

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770144

研究課題名(和文) 糖尿病の糖毒性に関与するタンパク質リン酸化制御分子の解析

研究課題名(英文) Analysis of protein kinases relating to glucotoxicity

研究代表者

末吉 紀行(SUEYOSHI NORIYUKI)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：90346635

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病において、糖毒性とそれに伴うインスリン分泌抑制を制御する情報伝達機構はほとんど分かっていない。我々は、糖毒性状態でのインスリン分泌量の減少に伴って発現量が減少するPKとしてCaMKIVを同定した。CaMKIVは高グルコース条件で培養した細胞抽出液によりCa²⁺依存的に分解され、カルパイン阻害剤により阻害された。また、INS-1細胞に恒常的活性型CaMKIVを導入することで、インスリンプロモーター活性が4倍上昇した。さらに、糖尿病モデルラットOLETFにおいても、糖毒性状態でCaMKIVの発現量が減少していた。

研究成果の概要(英文)：Glucotoxicity is a critical component of the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus; however, the molecular mechanisms of glucotoxicity are still not fully understood. In this study, we analyzed the protein kinase that correlated with insulin synthesis in INS-1 cells under glucotoxic conditions. When expression patterns of protein kinases in INS-1 cells were analyzed by Western blotting with Multi-PK antibodies, a kinase of 63 kd was significantly reduced concomitant with the decrease of insulin secretion under glucotoxic conditions. Judging from the molecular size of a native kinase/cyanogen bromide fragment and pI value, the 63-kd protein kinase was deduced to be CaMKIV. The decreased CaMKIV levels under glucotoxic conditions recovered to original levels after changing the medium to a normal glucose concentration. Recombinant CaMKIV was degraded in a Ca²⁺-dependent manner by incubation with cell lysates from INS-1 cells under glucotoxic conditions, and degradation was protected by calpain inhibitor. Furthermore, CaMKIV was reduced in the pancreatic islets of diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, whereas that of nondiabetic Long-Evans Tokushima Otsuka rats was not. This study suggests that the abnormal regulation of CaMKIV is a component of β -cell dysfunction caused by high glucose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖尿病、糖毒性、プロテインキナーゼ、CaMKIV

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物において、血中グルコース濃度を一定に保持することは生理的に重要な意味を持つ。グルコース濃度の上昇はインスリンやグルコース恒常性に関与するいくつかの遺伝子の転写を促進する。一時的な細胞外グルコース濃度の上昇は膵臓β細胞の機能と生存を促進するが、慢性的なグルコース濃度の上昇は逆にβ細胞の機能を損なわせる。この慢性的なグルコース濃度の上昇による毒性を糖毒性と呼ぶ。糖毒性は、末梢組織におけるインスリンの作用とβ細胞のインスリン分泌に対して障害を起すため、2型糖尿病の病態生理において重要な意味を持つ。インスリン分泌障害はグルコース濃度の上昇を促進させ、その結果糖毒性を引き起こす。この自己促進型のフィードバックメカニズムは糖尿病の進行を加速し、糖尿病性合併症を引き起こす。この糖毒性の特徴の一つは、インスリンプロモーター活性の低下によるインスリン遺伝子の発現抑制である。膵臓β細胞は1型および2型糖尿病の発病において重要な役割を果たしており、その機能障害は主にアポトーシスと高血糖の亢進による結果である。グルコースによる毒性やβ細胞のアポトーシスには転写因子である *pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1)* や *CCAAT/enhancer-binding protein-β (C/EBP-β)* が関与することが知られているが、糖毒性の分子メカニズムは未だ十分には分かっていない。

プロテインキナーゼはシグナル経路の制御を通して様々な細胞内機能において中心的な役割を果たすことが知られている。そのため、それらの機能的役割を解明するためには、細胞や組織における全てのプロテインキナーゼの発現プロファイルを知ることが重要である。これまでに、プロテインキナーゼの高度保存領域に対するユニークなモノクローナル抗体(マルチ PK 抗体)を作製し、これらを用いて多数のプロテインキナーゼを検出してきた。そして、これらの抗体がウエスタンブロッティングにより複数の種類のプロテインキナーゼを検出するツールとして有用であることを示した。

2. 研究の目的

(1) マルチ PK 抗体を用いて、細胞内に発

現している PK を網羅的に検出する手法、ならびに検出した PK を簡便に特定する手法を確立する。

(2) 確立した手法の応用例として、糖尿病のモデル細胞である INS-1 細胞において検出された PK を同定し、インスリン分泌の制御メカニズムへの関与を解明する。

