

## 4. メチルグリオキサールによるインスリン抵抗性モデル

井上 善晴

京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻

Key words : メチルグリオキサール, インスリン抵抗性, 糖尿病, TOR, ネガティブフィードバック

### 緒言

メチルグリオキサール (MG) は一つの分子内にケト基とアルデヒド基を持つ 2-オキソアルデヒドであり、主に解糖系から派生する。MG は反応性に富み、タンパク質と結合して終末糖化産物 (AGE) の生成を引き起こす。糖尿病患者の血中 MG レベルは、健康な人のそれよりも約 4~6 倍も高く、AGE は糖尿病合併症との関連が知られている。しかしながら、MG レベルの上昇が糖尿病の発症や増悪に関わっているのか、あるいは糖尿病の結果として MG レベルが上昇しているのかについては、まだよく分かっていない。

2 型糖尿病の主要な病態はインスリン抵抗性である。インスリンはチロシンキナーゼ型受容体により感知されると、受容体は自己リン酸化するとともに、インスリン受容体基質 (IRS) をチロシンリン酸化する。チロシンリン酸化された IRS はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) を活性化し、その結果、PI(3,4,5)P3 レベルが上昇する。PI(3,4,5)P3 はホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 (PDK1) を活性化し、活性化された PDK1 は Akt の activation loop 内の Thr<sup>308</sup> をリン酸化する。一方、インスリンは TOR (target of rapamycin) シグナルを活性化させる。TOR は真核生物において広く保存された Ser/Thr キナーゼであり、細胞の増殖を始め、さまざまな細胞機能に参与する。TOR は細胞内で 2 種類の TOR 複合体 (TORC1, TORC2) を形成する。そこで本研究では、TOR が関与するインスリンシグナル応答に対する MG の作用について明らかにし、MG によるインスリン抵抗性についての新しいモデルの可能性について検討した。

### 方法および結果

#### 1. MG による mTORC2 依存的な Akt のリン酸化<sup>1)</sup>

哺乳類における TORC2 (mTORC2) は、プロテインキナーゼ Akt の turn motif (TM) 内の Thr<sup>450</sup>、ならびに hydrophobic motif (HM) 内の Ser<sup>473</sup> をリン酸化する。これらのリン酸化部位のうち、インスリンに応答してリン酸化レベルが亢進するのは HM 内の Ser<sup>473</sup> である。マウスの前駆脂肪細胞 3T3-L1、ならびに筋芽細胞 C2C12 を MG で処理し、mTORC2 による Akt のリン酸化を、それぞれのリン酸化部位に対する特異的リン酸化抗体を用いて検討を行った。その結果、いずれの細胞においても、MG により Akt の Ser<sup>473</sup> のリン酸化レベルが上昇した。しかしながら、Thr<sup>450</sup> のリン酸化レベルは上昇しなかった (図 1A)。このリン酸化レベルの上昇が mTORC2 によるものかどうかを確認するため、mTORC1 の阻害剤であるラパマイシン、ならびに mTORC1 と mTORC2 のいずれも阻害する Torin 1 存在下でのリン酸化を検討した。その結果、MG による Ser<sup>473</sup> のリン酸化レベルの上昇はラパマイシンでは阻害されず、Torin 1 存在下でのみ阻害された (図 1B)。このことから、MG による Akt Ser<sup>473</sup> のリン酸化は、mTORC2 依存的であると考えられた。

