

ベオリン (カベオリン-1, -2, -3) がクローニングされている 5, 6). 細胞にカベオリンを過剰発現すると特徴的な陥凹構造を持つカベオラが細胞膜上に形成されることから、カベオリンがカベオラの主要な構成蛋白であると考えられている。カベオリン-1 と-3 はアミノ酸配列の相同性が高く、細胞内シグナルにおける機能も類似しているものの、この二つのサブタイプのカベオリンは組織分布が全く異なっている。カベオリン-1 は主に、内皮細胞、線維芽細胞、脂肪細胞などに発現しているが、カベオリン-3 は骨格筋細胞や心筋細胞、平滑筋細胞などの筋組織にのみ発現を認める。なお、カベオリン-2 はカベオリン-1 と共発現しているものの、細胞内シグナルにおける機能はほとんど分かっていない。

2. カベオラ、ラフトへのシグナル伝達分子の局在

これまでの研究から、細胞内シグナル関連分子の多くがカベオラ内に局在することが分かってきている 7). G 蛋白共役型受容体, 3 量体 G 蛋白質,

Ras, NOS, アデニル酸シクラーゼ, プロテインキナーゼ C などの蛋白のカベオラ内への集積についての報告がある。これらの分子のカベオラへの局在は一般的に、シヨ糖密度勾配による低密度分画への回収や界面活性剤への難溶性で証明されるが、電子顕微鏡や免疫染色など形態学的にも証明された分子もある。シヨ糖密度勾配による精製で回収したカベオラ分画には細胞を構成する全蛋白質の数パーセントの量しか含まないが、このわずかな分画にカベオリンや上述したシグナル伝達分子が集合している。そのことから、カベオリンが様々なシグナル伝達分子の scaffold 蛋白として働く可能性が示唆された 8,9)。すなわち、関連した蛋白がある特定のドメインに集合することにより、シグナル伝達の連鎖の効率を高めているものと考えられている。一方、細胞にはラフトと呼ばれるカベオラと近い性質を持つ細胞内ドメインが存在する。ラフトはカベオラと同様にコレステロールなどの低密度の脂質が集中する細胞膜ドメインであるが、カベオリンの発

現がみられず、細胞膜の陥凹構造も持たない。このラフトにも様々なシグナル伝達分子が集中することが知られており、カベオラ、ラフト自身がシグナル伝達分子の集合に関与しているものと思われる。

3. カベオリンによるシグナル調節機構

前にも述べたように、カベオリンは scaffold 蛋白として働くだけでなく、カベオリンそのものが種々のシグナル伝達分子を調節する作用を持っている。その調節部位はカベオリンの **scaffolding domain** と呼ばれる配列であり、この部位が直接酵素などと相互作用することにより、活性を抑制することが知られており、G 蛋白質、アデニル酸シクラーゼ、NOS、PKC など、その報告がある (7, 10-12)。

4. カベオリンとインスリンシグナル

カベオリンは一般的に多くのシグナルを抑制することは既に述べたが、カベオリンと相互作用するためには

特異的なアミノ酸配列が必要となる。すなわち、 $\phi X\phi XXXX\phi$ あるいは $\phi XXXX\phi XX\phi$ (ϕ : 芳香族アミノ酸) という配列であり、インスリン受容体 β サブユニットにも存在する (WSFVVLW, 1193-1200)。この特異的な配列を持つ蛋白はカベオラに存在することが予想されるが、インスリン受容体もまたカベオラに存在し、カベオリンと相互作用することが複数の研究グループから細胞分画法、電子顕微鏡などの方法により報告された (4,13,14)。当初は他のシグナルと同様カベオリンはインスリンシグナルに対する負の調節機能を持つものと予想されたが、我々の研究グループから予想外の結果が報告され、他の複数のグループからも同様の報告がなされた (4)。すなわち、カベオリン **scaffolding domain** の精製ペプチドと精製インスリン受容体キナーゼドメイン、それにインスリン受容体基質 (IRS) を用いた *in vitro* の系において、カベオリン **scaffolding domain** のペプチドがその濃度依存的にインスリン受容体のキナーゼ活性を上昇さ