3. 研究の方法

インスリン分泌と相関して発現量が変動するプロテインキナーゼを調べるため、糖尿病モデル細胞である INS-1 細胞と網羅的にプロテインキナーゼを検出することが出来るマルチ PK 抗体を用いた。ウエスタンブロッティングで解析し、変動があったバンドの同定には、今回新たに開発した CnBr 分解法を利用したユニークな 2D-PAGE および MicroRotofor/SDS-PAGE を併用し、等電点や分子量などの情報から PK を同定した。また、糖尿病モデルラット OLETF とコントロールラット LETO を用いて、動物レベルでの実験も行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内に発現するプロテインキナーゼを簡便に同定するために、CnBr 分解法を利用したユニークな 2D-PAGE を考案した。プロテインキナーゼのサブドメイン VIB 配列を含む CnBr 分解断片をマルチ PK 抗体を用いて検出することによって、その分子量を知ることができる。さらに、MicroRotofor/SDS-PAGE 解析を行うことにより、プロテインキナーゼの分子量および等電点が決定できる。実際にリコンビナント DCLK および CaMKII をこの新たな 2D-PAGE で解析すると、予想される断片の分子量にスポットが検出された。さらにラット脳抽出液を MicroRotofor と 2D-PAGE を組み合わせて解析したところ、ネイティブの分子量が約 63 kDa で、等電点が約 5 のプロテインキナーゼの CnBr 分解断片の分子量は約 19 kDa であった。これらの情報をもとに、インターネットデータベースから相当するプロテインキナーゼを検索したところ、CaMKIV であると推測された。そこで CaMKIV の発現を CaMKIV 特異的な抗体を用いることにより確かめた。これらの結果から、新たに考案した 2D-PAGE と MicroRotofor を用いることにより、細胞や組織に発現する未知のプロテ

ンキナーゼを簡便に同定することが可能であると考えられる。

(2) 糖毒性は2型糖尿病の病態生理における重要な構成要素である。しかし、糖尿病の分子メカニズムはまだ十分に理解されていない。そこで今回の研究では、新しく開発した手法を用いて膵臓β細胞の糖毒性に関与するプロテインキナーゼの同定を試みた。糖尿病モデル細胞である INS-1 細胞に発現するプロテインキナーゼを調べるため、多様なプロテインキナーゼを検出できるマルチ PK 抗体を用いたウエスタンブロッティング解析を行った。その結果、インスリン分泌量と相関して発現量が変動する 63 kDa のプロテインキナーゼを見出した。この 63 kDa のプロテインキナーゼを同定するために、ユニークな 2D-PAGE の手法と MicroRotofor/SDS-PAGE を利用した。63 kDa のプロテインキナーゼは、ネイティブの分子量、CNBr 断片の分子量、等電点の情報から CaMKIV であると推測された。そこで、CaMKIV であることを CaMKIV に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確かめた。糖毒性条件下における CaMKIV の減少は、通常のグルコース濃度の培地で培養することによって回復した。リコンビナント CaMKIV は糖毒性条件下の INS-1 細胞抽出液によって Ca²⁺依存的に分解され、この分解は calpain inhibitor III によって抑制された。さらに、糖尿病モデルである OLETF ラットにおいて CaMKIV が減少し、コントロールラットでは減少していないことを確かめた。これらの結果から、慢性的な高グルコースによって引き起こされるβ細胞の機能障害は、CaMKIV の異常制御が関係していることを示唆する。

(3) CaMKIV の他にも2型糖尿病に関与していると考えられる PK がないか探索した。マルチ PK 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、2型糖尿病のモデル動物である OLETF ラットとコントロールラットの LETO の各臓器に発現する PK のプロファイリングを行い比較したところ、膵臓に発現する 58 kDa の PK が OLETF ラットでは減少していることが明らかとなった。この 58 kDa の PK について、MicroRotofor で等電点を調べたところ、約 5 であった。分子量 58 kDa と等電点約 5 という情報をもとに、該当する PK を ExPASy TagIdent tool で検索すると、インスリンシグナル経路に関わっている PKB alpha やスト

