

発表番号 55

塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリーの糖尿病、高血圧への関与

助成研究者：竹森 洋 (大阪大学大学院、医学系研究科)

共同研究者：土居純子 (金蘭大学、生活科学)

我々は塩誘導性キナーゼ 1 (SIK1) を高塩食処理したラットの副腎に特異的に誘導される遺伝子として単離した。その後、SIK の相同性を利用して脂肪細胞特異的キナーゼ (SIK2) と組織非特異的キナーゼ (SIK3) の同定にも成功した。これらキナーゼはキナーゼドメインの相同性から、AMP により活性化されるキナーゼ (AMPK) ファミリーに属することが推測されるが、実際の機能は未知である。

SIK1 は副腎皮質培養細胞 (Y1) において、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 処理により誘導され、その誘導は副腎皮質ステロイドホルモン合成酵素の発現より速い。SIK1 の強制発現は ACTH による副腎皮質ステロイドホルモン合成酵素の発現を抑制した。副腎皮質ステロイドホルモン合成酵素のプロモーターを利用した解析から、SIK1 は ACTH による cAMP/PKA シグナル活性化を抑制すること、その作用点はプロモーター上の CRE であり、CRE に結合する因子の CREB の bZIP ドメインを負に制御する作用を有することが明らかとなった。これらのことから、SIK1 は副腎皮質において ACTH 刺激の初期に、ステロイドホルモン合成酵素の発現調節を行っているものと予想された。

一方、SIK2 は未分化脂肪細胞 (3T3-L1) が脂肪細胞へと分化する際に、やはり初期から誘導される。さらに、SIK2 はインスリンシグナル伝達分子 IRS-1 の Ser749 をリン酸化する。また、2型糖尿病モデルマウス (db/db) の脂肪細胞で SIK2 のタンパクおよび活性が上昇している。これらの結果から、SIK2 は脂肪細胞において、インスリンシグナルを修飾することでインスリン耐性に関与しているものと予想された。

以上のことは、SIK1 は副腎皮質において高塩食および ACTH 刺激によるアルドステロンの産生に影響を与えることで血圧調節に密接に関与し、SIK2 は脂肪細胞において、その細胞分化を修飾することで肥満や糖尿病に関係することを示唆する。

7

助成番号 0238

塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリーの糖尿病、高血圧への関与

助成研究者：竹森 洋 (大阪大学大学院、医学系研究科)
共同研究者：土居純子 (金蘭大学、生活科学)

研究目的

cAMP-PKA-CREB シグナルは細胞増殖に関わる中心的なシグナル機構の1つであるのみならず、個々の細胞機能に密接に関与する。例えば副腎皮質においては、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) で活性化された転写因子 CREB が副腎皮質の最重要機能であるステロイドホルモン合成を合成酵素の遺伝子発現調節と言う形で担っていたり、脂肪細胞では cAMP/CREB シグナル不全が肥満の1つの原因であることが古くから議論されている。

我々はラット副腎皮質から高塩食処理時に特異的に誘導されるタンパクリン酸化酵素 (塩誘導キナーゼ (SIK1)) を単離した(1)。SIK1 の生理機能を検討したところ、SIK1 は cAMP-PKA シグナル系で誘導され、PKA で活性化される cAMP-responsive element (CRE) を負に制御するフィードバック分子であることを明らかにした(2)。そして、その作用点は CRE に結合する CREB の bZIP ドメインであること (3)、さらに SIK1 による CREB 抑制現象は PKA による SIK1 の直接的リン酸化 (C末ドメインに存在する Ser577) を介した SIK1 の核-細胞質間の移行が密接に関与することも明らかにした (4)。

最近、SIK1 の 1 次構造を利用して脂肪細胞特異的蛋白リン酸化酵素 (SIK2) の単離にも成功した (5)。本研究は、SIK1 と SIK2 の構造比較から、これら酵素の機能とその調節機構を解明するとともに、SIK1 と SIK2 の発現様式や病態との相関を検討することで、糖尿病や高血圧との関連について検討することを目的とした。

研究方法

ラット SIK1 に似た遺伝子の存在をデータベースで検索したところ、KIAA0781 (GenBank™ No. AB18324) と命名されたヒトの cDNA が存在することが明らかとなった。残念ながらこのクローンは全長ではなかったことと、将来の病態モデル動物の作成にあたり、マウスの cDNA の情報が有用であることを考慮して、

