂肪肝は肝臓におけるインスリン抵抗性の原因となるが、ここでも慢性炎症がインスリン抵抗性の形成に関与していることが分かっている [9]。脂肪肝において慢性炎症がインスリン抵抗性を惹起する細胞内メカニズムとしていくつかの経路が想定されているが、最も主要な経路の1つとされるのが nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路とインスリンシグナル伝達系との相互作用によるものである。脂肪肝においては血中の TNF- α や遊離脂肪酸などの上昇が認められ [9]、これらが TNF receptor (TNFR) や toll-like receptor 4 (TLR4) [10] に作用し、転写因子である NF- κ B が活性化する。この経路で活性化される I κ B kinase β (IKK β) が IRS-1 Ser307 をリン酸化することで、インスリン受容体と IRS-1 との親和性を低下させ、インスリン抵抗性を惹起することが知られている [11]。肝臓特異的 IKK β ノックアウトマウスでは高脂肪食を負荷しても肝臓でのインスリン感受性が保たれ [12]、逆に肝臓特異的に活性型 IKK β を過剰発現したマウスでは肝臓でのインスリン抵抗性が惹起される [13] ことが報告されており、NF- κ B 経路は肝臓においても慢性炎症とインスリン抵抗性を結び付ける重要な因子と考えられている。

NF- κ B は 1986 年に免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写因子として同定された [14]。当初は κ 軽鎖発現 B 細胞特異的に発現

していると考えられたが、その後ほとんどの細胞にユビキタスに発現していることが明らかとなっている。NF- κ B により転写制御される遺伝子は非常に多種にわたっており、NF- κ B 活性化により TNF- α , interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカインや、B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma extra-large (Bcl-X_L) などのアポトーシス抑制に関わる遺伝子を始め、数多くの遺伝子発現が誘導されることが分かっている [15]。

NF- κ B 活性化の細胞内メカニズムとしては、定型的経路 (canonical pathway) と非定型的経路 (non-canonical pathway) の主に 2 種類が知られている [16] (**Figure 2**)。定型的経路は TNF- α や IL-1 β の他、lipopolysaccharide (LPS), 遊離脂肪酸、ウイルス由来の double-stranded RNA (dsRNA) などにより TLRs を介して活性化される経路である。TNFR からの経路と interleukin-1 receptor (IL-1R) や TLRs からの経路では上流のシグナルが若干異なるが、最終的には IKK α , IKK β , NF- κ B essential modulator (NEMO, IKK γ) からなる IKK 複合体 (I κ B kinase complex) が活性化され、inhibitor of κ B (I κ B) をリン酸化する。I κ B は p50, p65 の二量体からなる NF- κ B と結合し不活性型として細胞質に留めておく役割を担っているが、リン酸化されることでユビキチン化を受けプロテアソームで分解されるため [17]、遊離した NF- κ B が核内に移行し種々の遺伝子発現を誘導することとなる。一方の非定型的経路は

lymphotoxin- β (LT- β) や B-cell activating factor (BAFF) などによって活性化される経路であり、NF- κ B-inducing kinase (NIK) 活性化を介し、IKK α 複合体が活性化することで、リン酸化された p100 がユビキチン化を介し p52 へとプロセッシングされ、p52, RelB の二量体からなる NF- κ B が核内移行し転写活性を發揮する [16]。

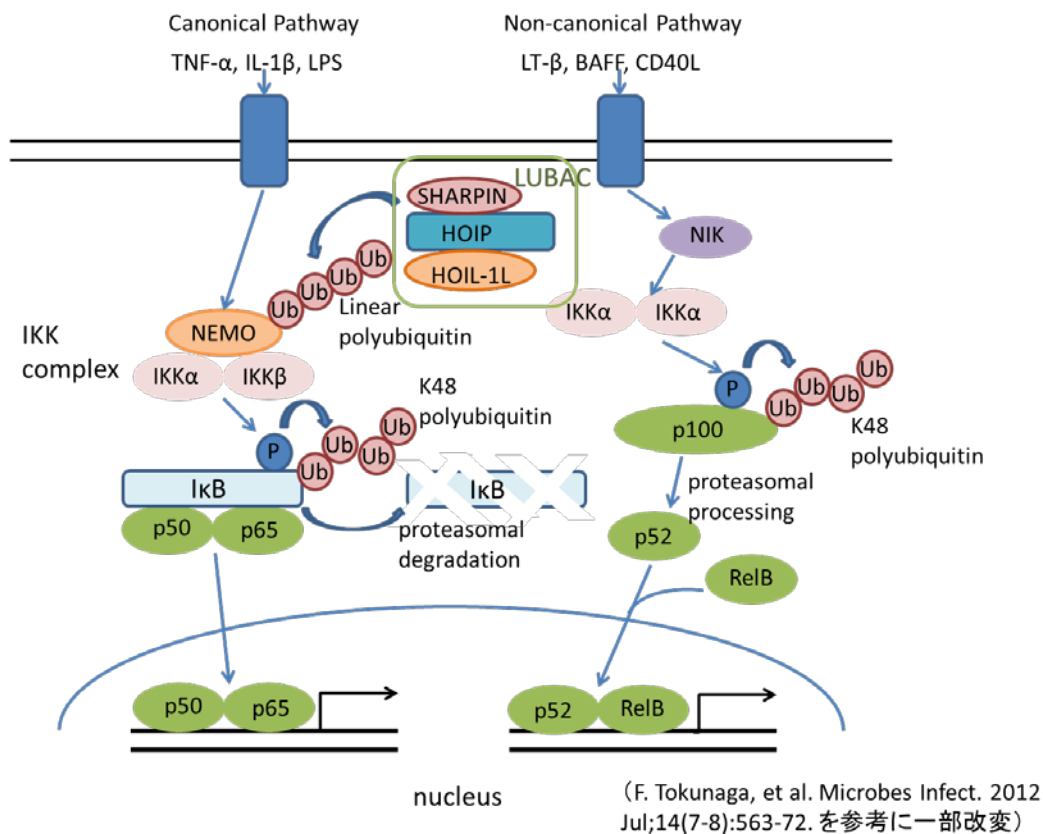


Figure 2. NF- κ B 活性化のメカニズム

定型的経路 (canonical pathway) は TNF- α , IL-1 β , TLR ligands により活性化し、IKK 複合体活性化により I κ B がリン酸化され、ユビキチン化・プロテアソーム分解されることで NF- κ B が核内移行し転写活性を發揮する。一方、非定型的経路 (non-canonical pathway) は LT- β , BAFF などにより活性化し、NIK 活性化、IKK α 複合体活性化を介し、リン酸化・ユビキチン化された p100 が部分分解されることで活性化する。

