

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15977

研究課題名(和文) インスリン分泌障害に関与する脂質修飾タンパク質の探索

研究課題名(英文) Exploring lipid-modifying proteins involved in impaired insulin secretion

研究代表者

松下 祥子 (MATSUSHITA, Shoko)

日本大学・理工学部・助教

研究者番号：10806079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の2型糖尿病患者では、血糖値を下げるインスリンの分泌障害を起因とする症例が他国と比較して多いことから、インスリン分泌障害の発症機序に着目した。特に、グルコース濃度変化に応じてインスリンを含有する小胞を細胞膜へ移行させ、その小胞膜と細胞膜との融合に関与する脂質修飾タンパク質を探索するため、分析手法の開発を試みた。

脂肪酸鎖長の異なる分子種を合成し、生体内で目的の分子をラベル化するクリック反応を利用して、脂質修飾されやすいタンパク質を解析した。その結果、脂肪酸鎖長に応じて変動するタンパク質の検出に成功した。また、合成した分子種によるインスリンの分泌能を解析し、簡易的分析手法の開発に着手した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、脂質修飾タンパク質の分析手法の開発およびインスリン分泌障害と脂質修飾タンパク質の関連性を示した点にある。また、不十分ではあるが、引き続き解析を続けることにより、分析化学、生化学および医学的な知見を得ることに繋がると考えている。

本研究の社会的意義は、糖尿病患者への還元が挙げられる。本邦における糖尿病患者数には有意な増減が見られていないが、世界規模では爆発的に増加している。インスリンの分泌能に関する知見を得ることは、糖尿病患者の病態理解に繋がり、発症予防・治療効果の増大に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Impaired insulin secretion is a more common cause of type 2 diabetes in Japan compared to other countries. In this study, we developed detection methods for lipid-modifying proteins involved in the transfer of insulin-containing vesicles to cell membranes in response to changes in glucose concentration.

Different chain lengths of fatty acids were synthesized as labels to analyze lipid-modifying proteins. These labels were reactive to target molecules without leaving behind residual products in vitro. Thus, we successfully modified proteins for each fatty acid length. In addition, the secretory capacity of insulin with the synthesized labels was evaluated. Finally, we attempted to develop a new analytical method for detection of modified proteins.

研究分野：薬系分析および物理化学関連

キーワード：糖尿病 脂質修飾 クリックケミストリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では、白色人種と比較して「インスリン分泌障害」に起因する2型糖尿病患者数が2倍から3.6倍程度多いことが知られており、「インスリン分泌障害」の発症機序解明が求められている¹⁾。インスリンは膵臓β細胞にて作られ、細胞内のインスリン小胞内に貯蔵される。その後、グルコースなどのインスリン分泌刺激に応じて、そのインスリン小胞を膵臓β細胞の細胞膜へと移行させ、インスリンを細胞外に分泌する。そのため、インスリン分泌障害の病態を明らかにするためには、インスリン小胞膜と細胞膜との相互作用に影響を及ぼす因子を明らかにする必要があったと考えた。

これまでに糖尿病モデルマウスにおいて「脂質修飾された低分子代謝物が膵臓に蓄積することにより、インスリン分泌能が低下すること」および「修飾脂肪酸の鎖長差により、インスリン分泌障害の程度が異なること」が報告された²⁾。脂質修飾は低分子代謝物に限らず、生体高分子であるタンパク質においても生じ、神経伝達物質の分泌能や発がん活性に必須であるなど、疾患との関連が示唆されている他、生理活性タンパク質に結合することにより、シグナル伝達に関わることが知られている³⁾。また、2型糖尿病患者において脂質異常症を併発する症例は多く、脂質変化がインスリン分泌障害の発症に影響を与えている可能性が高いと考えられた。しかしながら、膵臓β細胞のタンパク質に対して脂質修飾が起こりえるのか、また、2型糖尿病のような高グルコース環境下における脂質修飾タンパク質の変動は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では**インスリン分泌障害に關与する脂質修飾タンパク質探索系の樹立を目的とした**。脂質修飾タンパク質を検出する手法を確立するにあたり、クリックケミストリー手法に着目した⁴⁾。この方法は、室温で反応が進行し、副生成物が生成されないという特徴があり、タンパク質の解析に使用しやすいと考えられた。今回は、銅触媒下においてアルキン構造とアジド構造を環化させ、トリアゾール構造を生成する反応を利用することとした。そのため、まず脂質修飾タンパク質を標識する脂肪酸アルキンの合成を行った。その後、脂質修飾タンパク質の精製条件の検討、グルコース濃度変化に伴う脂質修飾タンパク質の発現変動を解析することを目指した。また、インスリン分泌障害への関与を明らかにするため、インスリン分泌量の測定や組織上での簡易分析手法の開発へ応用することとした。