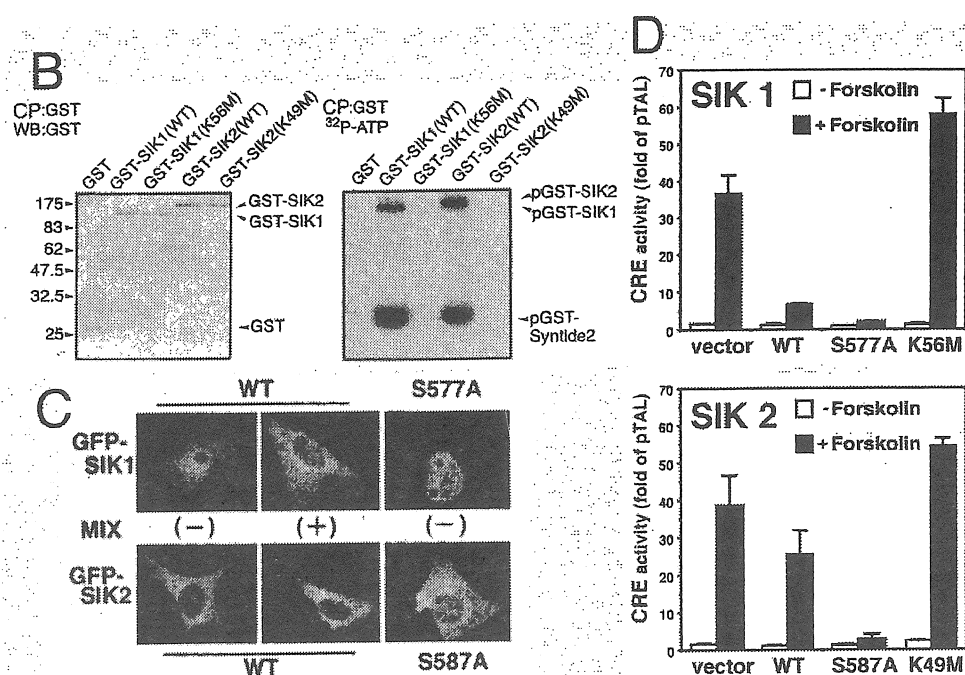


図 1、ラット SIK1 とマウス SIK2 の比較

A : タンパク構造、B : タンパクリン酸化活性、C : 細胞内局在、
D : CRE 抑制活性の比較。

SIK1 と SIK2 タンパクの特性比較を図 1 に示す。SIK1 と SIK2 タンパク内には高い相同性を示す領域が 3 カ所存在する (図 1A)。N-端からそれぞれ、ドメイン 1、2、3、と名付けた。ドメイン 1 はキナーゼドメインで、SIK1 の場合は 56 番目の Lys を Met に改変することで、キナーゼ活性欠損 SIK 変異体を作成した。SIK2 は 49 番目の Lys に相当する。これら変異体は自己リン酸化活性および、タンパクリン酸化活性の双方が消失する (図 1B)。蛍光タンパク GFP を利用した解析から、SIK1 は通常は主に核内に存在し、PKA の活性化に伴って細胞質へ移行する性質を有することを報告した (図 1C)。またその細胞内局在が SIK1 の最も顕著な生理活性である CRE 抑制活性に密接に関係する (図 1D)。そこで、SIK2 も同様に細胞内局在と CRE 抑制活性の相関を検討した。検討する細胞には脂肪前駆細胞 (3T3-L1) を利用し、PKA の活性化は脂肪分化混合試薬 (MIX: cAMP、デキサメサゾン、インスリン) を用いた。その結果、SIK2 は PKA の活性化の有無に関わらず細胞質に存在した。SIK1 の核外移行は PKA による SIK1 の Ser577 の直接的リン酸化が必要である。Ser577 を Ala に置換し

た、PKA 耐性 SIK1 は絶えず核内に止まり、その CRE 抑制活性も強力である。一方、SIK2 に PKA 耐性変異 (Ser587Ala) を導入しても、若干核への親和性が高まるものの、殆どは細胞質へ止まる。しかしながら、CRE 抑制活性は PKA 耐性変異により強まった。このことは、細胞内局在変化と CRE 抑制活性の変動は同一の Ser のリン酸化で調節されているものの、別個の現象であることを意味する。その PKA でリン酸化を受ける Ser はドメイン3 に存在する。