定型的経路による NF- κ B 活性化に関わる因子として近年同定されたのが linear polyubiquitin chain assembly complex (LUBAC) である [18,19]。LUBAC はユビキチン分子の N 末端のメチオニン残基が別のユビキチン分子の C 末端とペプチド結合した直鎖状ポリユビキチン (linear polyubiquitin) を形成する E3 ligase である [18]。LUBAC は約 600 kDa の複合体であり、当初は heme-oxidized IRP2 ligase-1 (HOIL-1L) と HOIL-1L interacting protein (HOIP) から構成されると考えられていた [18] が、2011 年に新たな構成因子として SHANK-associated RH domain interacting protein (SHARPIN) が同定された [20-22] (**Figure 3**)。LUBAC の活性中心は HOIP の RING-IBR-RING domain であり、SHARPIN や HOIL-1L は ubiquitin-like domain (UBL domain) を介して HOIP の ubiquitin-associated domain (UBA domain) に結合し、LUBAC の安定化に寄与していると考えられている [20]。現在のところ、LUBAC は HOIL-1L-HOIP または SHARPIN-HOIP という複合体が複数集まって形成されていると考えられている [20]。

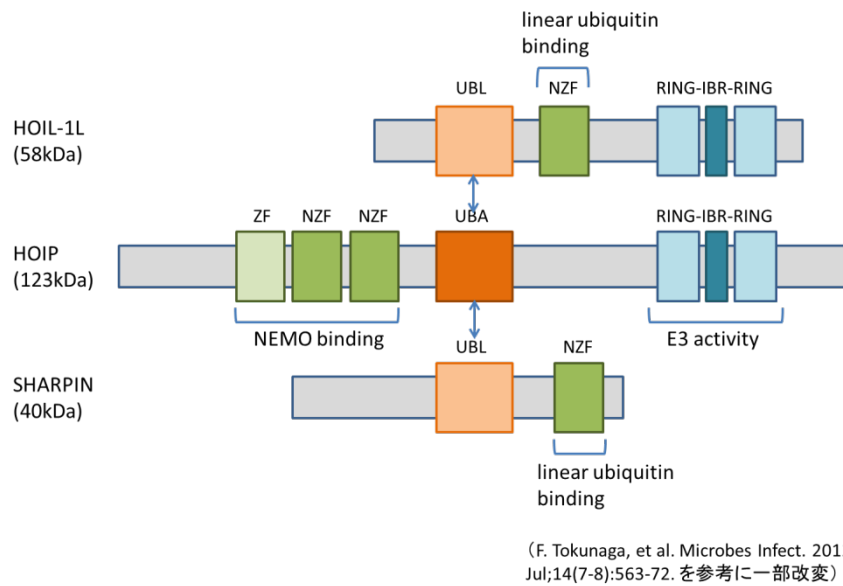


Figure 3. LUBAC 構成因子の構造模式図

LUBAC は直鎖状ユビキチン化を形成する約 600 kDa の複合体であり、現在 SHARPIN, HOIL-1L, HOIP の 3 分子から構成されると考えられている。LUBAC としての活性中心は HOIP の RING-IBR-RING domain であり、SHARPIN や HOIL-1L は LUBAC の安定化に寄与していると考えられている。

LUBAC は IKK 複合体の調節サブユニットである NEMO の Lys285 と Lys309 に直鎖状ポリユビキチンを付加し、IKK を活性化することで定型的経路を介した NF- κ B 活性化を促進する [19] (Figure 2)。LUBAC による NF- κ B 活性化には活性中心である HOIP と少なくとも SHARPIN または HOIL-1L のいずれかが必要であり、一方で SHARPIN, HOIL, HOIP のいずれをノックダウンしても定常時および TNF- α 刺激時の NF- κ B 活性化の低下が認められることが報告されている [19,20,23]。

前述の通り、慢性炎症によるインスリン抵抗性の惹起には NF- κ B 経路のイ

インスリンシグナル伝達系への作用が重要な役割を担っており、NF- κ B 活性化に働く LUBAC およびその構成因子である SHARPIN, HOIL-1L, HOIP もインスリンシグナル伝達系に作用している可能性が考えられる。しかし、これまでに SHARPIN (別名 SHANK-interacting protein-like 1 (SIPL1)) が phosphatase and tensin homolog (PTEN) 阻害作用を介して PI3K/Akt 経路を活性化させるとの報告がなされている [24] もの、それ以外の知見は得られていない。そこで、LUBAC 構成因子のうち特に SHARPIN と比較的相同性の高い HOIL-1L に着目し、インスリンシグナル伝達系との関連につき、研究を遂行することとした。

方法

(1) 抗体、試薬

抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体、抗 Akt 抗体はウサギを、抗リン酸化チロシン (pY) 抗体はマウスを免疫して当研究室にて作成した抗体を使用した。抗 SHARPIN 抗体、抗 HOIL-1L 抗体、抗 HOIP 抗体は広島大学医歯薬総合研究科医化学研究室浅野知一郎教授より供与頂いた。抗 p85 抗体 (#06-195) は Upstate 社より、抗 Akt Thr308 リン酸化抗体 (#4056L)、Ser473 リン酸化抗体 (#4060S)、抗 $I\kappa B\alpha$ 抗体 (#4814)、抗 $I\kappa B\alpha$ Ser32 リン酸化抗体 (#2859) は Cell Signaling 社より購入した。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (NA9340V)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (NA931V) は GE healthcare 社より購入した。

インスリンはヒトインスリンであるヒューマリン R バイアル (イーライリリー社) を使用した。TNF- α は R&D systems 社より購入した recombinant mouse TNF-alpha, truncated form (410-TRNC) を使用した。Wortmannin は和光化学純薬より、LY294002 は SIGMA 社より購入したものを使用した。

(2) アデノウイルスベクターの作成

human myc-HOIL-1L cDNA は広島大学医歯薬総合研究科医化学研究室浅野知一郎教授より供与頂いた。

Adenovirus Expression Vector Kit (タカラバイオ社) のプロトコールに従い、インサート部分をコスミドベクターに移し、Gigapack III-XL Packaging Extract (Agilent Technologies 社) を使用し増幅した後、BspT104I 消化したコスミドを HEK-293 細胞にトランスフェクションし、human myc-HOIL-1L 発現アデノウイルスベクターを作成した (完全長 DNA 導入法)。

作成したアデノウイルスは Adenopure (Puresyn 社) を使用して精製し、ウイルス力価を確認後、マウスでの実験に使用した。

(3) マウス

マウスは日本生物材料センターより購入した 8~10 週齢の C57BL/6J 雄マウスを使用し、一般的な環境下で通常食を与えて飼育した。

マウス肝での HOIL-1L 過剰発現実験は、human myc-HOIL-1L 発現アデノウイルスベクターまたはコントロールとして green fluorescent protein (GFP) 発現アデノウイルスベクターをそれぞれ 1.4×10^9 pfu/body 尾静脈投与し、8 日後に腹腔内ブドウ糖負荷試験、12 日後にインスリン負荷試験を施行後、16 時間絶食下にて 15 日後に解剖を行った。

解剖後速やかに肝臓を可溶化バッファー (20 mM Tris (pH7.5) , 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethyleneglycotetraacetic acid (EGTA), 1 % Triton X-100, 2.5 mM sodium

pyrophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM β -glycerophosphate) でホモジェナイズし、30 分氷冷後、4 °C, 9,000 rpm, 10 分遠心、上清をさらに 4 °C, 15,000 rpm, 30 分遠心し、上清を Western blot 解析に使用した。

