

## 8. おわりに

現在までに解析した2分子は、いわゆる Cbl interactome<sup>7)</sup> (図3)に含まれる細胞増殖因子受容体の細胞内移行および分解に関する制御因子であった。我々を含めて、類似のリン酸化プロテオミクスで同定されたものにはCblをはじめとして、受容体のエンドソーム局在やプロテアソーム分解に関与するタンパク質が多数含まれていたことから、まだ未解析の新規タンパク質もこの経路に関与する可能性が高い。今後、できるだけ多くの未知タンパク質の解析を進め、EGF受容体シグナル伝達経路の包括的理解に貢献できればと思う。

### 謝辞

本研究は徳島大学分子酵素学(現:疾患酵素学)研究センター・酵素分子生理学(現:疾患プロテオミクス)研究部門、谷口寿章教授のご指導のもと行われたものである。谷口研究室の古今のすべてのメンバー、特に田代京子さん、鍋師裕美さん、村田康信博士、佐野悦子博士、山内英美子博士のご協力にこの場をお借りして深く感謝いたします。

- 1) Hynes, N.E. & Lane, H.L. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, 5, 341-354.
- 2) Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E. J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., & Comb, M.J. (2005) *Nat. Biotechnol.*, 23, 94-101.
- 3) Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., & Jorgensen, T.J. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 873-886.
- 4) Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006) *Cell*, 127, 635-648.
- 5) Hunter, T. & Sefton B.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1311-1315.
- 6) Konishi, H., Tashiro, K., Murata, Y., Nabeshi, H., Yamauchi, E., & Taniguchi, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 28919-28931.
- 7) Schmidt, M.H. & Dikic, I. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 907-919.
- 8) Stamenova, S.D., French, M.E., He, Y., Francis, S.A., Kramer, Z.B., & Hicke, L. (2007) *Mol. Cell*, 25, 273-284.
- 9) Tashiro, K., Konishi, H., Sano, E., Nabeshi, H., Yamauchi, E., & Taniguchi, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 24612-24622.
- 10) Vazza, G., Picelli, S., Bozzato, A., & Mostacciolo, M.L. (2003) *Gene*, 314, 113-120.
- 11) Blagoev, B., Ong, S.E., Kratchmarova, I., & Mann, M. (2004) *Nat. Biotechnol.*, 22, 1139-1145.
- 12) Thelemann, A., Petti, F., Griffin, G., Iwata, K., Hunt, T., Settinari, T., Fenyó, D., Gibson, N., & Haley, J.D. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 356-376.
- 13) Pandey, A., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Fernandez, M.,

- Nielsen, M., Kristiansen, T.Z., Ohara, O., Podtelejnikov, A.V., Roche, S., Lodish, H.F., & Mann, M. (2002) *Oncogene*, 21, 8029-8036.
- 14) Raiborg, C., Slagsvold, T., & Stenmark, H. (2006) *Trends Biochem. Sci.*, 10, 541-544.
  - 15) Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A.G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P.P., Polo, S., & Schneider, T.R. (2006) *Cell*, 124, 1183-1195.

小西 博昭

(徳島大学疾患酵素学研究センター  
疾患プロテオミクス研究部門)

Proteomic identification of the new functional proteins in the EGF receptor-mediated signaling pathway  
Hiroaki Konishi (Institute for Enzyme Research, University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan)

## インスリンシグナルにおける転写因子 FoxO1 の役割

### 1. はじめに

FoxO タンパク質は forkhead ドメインを有する転写因子群の O サブファミリーに属する転写因子であり (Forkhead bOX-containing protein, O subfamily), その転写活性は基本的にはセリン/スレオニンキナーゼである Akt (PKB; protein kinase B) によるリン酸化と、それによって惹きされる核から細胞質への移行により調節されている。つまりインスリンにより Akt が活性化されると、FoxO タンパク質は核内でリン酸化されて細胞質へ移行し、不活性型となる (図1参照)。これまでに FoxO タンパク質は細胞の増殖、分化、アポトーシス、ストレス抵抗性等を調節する非常に多機能なタンパク質であることが明らかとなっていたが、さらに最近の研究結果から、このような細胞レベルでの基本的な機能に加え臓器レベルにおいても多くのインスリン作用に関わることが明らかとなってきた。本稿では、各種インスリン標的臓器における FoxO タンパク質の役割を最近の筆者らの知見も合わせて紹介する。