せることを明らかにした (図1) 4). この現象は, HEK293T にカベオリンを過剰発現した際にも認められた. つまり, 一般的にシグナル抑制作用を持つカベオリンが, インスリンシグナルにおいては例外的に促進的に働くことが示されたのである. なお, これらの結果ではカベオリン-1および3に促進作用を認め, カベオリン-2はそのような作用を持たなかった. また, カベオリン-1 と比べ, カベオリン-3 の促進作用の方が強力であった.

5. カベオリン-3 ノックアウトマウスにおける糖代謝異常

そこで次に, 我々はカベオリン-3 の欠損マウス (Cav3KO) を用いて, *in vivo* におけるカベオリン-3 のインスリンシグナル調節機構を検討した (15). カベオリン-3 は筋組織特異的に発現を認めるサブタイプであり, 骨格筋はインスリンの主要な標的臓器であるため, Cav3KO では骨格筋でのインスリンシグナルの活性抑制を介してインスリン抵抗性を呈しているものと予想された. 実際, Cav3KO では, イ

ンスリンシグナルを構成する各分子 (IR, IRS-1, Akt) の骨格筋における発現に変化はみられなかったが, インスリン刺激後の IR, IRS-1 Akt のリン酸化は著明に低下していた (図2).

また, 骨格筋への糖取り込みは Cav3KO で有意に減少しており, 糖負荷試験で野生型と比べて Cav3KO で有意に血糖の上昇を認めた (図3A). 同時に測定した血清インスリン値は両者のマウスで変化はなく, 血糖値の上昇は骨格筋への糖の取り込み低下によるものと考えられた. さらに, ストレプトゾトシンという膵β細胞毒性物質を少量投与したところ, Cav3KO は野生型よりも激しい高血糖を呈した (図3B).

このことは, Cav3KO が糖尿病に対するリスクファクターに対して脆弱となっていることを示唆している. また, Cav3KO は血清中性脂肪, 遊離脂肪酸, 総コレステロールが上昇しており, 脂質代謝異常も合併していた (図4).

これらの結果から Cav3KO ではいわ

ゆるインスリン抵抗性の病態を示しているものと考えられた。興味深いことに、Cav3KO に対してアデノウイルスを用いてカベオリン-3 を骨格筋に遺伝子導入すると、インスリンシグナルがある程度改善することも明らかとなった (図5)。

これらの研究結果により、カベオリンによるインスリンシグナル増強作用が *in vivo* でも証明されたのと同時に、カベオリン-3 の生体内での糖代謝における役割が初めて明らかとなった。この Cav3KO における糖代謝異常は、骨格筋特異的なインスリン受容体ノックアウトマウスでみられる表現型と類似しているものである (16,17)。すなわち、骨格筋での糖取り込み能低下によりインスリン抵抗性を生じるが、その症状、特徴は Cav3KO とほぼ同様で同程度であった。インスリンシグナルにおいて、最も中心的なシグナルであるインスリン受容体の欠損と同程度の症状を Cav3KO でも起こし得ることは、糖代謝においてカベオリンがいかに重要な因子であるかという

ことを示唆している。

近年、カベオリン-1 ノックアウトマウス(Cav1KO)についての報告もされており (18)、脂肪組織の絶対的な減少とともに脂肪細胞でのインスリン受容体の発現量が著明に(90%以上)減少することにより、インスリン抵抗性を示すことが示されている。この報告ではカベオリン-1 がインスリン受容体の蛋白の安定性に関与することを示しており、カベオリンの欠損状態ではインスリン受容体の不安定性が上昇することによりインスリン受容体の発現量が著しく減少すると考えられる。Cav3KO ではインスリン受容体をはじめとするインスリンシグナル関連分子の発現および細胞内局在に変化はみられず、カベオリン-1 とカベオリン-3 の機能はインスリンシグナルの増強効果という点では一致しているものの、その作用機序は多少異なっている可能性がある。また近年、グルコーストランスポーター4(GLUT4)のインスリン刺激による細胞膜へのトランスロケーションにカベオリン-3 が関与しているとの報告 (19)や、イン