本研究の全ての動物実験は東京大学の動物実験指針に沿って実験を行った。

(4) ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験

ブドウ糖負荷試験は、マウスを 14 時間絶食後、グルコース 2 g/kgBW を腹腔内投与し施行した。インスリン負荷試験は、マウスを 14 時間絶食後、インスリン (ヒューマリン R) 0.75 単位/kgBW を腹腔内投与し施行した。試験前の血糖値および負荷後 15, 30, 60, 90, 120 分後の血糖値を尾静脈血よりグルテストネオスーパー (三和化学研究所) を使用して測定した。

(5) 細胞培養

HepG2 細胞は 10 %ウシ胎児血清 (fetal calf serum : FCS) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose 培地 (和光純薬工業社) で 37 °C, 5 % CO_2 インキュベータ内で培養した。インスリン刺激は、前日に 0.2 % bovine serum albumin (BSA) を添加した無血清培地に培地交換した上で、終濃度 100 nM となるようインスリンを加えて行った。一定時間後、氷冷した phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、可溶化バッファー

(20 mM Tris (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM β-glycerophosphate) にて可溶化し、10 分氷冷後、4 °C, 15,000 rpm, 10 分遠心し、上清を Western blot 解析および免疫沈降に使用した。

(6) Western blot 解析および免疫沈降法

上記の方法で得た細胞上清または total lysate を 100 mM dithiothreitol (DTT) を加えた Laemmli サンプルバッファーで 96 °C, 15 分ボイルした。作成したサンプルを sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて分離し polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレン (GE healthcare 社) に転写、ブロッキング後に 1 次抗体および horseradish peroxidase (HRP) で標識された 2 次抗体と反応させた。ECL (GE healthcare 社) またはイムノスターLD (和光純薬工業社) を用い化学発光させ、ImageQuant LAS4000mini (富士フィルム社) を使用し検出した。

免疫沈降は上記の方法で得た細胞上清に各抗体を 3 μg/ml 加え、4 °C で 1 時間反応した後、Protein A Sepharose (GE healthcare 社) を加え、さらに 4 °C で 1 時間反応させた。反応後のビーズを可溶化バッファーで 5 回洗浄し、100 mM DTT を加えた Laemmli サンプルバッファーを加えて 96 °C, 15 分ボイルし、免疫沈降サンプルとした。

(7) PI3K 阻害剤 (Wortmannin, LY294002) 添加実験

実験前日に培地を無血清培地に交換し、実験当日 Wortmannin 100 nM [25] または LY294002 20 μ M を添加し、遮光の上、30 分間インキュベーションした。その後 insulin 100 nM にて刺激し、1 時間後に細胞を回収した。

(8) 統計分析

本論文中的数值およびグラフの誤差範囲は平均値±標準誤差で表記した。2 群のデータの比較においては、まず F 検定にて等分散が仮定できるかどうか検討し、等分散性が棄却されない場合は Student の t 検定を、等分散性が棄却される場合には Welch の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

結果

HOIL-1L をマウス肝にて過剰発現させることで耐糖能が改善する

まず、HOIL-1L が糖代謝に影響を及ぼすのかどうか確認するため、作成した human myc-HOIL-1L 発現アデノウイルスベクターをマウス (C57BL/6J, 雄, 8 週齢) 尾静脈より投与し、肝臓にて HOIL-1L を過剰発現させた際の耐糖能の検討を行った。HOIL-1L 発現アデノウイルスベクター投与にて、肝臓で HOIL-1L が過剰発現していることを Western blot 法にて確認した (**Figure 4A**)。

腹腔内ブドウ糖負荷試験 (intraperitoneal glucose tolerance test : IPGTT) において、HOIL-1L 過剰発現にてコントロールに比し、糖負荷 30, 60 分後の血糖値の有意な低下を認め (30 分後 : $p < 0.01$, 60 分後 : $p < 0.05$) (**Figure 4B**)、area under the curve (AUC) にて 16 % の低下を認めた ($p < 0.05$) (**Figure 4C**)。また、インスリン負荷試験 (insulin tolerance test : ITT) においても、HOIL-1L 過剰発現にてインスリン投与 120 分後の血糖低下が有意 ($p < 0.01$) であり (**Figure 4D**)、AUC にて GFP 比で 27 % の低下を認め ($p < 0.05$) (**Figure 4E**)、インスリン感受性の亢進が認められた。解剖時の体重には差を認めず、肝重量・精巣上体周囲脂肪重量は HOIL-1L 過剰発現群でやや大きい傾向を認めるものの、有意差は認めなかった (肝重量 : $p = 0.23$, 精巣上体周囲脂肪重量 : $p = 0.29$)。

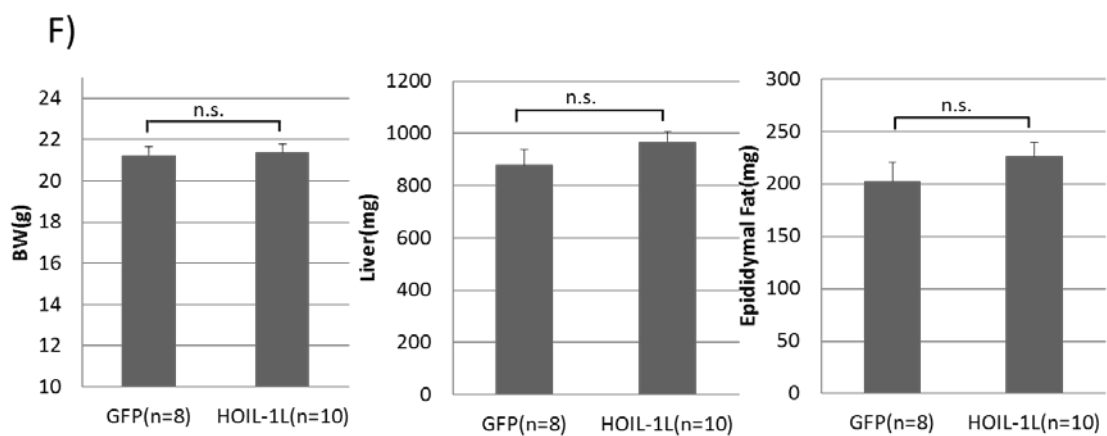
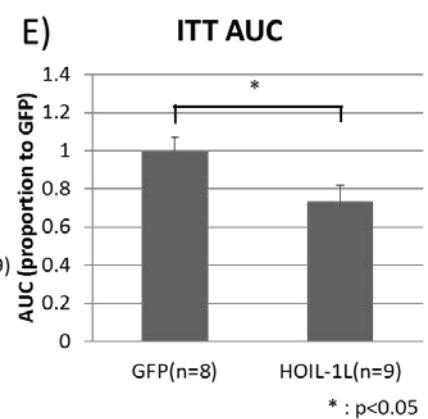
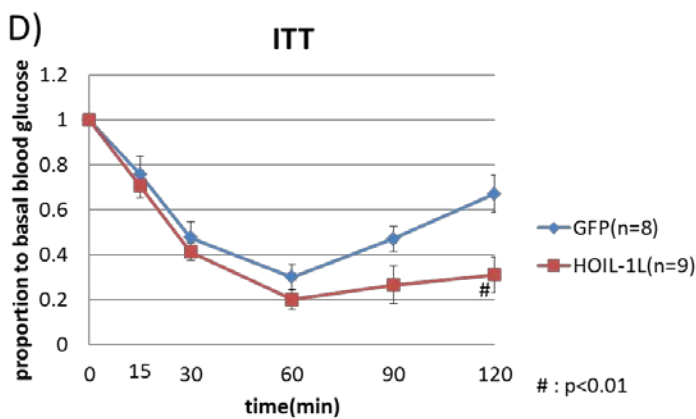
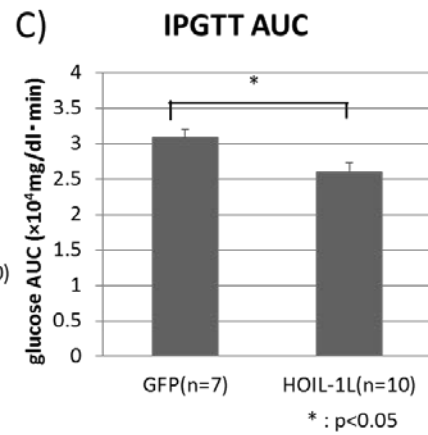
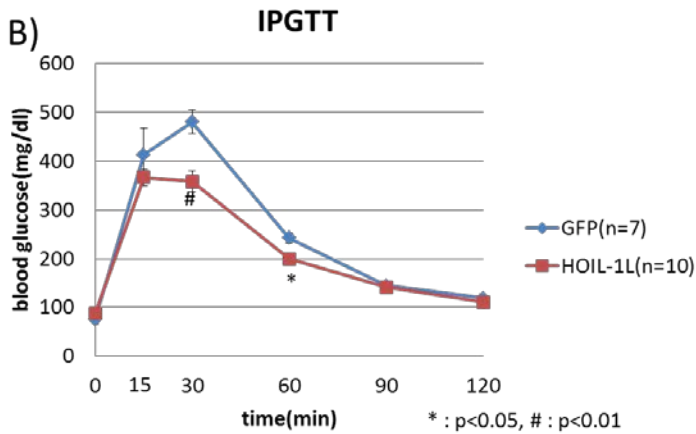
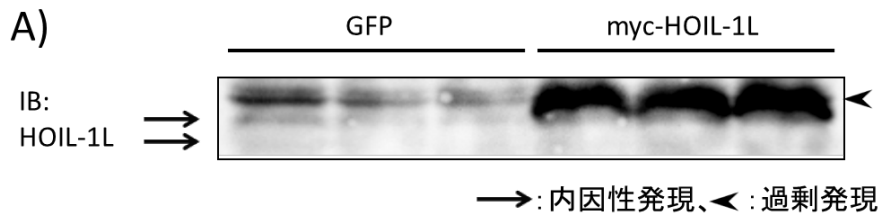