### 2. FoxO タンパク質の膵β細胞における役割

膵β細胞は、必要時にインスリンを血中に分泌することで、血糖値を適切な生理的範囲に保つ働きをしている。このβ細胞の絶対的、あるいは相対的な不足がそれぞれ1

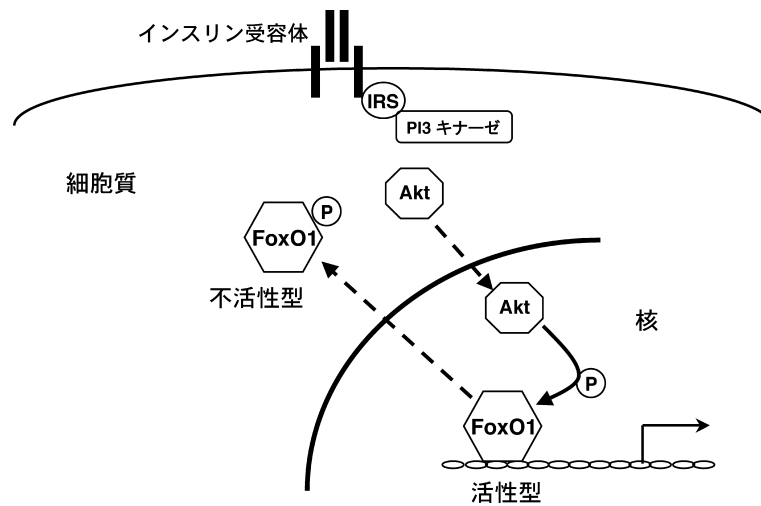


図1 インスリンによる FoxO1 の活性調節機序

インスリンが細胞膜上のインスリン受容体と結合すると、細胞質内で、PI3 キナーゼ/Akt 経路が活性化され、活性化された Akt は核に移行して FoxO1 をリン酸化する。リン酸化された FoxO1 は核から細胞質に移行する。FoxO1 は転写因子であり、核内で活性型、細胞質内では不活性型となる。つまり、インスリンは FoxO1 の活性を負に制御していることになる。

型糖尿病と2型糖尿病の成因となる。インスリン受容体基質の一つ、IRS2 欠損マウスは、 $\beta$ 細胞量の減少を伴って発症する糖尿病のモデル動物である。IRS2 欠損マウスに FoxO1 ヘテロ欠損マウスを掛け合わせた IRS2<sup>-/-</sup> : FoxO1<sup>+/-</sup> マウスでは、IRS2 単独欠損マウスに比し、 $\beta$ 細胞量の減少が著明に改善し、結果として糖尿病が改善していた<sup>1)</sup>。IRS2 欠損マウスの $\beta$ 細胞では、 $\beta$ 細胞の増殖に重要である転写因子 Pdx1 の発現が著明に減少しているが、IRS2<sup>-/-</sup> : FoxO1<sup>+/-</sup> マウスでは、Pdx1 の発現が改善していた<sup>1)</sup>。Pdx1 のプロモーター領域には、Pdx1 の主要な転写調節因子である FoxA2 (HNF3 $\beta$  とも呼ばれる) と FoxO1 に共通の DNA 結合部位が存在し、この領域を用いた Pdx1 プロモーターアッセイにより、FoxA2 により活性化される Pdx1 プロモーター活性が、FoxO1 の共発現により抑制されることが確認された<sup>1)</sup>。つまり、FoxO1 は Pdx1 プロモーターとの結合を FoxA2 と競合することによって Pdx1 の転写を抑制している。

一方、Pdx1 は胎生期の膵臓発生過程においても重要な役割を果たしており、例えば、Pdx1 欠損マウスには膵臓が形成されない。マウスの比較的早期の胎生膵 (E9.5-E14.5) においては Pdx1 は全ての膵臓の細胞に発現しているが、次第に内分泌細胞に限局していき (E14.5-E17.5)、最終的には $\beta$ 細胞のみに発現するようになる。筆者らは FoxO1 も Pdx1 と非常に良く似た発現パターンを呈するこ