スリンシグナルの負の制御因子である PTP1B などの脱リン酸化酵素とカベオリンの相互作用の報告 (20,21) もある。カベオラ/ラフトにおけるインスリンシグナルについて、現在までに明らかになっている機序を図 6 に示す。このように、カベオリンによるインスリンシグナル調節機序はまだ不明な点が多く、検討すべき課題は多いといえる。

6. カベオリン-3 による糖尿病遺伝子治療

我々は現在、カベオリンを用いた糖尿病の新規治療への可能性を検討している。内因性にカベオリンの発現をほとんど認めない肝組織においてカベオリン遺伝子を導入して過剰発現させることにより、肝組織における糖代謝の改善を認めることを確認し、昨年論文が受理された。この研究では、2 型糖尿病を発症した肥満マウスに対して、カベオリン 3 の遺伝子をアデ

ノウイルスを用いて導入することにより、血糖値の低下作用、肝臓での糖代謝の改善作用を示した。この研究はカベオリンが糖尿病に対する新規の治療薬としての可能性を示唆するものであった。この研究では PTP1B がカベオリンによる調節を受けてインスリンシグナルを制御していることが明らかになった(22)。また最近我々は、血管内皮細胞において、カベオリンにおける PTP1B の活性調節機構にはカベオラにおける活性酸素が関与していることを報告した(23)。この報告では、カベオラで局所的に産生された活性酸素により PTP1B のシステイン残基が酸化状態(Cys-OH)となり、PTP1B の活性が低下することを示した。この結果は骨格筋細胞や肝細胞、脂肪細胞におけるインスリンシグナルにも応用できる可能性があると考えている。なお現在はより実際の治療の実用化に向け、ペプチドによる治療を目指した研究も進行中である。