Figure 4. マウス肝にて HOIL-1L を過剰発現させると耐糖能改善が認められる。

C57BL/6J, 雄, 8 週齢のマウスに GFP または human myc-HOIL-1L 発現アデノウイルスベクターを尾静脈投与した。

A) 肝臓における HOIL-1L 発現 (Western blot 法)

B) IPGTT (14 hr fasting, glucose 2 g/kg i.p., GFP n=7, HOIL-1L n=10, * : p<0.05, # : p<0.01, mean±s.e.m.)

C) IPGTT glucose AUC (* : p<0.05, mean±s.e.m)

D) ITT (14 hr fasting, insulin 0.75 U/kg i.p., GFP n=8, HOIL-1L n=9, # : p<0.01, mean±s.e.m.)

E) ITT AUC (GFP 比) (* : p<0.05, mean±s.e.m)

F) 解剖時体重、肝重量、精巣上体周囲脂肪重量 (GFP n=8, HOIL-1L n=10, mean±s.e.m)

HOIL-1L 過剰発現により NF- κ B 活性の変化は認められない

次に、HOIL-1L を過剰発現した際の NF- κ B 活性に対する影響につき、培養細胞にて HOIL-1L をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させ、TNF- α 刺激 (10 ng/ml, 10 min) を行い、I κ B α の蛋白量およびリン酸化を Western blot 法にて検討した。培養細胞はヒト肝癌由来の細胞株である HepG2 細胞を使用した。

HOIL-1L を単独で過剰発現しても、コントロール (LacZ) と比較して TNF- α 刺激後の I κ B α 分解 (Figure 5A, 5B) や I κ B α リン酸化 (Figure 5A, 5C) は亢進せず、有意な NF- κ B 活性の変化は認められなかった。

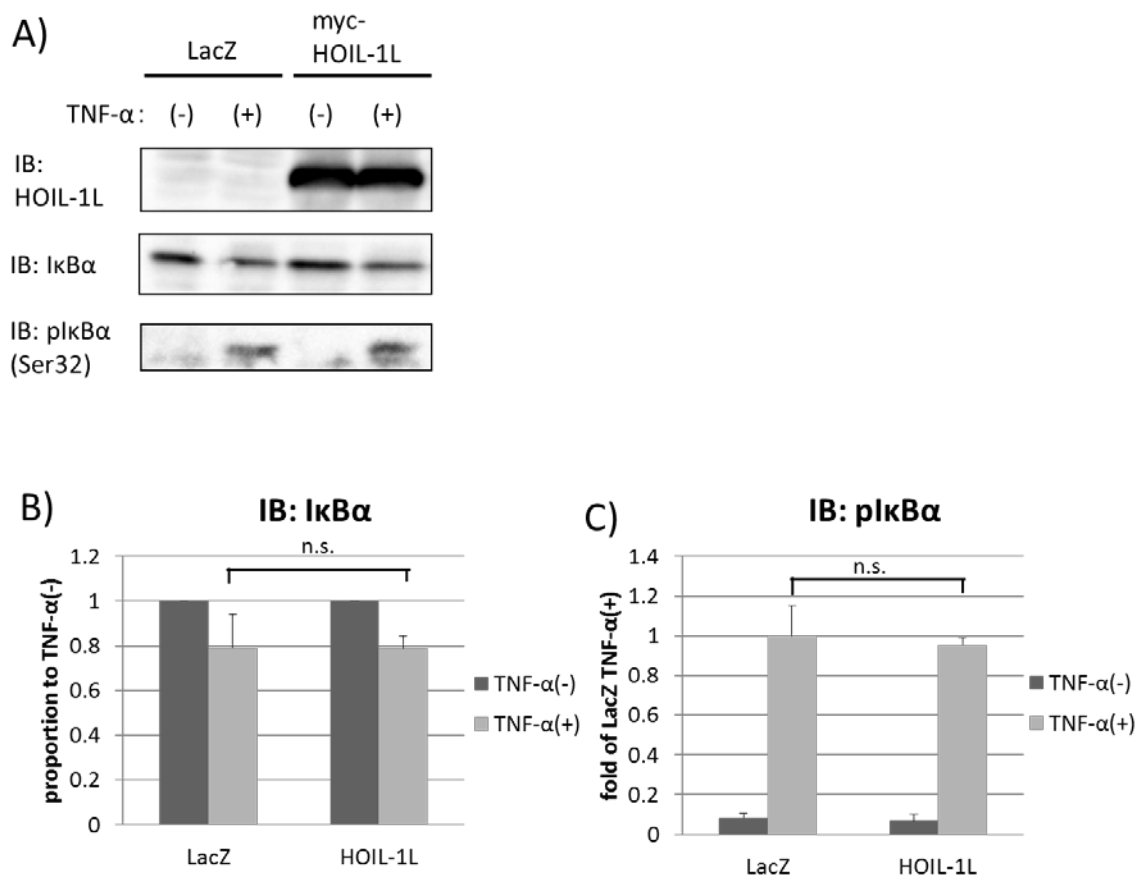


Figure 5. HOIL-1L を過剰発現しても NF- κ B 活性の変化は認められない

HepG2 細胞にて HOIL-1L をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させ、TNF- α 刺激 (10 ng/ml, 10 min) し、I κ B α の蛋白量およびリン酸化を Western blot 法にて検討した。