とを確認している (未発表データ)。Pdx1 以外にも、Nkx 2.2 や Pax4 といった、膵細胞の分化や膵細胞型の決定に重要な役割をする転写因子も同様の発現パターンを示すことから、FoxO1 も膵細胞の分化に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。成体においては、膵管細胞は膵内分泌細胞のプロジェニター細胞と考えられている。実際、成体マウスの膵管細胞の中には、稀ではあるが、Pdx1 とインスリンが共に陽性の細胞が含まれている。一方、FoxO1 陽性の膵管細胞も、低頻度ではあるが存在する。重要なことに、Pdx1 とインスリンが共に陽性の膵管細胞は全て FoxO1 も陽性であった<sup>1)</sup>。これらの結果より、FoxO1 は膵細胞の分化や新生に関与している可能性があり、今後の検討が期待される。

2型糖尿病における $\beta$ 細胞機能の障害は、慢性的な高血糖状態に $\beta$ 細胞が暴露されることで惹起されると考えられており、この仮説は“糖毒性”仮説と呼ばれている。糖毒性の発生にはスーパーオキシドによる酸化ストレスが関与するとされている。 $\beta$ 細胞に過酸化水素添加による酸化ストレスを与えると、FoxO1 は核に移行し、この核移行に伴って $\beta$ 細胞に転写因子 NeuroD と MafA の発現が増加する。著者らは NeuroD と MafA が FoxO1 の直接の転写標的因子であることを明らかにした<sup>2)</sup>。NeuroD と MafA は共にインスリン遺伝子の転写調節因子であることから、 $\beta$ 細胞が酸化ストレスに暴露されると、FoxO1 が核に移行し

てβ細胞の機能を保持していると考えられる。実際に、いくつかの糖尿病モデルマウスではβ細胞における MafA の発現が減少しているが、β細胞に恒常的活性型の FoxO1 を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせると、MafA の発現が増加する<sup>2)</sup>。酸化ストレスによる FoxO1 の核移行には FoxO1 のアセチル化が関わっている。アセチル化された FoxO1 は、核内のサブドメイン (PML body) に発現しているタンパク質 PML (promyelocyte leukemia-associated protein) と結合する。さらにアセチル化された FoxO1 はユビキチン化を受けにくくなり、タンパク質が安定する結果、FoxO1 はいっそう核に集積することになる。一方、PML には NAD 依存性脱アセチル化酵素である Sirt1 も結合しており、Sirt1 は FoxO1 を脱アセチル化し、脱アセチル化された FoxO1 は転写活性が上昇し、転写標的遺伝子の NeuroD や MafA の発現が増加する<sup>2)</sup>。

### 3. FoxO タンパク質の脳視床下部における役割

インスリンとレプチンは共に視床下部弓状核に作用して、摂食抑制神経ペプチド Pomc の発現を促進し、逆に摂食促進神経ペプチド Agrp を抑制することで摂食を負に制御するホルモンである。レプチンは Jak2-Stat3 経路を活性化し、Stat3 は核に移行してこれらの神経ペプチドの転写を直接調節している<sup>3)</sup>。一方、インスリンは視床下部において PI3 キナーゼ/Akt 経路を活性化し、この経路がインスリンによる摂食抑制作用に重要であることが報告されている<sup>4)</sup>。マウスの脳において、FoxO1 は視床下部の領域に比較的優位に発現しており、実際に弓状核の Agrp ニュー

