

熱ショックによるインスリン受容体自己リン酸化抑制の機序

長坂祐二

Heat Shock Inhibits Autophosphorylation of Insulin Receptor at the Postbinding Level in Rat Hepatoma H4II Cells

Yuji NAGASAKA

Summary

Effects of heat shock on insulin signal transduction were examined using rat hepatoma H4EII(H4) cells. Exposure of cells to 45°C for 10 min moderately activated ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase), whereas strongly inhibit insulin-stimulated ERK activation and insulin-stimulated autophosphorylation of the insulin receptor. The response to insulin were partially restored at 4 h of the incubation at 37°C after heat shock. Number of insulin receptors on the surface of H4 cells gradually decreased after heat shock and become 50% of the control cells at 4h of the incubation at 37°C after heat shock. The inhibition of insulin-stimulated ERK activation was well correlated with a defect of autophosphorylation of the insulin receptor, but not with the decrease in the receptor number. Heat shock did not interfered with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)-stimulated ERK activation. Increased intracellular cAMP concentration inhibits heat shock-induced ERK activation, but had no effects on heat shocked decrease in insulin-stimulated autophosphorylation of the insulin receptor. These results show that heat shock directly interferes with insulin signaling through the inhibition of autophosphorylation of the insulin receptor at the postbinding level.

1. 緒言

MAP (Mitogen-activated preotein) キナーゼ・ファミリーは細胞外の刺激を細胞内に伝達する主要なシグナル伝達経路を構成するタンパク質リン酸化酵素である⁽¹⁾。MAP キナーゼ・ファミリーには少なくとも3つのサブファミリー (ERK、JNK、p38MAPK) があるが、1つのアミノ酸をはさんで並ぶスレオニンとチロシンの2つのアミノ酸がリン酸化されることにより活性化するという共通の特徴を有する⁽²⁾。ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase) は種々の成長因子によって活性化される。多くの成長因子受容体の細胞内ドメインにはチロシンのリン酸化部位があり、成長因子が結合することにより受容体の自己リン酸化がおきる。その結果 Ras 依存性の細胞内シグナル伝達経路が活性化され、ERK を含むリン酸化カスケードを介してシグナルが核に伝達されて細胞分裂が起きる。JNK (Jun N-terminal kinase) と p38MAPK (p38 mitogen-activated preotein kinase) は炎症性サ

イトカインや紫外線、放射線、熱ショック、浸透圧など種々のストレスにより活性化され、細胞障害やアポトーシスに関与することが知られている^(3, 4)。

熱ショックに暴露された細胞は一連の HSPs (Heat shock proteins) の産生が促進される。HSPs のうち、Small HSP は熱ショックによりセリン残基がリン酸化されて、熱ショックに対する細胞の防御反応に重要な役割を果たすと考えられている⁽⁵⁾。ERK によって活性化される MAPKAP キナーゼ2 (MAP kinase-activated kinase 2) は Small HSP を基質にすることが知られている⁽⁶⁾。インスリンも熱ショックも、ともに ERK を活性化するが、熱ショックはインスリンによる細胞増殖作用を強く抑制することが知られている⁽⁷⁾。異なる刺激が同じ ERK によるシグナル伝達経路を活性化し、異なる作用を呈するメカニズムは不明である。この研究では、マウス肝癌細胞由来の培養細胞を用いて、熱ショックがインスリン受容体のインスリン結合、インスリン受容体の自己リン酸化、ERK 活性に与える影響

を調べることにより、熱ショックがインスリンのシグナル伝達を抑制するメカニズムについて検討した。

2. 材料と方法

2-1. 細胞培養と熱ショック処理

マウス肝癌細胞由来の H4細胞は 5% 牛胎児血清、5% 馬血清を含む Swims's-77 培地により、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。実験 4 時間前に培地を Krebs-Ringer-Hepes 緩衝液 (pH7.4、0.1% 牛血清アルブミンを含む) に交換した。熱ショックは培養ディッシュを 45℃ の恒温槽に 10 分間浸すことにより与えた。熱ショック後、培養ディッシュは 37℃ インキュベーターに戻し、さらに 4 時間インキュベーションを続けた。

2-2. ERK の部分精製と活性測定

インキュベーション終了後、細胞は 0.8ml の緩衝液 A (25mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5、25mM NaCl、40mM p-nitrophenylphosphate、1mM sodium orthovanadate、2mM EGTA、1mM dithiothreitol、0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride) に浮遊させ、氷上にて超音波破碎した。続いて、20,000G、5 分間遠心した後、上清を直ちに 0.2ml の phenyl-Sepharose と混合し、緩衝液 A で 1 回洗浄した。ERK の溶出は 0.2ml の 10%、30%、45% ethylene glycol を含む緩衝液 A で続けて行い、45% ethylene glycol で溶出した分画を部分精製 ERK とした⁽⁸⁾。