A) Western blot (同様の実験を 3 回施行し再現性を確認、代表的な結果を提示)

B) TNF- α 刺激前に対する TNF- α 刺激後の I κ B 蛋白量の検討 (n=3, mean \pm s.e.m.)。

C) TNF- α 刺激前後の I κ B α リン酸化 (LacZ TNF- α (+)=1 として補正, n=3, mean \pm s.e.m.)。

HepG2 細胞にて HOIL-1L を過剰発現すると、IRS よりも下流のレベルでイン

スリンシグナルが亢進する

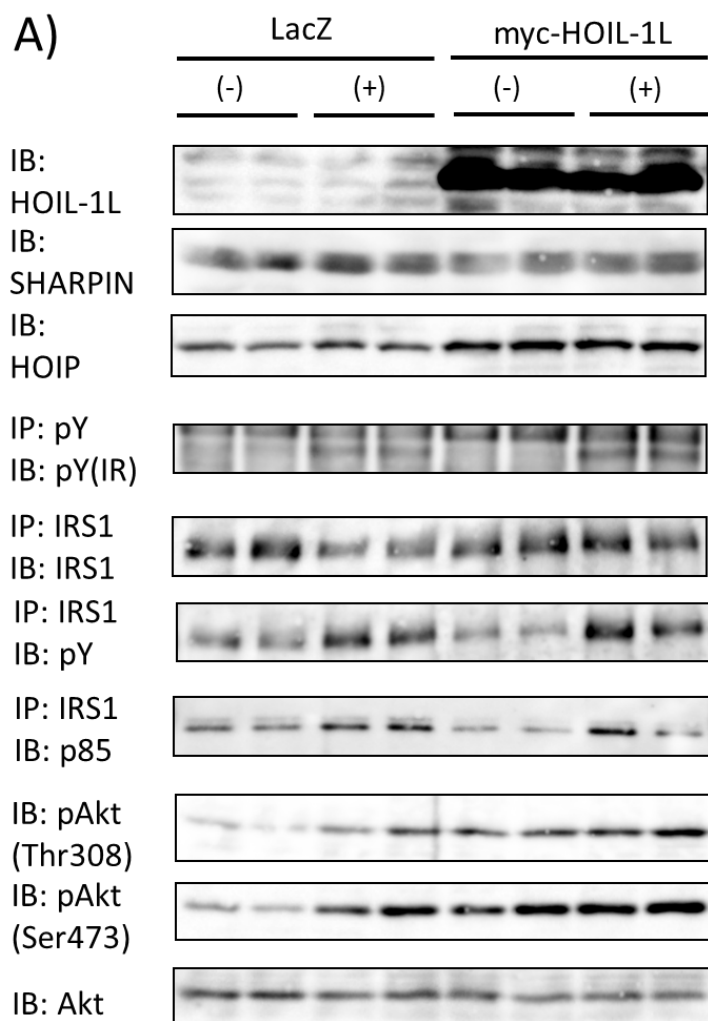
HOIL-1L のインスリンシグナル伝達系に及ぼす影響について検討するため、

肝臓由来の培養細胞である HepG2 細胞を用い、HOIL-1L を過剰発現しインス

リン刺激した際のインスリンシグナルの変化について検討を行った。

HepG2 細胞にアデノウイルスベクターを用いて HOIL-1L を過剰発現させ、2 日後に 100nM insulin で刺激し 1 時間後に方法の項で示した可溶化バッファーにて細胞を回収し、抗 IRS-1 抗体および抗リン酸化チロシン (pY) 抗体にて免疫沈降を行った。

Figure 6A, 6B に示すように、HOIL-1L 過剰発現にてインスリン非刺激時・刺激後ともに Akt リン酸化 (Thr308, Ser473) の有意な亢進を認めたが、インスリン受容体 (IR) のチロシンリン酸化や IRS-1 のチロシンリン酸化の亢進は認められなかった。また IRS-1 に結合する PI3K p85 subunit の量についても明らかな差が認められなかった。



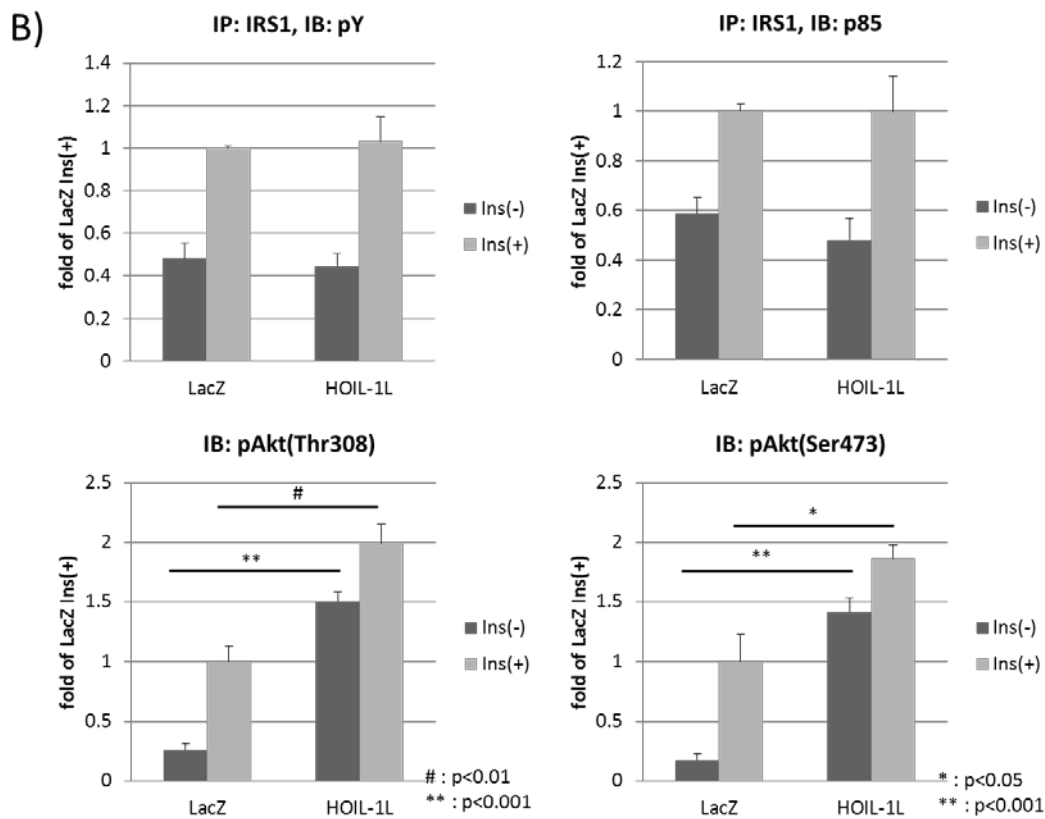


Figure 6. HepG2 細胞において HOIL-1L を過剰発現すると IRS より下流のレベルでインスリンシグナルの亢進が認められる。

HepG2 細胞において HOIL-1L をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させ、インスリン刺激 (100 nM) 後 1 時間で細胞を回収した。