ロンと Pomc ニューロンに発現している。さらに、マウスを絶食させておくと、FoxO1 は Agrp ニューロンの核に優位に発現しており、摂食させると細胞質に優位に発現するようになる<sup>5)</sup>。恒常的活性型の FoxO1 を発現するアデノウイルス (FoxO1-ADA) をラットの視床下部弓状核に直接マイクロインジェクションするとラットの摂食量が増加し、その結果として体重も増加する<sup>5,6)</sup>。さらに FoxO1-ADA 投与群では Agrp 遺伝子の発現量が増加しており、プロモーター解析の結果、FoxO1 は Agrp プロモーターと Pomc プロモーターとの結合を Stat3 と競合し合うことで、直接これらの神経ペプチドの転写調節に関わることが明らかとなった<sup>5)</sup>。つまり、レプチンは Jak2-Stat3 経路を活性化し、Stat3 が核へ移行して、摂食を促進する神経ペプチド Agrp の発現を減少させ、逆に摂食を抑制する神経ペプチド Pomc を増加させることで、摂食を抑制している。一方、もともと FoxO1 は Agrp を増加させて Pomc を減少させているが、インスリンは PI3 キナーゼ/Akt を介して FoxO1 をリン酸化し核から細胞質に移行させることで、結果としてインスリンもレプチンと同じく Agrp を減少させ、Pomc を増加させて、摂食を抑制している (図2参照)。

### 4. FoxO タンパク質の肝臓における役割

肝臓においては、FoxO1 は糖の新生に関わる PEPCK や G6Pase の転写調節を介して、糖代謝をコントロールしている。その際、もともと核内受容体である PPARγ (peroxisome proliferators-activated receptor γ) の転写共役因子として同定された PGC1 が FoxO1 の転写共役因子としても機

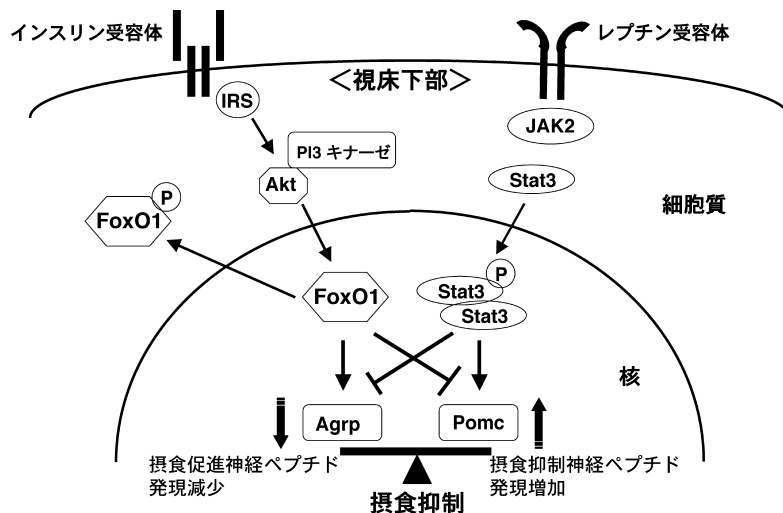


図2 レプチンとインスリンが摂食を調節する分子メカニズム

能し、PEPCKの転写調節に関わっている<sup>7)</sup>。さらにFoxO1は糖利用に関わる酵素であるグルコキナーゼや、糖から脂肪への合成に関与する転写因子SREBP-1cの発現を調節することで、脂質代謝もコントロールしている。一方、アポリポタンパク質CIII (apoCIII)の転写も調節することが報告されており、インスリン抵抗性状態における高脂血症の発症にFoxO1が関与する可能性がある。これらのFoxO1の代謝作用はマウスを用いた*vivo*の系でも確認されており、恒常的活性型FoxO1変異体を肝臓に発現するトランスジェニックマウスでは耐糖能が低下しており、同じ変異体をアデノウイルスを用いて肝臓に強制発現させると、著明な脂肪肝を発症する<sup>8,9)</sup>。このように、FoxO1は肝臓における糖代謝と脂質代謝を複数のステップで制御していると考えられる。