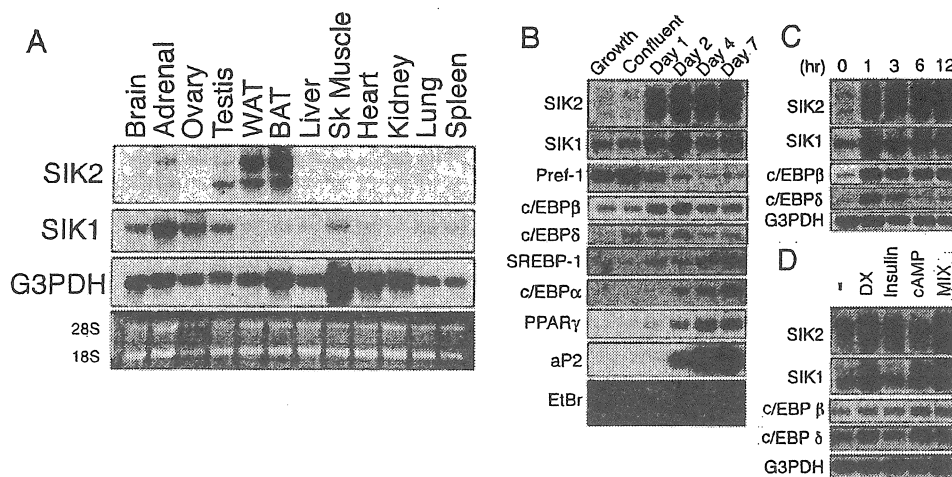


図2, SIK1 と SIK2 の発現分布と脂肪分化に伴う誘導

次に、SIK1 と SIK2 の mRNA の組織間分布と脂肪分化に伴う発現量の変化を検討した。予備実験から SIK2 は脂肪細胞に高い発現が予想されていたが、やはり調べた臓器の中では白色脂肪細胞 (WAT) と褐色脂肪細胞 (BAT) での発現が顕著であった (図 2A)。SIK1 は元々クローニングに用いた副腎やステロイド産生臓器で高い発現が見られた。脂肪分化 (3T3-L1 細胞) に伴う発現変動はさらに興味深く、SIK2 脂肪分化処理初期から誘導され、成熟後もその発現は維持されていた。その誘導にはデキサメサゾンが最も関与していた (図 2B-D)。SIK1 は脂肪分化誘導初期に一過性に誘導された。

SIK2 の発現が成熟脂肪細胞で高いレベルに保たれている事実は、SIK2 が CREB シグナルを介する脂肪細胞の分化調節のみならず、脂肪細胞の機能そのものにも関与することを意味する。脂肪細胞でのインスリシグナルはインスリ受容体の結合分子 IRS-1 を介して調節されている。IRS-1 の発現も脂肪細胞の成熟に

伴って上昇する。また最近、2型糖尿病のモデルラットの肝臓では IRS-1 の Ser789 が AMPK 以外の AMPK 様活性でリン酸化されていることが報告されている (6)。そこで、SIK2 による IRS-1 の Ser789 のリン酸化の有無の検討を行った。