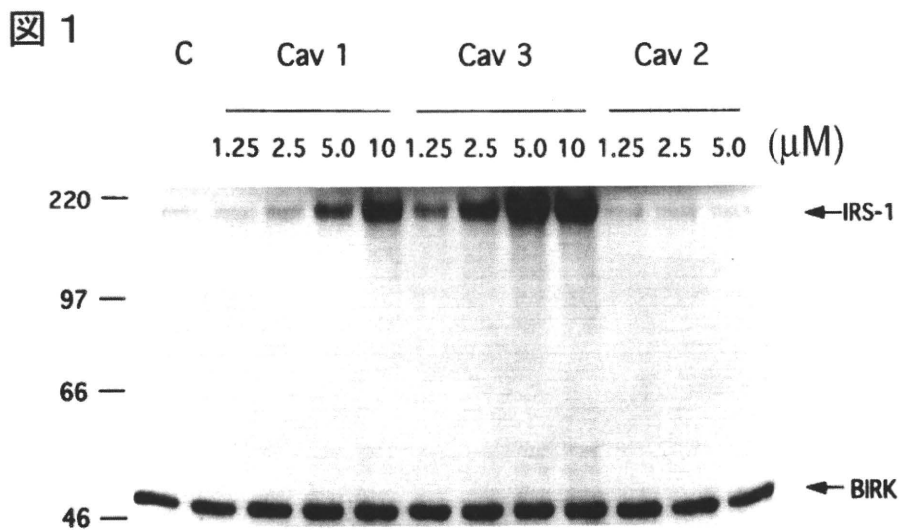
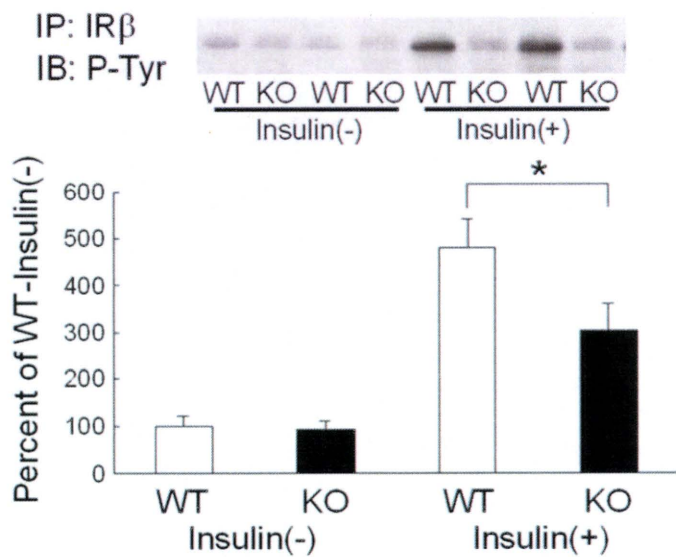
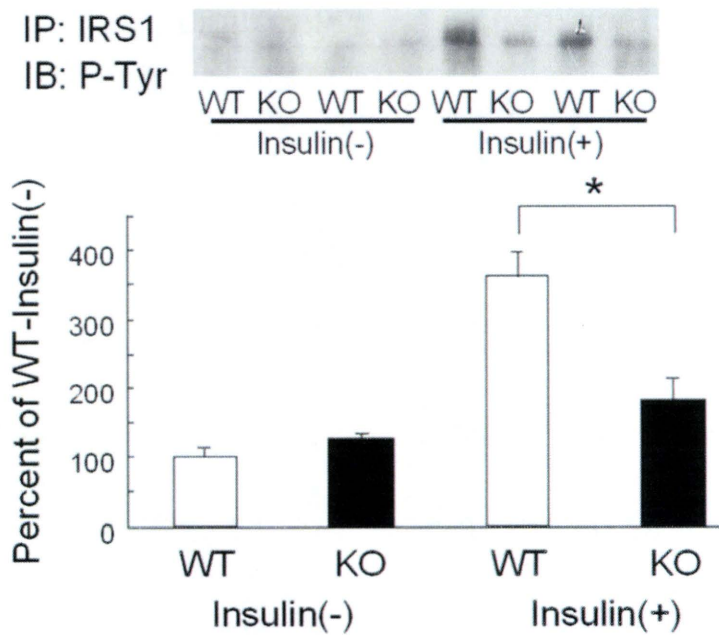


図 1, カベオリン由来ペプチドによる IRS-1 リン酸化の増強
 インスリン受容体キナーゼ (*BIRK*) を各種カベオリン由来ペプチド存在下 (*Cav 1*, caveolin-1; *Cav 2*, caveolin-2; *Cav 3*, caveolin-3, 0-10 μM) で $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と IRS-1 と反応させ, SDS-PAGE とオートラジオグラフィーを行った. 特に caveolin-3 においてインスリン受容体キナーゼ活性の増強が認められる.