A) 抗 IRS-1 抗体、抗リン酸化チロシン (pY) 抗体にて免疫沈降を行い、抗 IRS-1 抗体、抗 pY 抗体および抗 p85 抗体にて Western blot を行った。HOIL-1L, SHARPIN, HOIP, pAkt (Thr308), pAkt (Ser473), Akt の発現量については細胞上清の Western blot により検討した。(同様の実験を 3 回以上施行し再現性を確認、代表的な結果を提示)

B) Western blot 定量 (LacZ Ins(+)=1 として補正, n=3, * : p<0.05, # : p<0.01, ** : p<0.001, mean±s.e.m.)。

HOIL-1L によるインスリンシグナル亢進はあらかじめ PI3K 阻害剤を投与する

と消失する

HOIL-1L によるインスリンシグナル亢進が PI3K のレベルで生じているのか、

あるいはそれよりも下流の PDK1 や Akt のレベルで生じているのかを検討するため、PI3K 阻害剤を用いた以下の実験を行った。

HepG2 細胞にアデノウイルスベクターを用いて HOIL-1L を過剰発現させ、代表的な PI3K 阻害薬である Wortmannin (100 nM) または LY294002 (20 μ M) を添加し、30 分後に 100 nM insulin で刺激し、1 時間後に細胞を回収した。

Figure 6A の結果と同様、HOIL-1L 過剰発現によりインスリン非刺激時・刺激後ともに Akt Ser473 リン酸化が亢進したが、Wortmannin あるいは LY294002 の添加により、インスリン非刺激時・刺激後ともにコントロール (LacZ) と同程度まで Akt リン酸化が低下した (Figure 7)。

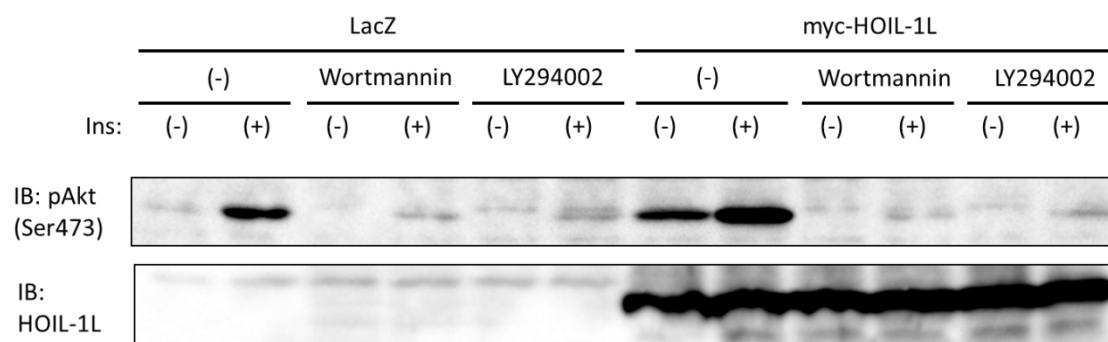


Figure 7. HOIL-1L 過剰発現によるインスリンシグナル亢進はあらかじめ PI3K 阻害剤 (Wortmannin, LY294002) を添加すると消失する

HepG2 細胞にて HOIL-1L を用いて過剰発現させ、Wortmannin (100 nM) または LY294002 (20 μ M) にて 30 分処理後、100 nM insulin にて刺激し、1 時間後に細胞を回収した (同様の実験を複数回施行し再現性を確認、代表的な結果を提示)。

考察

SHARPIN, HOIL-1L, HOIP より形成される LUBAC は、NEMO を直鎖状ポリユビキチン化することで、定型的経路を介する NF- κ B 活性化を促進する作用を持つ [20-22]。SHARPIN, HOIL-1L, HOIP は LUBAC 構成因子として機能するが、例えば SHARPIN が β 1-integrin に結合しその活性を阻害すること [26] や HOIL-1L (別名 RBCC protein interacting with protein kinase C1 (RBCK1)) が estrogen receptor α (ER α) の転写を促進すること [27,28] が報告されており、これらの LUBAC 構成因子は分子単体としても機能を有している可能性が示唆される。

マウスへの HOIL-1L 発現アデノウイルスベクター投与により、ブドウ糖負荷試験・インスリン負荷試験において耐糖能改善およびインスリン感受性の亢進が認められた (**Figure 4B~4E**)。アデノウイルスベクターを尾静脈投与するとそのほとんどが肝臓で発現することが知られており [29]、肝臓において糖代謝に変化が生じている可能性が考えられた。

HepG2 細胞における検討で HOIL-1L 単独での過剰発現では NF- κ B 活性に有意な変化を認めなかった(**Figure 5A~5C**)。したがって、HOIL-1L による糖代謝の変化は、LUBAC としての機能とは独立した HOIL-1L 分子単体による機

序である可能性が示唆された。

そこで、肝臓由来の培養細胞である HepG2 細胞において HOIL-1L のインスリンシグナル伝達系への影響を検討したところ、インスリン非刺激時・刺激後ともに Akt リン酸化 (Thr308, Ser473) の亢進が認められた (**Figure 6A, 6B**)。IR, IRS-1 のチロシンリン酸化には差を認めず、また IRS-1 に結合する PI3K p85 subunit の量にも変化を認めないことから、HOIL-1L 過剰発現によるインスリンシグナル亢進は IRS よりも下流の機序によるものと考えられた。

また、PI3K 阻害薬 (Wortmannin, LY294002) をあらかじめ処理した上でインスリン刺激を行うと、HOIL-1L による Akt リン酸化の亢進はインスリン非刺激時・刺激後ともに消失した (**Figure 7**)。仮に HOIL-1L によるインスリンシグナル増強が PI3K よりも下流で生じているとすれば、少なくともインスリン非刺激時の Akt リン酸化は Wortmannin, LY294002 添加により PI3K を阻害しても残存するはずであり、HOIL-1L 過剰発現によるインスリン非刺激時の Akt リン酸化亢進が消失したことは PI3K あるいはそれより上流の機序を示唆するものと考えられた。したがって、**Figure 6, 7** の結果を総合すると、HOIL-1L によるインスリンシグナル亢進は PI3K のレベルで生じているものと推測された。