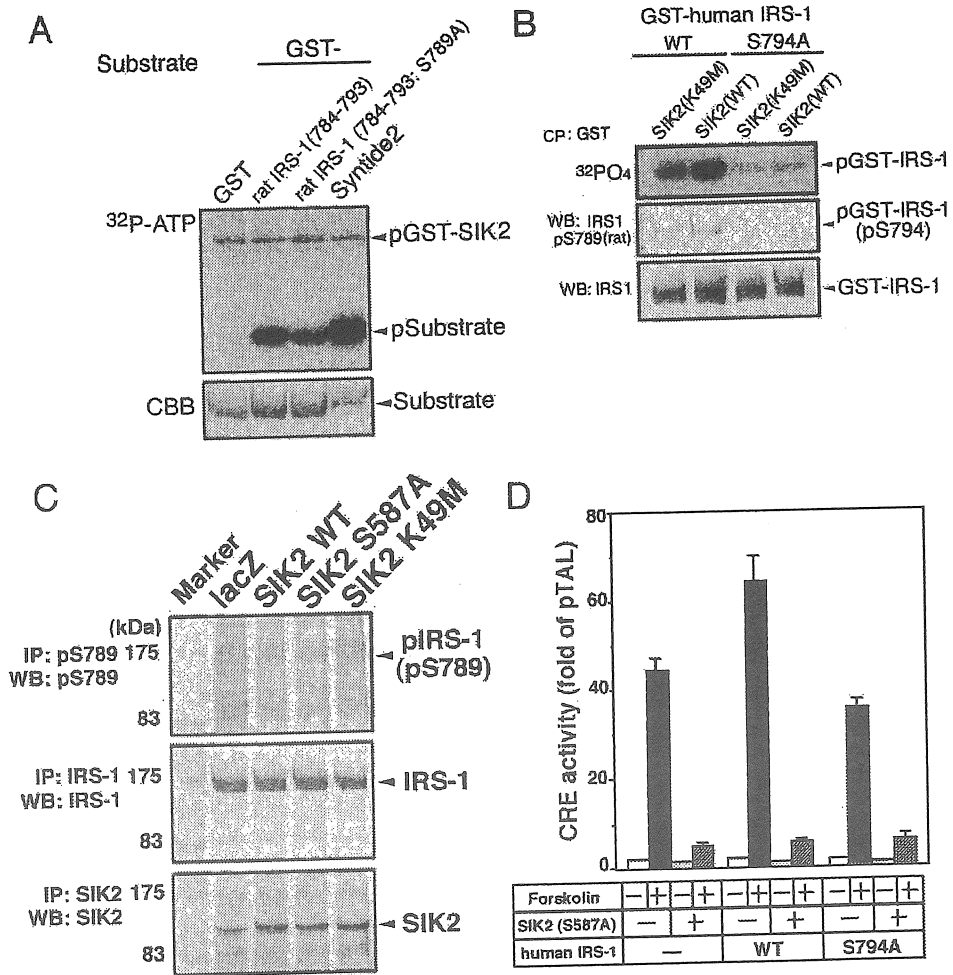


図 3, SIK2 による IRS-1 のリン酸化

GST 融合 SIK2 は in vitro でラット IRS-1 の 784-793 のペプチドをリン酸化した(図 3A)。そのリン酸化は IRS-1 の Ser789 を変異させると減少した。次に、COS 細胞で GST-融合のヒト IRS-1 と SIK2 を同時に発現させ細胞をアイソトープ (P) でラベルした後、GST を利用して IRS-1 タンパクを精製し、IRS-1 のリン酸化

の程度を検討した。IRS-1 のリン酸化はキナーゼ活性を有する SIK2 との共発現で上昇した (図 3B)。また、ヒト IRS-1 の Ser794 (ラットの IRS-1 の Ser789 に相当) の変異は、IRS-1 のリン酸化量を下げ SIK2 活性に影響されなくなった。さらに、アデノウイルスを利用して内因性の IRS-1 の SIK2 によるリン酸化を検討した。結果、キナーゼ活性を持つ SIK2 の高発現は脂肪細胞内で IRS-1 の Ser789 のリン酸化を亢進させた (図 3C)。一方、IRS-1 の Ser789 のリン酸化の SIK2 の CRE 抑制活性における影響を検討した結果 (図 3D)、IRS-1 の Ser789 のリン酸化は SIK2 による CRE 抑制には関与せず、むしろ CRE 活性を上昇させる結果を得た。

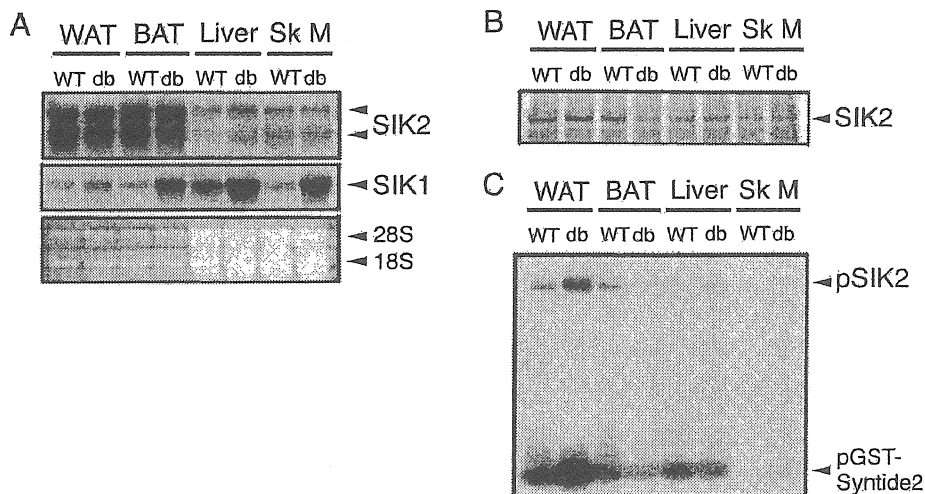


図 4, 2 型糖尿モデルマウス (db/db) における SIK の発現

最後に 2 型糖尿モデルマウス (db/db) における SIK の発現を検討した。野生型マウスおよび 2 型糖尿モデルマウスは 10 週齢を利用し、インスリンの標的臓器である、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、肝臓、骨格筋での発現を検討した。まず、SIK2mRNA の発現は野生型および 2 型糖尿モデルマウスで差は観察されなかった (図 4A)。SIK1mRNA は 2 型糖尿モデルマウスの褐色脂肪細胞、肝臓、骨格筋で発現が亢進していた。SIK2 タンパク (図 4B) および酵素活性 (図 4C) は 2 型糖尿モデルマウスの白色脂肪細胞では亢進していたが、反対に褐色脂肪細胞では減少していた。