図 2 A



B



C

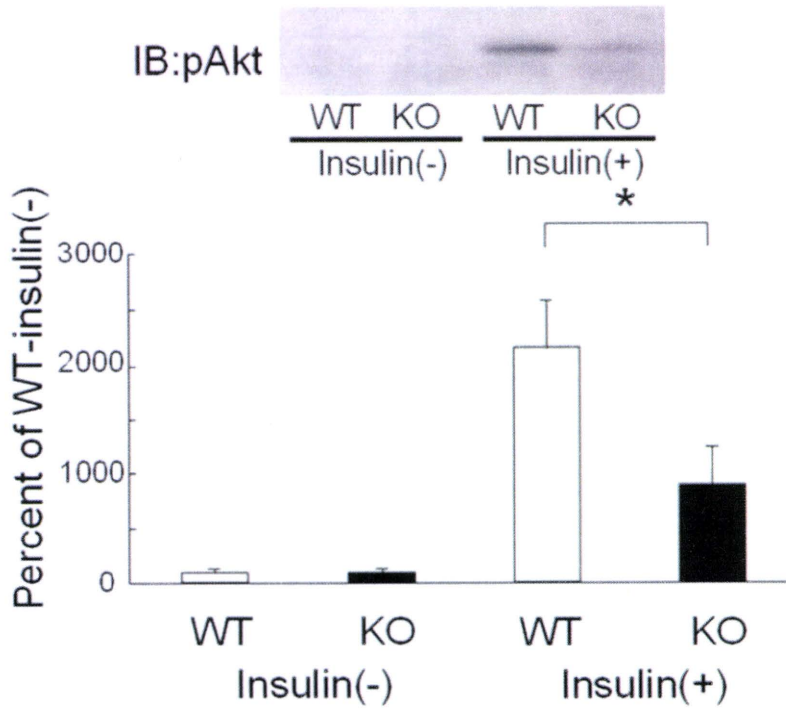


図2, カベオリン-3 ノックアウトマウスの骨格筋におけるインスリンシグナルの減弱

インスリン負荷前と負荷後の野生型(WT)とカベオリン-3 ノックアウトマウス(KO)における骨格筋におけるインスリン受容体(IR: A), IRS-1(B), Akt(C)のリン酸化を示す (*: $p < 0.05$).

図 3

A



B



図 3, 糖負荷試験

A. 糖負荷 (矢印) 後の野生型 (○) と Cav3KO (●) の血糖値の変化を示す. B. ストレプトゾトシン処理後の糖負荷試験 (*: $p < 0.05$).

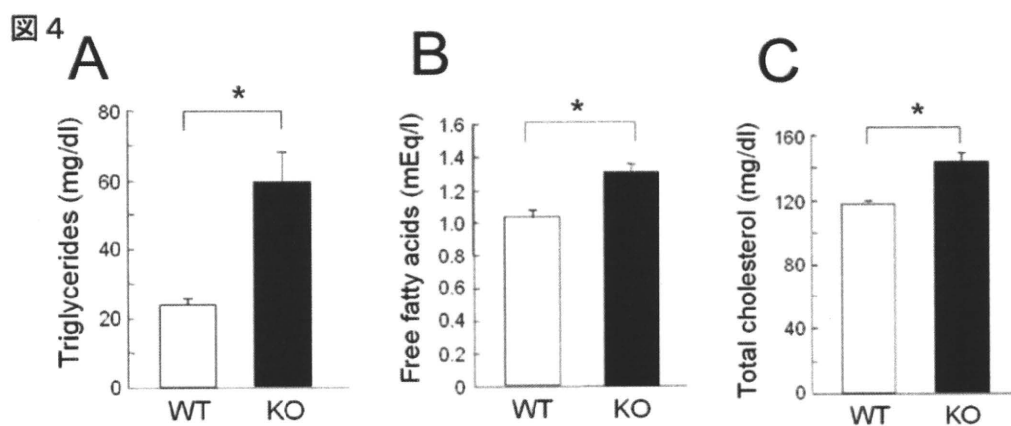


図 4, 血清中の空腹時中性脂肪 (triglyceride), 遊離脂肪酸 (free fatty acid), 総コレステロール(total cholesterol) (*: $p < 0.05$).

