

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分  
平成28年3月16日現在

インスリン受容体基質複合体の機能修飾を介した  
インスリン様活性制御法の開発

Development of methods to regulate abnormality of  
insulin-like activity by modulation of function of  
insulin receptor substrates-associated complex

課題番号：25221204

高橋 伸一郎 (SHIN-ICHIRO TAKAHASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授



研究の概要

動物の正常な生命活動に必須な同化ホルモン、インスリン／インスリン様成長因子の広範な生理活性の調節に、シグナル伝達分子であるインスリン受容体基質（IRS）に相互作用する多くのタンパク質やRNAが重要な役割を果たしていることを明らかにし、さらには、これらの相互作用を制御することにより種々の疾病の正常化が可能となることを示す。

研究分野：動物生命科学・動物生産科学

キーワード：代謝・内分泌制御、インスリン様活性

1. 研究開始当初の背景

動物の正常な生命活動に必須な同化ホルモン、インスリン（INS）／インスリン様成長因子（IGF）の広範な生理活性（インスリン様活性）は、これらのホルモンの受容体に内蔵されたチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化されるインスリン受容体基質（IRS）を介して発現される。何らかの理由でIRSを介したINS／IGF細胞内シグナル伝達（インスリン様シグナル系）が過度に抑制されると、糖尿病や成長遅滞、老化などが誘導・進行することが明らかになっている。反対に、シグナルが過剰に伝達されると、過成長・がん悪性化などが起こる。これらの疾病の予防法や治療法として、インスリン様シグナル伝達の初発段階である受容体キナーゼ活性の調節が試みられてきたが、インスリン様活性のすべてに影響を与え副作用が大きいため、他の手法の開発が急務である。

2. 研究の目的

我々は、IRSが多種類のタンパク質（IRSAPと命名）と相互作用して巨大なシグナル分子複合体（IRSomeと命名）を形成しており、他の細胞外因子の刺激や生体が置かれた生理状態に応答してIRSomeの構成タンパク質が変化することにより、INS／IGFシグナルやインスリン様活性が調節されていることを発見した。この独創性の高い研究成果を背景に、本研究では、INS／IGF抵抗性あるいは感受性増強を引き起こしているIRSAPを特定し、これらのIRSAPとIRSとの相互作用を阻害する低分子化合物を開発、

これらを用いてインスリン様活性の制御が可能であることを示すことを目的としている。

3. 研究の方法

種々のINS／IGF標的細胞よりIRSと共免疫沈降されるタンパク質のLC-MS/MS法を用いた網羅的解析やIRSをbaitに用いたyeast two-hybrid法などにより、IRSAPの同定を行った。続いて、同定されたIRSAPの中から、当該タンパク質を過剰発現・発現抑制した細胞系を用いてインスリン様活性の修飾に関連するIRSAPを特定した。次に、IRSAPとIRSの相互作用を阻害する低分子化合物を化合物ライブラリーよりスクリーニングした。インスリン様活性が抑制あるいは増強されている疾病モデル細胞などを、この化合物で処理、あるいはIRSと当該IRSAPの相互作用領域を過剰発現することにより、これらの相互作用を阻害し、インスリン様活性の異常が正常化するかを検討した。

4. これまでの成果

1) IRSAPの同定

INS／IGFの標的である種々の培養細胞や臓器から、主にIRS-1／IRS-2（IRSの4分子種のうち、前述の疾病に関与していることが明らかとなっている2分子）と相互作用するタンパク質の同定を進め、約50種類のタンパク質の同定に成功した。これらは機能的に、①IRSを介したインスリン様シグナル・活性を修飾するタンパク質、②IRSの寿命や品質を調節するタンパク質、③IRSの細胞内

局在を決定するタンパク質、④新機構で生理活性を発現するタンパク質などに分類された。

以下に、それぞれの機能ごとに検討を進めた分子の研究成果について概説する。

2) IRS を介したインスリン様シグナル・生理活性を修飾するタンパク質

GKAP42、DGK $\zeta$ 、53BP2S、14-3-3 や Nedd4、数種類のリン酸化・脱リン酸化酵素、アセチル化・脱アセチル化酵素などがこのグループに分類できる。特に、GKAP42、DGK $\zeta$ 、Nedd4 は、IRS との相互作用が変化すると、インスリン様活性も変動し、GKAP42 や DGK $\zeta$  は、脂肪細胞におけるインスリン依存性糖取り込み、Nedd4 は個体の成長やがん細胞の増殖などに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