PTEN は PIP₃ の 3 位のリン酸基を脱リン酸化することで PI3K 活性に拮抗する作用を有し、PI3K レベルでのインスリンシグナルの negative feedback

system の 1 つとされている。既報 [24] にて SHARPIN が UBL domain を介し PTEN に結合し、PTEN phosphatase activity を阻害することが報告されている。HOIL-1L も UBL domain を有する (**Figure 3**) ことから PTEN への作用を介してインスリンシグナルを亢進させている可能性が考えられたが、免疫沈降法や GST pull-down にて検討を行ったものの HOIL-1L と PTEN との明確な結合を示すことはできなかった (データ非掲載)。HOIL-1L は RING-IBR-RING domain を有し単独でも E3 ligase として活性を有する上、supressor of cytokine signaling-6 (SOCS-6) [30] や protein kinase C (PKC) [31-33] といったインスリンシグナルと関連の深い分子との結合が報告されており、PTEN 以外を介する機序についても今後検討が必要と考えている。

インスリンシグナル以外で肝臓への糖取り込みを規定する因子として、解糖系の律速酵素であり、グルコースからグルコース 6-リン酸への代謝を担うグルコキナーゼ (glucokinase : GK) への作用の可能性も考えられた。GK は空腹時などグルコース濃度が低い条件下では glucokinase regulatory protein (GKRP) と結合し核内に非活性の状態が存在するが、グルコース濃度上昇により GK は GKRP より解離し細胞質へと移動し、肝細胞において glucose transporter 2 (GLUT2) を介して取り込まれたグルコースをグルコース 6-リン酸へと変換する [34]。HOIL-1L が GK または GKRP に作用している可能性を

考え、マウス肝および培養細胞（HepG2 細胞）において HOIL-1L を過剰発現した際の GK, GGRP の発現量や細胞内局在について細胞分画別の Western blot 法による検討や免疫染色による検討を行ったが、明らかな変化を見出すことはできなかった（データ非掲載）。

最近、常染色体劣性遺伝を呈する HOIL-1 欠損の患者（2 家系 3 人）についての報告がなされた [35]。HOIL-1 欠損患者では慢性的な自己炎症（autoinflammation）と易感染性を呈する他、機序は不明だが異常グリコーゲンによる筋での封入体形成によりミオパチーや心筋症を生じることが報告されている [35,36]。今後、HOIL-1L のグリコーゲン代謝に与える影響についても検討を行っていきたいと考えている。

また、今回の研究においては HOIL-1L 単独での過剰発現であり LUBAC としての活性には変化は認められなかったが、shRNA 発現ベクターを用いて SHARPIN, HOIL-1L, HOIP をそれぞれ knock-down すると、既報 [19,20] に合致していずれの knock-down によっても LUBAC 活性が低下し、TNF- α 刺激時の NF- κ B 活性化が抑制されることを確認している（データ非掲載）。今後、LUBAC 活性低下による NF- κ B 活性の低下が高脂肪食負荷などにより生じるインスリン抵抗性を改善する可能性についても検討を行っていきたいと考えている。

最後に、本研究における限界について考察しておく。本研究においては細胞レベルでの検討に HepG2 細胞を使用している。HepG2 細胞は糖代謝およびインスリンシグナル伝達領域の研究において頻用されている培養細胞の 1 つであるが、ヒト肝癌由来の細胞株であり、正常マウス肝細胞で HOIL-1L を過剰発現した際の変化とは乖離がある可能性は否定できない。マウスの肝癌細胞株である Hepa1-6 細胞を使用しても HOIL-1L 過剰発現にてインスリンシグナルが亢進することは確認している（データ非掲載）が、癌細胞においては様々な代謝変化が生じていることが知られており [37]、初代培養細胞での検討も必要と考えている。

Figure 8 に本研究結果から推測される HOIL-1L および LUBAC のインスリンシグナル伝達系への作用の概念図を示す。本研究において、LUBAC 構成因子の 1 つである HOIL-1L が LUBAC としての機能とは独立して PI3K のレベルでインスリンシグナルを亢進させる可能性があることが明らかとなった。SHARPIN と同じく UBL domain を有することから PTEN 阻害作用による可能性が考えられるが、HOIL-1L はそれ自身が E3 ligase として機能するためユビキチン化を介する機序などその他の可能性も考えられる。今後、詳細なメカニズムについて、更なる検討を加えていきたいと考えている。

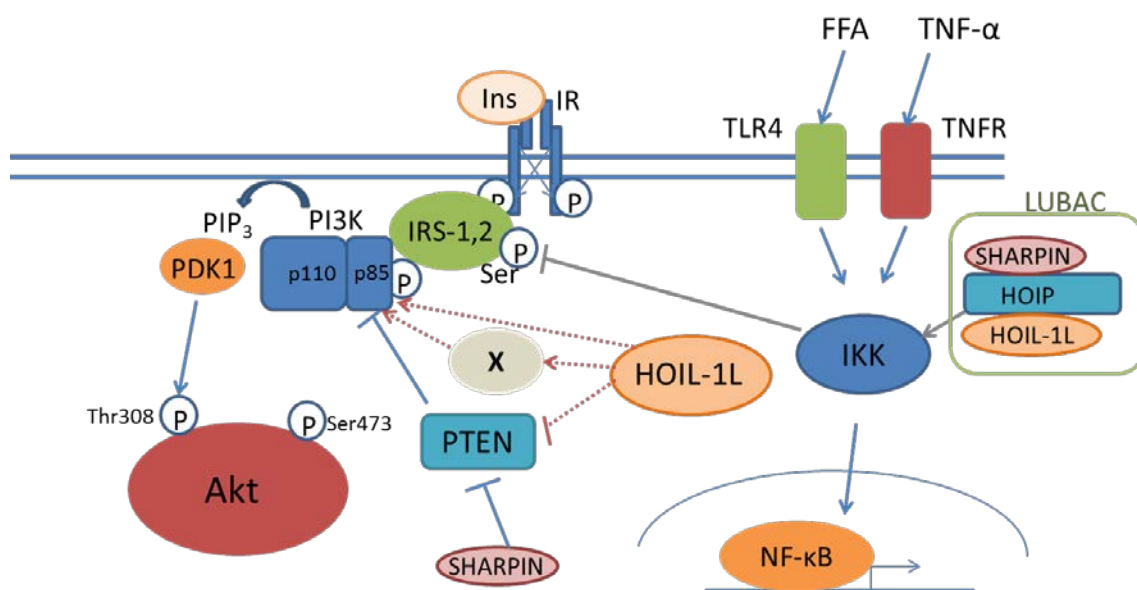


Figure 8. 本研究による結果の概念図

本研究により HOIL-1L が LUBAC としての機能とは独立して PI3K レベルでインスリンシグナルを亢進させることが明らかとなった (Figure 5, 6, 7)。SHARPIN が UBL domain を介して PTEN と結合し PTEN 活性を阻害することが報告されており [24]、HOIL-1L も同じく UBL domain を有することから PTEN への作用を介している可能性が考えられるが、HOIL-1L は単独でも E3 ligase として機能することや、SOCS-6 や PKC などとの相互作用も報告されていることから、その他の機序で PI3K レベルでインスリンシグナルを亢進させている可能性も考えられる。

引用文献

- [1] 清野裕、南條輝志男、田嶋尚子、門脇孝、柏木厚典、荒木栄一、伊藤千賀子、
稲垣暢也、岩本安彦、春日雅人、花房俊昭、羽田勝計、植木浩二郎 糖尿病の
分類と診断基準に関する委員会報告（国際標準化対応版）*糖尿病* 55: 485-504,
2012
- [2] Fukushima M, Suzuki H, and Seino Y. Insulin secretion capacity in the
development from normal glucose tolerance to type 2 diabetes. *Diabetes Res
Clin Pract* 66 Suppl 1: S37-43, 2004.
- [3] 厚生労働省ホームページ 平成 24 年「国民健康・栄養調査」の結果
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000032074.html>
- [4] Taniguchi CM, Emanuelli B, and Kahn CR. Critical nodes in signalling
pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96, 2006.
- [5] 春日雅人編「糖尿病学イラストレイテッド」羊土社 pp.31-39, 2012
- [6] Baker RG, Hayden MS, and Ghosh S. NF-kappa B, Inflammation, and
Metabolic Disease. *Cell Metabolism* 13: 11-22, 2011.
- [7] Donath MY and Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease.
Nat Rev Immunol 11: 98-107, 2011.