ERK の活性測定は既報に従い⁽⁸⁾、myeline basic protein を基質として測定した。

2-3. インスリン受容体の部分精製と In Vitro での自己リン酸化

インキュベーション終了後、細胞は緩衝液 B (50mM HEPES 緩衝液、pH7.4、1% Triton X-100、100mM NaF、10mM sodium pyrophosphate、5mM EDTA、1mM EGTA、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1g/ml leupeptine) で溶解した。続いて、20,000G、10 分間遠心した後、上清を直ちに 0.2mL の wheat germ agglutinin-Sepharose と混合し、緩衝液 B で 5 回洗浄した。インスリン受容体の溶出は 0.2mL の 0.3M N-acetyl-D-glucosamine で行った。

部分精製したインスリン受容体は 10⁻⁷M インスリンと氷上で 1 時間 プリ・インキュベーションした後、[γ-³²P] ATP (10μM) と 2mM MnCl₂ を加え、22℃、10 分間インキュベーションした。反応は SDS-PAGE サンプル緩衝液を加えることにより停止し、直ちに SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法) でタンパク質を分離し、オートラジオグ

ラフィーでインスリン受容体に自己リン酸化を同定した⁽⁸⁾。

2-4. 細胞表面へのインスリン結合の測定

インキュベーション終了後、4℃ のリン酸緩衝液を含む生理食塩水を培養ディッシュに加えて細胞を洗浄した。続いて、¹²⁵I-インスリン (27,000cpm) とラベルをしていない種々の濃度のインスリンを含む Krebs-Ringer-HEPES 緩衝液を加えて 4 時間氷上でインキュベーションした。その後、0.5ml の 0.1% SDS で溶解して、γ-カウンターで測定した。特異的結合はラベルをしていない 10⁻⁶M インスリン存在下での結合を引くことにより求めた。

3. 結果

3-1. インスリンおよび PMA による ERK 活性化に対する熱ショックの効果 (図 1)

培養ディッシュ内の細胞数およびトリパンブルー染色による細胞の Viability はインキュベーション前後で変化はなかった。熱ショックを加えていないコントロールの細胞では、10⁻⁷M インスリンを 3 分間作用させることにより、ERK 活性は 7 倍に増加した。ERK 活性は熱ショック処理自体により活性化し、45℃、10 分間の熱ショック直後で約 3 倍に、30 分後で約 5 倍に達し、4 時間後ではコントロールと同等まで低下した。熱ショック直後および 30 分後

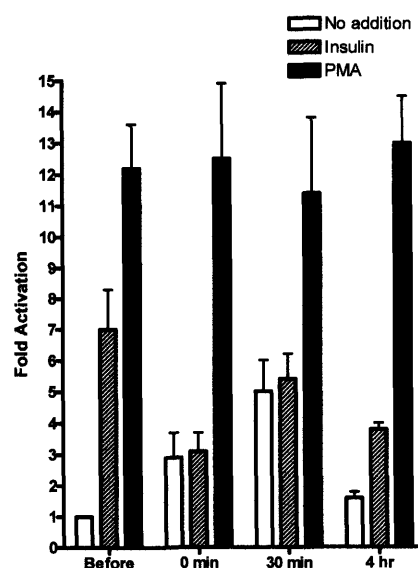


図 1 インスリンおよび PMA による ERK 活性化に対する熱ショックの効果

細胞は 45℃、10 分間の熱ショックを与えた後、37℃ に戻した。熱ショック前、熱ショック直後、30 分後、4 時間後に 10⁻⁷M インスリンまたは 10⁻⁶M PMA で 3 分間刺激し、ERK を部分精製してから ERK 活性を測定した。

の細胞はインスリンを加えても、インスリンによる ERK の活性化は認められなかった。しかし、熱ショック4時間後にはインスリンに対する反応性が部分的に回復した。一方、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) は熱ショックの有無に関わらず ERK を著明 (10倍以上) に活性化した。

3-2. H4細胞へのインスリン結合に対する熱ショックの効果 (図2)

熱ショックは細胞表面のインスリン受容体数を減少させることが報告されている⁹⁾。そこで、熱ショックがインスリンによる ERK 活性化を抑制する機序として、受容体数の減少が主要な原因であるかどうかを確かめるために H4細胞へのインスリン結合の測定を行った。インスリン結合は熱ショック直後にはコントロールの細胞をほとんど変化ないが、その後徐々に減少し、4時間後にはコントロールの約50%になった。Scatchard 分析の結果、インスリン結合の減少は、インスリン受容体のインスリンに対する親和性の低下ではなく、細胞表面に存在する受容体数の減少が示唆された。以上の結果から、ERK 活性化抑制の時間経過とインスリン受容体数減少の時間経過には乖離があり、熱ショックによるインスリン受容体数の減少で ERK 活性化の抑制を説明できないことが明らかになった。