3. 研究の方法

本研究では、「(1) クリックケミストリーを用いた脂質修飾タンパク質解析系の確立」および「(2) 新規前処理法の開発による網羅的かつ簡易な脂質修飾タンパク質解析」を実施した。

(1) クリックケミストリーを用いた脂質修飾タンパク質解析系の確立

試薬作製

C末端をアルキン化した脂肪酸を合成するため、有機金属試薬や Jones 試薬を用いて、目的の脂肪酸鎖長になるよう、脱水下で合成反応を行った。得られた生成物を核磁気共鳴装置や質量分析装置を用いて、生成物の構造および質量を測定した。

細胞毒性・形態評価

ラット由来膵臓β細胞の培養条件を検討後、で合成した脂質修飾ラベル化試薬の添加濃度を検討した。また、高血糖状態を模した高グルコース含有培地にて培養を行った。その際、WST-8 試薬による生存率および光学顕微鏡を用いた細胞の形態評価を行った。

タンパク質発現解析

グルコース濃度の異なる培地中に で合成した試薬を で決定した濃度になるよう添加し、一定時間細胞を培養後、タンパク質を回収した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、タンパク質の分子量毎に分離後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色により、各バンドの染色強度を比較した。

クリックケミストリー

と同様の条件で細胞を培養後、タンパク質を回収した。その後、銅触媒下において、ビオチンが修飾されたアジド化合物を添加し、アジド-アルキン環化反応を行った。その後、ストレプトアビジンアガロースビーズを用いてビオチン修飾された脂質修飾タンパク質を回収・精製した。精製したタンパク質を と同様に SDS-PAGE を行い、CBB 染色または銀染色によりバンド発現の有無および染色強度を比較した。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析 (MALDI-MS)

において、変化の見られたタンパク質のバンドを切り出し、ゲル内消化後、タンパク質を MALDI-MS にて解析した。

ELISA

インスリンの分泌能および合成能を評価するため、ELISA 法にて細胞外液および細胞内のインスリン濃度を測定した。

(2) 新規前処理法の開発による網羅的かつ簡易な脂質修飾タンパク質解析

MALDI-MS

導電性スライドガラス上に細胞を播種後、合成した試薬を添加した。一定時間培養後、培地を除去した。洗浄後、イオン化補助剤であるマトリックスを手動スプレーにて均一に塗布し、レーザーを照射することでマススペクトルを得た。

4. 研究成果

(1) クリックケミストリーを用いた脂質修飾タンパク質解析系の確立

試薬作製

C末端をアルキン化した脂肪酸の合成を試みた結果、既に市販されているパルミチン酸アルキン (C16) を含む、4種類の脂肪酸アルキンの合成に成功した。

細胞毒性・形態評価

ラット由来膵臓β細胞として BRIN-BD11 細胞を用い、RPMI-1640 培地にて培養した。WST-8 を添加し、450 nm の吸光度を測定した結果、播種密度は 4.0×10^4 cells/mL 条件が最適であると考えられた。合成した脂質修飾ラベル化試薬を終濃度 100-200 μ M となるよう添加した結果、各試薬によって細胞の生存率が大きく異なることが分かった。特に、200 μ M の C16 を添加した群において、生存率が著しく低下し、それらの細胞は、接着せずに浮遊した。一方、高血糖状態を模した高グルコース含有培地下にて培養を行ったところ、試薬の濃度差による細胞生存率および形態に大きな変化は見られなかった。今回の研究では、2型糖尿病を模した高グルコース環境下において、脂質修飾され得るタンパク質を探索するため、各試薬の添加量は細胞毒性の見られない最大量 (200 μ M 以下) を添加することとし、C16 においては終濃度を 100 μ M とした。