- [8] Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91, 1993.
- [9] Tilg H and Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 19: 371-379, 2008.
- [10] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, and Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-3025, 2006.
- [11] Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, and Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277: 48115-48121, 2002.
- [12] Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, and Karin M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11: 191-198, 2005.
- [13] Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, and Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med* 11: 183-190, 2005.

- [14] Sen R and Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928, 1986.
- [15] 'NF- κ B Transcription Factors' (Boston University Dr. Thomas Gilmore 研究室ホームページ) <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>
- [16] Bonizzi G and Karin M. The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* 25: 280-288, 2004.
- [17] Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, and Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9: 1586-1597, 1995.
- [18] Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, Kanie M, Sano S, Tokunaga F, Tanaka K, and Iwai K. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *Embo J* 25: 4877-4887, 2006.
- [19] Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, Akira S, Takao T, Tanaka K, and Iwai K. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol* 11: 123-132, 2009.

[20] Tokunaga F, Nakagawa T, Nakahara M, Saeki Y, Taniguchi M, Sakata S, Tanaka K, Nakano H, and Iwai K. SHARPIN is a component of the NF-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 471: 633-636, 2011.

[21] Ikeda F, Deribe YL, Skanland SS, Stieglitz B, Grabbe C, Franz-Wachtel M, van Wijk SJJ, Goswami P, Nagy V, Terzic J, Tokunaga F, Androulidaki A, Nakagawa T, Pasparakis M, Iwai K, Sundberg JP, Schaefer L, Rittinger K, Macek B, and Dikic I. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappa B activity and apoptosis. *Nature* 471: 637-641, 2011.

[22] Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, Emmerich CH, Rieser E, Haas TL, Webb AI, Rickard JA, Anderton H, Wong WW, Nachbur U, Gangoda L, Warnken U, Purcell AW, Silke J, and Walczak H. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* 471: 591-596, 2011.

[23] Tokunaga F and Iwai K. LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses. *Microbes Infect* 14: 563-572, 2012.

[24] He L, Ingram A, Rybak AP, and Tang D. Shank-interacting protein-like 1

promotes tumorigenesis via PTEN inhibition in human tumor cells. *J Clin Invest* 120: 2094-2108, 2010.

[25] Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A, and Olefsky JM. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 24: 8778-8789, 2004.

[26] Rantala JK, Pouwels J, Pellinen T, Veltel S, Laasola P, Mattila E, Potter CS, Duffy T, Sundberg JP, Kallioniemi O, Askari JA, Humphries MJ, Parsons M, Salmi M, and Ivaska J. SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta1-integrin activation. *Nat Cell Biol* 13: 1315-1324, 2011.

[27] Gustafsson N, Zhao C, Gustafsson JA, and Dahlman-Wright K. RBCK1 drives breast cancer cell proliferation by promoting transcription of estrogen receptor alpha and cyclin B1. *Cancer Res* 70: 1265-1274, 2010.

[28] Gustafsson Sheppard N, Heldring N, and Dahlman-Wright K. Estrogen receptor-alpha, RBCK1, and protein kinase C beta 1 cooperate to regulate estrogen receptor-alpha gene expression. *J Mol Endocrinol* 49: 277-287, 2012.

[29] Ono H, Shimano H, Katagiri H, Yahagi N, Sakoda H, Onishi Y, Anai M,

Ogihara T, Fujishiro M, Viana AY, Fukushima Y, Abe M, Shojima N, Kikuchi M, Yamada N, Oka Y, and Asano T. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. *Diabetes* 52: 2905-2913, 2003.

[30] Bayle J, Lopez S, Iwai K, Dubreuil P, and De Sepulveda P. The E3 ubiquitin ligase HOIL-1 induces the polyubiquitination and degradation of SOCS6 associated proteins. *FEBS Lett* 580: 2609-2614, 2006.

[31] Cong YS, Yao YL, Yang WM, Kuzhandaivelu N, and Seto E. The hepatitis B virus X-associated protein, XAP3, is a protein kinase C-binding protein. *J Biol Chem* 272: 16482-16489, 1997.

[32] Tokunaga C, Kuroda S, Tatematsu K, Nakagawa N, Ono Y, and Kikkawa U. Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase C-interacting protein with structural motifs related to RBCC family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 353-359, 1998.

[33] Nakamura M, Tokunaga F, Sakata S, and Iwai K. Mutual regulation of conventional protein kinase C and a ubiquitin ligase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 340-347, 2006.

- [34] Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414: 1-18, 2008.
- [35] Boisson B, Laplantine E, Prando C, Giliani S, Israelsson E, Xu Z, Abhyankar A, Israel L, Trevejo-Nunez G, Bogunovic D, Cepika AM, MacDuff D, Chrabieh M, Hubeau M, Bajolle F, Debre M, Mazzolari E, Vairo D, Agou F, Virgin HW, Bossuyt X, Rambaud C, Facchetti F, Bonnet D, Quartier P, Fournet JC, Pascual V, Chaussabel D, Notarangelo LD, Puel A, Israel A, Casanova JL, and Picard C. Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. *Nat Immunol* 13: 1178-1186, 2012.
- [36] Nilsson J, Schoser B, Laforet P, Kalev O, Lindberg C, Romero NB, Davila Lopez M, Akman HO, Wahbi K, Iglseider S, Eggers C, Engel AG, Dimauro S, and Oldfors A. Polyglucosan body myopathy caused by defective ubiquitin ligase RBCK1. *Ann Neurol* 74: 914-919, 2013.
- [37] Cairns RA, Harris IS, and Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95, 2011.

謝辞

本研究を遂行するに当たり、御指導頂きました指導教員の糖尿病・代謝内科学門脇 孝教授に深甚なる謝意を表します。

そして研究開始当初より終始懇切丁寧に御指導頂きました、研究グループ長の迫田 秀之先生に厚く御礼申し上げます。また実験に当たり多くの御指導・御協力を頂きました、東京大学糖尿病・代謝内科学 藤城 緑先生、金子 直先生、山崎 広貴先生、朝日生命成人病研究所 榎山 暁史先生、菊池 貴子先生、広島大学医化学研究室 浅野 知一郎教授に深謝致します。最後に、研究遂行にあたり多大なサポートを下さった実験助手の堀川 夏呼さん、牟田 裕理子さん、藤田 政子さんに深く感謝致します。