レス応答性キナーゼである MAPKK5 など 24 種類の PK が候補に挙がった。この 58 kDa の PK は、OLETF ラットが糖尿病を発症する 25 週齢以降で減少していることから、糖尿病に関与している可能性がある。一方、ラットインスリノーマ INS-1 細胞の抽出液をマルチ PK 抗体を用いて解析したところ、インスリン分泌抑制(糖毒性)が起こる 22.4 mM グルコースで培養したときに発現量が増加する 210 kDa と 170 kDa の PK を検出した。これらの PK の分子量と、MicroRotofor における等電点 (pI = 6) に基づいたデータベース検索により、膜貫通型 PK である MRCK と ROCK が候補に挙がった。本研究において、OLETF ラットの膵臓および INS-1 細胞から2型糖尿病に関与していると思われるいくつかの PK が検出された。今後はこれらの PK を同定し、2型糖尿病の発症との関わりを明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Kaneko K., Sugiyama Y., Yamada Y., Sueyoshi N., Watanabe A., Asada Y., Ishida A., Kameshita I., CoPK32 is a novel stress-responsive protein kinase in the mushroom *Coprinopsis cinerea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, in press, 2011. 査読有
- ② Nagamine T., Shimomura S., Sueyoshi N., Kameshita I., Influence of Ser/Pro-rich domain and kinase domain of doublecortin-like protein kinase on microtubule-binding activity. *The Journal of Biochemistry*, in press, 2011. 査読有
- ③ 亀下勇、末吉紀行、プロテインキナーゼ解析用ツールとしての網羅的抗体、*生化学* 83 巻、330-335, 2011. 査読有
- ④ Senga Y., Nagamine T., Sekiguchi M., Kaneko K., Sueyoshi N., Kameshita I., Detection of protein kinase substrates in tissue extracts after separation by isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry*, 408(2), 345-347, 2011. 査読有

- ⑤ Sugiyama Y., Murao K., Imachi H., Sueyoshi N., Ishida T., Kameshita I., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV involvement in the pathophysiology of glucotoxicity in rat pancreatic β -cells. *Metabolism*, 60(1), 145-153, 2011. 査読有
- ⑥ Sugiyama Y., Hatano N., Sueyoshi N., Suetake I., Tajima S., Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Kameshita I., The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase I δ /epsilon. *Biochemical Journal*, 427(3), 489-497, 2010. 査読有
- ⑦ Nimura T., Sugiyama Y., Sueyoshi N., Shigeri Y., Ishida A., Kameshita I., A minimum size homologue of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV naturally occurring in zebrafish. *The Journal of Biochemistry*, 147(6), 857-865, 2010. 査読有
- ⑧ Kameshita I., Shimomura S., Nishio K., Sueyoshi N., Nishida T., Nomura M., Tajima S., Expression and characterization of PKL01, an Ndr kinase homolog in *Lotus japonicus*. *The Journal of Biochemistry*, 147(6), 799-807, 2010. 査読有
- ⑨ Shimomura S., Nagamine T., Hatano N., Sueyoshi N., Kameshita I., Identification of an endogenous substrate of zebrafish doublecortin-like protein kinase using a highly active truncation mutant. *The Journal of Biochemistry*, 147(5), 711-722, 2010. 査読有
- ⑩ Kameshita I., Baba H., Umeda Y., Sueyoshi N., In-gel protein phosphatase assay using fluorogenic

substrates. *Analytical Biochemistry*, 400(1), 118-122, 2010. 査読有

- ⑪ Sueyoshi, N., Nimura, T., Ishida, A., Taniguchi, T., Yoshimura, Y., Ito, M., Shigeri, Y., Kameshita, I., Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP) is indispensable for normal embryogenesis in zebrafish, *Danio rerio*. *Arch. Biochem. Biophys.* 488, 48-59, 2009. 査読有
- ⑫ Kaneko, K., Yamada, Y., Sueyoshi, N., Watanabe, A., Asada, Y., Kameshita, I., Novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase expressed in actively growing mycelia of the basidiomycetous mushroom *Coprinus cinereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790, 71-79, 2009. 査読有
- ⑬ Inoue, T., Okino, N., Kakuta, Y., Hijikata, A., Okano, H., Goda, H.M., Tani, M., Sueyoshi, N., Kambayashi, K., Matsumura, H., Kai, Y., Ito, M., Mechanistic insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase. *J. Biol. Chem.* 284, 9566-9577, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 2 1 件)
- ① Noriyuki Sueyoshi, Takaki Nimura, Takashi Onouchi, Hiromi Baba, Shinobu Takenaka, Atsuhiko Ishida, Isamu Kameshita : Functional Processing of Nuclear Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Phosphatase (CaMKP-N) : EVIDENCE FOR A CRITICAL ROLE OF PROTEOLYTIC PROCESSING IN THE REGULATION OF ITS CATALYTIC ACTIVITY, SUBCELLULAR LOCALIZATION AND SUBSTRATE TARGETING *IN VIVO*. 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral & 9th International Conference on Protein Phosphatase, Tokyo (2011年2月3日).
- ② 千賀由佳子、永峰賢、二村貴樹、末吉紀