タンパク質発現解析

クリックケミストリー実施前にタンパク質を回収し、SDS-PAGE を行ったところ、複数のバンドにおいて発現および染色強度に変動が見られた。これらは脂肪酸アルキン試薬により誘導されたタンパク質であると考えられた。今後、末端構造にアルキン構造を持たない脂肪酸を用いて、タンパク質発現を解析する予定である。

クリックケミストリー

クリックケミストリー実施後の細胞においても、と同様のタンパク質発現変動が見られた。次に、ストレプトアビジンアガロースビーズを用いた精製後のタンパク質発現を解析したところ、50-200 kDa のタンパク質において、試薬添加の有無に関わらず、バンドが検出された。これらはクリックケミストリーで用いるビオチン修飾アジド試薬との非特異的な結合が起こった可能性、または、精製過程に行う洗浄操作が不十分であった可能性が考えられた。一方、合成した試薬添加群においてのみ、グルコース濃度変化に応じたバンドの発現変化が複数観察された。また、これらのバンドは添加する脂肪酸差長によって異なっていることが分かった。この結果から、これらの特異的なバンドは、グルコース濃度変化に応じて発現変動する脂質修飾タンパク質であり、脂肪酸差長によって異なるタンパク質に修飾され得る可能性が示唆された。

MALDI-MS

において、変化の見られた CBB 染色後のバンドを切り出し、ゲル内消化後、2,5-ジヒドロキシ安息香酸をイオン化補助剤に用いて MALDI-飛行時間型 MS にて解析したところ、消化酵素であるトリプシンや夾雑物質であるケラチンに相当するペプチド断片シグナルが多数観察された。そのため、変動がみられたタンパク質の同定には至らなかった。今後、Orbitrap 型やフーリエ変換型の質量分析装置の使用や同位体質量タグを用いた液体クロマトグラフィー-質量分析による網羅的プロテオミクスを試みることにより、タンパク質の同定および発現量変化を測定する予定である。

ELISA

添加する試薬の種類によって、細胞内外のインスリン量に差があることが分かった。特に、C16 においては、高グルコース濃度変化によって細胞内でのインスリン合成能が低下しやすいことが分かった。このことから、インスリン合成能および分泌能のどちらにおいても、細胞外液に含有する脂肪酸の量や鎖長による影響を受けることが示唆された。一方、今回の結果からは、脂質修飾タンパク質がインスリンの分泌や合成能に影響を与えたのかは不明である。そのため、にて変動したタンパク質を同定し、また、脂質修飾に関与する酵素を特定した後、遺伝子組み換え操作を行い、細胞内での脂質修飾タンパク質を過剰発現させることで、インスリンの分泌および合成能の評価を行うことを考えている。

(2) 新規前処理法の開発による網羅的かつ簡易な脂質修飾タンパク質解析

MALDI-MS

簡易分析に使用する予定であった装置が COVID-19 による社会情勢の影響で購入できず、当初の予定通り、実施することができなかった。一方、スライドガラス上に細胞を播種し、合成した試薬を添加した後、MALDI-MS 解析を試みたところ、試薬添加群に特異的なシグナルの検出に成功した。今後、これらのシグナルの同定を行うことやクリックケミストリーを実施後の MALDI-MS 解析を行っていく予定である。

<引用文献>

- 1) Fukushima M et al., *Diabetes Res Clin Pract*, 66, S37-S43, 2004
- 2) Aichler M et al., *Cell Metab*, 26, 1334-1347, 2017
- 3) Resh MD et al., *Nat Chem Biol*, 2, 584-590, 2006
- 4) Worrell BT et al., *Science*, 340, 457-460, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田 仁捺, 松下 祥子, 杉本 歩未, 志村 大順, 田代 憲史郎, 林 亜紀, 早川 麻美子, 青山 忠, 鈴木 佑典
2. 発表標題 質量分析法を用いた膵 細胞における脂質修飾タンパク質の検出
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------