

氏名(本籍)	石 琨(中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第487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17年3月25日
学位論文題目	Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Associates with Insulin Receptor and Negatively Regulates Insulin Signaling without Receptor Internalization  (チロシンホスファターゼ1B(PTP1B)はインスリン受容体の細胞内へのインターナライゼーションを要せずインスリン受容体と結合し、インスリン情報伝達を負に調節する)
審査委員	主査 教授 大久保 岩男 副査 教授 木村 隆英 副査 教授 木村 博

## 論文内容要旨

※整理番号	491	(ふりがな) 氏 名	石 琨
学位論文題目	Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Associates with Insulin Receptor and Negatively Regulates Insulin Signaling without Receptor Internalization (チロシンホスファターゼ 1B(PTP1B)はインスリン受容体の細胞内へのインターナリゼーションを要せずインスリン受容体と結合し、インスリン情報伝達を負に調節する)		
<p><b>【背景と目的】</b> 近年チロシン残基の脱リン酸化を触媒するチロシンホスファターゼの活性亢進とインスリン抵抗性の連関が報告されている。インスリン情報伝達においてシグナル蛋白のリン酸化と細胞内局在の変化が重要であると考えられる。最近、血小板由来成長因子(PDGF)の受容体が細胞内へインターナリゼーションして、小胞体に局在するチロシンホスファターゼ 1B (PTP1B) により、脱リン酸化されることが報告された。しかし、インスリン情報伝達において、PTP1B によりインスリン受容体がどのように脱リン酸化されるかについては、十分解明されていない。そこでインスリン受容体の PTP1B による脱リン酸化の分子機構を明らかにするために、以下の実験を行った。</p> <p><b>【方法】</b> 1) アデノウィルスを用いてインスリン標的臓器のモデルである 3T3-L1 脂肪細胞にホスファターゼ活性欠失変異体 PTP1B (PTP1BC/S) を過剰発現させ、PDGF とインスリン情報伝達における各受容体と PTP1BC/S の結合の time course について免疫沈降法にて検討した。2) 受容体の細胞内へのインターナリゼーションの抑制剤である Dansylcadaverine(DC)がインスリン受容体の細胞内へのインターナリゼーションを遮断するか否か、さらに DC の各受容体と PTP1BC/S の結合に対する影響を検討した。3) アデノウィルスを用いて野生型 PTP1B を過剰発現させ、PTP1B によるインスリン受容体の脱リン酸化における DC 前孵置の影響をウエスタンブロット(WB)法で検討した。4) アデノウィルスを用いて野生型 (WT) 及び C 末端欠失細胞質型 (delta-CT) PTP1B を過剰発現させ、その発現量を WB 法で、細胞内局在を膜分画法と免疫蛍光染色法にて、活性をリン酸パラニトロフェニルを基質として測定した。5) インスリン情報伝達系への影響を調べるため、インスリン受容体、IRS-1 のリン酸化についてリン酸化抗体を用いた WB 法で検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

6) 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリンの糖取り込み促進作用を 2-deoxyglucose を用いて測定した。

**【結果】** 1) アデノウィルスを用いて 3T3-L1 脂肪細胞に蛋白レベルで約 8 倍の PTP1B/S の発現増加を確認した。インスリン刺激による PTP1B とインスリン受容体の結合は 5 分でピークになり、PDGF 刺激下では PTP1B と PDGF 受容体の結合のピーク時間は 30 分であった。2) DC は 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリン受容体の細胞内へのインターナリゼイションを 80% 遮断し、さらにインスリン受容体の細胞内へのインターナリゼイションを要する Shc 蛋白のリン酸化を抑制した。DC 前孵置により PDGF 受容体と PTP1B の結合は抑制されたが、インスリン受容体との結合は影響されなかった。3) DC 前孵置は PTP1B によるインスリン受容体の脱リン酸化には影響しなかった。4) 膜分画法と免疫蛍光染色法にて WT が主に小胞体に、delta-CT が細胞質に局在することを確認し、さらにインスリン刺激により WT、delta-CT 蛋白の一部が細胞膜へ移行することを認めた。5) delta-CT は WT に比しその活性がより高かったものの、インスリン情報伝達において delta-CT は WT と同程度にインスリン刺激による受容体及び IRS-1 のリン酸化を約 50% 抑制した。6) WT、delta-CT 過剰発現は対照に比べて糖取り込みを同程度に抑制した。

**【考察】** PDGF 受容体と PTP1B の結合のピーク時間はインスリン受容体の場合と違うことより、PTP1B によるインスリン受容体の脱リン酸化の分子機構が PDGF 受容体と異なる可能性が示唆された。細胞質内へのインターナリゼイションを抑制しても、インスリン受容体と PTP1B の結合は抑制されないこと、さらに、細胞内局在変異型 PTP1B は野生型 PTP1B と同程度にインスリン受容体を脱リン酸化し、インスリン情報伝達を抑制することより、PTP1B は小胞体表面や細胞質内ではなく、細胞膜でインスリン受容体と結合し、インスリン情報伝達を負に調節していると考えられた。

**【結論】** PTP1B はインスリン受容体の細胞内へのインターナリゼイションを要せず、インスリン刺激により細胞膜に移行し、インスリン受容体と結合し、インスリン情報伝達を負に調節することが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	491	氏名	石 琨
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>インスリン抵抗性発症の分子機構の一つとして、チロシン残基の脱リン酸化を触媒するチロシンホスファターゼの活性亢進が考えられている。本研究は、3T3-L1 脂肪細胞を用いて、血小板由来成長因子 (PDGF) 及びインスリン情報伝達系における各受容体とチロシンホスファターゼ 1 B (PTP1B) の結合の time course を検討し、更に受容体の細胞内へのインターナリゼーションの遮断がその結合へどのように影響するか、また C 末端欠失による細胞質局在変異型 PTP1B のインスリンシグナル伝達への影響とその分子機構について検討したものである。</p> <p>その結果、脂肪細胞においてはインスリン受容体と PTP1B の結合は PDGF 受容体と異なり、必ずしも受容体のインターナリゼーションが必要ではないこと、PTP1B の細胞膜近傍への移行が PTP1B によるインスリン情報伝達の抑制作用に重要であることが明らかになった。</p> <p>このように本論文は脂肪細胞における PTP1B によるインスリン受容体の脱リン酸化の分子機構を解明したものであり、博士 (医学) の学位論文に値するものと認める。</p>			
(平成 17 年 2 月 8 日)			