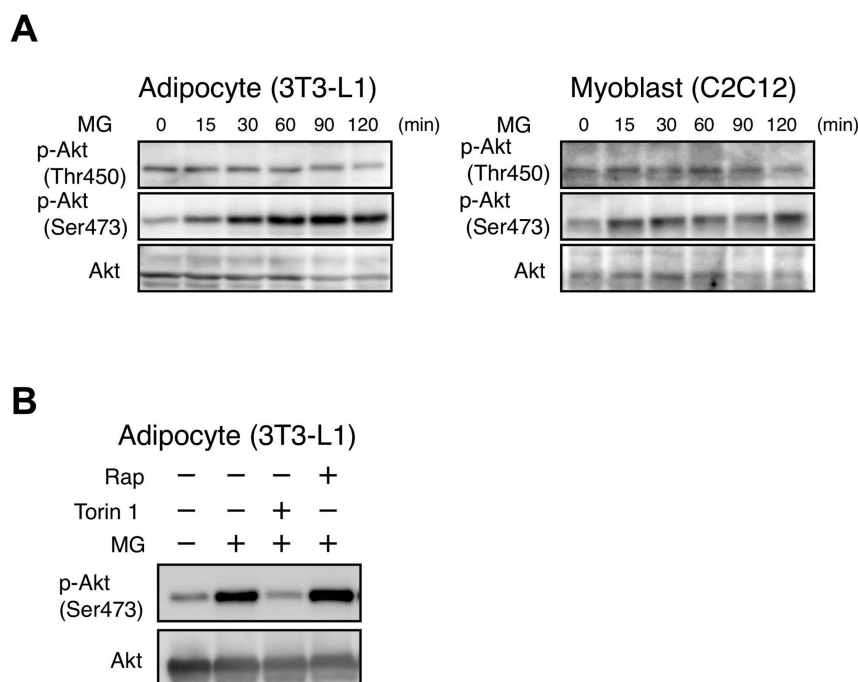


図1. MGによる mTORC2 依存的 Akt のリン酸化

(A) マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 ならびに筋芽細胞 C2C12 を MG で処理した細胞における Akt の turn motif 内の Thr<sup>450</sup>、ならびに hydrophobic motif 内の Ser<sup>473</sup> のリン酸化状態を、それぞれのリン酸化部位特異的リン酸化抗体を用いて検出した。(B) 3T3-L1 細胞を、mTORC1 特異的阻害剤であるラパマイシン (Rap)、あるいは mTORC1 ならびに mTORC2 を阻害する Torin 1 存在下で、MG で処理した際の Akt (Ser<sup>473</sup>) のリン酸化状態を、特異的リン酸化抗体を用いて検出した。

## 2. インスリンシグナル経路に及ぼす MG の影響

糖尿病患者では恒常的に血中 MG レベルが上昇している。MG により mTORC2 依存的に Akt のリン酸化が起こったことから、糖尿病患者ではインスリンシグナル経路も活性化しているのではないかと考えられた。しかしながら、インスリンシグナル経路が常に活性化していると、グルコースの過剰の取り込みにより低血糖状態になるおそれがあるため、血糖値を一定レベルに維持するため、インスリンシグナル経路はネガティブフィードバック機構により制御されている。すなわち、Akt は低分子量 G タンパク質 Rheb の GAP (GTPase activating protein) である Tsc1-Tsc2 複合体のうち、Tsc2 をリン酸化することでこれを不活性化し、結果的に Rheb の活性化を引き起こす。Rheb は mTORC1 を活性化し、活性化された mTORC1 は S6K1 をリン酸化する<sup>2-4</sup>。活性化された S6K1 は IRS-1 の Ser/Thr 残基をリン酸化することでインスリン受容体と IRS-1 との相互作用を阻害し、結果的にインスリンシグナルを遮断する<sup>5</sup>。

そこでまず、IRS-1 の Ser<sup>307</sup> のリン酸化が MG により亢進するかどうかを検討した。その結果、MG 処理により Ser<sup>307</sup> のリン酸化が起こり、そのリン酸化はラパマイシン処理により抑制された (図 2A)。IRS-1 の Ser<sup>307</sup> をリン酸化するのは S6K1 であるが、S6K1 は mTORC1 により Thr<sup>389</sup> がリン酸化されることで活性化される。そこで、MG 処理による S6K1 のリン酸化を検討したところ、Thr<sup>389</sup> のリン酸化が起こり、そのリン酸化は mTORC1 阻害剤であるラパマイシンにより阻害された (図 2B)。以上の結果から、MG は mTORC1 の活性化を介して S6K1 の Thr<sup>389</sup> のリン酸化、さらに S6K1 による IRS-1 の Ser<sup>307</sup> のリン酸化を引き起こしていることが明らかとなった。

mTORC1 の活性化は、アミノ酸の他に、インスリンなどの成長因子により mTORC2 シグナルの下流でも起こる<sup>2-4</sup>。MG が mTORC2 依存的に Akt をリン酸化したことから、MG による mTORC1 の活性化が mTORC2 シグナルの下流で起こっているかどうかを検討した。すなわち、mTORC1 を活性化する Rheb の GAP である Tsc2 のリン酸化が起こっているかどうかを検討した。その結果、MG で処理しても Tsc2 の Thr<sup>1462</sup> のリン酸化は認められなかった (図

2C)。従って、MG による mTORC2 を介した Akt Ser<sup>473</sup> のリン酸化は、少なくとも Tsc1-Tsc2→Rheb を介した mTORC1 の活性化に結びついていない可能性が考えられた。そこでこのことを確かめるため、Akt 阻害剤 (Akti) 存在下で MG で処理した際の S6K1 のリン酸化を検討した。その結果、Akti 存在下でも MG による S6K1 の Thr<sup>389</sup> のリン酸化が起ることを確認した (図 2D)。これらのことから、MG は mTORC1 を mTORC2 シグナルの下流ではなく、別経路で活性化していると考えられた。