考察

SIK1 の構造を利用した解析から、新たなキナーゼ SIK2 の同定に成功した。SIK2 は脂肪細胞で高い発現が観察され、グルココルチコイドやインスリンで誘導され、CREB の制御や IRS-1 のリン酸化を行う結果を得た。また、SIK2 のリン酸活性が2型糖尿モデルマウスの白色脂肪細胞で亢進している事実は、SIK2 がインスリン抵抗性に関与することを示唆する。

今後の課題

これまでの研究は主に培養細胞を用いた SIK1 や SIK2 の生理活性の検討である。そして、SIK1 や SIK2 がステロイド合成調節やインスリンシグナルに関与する知見を得ることができた。今後はこれら *in vitro* の結果が生体レベルでも反映されているか、また、SIK を標的とした病気の治療薬の開発に役立てることが可能か否かが重要となる。予備実験段階ではあるが、SIK2 導入動物は野生型動物に比べ体重差が生じる結果を得ている。また、SIK2 もアルドステロン産生に関与する可能性を示唆する結果も得ている。さらに、SIK には第3のイソ酵素 (SIK3) も存在し、生体レベルでの SIK の役割解明が必要である。

参考文献

- 1) Wang, Z., Takemori, H., Halder, S. K., Nonaka, Y., and Okamoto, M. (1999)
FEBS Lett **453**, 135-139
- 2) Lin, X., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Horike, N., Makino, A., Nonaka, Y., and Okamoto, M. (2001)
Mol Endocrinol **15**, 1264-1276
- 3) Doi, J., Takemori, H., Lin, X.-z., Horike, N., Katoh, Y., and Okamoto, M. (2002)
J Biol Chem **277**, 15629-15637
- 4) Takemori, H., Katoh, Y., Horike, N., Doi, J., and Okamoto, M. (2002)
J Biol Chem **277**, 42334-42343
- 5) Horike N., Takemori H., Katoh Y., Doi J., Min L., Asano T., Sun X.J., Yamamoto H., Kasayama S., Muraoka M., Nonaka Y., and Okamoto M. (2003)
J Biol Chem **278**, 18440-18447
- 6) Qiao, L. Y., Zhande, R., Jetton, T. L., Zhou, G., and Sun, X. J. (2002)
J Biol Chem **277**, 26530-26539

Involvement of salt-inducible kinase (SIK) family enzymes in diabetes and hypertension

Hiroshi Takemori and Junko Doi

Department of Molecular Physiological Chemistry, Osaka University Medical School

Department of Life Science, Kinran College

Summary

The cloning of salt-inducible kinase-1 (SIK1) that was specifically expressed in the adrenal glands of high-salt diet-fed rats led to subsequent clonings of adipose-specific SIK2 and rather ubiquitous SIK3. The three enzymes constitute a novel serine/threonine kinase subfamily, a member of AMP-activated protein kinase family. Physiological roles of SIK1 and SIK2 have been investigated. The SIK1 transcript was expressed very early in the ACTH-stimulated Y1 cells, even before the expression of transcripts for CYP11A and StAR protein. Forced expression of SIK1 inhibited the ACTH-dependent expression of CYP11A- and StAR protein-genes. Cotransfection assays employing CRE-reporter gene showed that SIK1 could repress the PKA-dependent activation of CRE by acting on the CREB's bZIP domain, though the target site of SIK1-mediated phosphorylation has yet to be determined. The ACTH/PKA-dependent nucleocytoplasmic shuttling of SIK1 took place in Y1 cells, implicating that the intracellular movement of SIK1 might be a physiologically important determining factor for regulation of steroidogenic gene expression in the early phase of ACTH-stimulation. The SIK2 gene was expressed in 3T3-L1 cells at a very early stage of adipogenesis. SIK2 could phosphorylate Ser-794 of human Insulin-Receptor-Substrate-1 *in vitro* as well as *in vivo*. Besides, the SIK2 activity in *db/db* mice adipose tissues was significantly higher than that in wild-type adipose. These results strongly suggest that SIK2 may play important role(s) in modulating the insulin-signaling cascade of adipocytes, and thus, may be involved in the development of insulin resistance. Taken together, these results suggest that the SIK isoforms regulate hormonal signal transductions in adrenal as well as in fat tissues.