- 行、亀下勇：Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼ I (CaMKI)-delta はゼブラフィッシュの正常な胚発生に重要である。第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (2010年12月7日~10日).
- ③ 片山将一、杉山康憲、末吉紀行、寺地徹、亀下勇：植物 Ndr キナーゼの自己チロシンリン酸化活性。第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (2010年12月7日~10日).
- ④ 馬場裕美、金子啓祐、末吉紀行、亀下勇：蛍光基質を用いたホスファターゼ検出法の新しい応用例。第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (2010年12月7日~10日).
- ⑤ 小野内貴士、二村貴樹、馬場裕美、竹中忍、石田敦彦、亀下勇、末吉紀行：核局在型 Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP-N) の機能的な限定分解。第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (2010年12月7日~10日).
- ⑥ Yukako Senga, Tadashi Nagamine, Takaki Nimura, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI)-delta is indispensable for normal embryogenesis in zebrafish, *Danio rerio*. ISD-Nara, Japan, Nara (2010年11月15日~18日).
- ⑦ Mari Sekiguchi, Yasunori Sugiyama, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita : Identification and characterization of protein kinases that bind to N-terminal domain of DNA methyltransferase 1. 12th IUBMB Conference, Melbourne (2010年9月26日~10月1日).
- ⑧ Yukako Senga, Tadashi Nagamine, Takaki Nimura, Eriko Nanto, Isamu Kameshita, Noriyuki Sueyoshi : Knockdown of zebrafish Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I causes developmental abnormalities in zebrafish, *Danio rerio*. 12th IUBMB Conference, Melbourne (2010年9月26日~10月1日).
- ⑨ 金子啓祐、馬場裕美、渡邊彰、麻田恭彦、末吉紀行、亀下勇：担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成過程で活性が増大するホスファターゼ。日本農芸化学会四国支部大会、香川 (2010年9月24, 25日)
- ⑩ Keisuke Kaneko, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita : Characterization of novel protein kinases in mushroom *Coprinus cinereus*. The 9th International Mycological Congress, Edinburgh (2010年8月1日~8月6日).
- ⑪ Hiromi Baba, Keisuke Kaneko, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita : Detection of protein kinases and protein phosphatases expressed in mushroom. The 9th International Mycological Congress, Edinburgh (2010年8月1日~8月6日).
- ⑫ 千賀由佳子、永峰賢、二村貴樹、末吉紀行、亀下勇：ゼブラフィッシュの初期胚発生における Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼ I delta (CaMKIdelta) の役割。第51回日本生化学会中国・四国支部例会、山口 (2010年5月14, 15日).
- ⑬ 馬場裕美、梅田嘉徳、末吉紀行、亀下勇：プロテインホスファターゼの新しい検出法の開発とその応用。第51回日本生化学会中国・四国支部例会、山口 (2010年5月14, 15日).
- ⑭ 馬場裕美、梅田嘉徳、末吉紀行、亀下勇：蛍光基質を用いたゲル内プロテインホスファターゼ検出法の開発。第32回日本分子生物学会年会、横浜 (2009年12月9~12日).

- ⑮ 下村幸子、永峰賢、波多野直哉、末吉紀行、亀下勇：ゼブラフィッシュ Doublecortin-like protein kinase (zDCLK) の活性型変異体を用いた内在性基質の探索ならびに同定。第32回日本分子生物学会年会、横浜（2009年12月9～12日）。
- ⑯ 千賀由佳子、永峰賢、二村貴樹、末吉紀行、亀下勇：CaMKI δ はゼブラフィッシュの正常な胚発生に不可欠である。第32回日本分子生物学会年会、横浜（2009年12月9～12日）。
- ⑰ 二村貴樹、岸野良美、末吉紀行、亀下勇：核局在型 CaM キナーゼホスファターゼ (CaMKP-N) の細胞内分解機構の解析。第32回日本分子生物学会年会、横浜（2009年12月9～12日）。
- ⑱ 金子啓祐、杉山康憲、末吉紀行、亀下勇：担子菌キノコのストレス応答性プロテインキナーゼの解析。日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部、日本食品科学工学会西日本支部、2009年度合同沖縄大会、沖縄（2009年10月30, 31日）。
- ⑲ 永峰賢、下村幸子、末吉紀行、亀下勇：Doublecortin-line protein kinase と Doublecortin の微小管結合力の違いはSP領域に起因する。第82回日本生化学会大会、神戸（2009年10月21～24日）。
- ⑳ 杉山康憲、関口菜里、末吉紀行、波多野直哉、木下英司、木下恵美子、小池透、末武勲、田嶋正二、亀下勇：マウス DNAメチルトランスフェラーゼ1のDNA結合活性はカゼインキナーゼ1によるリン酸化によって制御される。第82回日本生化学会大会、神戸（2009年10月21～24日）。
- ㉑ 沖野望、角田佳充、鶴木（加藤）陽子、末吉紀行、伊東信：スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ (SCDase) のX線結晶構造解析。第82回日本生化学会大会、神戸（2009年10月21～24日）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末吉 紀行 (SUEYOSHI NORIYUKI)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：90346635