3) IRS の寿命や品質を調節するタンパク質  
ユビキチンリガーゼである Cul7 や Mdm2、脱ユビキチン化酵素である USP7 や USP9X、シャペロン分子である HSP90 や gC1qR などが IRS と相互作用することがわかった。USP7 は IRS との相互作用を介してホルモン感受性を、USP9X はがん細胞の過増殖能・不死化能・浸潤能に寄与していることを発見した。

4) IRS の細胞内局在を決定するタンパク質  
タンパク質のソーティングに関わっている AP やタンパク質の核輸送を担っている importin  $\beta$  などが IRS と相互作用し、IRS の細胞内局在が決められていることが明らかとなった。一般に IRS は細胞膜近傍で受容体キナーゼによりチロシンリン酸化されインスリン様シグナルを伝達していると考えられているが、AP1 によってエンドソームに輸送された IRS-1 はエンドソーム近傍で増殖誘導を引き起こすシグナル伝達に関わる、以前報告したように importin  $\beta$  と相互作用し核に輸送された IRS-3 は転写活性に影響を与えるなどの機能を発揮していた。この研究過程で行った X 線結晶解析から、IRS の C 末端領域は天然変性タンパク質であり他のタンパク質と相互作用することにより高次構造が決まることが明らかとなった。

5) 新機構で生理活性を発現するタンパク質  
IRS-1 は PABPC1、G3BP1 や PRMT5 といった RNA 機能制御タンパク質に相互作用する他、U96A snoRNA や rRNA などにも相互作用し、タンパク質合成能などの調節に寄与しているという新しい機能を発見した。IRSome の形成には RNA の存在が重要であることもわかった。一方、IRS-2 はこのような性質は持ちあわせておらず、IRS-1 と IRS-2 の機能の差異も明らかとなった。

## 5. 今後の計画

ここまで述べてきたように、我々の研究成果により、IRS は多くのタンパク質や RNA

と、INS/IGF 刺激非依存的 (IRS のチロシンリン酸化非依存的) に相互作用し、これらの相互作用がインスリン様活性を修飾する、あるいは新しい機構で生理活性発現を仲介するという概念を証明することができた。これは、本研究の当初の目的を達成したといえる。

既にいくつかの IRSAP と IRS の相互作用を阻害する低分子化合物のスクリーニングに成功しているが、今後、ハイスループットスクリーニング法を導入し、我々が注目している他の IRSAP についても相互作用を阻害する低分子化合物のスクリーニング、最適化を続ける。そして、IRSAP をノックアウトした動物や、IRS と IRSAP の相互作用を阻害するような領域を高発現する動物、あるいは動物に IRS と IRSAP の相互作用を阻害する低分子化合物などを投与し、INS/IGF 活性の異常が正常化することを示す予定である。

このような研究を通して、細胞・個体レベルで、INS/IGF 抵抗性や感受性増加の原因となっている特定の IRSAP と IRS との相互作用を阻害することにより、インスリン様活性が正常化し、インスリン様シグナル伝達の異常が原因となっている糖尿病やがんなどの種々の疾病の新しい予防法や治療法の開発の基盤を構築したいと考えている。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Hakuno F, Fukushima T, Yoneyama Y,

Kamei H, Ozoe A, Yoshihara H, Yamanaka D, Shibano T, Sone-Yonezawa M, Yu BC, Chida K, \*Takahashi S-I. 2015 The novel functions of

high-molecular-mass complexes containing IRSs in mediation and modulation of insulin-like activities: Emerging concept of diverse functions by IRS-associated proteins. *Frontiers in Endocrinology* 6,

DOI:10.3389/fendo.2015.00073

Fukushima T, Yoshihara H, Furuta H, Kamei H, Hakuno F, Luan J, Duan C, Saeki Y, Tanaka K, Iemura S, Natsume T, Chida K, Nakatsu Y, Kamata H, Asano T, \*Takahashi S-I.

Nedd4-induced monoubiquitination of IRS-2 enhances IGF signalling and mitogenic activity. *Nat Commun.* 2015, 6:6780. doi: 10.1038/ncomms7780.

(他 23 報)

ホームページ等

<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/lab/shingroup/index.html>