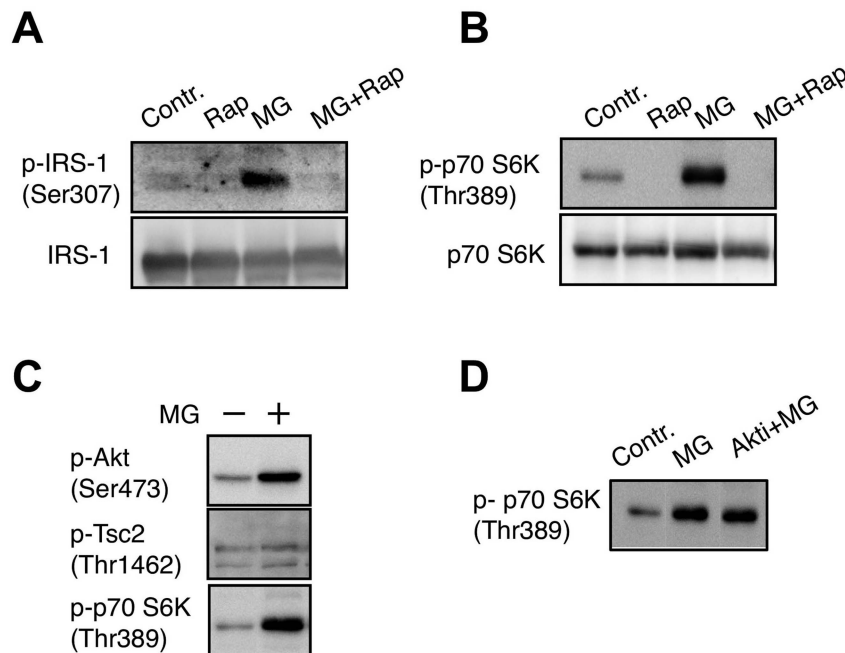


図 2. MG がインスリンシグナル伝達経路に及ぼす影響

(A) 3T3-L1 細胞を MG で処理した際の IRS-1 の Thr<sup>307</sup> のリン酸化状態を、特異的リン酸化抗体を用いて検討した。ラパマイシン (Rap) で処理する際は、予め Rap で 30 分処理した後に MG で処理をした。(B) (A) と同様に処理した 3T3-L1 細胞の S6K1 (p70 S6K) の Thr<sup>389</sup> のリン酸化状態を、特異的リン酸化抗体を用いて検出した。(C) 3T3-L1 細胞を MG で処理した際の Akt (Ser<sup>473</sup>)、Tsc2 (Thr<sup>1462</sup>)、ならびに S6K1 (Thr<sup>389</sup>) のリン酸化状態を、それぞれに特異的なリン酸化抗体を用いて検出した。(D) Akt 阻害剤 (Akti) 存在下で、MG による S6K1 (Thr<sup>389</sup>) のリン酸化を特異的なリン酸化抗体を用いて検出した。

### 3. MG によるインスリン抵抗性モデル

MG 処理により mTORC1 依存的に S6K1 の活性化が起り、その結果、IRS-1 の Ser<sup>307</sup> のリン酸化が起った。S6K1 や JNK による IRS-1 の Ser や Thr 残基のリン酸化は、IRS-1 とインスリン受容体との親和性を低下させ、結果的にインスリンシグナルを減衰させる<sup>5)</sup>。そこで、予め MG で処理した細胞をインスリンで刺激した際の Akt Ser<sup>473</sup> のリン酸化を検討した。その結果、MG で前処理した細胞では、前処理しなかった細胞に比べ、インスリンによる Ser<sup>473</sup> のリン酸化レベルの上昇が抑制された。またこのリン酸化レベルの上昇の抑制は、ラパマイシンによりキャンセルされた (図 3A)。

前駆脂肪細胞はインスリンの刺激により脂肪細胞へと分化する。インスリン刺激により mTORC2 依存的に活性化された Akt は FoxO1/3 をリン酸化し、リン酸化された FoxO1/3 は核外輸送され不活性化されるとともに、PPAR $\gamma$  により aP2 (FABP4) の発現が誘導されるなどして中性脂肪の合成が行われる<sup>6)</sup>。そこで、MG で前処理した細胞にインスリン刺激を与えた場合の FoxO1/3 のリン酸化を検討した。その結果、Akt のリン酸化の場合と同様に、MG で前処理した場合、インスリンによる FoxO1/3 のリン酸化の上昇が抑制され、それはラパマイシンによりキャンセルさ