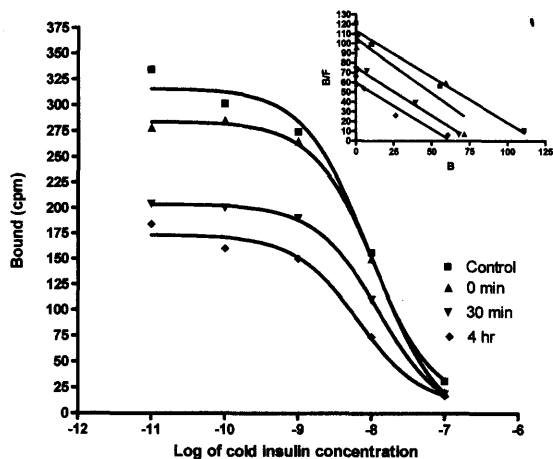


図2 H4細胞へのインスリン結合に対する熱ショックの効果

細胞は45°C、10分間の熱ショックを与えた後、37°Cに戻した。熱ショック前、熱ショック直後、30分後、4時間後にインスリン結合を測定した。

3-3. インスリン受容体の自己リン酸化に対する熱ショックの効果 (図3)

部分精製したインスリン受容体の自己リン酸化は、熱ショック直後には著明に低下するが、37°Cに戻して4時間後には部分的に回復し、インスリンによる

ERK 活性化の時間経過と一致した。このことは、熱ショックがインスリンによる ERK 活性化を抑制する機序として、インスリン受容体の自己リン酸化の抑制が主要な原因であることを示唆している。

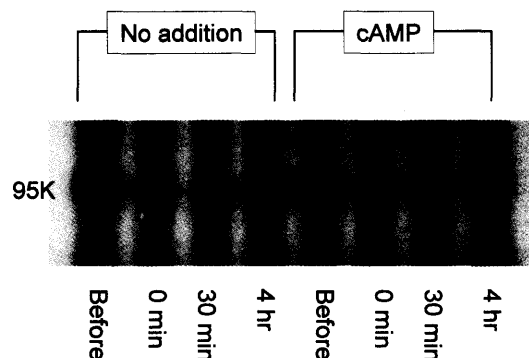


図3 インスリン受容体の自己リン酸化に対する cAMP の効果

熱ショックを与える10分前に、細胞に0.1mM 8-CTP-cAMPを作用させた。その後、45°C、10分間の熱ショックを与えた後、37°Cに戻した。熱ショック前、熱ショック直後、30分後、4時間後にインスリン受容体を部分精製して受容体自己リン酸化を測定した。

3-4. 熱ショックによる ERK 活性化およびインスリン受容体リン酸化に対する cAMP の効果 (図3、4)

インスリン受容体はセリン・スレオニン残基のリン酸化によりチロシンの自己リン酸化が抑制される

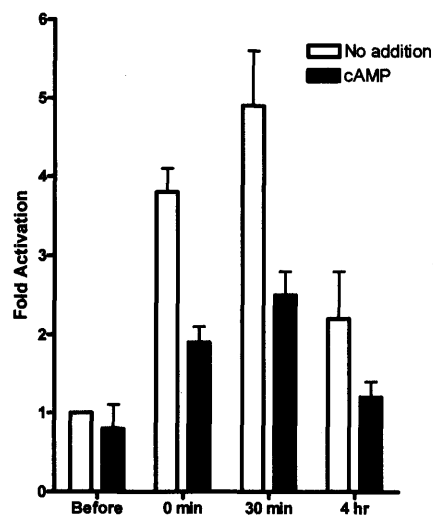


図4 熱ショックによる ERK 活性化に対する cAMP の効果

熱ショックを与える10分前に、細胞に0.1mM 8-CTP-cAMPを作用させた。その後、45°C、10分間の熱ショックを与えた後、37°Cに戻した。熱ショック前、熱ショック直後、30分後、4時間後に ERK を部分精製して ERK 活性を測定した。

ことが知られている⁽¹⁰⁾。熱ショック自体による ERK 活性化がインスリン受容体をリン酸化してインスリンによる自己リン酸化を抑制している可能性を検討するために、cAMP 刺激を利用して、熱ショック自体による ERK 活性化を抑制する実験を行った。cAMP 刺激として細胞膜を自由に通過する8-CPT-cAMP(8(4-chlorophenyl-thio)cAMP)を使用した。8-CPT-cAMP 自体はインスリン受容体の自己リン酸化に影響しなかった。8-CRP-cAMP は熱ショックによる ERK 活性化を約50%抑制した(図4)。しかし、8-CRT-cAMP は熱ショックによるインスリン受容体自己リン酸化の時間経過に影響しなかった(図3)。