### 5. FoxO タンパク質の骨格筋、脂肪細胞における役割

FoxO1は骨格筋細胞の分化を抑制する<sup>10)</sup>。そのメカニ

ムとして、著者らはFoxO1がNotchシグナル下流の転写因子RBP-jk (Csl, SuH, CBF-1とも呼ばれる)と直接結合し、Hes1の転写を活性化することを確認した(著者ら未発表データ)。Hes1はMyoDの転写抑制因子であることから、結果としてFoxO1はMyoDの発現を減少させ、骨格筋細胞の分化を抑制することになる。実際、骨格筋特異的FoxO1トランスジェニックマウスでは、総筋肉量の減少とともに1型筋繊維(赤筋)の2型筋繊維(白筋)に対する割合が低下し、マウスの運動能力は低下する<sup>11)</sup>。しかしながら、骨格筋特異的FoxO1ノックアウトマウスも同様の所見を呈することから(著者ら未発表データ)、今後の検討が必要である。一方、FoxO3aは骨格筋萎縮に関与するユビキチンリガーゼであるatrogin-1の転写を調節しており、さらにFoxO1は、脂肪酸輸送タンパク質のCD36やLPL (lipoprotein lipase)の転写調節を介して、骨格筋における脂肪酸取り込みや脂肪酸利用に関与することが報告されている。また、FoxO1は細胞周期抑制因子p21Waf1

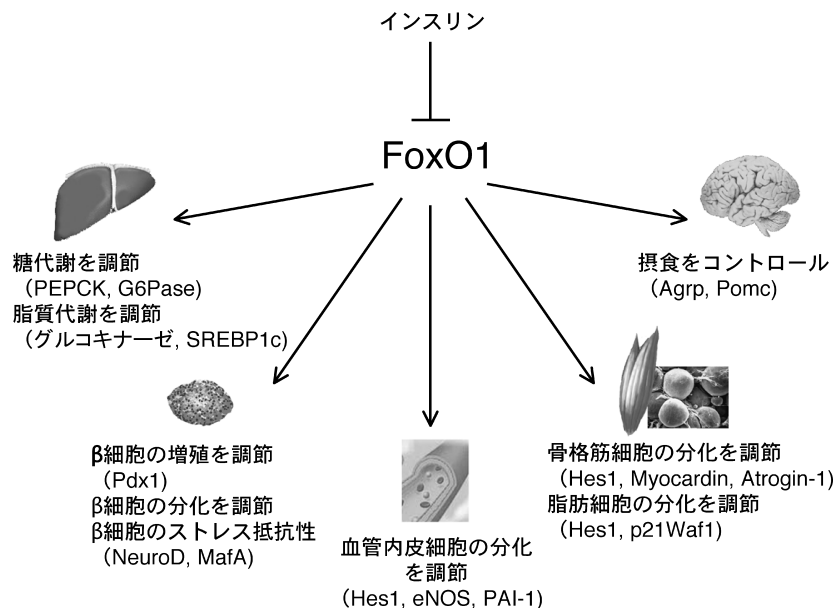


図3 各種インスリン標的臓器におけるFoxO1の生理作用

肝臓においては、FoxO1は糖新生に関わるPEPCKやG6Pase、及び糖利用に関わるグルコキナーゼやSREBP1cの転写調節を介して、糖代謝と脂質代謝をコントロールしている。膵β細胞においては、FoxO1はβ細胞の増殖に重要な役割をする転写因子Pdx1の転写調節を介して、β細胞の増殖や分化をコントロールしている。また、β細胞が酸化ストレスに暴露された際のストレス抵抗性にもFoxO1は関わっている。さらに、血管内皮細胞において、FoxO1はEnosの産生やPAI-1の発現調節を介して、血管新生や動脈硬化の進展にも関わっている。また、視床下部においては、FoxO1は摂食調節神経ペプチドAgrpとPomcの転写調節をすることで、摂食をコントロールしている。一方、FoxO1はNotchシグナルとクロストークすることで骨格筋細胞や脂肪細胞の分化も調節している。