図 5

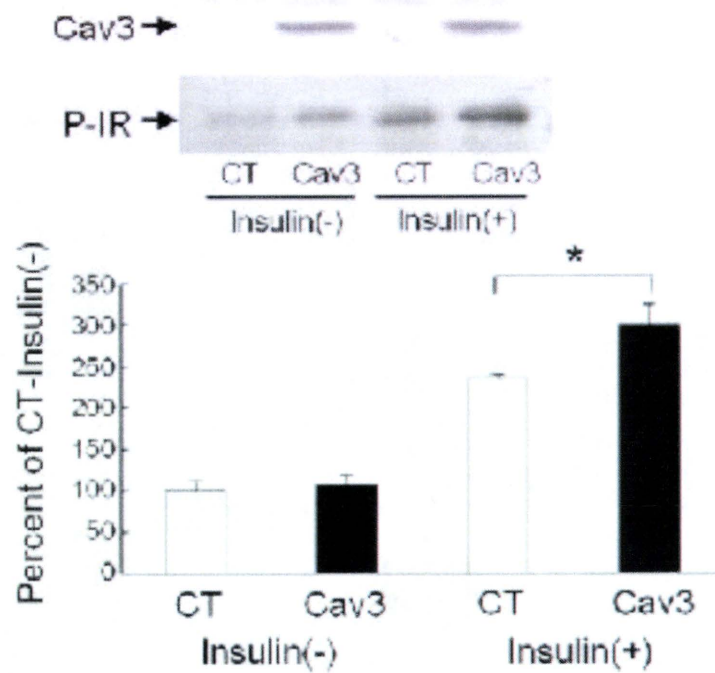
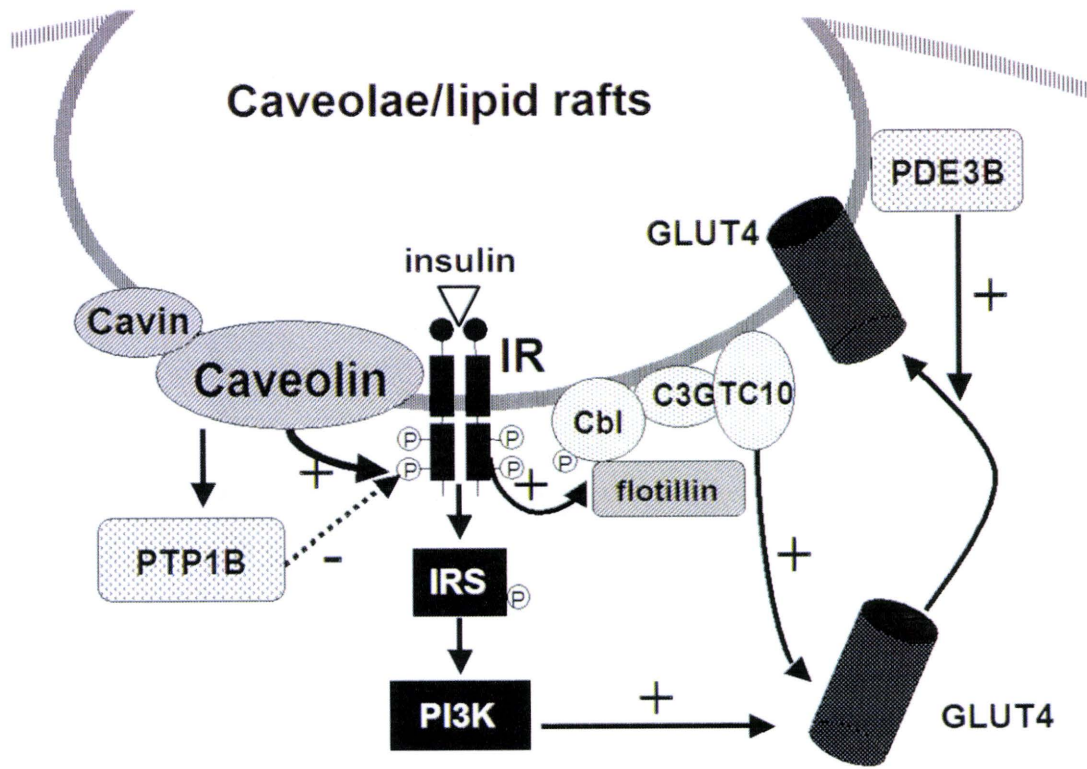


図 5, アデノウイルスによる骨格筋へのカベオリン-3 遺伝子導入によるインスリンシグナルの増強. コントロール(CT)とカベオリン-3(Cav3)を発現するアデノウイルスを骨格筋に筋肉内注射し, 48 時間後にインスリン受容体(IR)のリン酸化を観察した.