4. 考察

熱ショックによる細胞増殖の抑制、細胞死の誘導は癌の温熱療法として利用されている。これまでに、43~45℃の熱ショックは細胞のインスリン受容体のインスリンに対する親和性ではなく、受容体数を減少させることにより、細胞の増殖能を障害して、最終的に細胞死を引き起こすとする仮説が報告されている^(7,9)。今回の結果においても、熱ショックはインスリン受容体数を徐々に減少させ、熱ショック後4時間でコントロールの50%に減少した。しかし、インスリンによる ERK 活性化およびインスリン受容体の自己リン酸化は熱ショック直後にもっとも強く抑制され、4時間後には部分的に回復した。インスリン受容体の自己リン酸化と ERK 活性化はインスリンの細胞増殖作用を核に伝達する細胞内シグナル伝達機構の主要部分である。よって、熱ショックによるインスリンの細胞増殖抑制作用の機序として、インスリン受容体数の減少ではなく、インスリン結合後の細胞内シグナル伝達の障害が主要な原因であることが示唆された。

ERK は MEK (MAP キナーゼ/ERK キナーゼ) によってリン酸化されることにより活性化する⁽¹⁾。MEK は Raf-1 や MEK キナーゼによってリン酸化されることにより活性化する。インスリン受容体から ERK 活性化に至るシグナルは、インスリン受容体の自己リン酸化、IRS-1 のチロシンリン酸化、Grb2/Sos1 とのタンパク質-タンパク質相互作用、Ras 活性化、Raf-1 活性化、MEK 活性化を経由して伝達される^(11,12)。プロテイン・キナーゼ C のアクチベーターである PMA も ERK を活性化するが、PMA のシグナル伝達経路は Raf-1 および MEK キナーゼのレベルでインスリンのシグナル伝達経路と合流する⁽¹³⁾。今回の実験では、熱ショックは PMA による ERK 活性化に影響を与えないことから、熱ショックを受けた細胞においても Raf-1 以降のリン酸化カスケードは正常に動作していることがわかる。

以上の結果より、熱ショックがインスリンによる ERK 活性化を抑制する機序として、インスリンがインスリン受容体に結合して、インスリン受容体に自己リン酸化起きるまでの過程に異常が存在すると考えられる。

インスリン受容体の自己リン酸化の抑制は、部分精製した受容体でも認められることから、受容体が存在する細胞膜の異常よりも、受容体自体の異常が示唆される。インスリン受容体の自己リン酸化が抑制される機序としてインスリン受容体のセリン・スレオニン残基のリン酸化が知られており⁽¹⁰⁾、熱ショック自体による ERK 活性化がインスリン受容体のセリン・スレオニンのリン酸化を促進してインスリン受容体の自己リン酸化を抑制する機序が推定されたが、今回の結果より、cAMP により熱ショックによる ERK 活性化を約50%抑制しても熱ショックの効果に影響を与えなかったことから熱ショックによる ERK 活性化はインスリン受容体の自己リン酸化抑制とは関係しないと考えられた。

5. 謝辞

本研究の遂行に際してご助言・ご協力いただいた、山口大学医学部中村和行教授に感謝いたします。

参考文献

1. Cano, E., and Mahadevan, L.C. (1995) *Trend. Biochem. Sci.* 20, 117-122
2. Cambell, L.S., Seger, R., Graves, J.D., Graves, L.M., Jensen, A.M., and Krebs, E.G. (1995) *Recent. Prog. Horm. Res.* 50, 131-159
3. Derijard, B., Hibi, M., Wu, I., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994) *Cell* 76, 1025-1037
4. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (1994) *Cell* 78, 1027-1037
5. Arrigo, A.P., and Landry, J. (1994) in *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperone.* (Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. Ed)
6. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., Gaestel, M. (1992) *FEBS lett.* 313, 307-313
7. Lin, P.P., and Hahn, G.M. (1988) *Radiol. Res.* 113, 501-512
8. Nagasaka, Y., Kaku, K., Nakamura, K., and Kaneko, T. (1994) *Biochem. Biophys. Commun. Res.* 202, 1104-1112
9. Colderwood, S.K., and Hahn, G.M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 756, 1-8

10. Roth, R.A., and Beaudoin, S. (1987) *Diabetes* 36, 123-126
11. Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lec, C.H., Lowenstein, E., Mohammudi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993) *Science* 260, 1953-1955
12. Baltensperger, K, Kozwa, L.M., Cherniack, A.D., Klarlund, J.K., Chawla, A., Banerjee, U., and Czench, M.P. (1993) *Science* 260, 1950-1952
13. VanRentergham, B., Browning, M.D., and Maller J.L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24666-24672