れた (図 3B)。またこの時、脂肪細胞分化のマーカーの一つである aP2 (FABP4) の発現レベルも MG の用量依存的に減少した (図 3C)。以上のことから、MG はインスリンシグナル経路に対して阻害的に作用している可能性が示唆された。

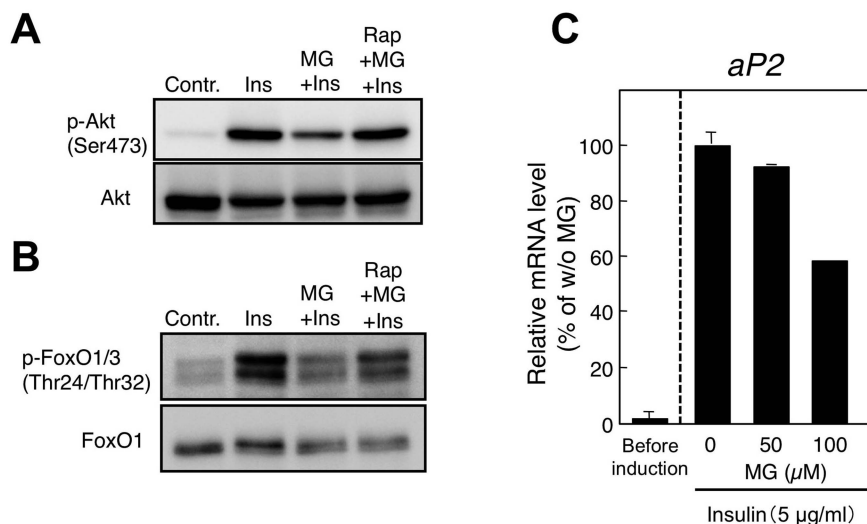


図 3. MG によるインスリンシグナル応答の阻害

(A) 3T3-L1 細胞をインスリン (Ins)、MG、MG で前処理した後にインスリンで処理、あるいは予めラパマイシン (Rap) で処理した後に MG を添加し、その後インスリンで処理した際の Akt (Ser<sup>473</sup>) のリン酸化状態を、特異的リン酸化抗体を用いて検出した。(B) (A) と同様に処理した 3T3-L1 細胞の FoxO1/3 (Thr<sup>24</sup>/Thr<sup>32</sup>) のリン酸化状態を検討した。(C) 3T3-L1 細胞を予め種々の濃度の MG で処理した後にインスリンで処理した際の aP2 の発現を、定量的 RT-PCR を用いて比較検討した。

## 考 察

2 型糖尿病患者において、肥大化した脂肪細胞から産生される遊離脂肪酸やマクロファージに由来する炎症性サイトカイン TNF  $\alpha$  は、JNK の活性化や IKK  $\beta$  といったシグナル伝達経路を介して IRS-1 の Ser 残基をリン酸化し、インスリンシグナル伝達を減弱させる<sup>5)</sup>。一方、糖尿病患者では恒常的に血中 MG レベルが亢進している<sup>7)</sup>。本研究で得られた結果から、空腹時の血糖値が低くインスリンが分泌されていないような状態でも血中の MG レベルが高いと、MG は mTORC1 を介して IRS-1 の Ser<sup>307</sup> のリン酸化を引き起こし、インスリン受容体と IRS-1 とのアフィニティーを低下させる。そのため、血糖値が上昇してインスリンが分泌されてもインスリンシグナルが適切に流れず、結果としてインスリン抵抗性が惹起されている可能性が考えられた。

## 共同研究者

本研究は、京都大学大学院農学研究科の野村亘博士と共同で行った。また、培養細胞に関連する研究設備の使用を快くお認めいただいた京都大学大学院農学研究科教授・河田照雄先生に感謝いたします。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Nomura W, Inoue Y. Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 2015;35(7):1269-1280. doi: 10.1128/MCB.01118-14. PMID: 25624345.

- 2) Durán RV, Hall MN. Regulation of TOR by small GTPases. *EMBO Reports* 2012;13(2):121-128. doi: 10.1038/embor.2011.257. PMID: 22240970.
- 3) Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell* 2014;156(4):771-785. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.049. PMID: 24529379.
- 4) Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017;45:72-82. doi: 10.1016/j.ceb.2017.02.012. PMID: 28411448.
- 5) Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation. Possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 2001;50(1):24-31. DOI: 10.2337/diabetes.50.1.24. PMID: 11147790.
- 6) Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, foxo and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2011;1813(11):1978–1986. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.010. PMID: 21440011.
- 7) McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin. Sci. (Lond)* 1994;87(1):21-29. DOI: 10.1042/cs0870021. PMID: 8062515.