

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700843

研究課題名（和文）心臓における解糖系酵素 GAPDH を介した新規インスリンシグナル伝達経路

研究課題名（英文）Study of a novel insulin signaling network mediated by GAPDH in H9c2 cardiac cell line

研究代表者

馬場 猛 (BABA TAKESHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80366450

研究成果の概要（和文）：

解糖系酵素として重要なGAPDHは、心筋細胞でインスリン刺激後リン酸化されるが、本研究においてインスリン刺激後GAPDHはリン酸化に先んじ細胞骨格に寄与するアクチンと会合し、ニトロ化され、さらに核移行することがわかった。また糖尿病発症ラット心筋組織において、このGAPDHを介したシグナル伝達が破綻している可能性も示唆された。これらの知見から心筋においてGAPDHがインスリンシグナル伝達において重要な役割を果たしていることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2 it has been shown that phosphorylation of GAPDH, one of the glycolytic enzymes, was induced by insulin treatment. In this study, GAPDH nitration and its association with actin were both induced by insulin treatment before the GAPDH phosphorylation response to insulin stimulation in the H9c2 cell line. Moreover, after treatment of the cell line with insulin, accumulation of GAPDH protein in the nucleus was observed. We also demonstrated the possibility that insulin signaling mediated by GAPDH was impaired in the heart of type 2 diabetic rat. These results suggest that GAPDH may play a key role in insulin signal transduction in cardiac muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：心筋、インスリン、2型糖尿病、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は血糖値調節機構の破綻様式の違いにより大きく1型と2型にわけられるが、遺伝的要因や環境因子による組織へのインスリン感受性低下及び膵臓からのインスリン分泌低下によって高血糖を示す2型糖尿

病が9割以上を占め、このような血糖値制御システムの破綻が脳卒中や心臓病といった病態発生のリスクファクターとして個体に大きく影響する。

一般にインスリンの働きによって血中の糖を骨格筋や脂肪細胞に取り込ませ、血糖値

を低下させると考えられているが、これらの組織による糖の取り込みだけが血糖値を低下させる主要因ではないことが示唆されており、血糖値調節の新たな機構の探索が重要だと考えられる。

このような背景からこれまでに我々は、ラットの心筋組織における血糖値調節機構の探索を試み、その結果、血糖値上昇時、心筋においてのみ、リン酸化 Akt と解糖系酵素として重要な役割を果たすグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が会合し、GAPDH 自身もリン酸化を受けることを明らかにしてきた (Baba T, *et. al.*, FEBS Letters, 2010)。また心筋細胞由来の H9c2 細胞株においても、インスリン刺激依存的にリン酸化 Akt と GAPDH が会合し、さらにインスリン刺激による GAPDH のリン酸化に伴い、GAPDH の酵素活性が亢進することも明らかにした。

GAPDH は解糖機能に加え、アポトーシスにも関与し、その機能は多岐にわたることが示唆されており、心筋における GAPDH を介したインスリンシグナル伝達経路の詳細なメカニズムの解析に伴う GAPDH の更なる機能解明は糖尿病やそれに伴う心疾患に対する治療開発に結びつくことが期待される。

2. 研究の目的

(1) 心筋細胞株における GAPDH を介したインスリンシグナル伝達経路の解明：

- 心筋細胞株のインスリン刺激に伴い、
- ① GAPDH のリン酸化修飾以外の修飾、および GAPDH に会合する分子の検討を行う。
 - ② 蛍光タンパク質と GAPDH の融合タンパク質発現解析系を構築し、蛍光顕微鏡によって細胞内局在およびその時間的变化を視覚的に検討する。

これらより、インスリンシグナル伝達制御機構の詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

(2) 心筋組織内の GAPDH の役割：

心筋組織における GAPDH を介した細胞内シグナル伝達の違いを、15 週齢から肥満を呈し、24 週齢で雄の約 90% が糖尿病を発症する、2 型糖尿病モデルラットである大塚製薬 (株) 徳島研究所で開発された、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) とコントロールラット (LETO) を比較して詳細に検討する。

これにより、心臓組織における血糖値制御に関わる GAPDH の役割に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ① 心筋細胞株 (H9c2) に対してインスリン刺激を 1 分、5 分、15 分間行い、細胞溶解液を調製し、抗 GAPDH 抗体で免疫沈降した。SDS-PAGE 後、我々が見出した 6-ニトロトリプトファン (6-NO₂Trp) に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。また SDS-PAGE 後、GAPDH と強く会合していた分子に対して質量分析法を用いたプロテオーム解析により、その分子の同定を行った。

② ラット心筋 cDNA ライブラリーから PCR 法により GAPDH cDNA 断片およびアクチン cDNA 断片を増幅し、GAPDH の下流に緑色蛍光タンパク質 (AcGFP) を、アクチンの上流に赤色蛍光タンパク質

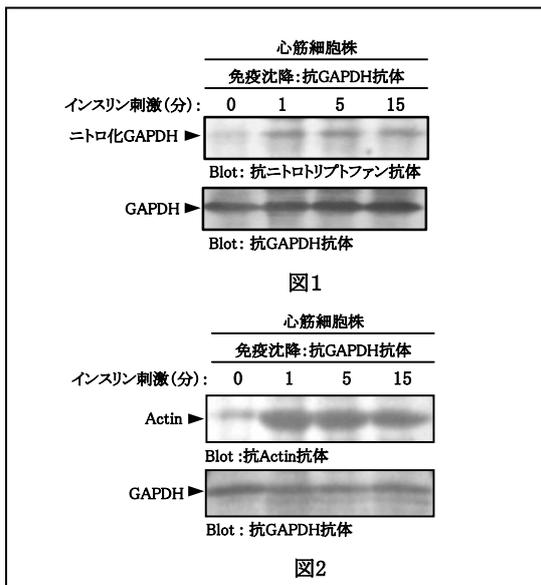
(DsRed) をコードする遺伝子を連結させ、哺乳類細胞発現ベクターに組み込み、融合タンパク質発現プラスミドベクターを構築した。構築したベクターを H9c2 細胞株にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入し、細胞株を樹立した。樹立した細胞株に対してインスリン刺激を行い、その蛍光を蛍光顕微鏡によって観察した。