の転写調節を介して脂肪細胞の分化初期に必要な clonal expansion を抑制することで、脂肪細胞の分化も制御している<sup>12)</sup>。

## 6. FoxO タンパク質の血管内皮細胞における役割

動脈硬化の進展に重要な役割を果たす plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の転写調節に FoxO1 が関わるという報告がある<sup>13)</sup>。一方、FoxO1 の全身のノックアウトマウスは大血管の形成不全により胎生早期 (E9.5) に死亡するが、FoxO1 のアイソフォームである FoxO3a と FoxO4 のノックアウトマウスは見かけ上、正常に発育することから、特に FoxO1 が血管の形成に重要であることが示された<sup>14)</sup>。さらに、FoxO1 ノックアウトマウスの ES 細胞から試験管内で分化誘導した血管内皮細胞は、VEGF 刺激に対して正常に反応しないことから、FoxO1 は VEGF 応答性の血管新生に必要であることが示された<sup>15)</sup>。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた検討では、FoxO1 と FoxO3a は eNOS (endothelial NO synthase) の発現を抑制する結果、血管新生を阻害することが報告された<sup>16)</sup>。さらに、著者らは HUVEC における FoxO1 の血管新生抑制作用には、Notch シグナルが関わっていることを確認している (未発表データ)。これらの結果は、動脈硬化症等の血管病変の解明に留まらず、FoxO タンパク質を操作することで腫瘍血管新生を阻害しうる可能性も示しており、この分野での今後の進展にも期待がかかる。

## 7. おわりに

FoxO1 の多くの生理的役割が、臓器レベルで明らかになってきた (図 3 参照)。しかしながら、実際に 2 型糖尿病や肥満の発症とどのように直接関わるかは未だ不明であり、今後の更なる検討が必要である。さらに、FoxO1 を遺伝子学的に、あるいは薬理的に操作することで、2 型糖尿病や肥満症といった生活習慣病の新しい治療法を開発できる可能性があり、今後の進展が期待される。

- 1) Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., 3rd, Wright, C.V., White, M.F., Arden, K.C., & Accili, D. (2002) *J. Clin. Invest.*, 110, 1839–1847.
- 2) Kitamura, Y.I., Kitamura, T., Kruse, J.P., Raum, J.C., Stein, R., Gu, W., & Accili, D. (2005) *Cell Metab.*, 2, 153–163.
- 3) Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., Neel, B.G., Schwartz, M.W., & Myers, M.G., Jr. (2003) *Nature*, 421, 856–859.
- 4) Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R.,

- Baskin, D.G., Myers, M.G., Jr., Seeley, R.J., & Schwartz, M. W. (2003) *Diabetes*, 52, 227–231.
- 5) Kitamura, T., Feng, Y., Kitamura, Y.I., Chua, S.C., Jr., Xu, A. W., Barsh, G.S., Rossetti, L., & Accili, D. (2006) *Nat. Med.*, 12, 534–540.
- 6) Kim, M.S., Pak, Y.K., Jang, P.G., Namkoong, C., Choi, Y.S., Won, J.C., Kim, K.S., Kim, S.W., Kim, H.S., Park, J.Y., Kim, Y.B., & Lee, K.U. (2006) *Nat. Neurosci.*, 9, 901–906.
- 7) Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., & Spiegelman, B.M. (2003) *Nature*, 423, 550–555.
- 8) Nakae, J., Biggs, W.H., Kitamura, T., Cavenee, W.K., Wright, C.V., Arden, K.C., & Accili, D. (2002) *Nat. Genet.*, 32, 245–253.
- 9) Matsumoto, M., Han, S., Kitamura, T., & Accili, D. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 2464–2472.
- 10) Hribal, M.L., Nakae, J., Kitamura, T., Shutter, J.R., & Accili, D. (2003) *J. Cell Biol.*, 162, 535–541.
- 11) Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I., & Ezaki, O. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 41114–41123.
- 12) Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., Arden, K. C., & Accili, D. (2003) *Dev. Cell*, 4, 119–129.
- 13) Vulin, A.I. & Stanley, F.M. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 20169–20176.
- 14) Hosaka, T., Biggs, W.H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A.D., Varki, N. M., Cavenee, W.K., & Arden, K.C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2975–2980.
- 15) Furuyama, T., Kitayama, K., Shimoda, Y., Ogawa, M., Sone, K., Yoshida-Araki, K., Hisatsune, H., Nishikawa, S., Nakayama, K., Nakayama, K., Ikeda, K., Motoyama, N., & Mori, N. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 34741–34749.
- 16) Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K., Hofmann, W.K., Heeschen, C., Aicher, A., Kollipara, R., DePinho, R.A., Zeiher, A.M., & Dimmeler, S. (2005) *J. Clin. Invest.*, 115, 2382–2392.

北村 忠弘

(群馬大学生体調節研究所

代謝シグナル研究展開センター)

Role of FoxO proteins in the insulin signaling  
Tadahiro Kitamura (Metabolic Signal Research Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15, Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-851, Japan)