图 6



参考文献

- (1) Glenney JR Jr: Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*, 264: 20163-20166, 1989.
- (2) Glenney JR Jr, Soppet D: Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 10517-10521, 1992.
- (3) Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68: 673-682, 1992.
- (4) Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG Jr, Ishikawa Y: Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem*, 273: 26962-26968, 1998.
- (5) Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, et al: Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*, 271: 2255-2261, 1996.
- (6) Way M, Parton RG: M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett*, 376: 108-112, 1995.
- (7) Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, et al: Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 19: 7289-7304, 1999.
- (8) Schwencke C, Yamamoto M, Okumura S, Toya Y, Kim SJ, Ishikawa Y: Compartmentation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in caveolae. *Mol Endocrinol*, 13: 1061-1070, 1999.
- (9) Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B: Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 277: 34280-34286, 2002.
- (10) Toya Y, Schwencke C, Couet J, Lisanti MP, Ishikawa Y: Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides. *Endocrinology*, 139: 2025-2031, 1998.
- (11) Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, et al: Caveolin

- interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem*, 272: 33416-33421, 1997.
- (12) Fujita T, Otsu K, Oshikawa J, et al: Caveolin-3 inhibits growth signal in cardiac myoblasts in a Ca²⁺-dependent manner. *J Cell Mol Med*, 10: 216-224, 2006.
- (13) Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, et al: Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J*, 13: 1961-1971, 1999.
- (14) Smith RM, Harada S, Smith JA, Zhang S, Jarett L: Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signal*, 10: 355-362, 1998.
- (15) Oshikawa J, Otsu K, Toya Y, et al: Insulin resistance in skeletal muscles of caveolin-3-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 12670-12675, 2004.
- (16) Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, et al: A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, 2: 559-569, 1998.
- (17) Wojtaszewski JF, Higaki Y, Hirshman MF, et al: Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *J Clin Invest*, 104: 1257-1264, 1999.
- (18) Cohen AW, Razani B, Wang XB, et al: Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C222-C235, 2003.
- (19) Fecchi K, Volonte D, Hezel MP, Schmeck K, Galbiati F: Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *FASEB J*, 20: 705-707, 2006.
- (20) Caselli A, Mazzinghi B, Camici G, Manao G, Ramponi G: Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. *Biochem*

Biophys Res Commun, 296: 692-697, 2002.

(21) Lee H, Xie L, Luo Y, et al: Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochemistry*, 45:234-240, 2006.

(22) Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, Ishikawa Y: Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C450-C456, 2010.

(23) Oshikawa J, Urao N, Kim HW, Kaplan N, Razvi M, McKinney RD, Poole LB, Fukai, T, Ushio-Fukai M: Extracellular SOD-Derived H₂O₂ Promotes VEGF Signaling in Caveolae/Lipid Rafts and Post-Ischemic Angiogenesis in Mice. *PLoS ONE* 5: e10189, 2010

[III]