(2) 24 週齢の OLETF、LETO、体重 1 kg あたり 5mL の 20% グルコース溶液を腹腔内に投与し、0 分、60 分、120 分後、心筋を回収し、直ちに細胞溶解液を調製後、抗 GAPDH 抗体を用いた免疫沈降法、電気泳動法によって GAPDH の翻訳後修飾の差異を比較検討した。

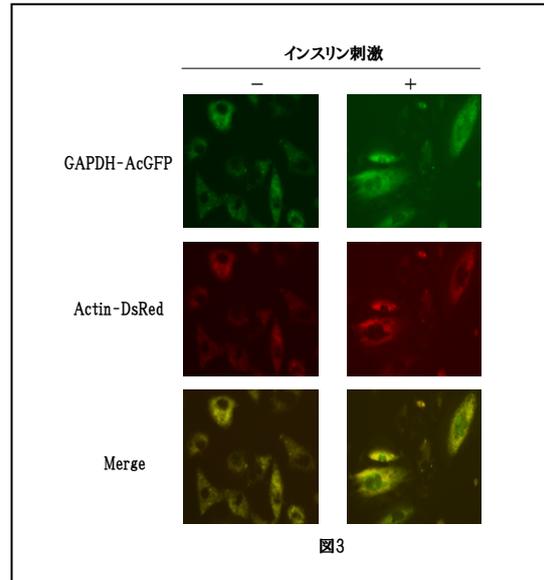
4. 研究成果

(1) ① H9c2 細胞株においてインスリン刺激後、1 分で GAPDH のニトロ化が観察され、刺激後 15 分までニトロ化の亢進が確認された (図 1)。またインスリン刺激後、1 分で GAPDH はアクチンと会合することも明らかとなった (図 2)。GAPDH はインスリン刺激 15 分後にリン酸化を受けることがわかっており (Baba T, *et. al.*, FEBS Letters, 2010)、従って、今回得られた結果より、心筋細胞株では GAPDH がインスリン刺激に伴うリン酸化に先

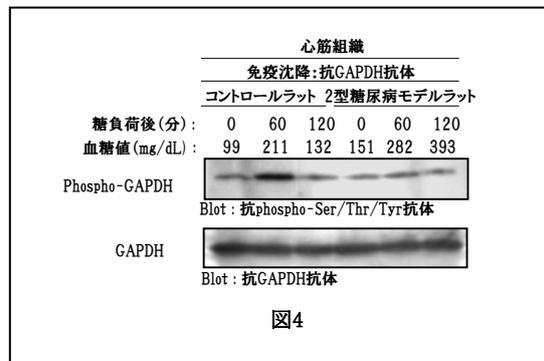
んじて、トリプトファンのニトロ化修飾を受け、さらにアクチンとも会合することが明らかとなった。一般的にタンパク質のニトロ化修飾は、炎症などの酸化ストレスを伴う疾患で生体内に生じる過剰な活性窒素種により生じ、タンパク質の機能傷害を引き起こすと考えられているが、トリプトファン残基のニトロ化修飾が細胞内シグナル伝達に関与していることは今までに報告されていない。



②蛍光タンパク質と GAPDH およびアクチンの融合タンパク質を発現する細胞株に対して、インスリン刺激を行い、蛍光顕微鏡によってそれらの局在変化を観察したところ、インスリン刺激前では GAPDH およびアクチンは細胞質内に偏在しているが、インスリン刺激を行うと、GAPDH は核移行していることが観察された (図 3)。エンドトキシン刺激したマクロファージやグルタミン酸刺激した神経細胞では GAPDH が核移行し、アポトーシスを誘導するとの報告がある。従ってインスリン刺激を受けた心筋細胞も GAPDH の核移行によってアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。



(2) コントロールラット (LETO) では、糖負荷後、血糖値の上昇時に GAPDH のリン酸化が亢進し、血糖値減少と共に脱リン酸化されるのに対し、2 型糖尿病モデルラット (OLETF) では、血糖値上昇時に GAPDH のリン酸化が亢進しなかった (図 4)。これにより糖尿病を発症するラットでは GAPDH を介したシグナル経路が破綻している可能性が示唆された。



今回の研究成果である心筋細胞のインスリン刺激による GAPDH とアクチンの会合、および GAPDH のリン酸化に先んじたニトロ化修飾、さらには GAPDH の核移行といった現象の発見がインスリンシグナル伝達の全貌解明の足がかりになると考えられる。また糖尿病発症ラットではこのような GAPDH を介したインスリンシグナルが破綻している可能性も示唆され、このようなシグナル伝達の更なる詳細の検討が多岐にわたる GAPDH の機能解明につながり、糖尿病のみならず、心疾患治療の創出に結びつくことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

①馬場 猛、小林 裕幸、川崎 広明、宇田宗弘、大森 大二郎、第 84 回生化学会、心臓における解糖系酵素 GAPDH を介した新規インスリンシグナル伝達経路、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館 (京都)

②馬場 猛、川崎 広明、宇田 宗弘、山倉文幸、第 85 回生化学会、心筋細胞における解糖系酵素 GAPDH を介したインスリンシグナル伝達、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 猛 (BABA TAKESHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80366450