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Otsu K, Toya Y, <u>Oshikawa J</u> , Kurotani R, Yazawa T, Sato M, <u>Yokoyama U</u> , Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, and <u>Ishikawa Y</u>	Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice.	Am. J. Physiol. Cell Physiol.	298(3)	C450-456	2010.
<u>Yokoyama U</u> , Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, and <u>Ishikawa Y</u>	Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus.	Circ Res	106	1882-1892	2010
Suzuki S, <u>Yokoyama U</u> , Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kurotani R, Sato M, Okumura S, and <u>Ishikawa Y</u>	Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells.	J. Biol. Chem.	285	24248-24259	2010
Sato M and <u>Ishikawa Y</u>	Accessory proteins for heterotrimeric G protein: Implication in the cardiovascular system.	Pathophysiology	17	89-99	2010
<u>Yokoyama U</u> , Minamisawa S, and <u>Ishikawa Y</u> :	Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus.	J Smooth Muscle Res.	46(2)	77-87	2010
Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, <u>Yokoyama U</u> , Okumura S, Cismowski MJ, Lanier S M, <u>Ishikawa Y</u> .	Identification of transcription factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of G α 16: Gene regulation by nuclear G α subunit and its activator.	J Biol Chem.	286(20)	17766-17776	2011
Jin MH, <u>Yokoyama U</u> , Sato Y, Shioda A, Jiao Q, <u>Ishikawa Y</u> , Minamisawa S.	DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus.	J Physiol Sci.	61	167-179	2011
<u>Oshikawa J</u> , Urao N, Kim HW, Kaplan N, Razvi M, McKinney RD, Poole LB, Fukai T, Ushio-Fukai M	Extracellular SOD-Derived H ₂ O ₂ Promotes VEGF Signaling in Caveolae/Lipid Rafts and Post-Ischemic Angiogenesis in Mice.	PloS ONE 5	5(4)	e10189	2010

Asino T, Sudhahar V, Urao N, Oshikawa J, Chen GF, Wang H, Finney L, Vogt S, McKinney RD, Maryon EB, Kaplan JH, Ushio-Fukai M, Fukai T	Unexpected role of the copper transporter ATP7A in PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration..	Circ Res	107	787-799	2010
Urao N, Razvi M, Oshikawa J, McKinney RD, Chavda R, Bahou WF, Fukai T, Ushio-Fukai M	IQGAP1 is involved in post-ischemic neovascularization by regulating angiogenesis and macrophage infiltration	Plos ONE 5	5(10)	e13440	2010

和文

石川義弘	心不全の治療標的としてのアデニル酸シクラールゼ	医学の歩み	232	577-581	2010
石川義弘	高齢者に向けた心不全治療薬の開発 平成21年度構成労働化学研究費研究成果等普及啓発事業 医療技術実用化総合研究:基礎研究成果の臨床応用推進研究	トランスレーショナル研究成果発表会要旨集		23-24	2010
石川義弘	新規磁性体薬剤化合物の画像診断への応用 平成21年度構成労働化学研究費研究成果等普及啓発事業	医療機器開発推進研究ナノメダイシン研究成果発表会要旨集		33-34	2010
石川義弘	cAMP シグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究	コスメトロジー研究振興財団研究業績中間報告集	19	68-81	2010
石川義弘、佐藤元彦、奥村敏、横山詩子、岩坪耕策	cAMPシグナルとニコチン受容体	平成21年度喫煙科学研究財団研究年報		109-114	2010
黒谷玲子、福村英信、佐藤 格、江口晴樹、石川義弘	磁性体を利用した薬剤送達法	磁気と健康	23	10-13	2010
石川義弘	高齢者に向けた心不全治療薬の開発	平成22年度厚生労働化学研究費研究成果等普及啓発事業 医療技術実用化総合研究:基礎研究成果の臨床応用推進研究 トランスレーショナル研究成果発表会要旨集		123-124	2011
岩本 眞理、西澤 崇、渡部 重朗、市川 泰宏、志水 直、山口 和子、赤池 徹、横山 詩子、瀧間 浄宏、佐近 琢磨、安井 清、柴田 利満、新村 一郎、横田 俊平	運動誘発性発作を呈するQT延長症候群の運動負荷心電図の特徴について	日本小児循環器学会雑誌	26	67-72	2010

住友直方、岩本眞理、 他	上室性期外収縮・心房細動・心房粗動、小児不 整脈の診断・治療ガイドライン	日本小児循環器 学会雑誌			2010
岩本 眞理	不整脈—最新主要文献と解説—	総合小児科診療 のための小児科 学レビュー201 0		49-53	2010

[IV]

研究成果の刊行物・別刷