

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590320

研究課題名(和文)スルホニル尿素によるEpac2A活性化の分子機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of molecular mechanism underlying Epac2A activation by antidiabetic sulfonylurea drugs

研究代表者

柴崎 忠雄(Shibasaki, Tadao)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00323436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インクレチンは膵細胞内のcAMPを増加させ、PKA依存性およびEpac2A依存性経路を介してインスリン分泌を増強する。Epac2Aはスルホニル尿素(SU)薬でも活性化されることから、インクレチンとSU薬の両方の標的であると考えられる。Epac2AはインクレチンとSU薬の相互作用によるインスリン分泌増強において重要な役割を果たしているが、本研究からその作用はcAMP結合ドメインBおよびcAMP結合ドメインAを介したcAMPとSU薬によるEpac2Aの協調的な活性化によって担われることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The incretin hormones potentiate insulin secretion by PKA-dependent and independent mechanisms, the latter involving Epac2A, which activates small G-protein Rap1. Epac2A is also a target of sulfonylureas (SU)s, widely used drugs in treatment of diabetes. In this study, the mechanism underlying the activation of Epac2A by SU was examined. Molecular docking simulation predicted the amino acid residues of Epac2A that interact with SUs. The predicted amino acids were mutated individually to alanine. Analyses of these mutants by FRET, SU binding, and Rap1 activity revealed that SU-binding site is located in the first cAMP-binding domain A and that binding of SUs to Epac2A depends on SU structures as well as the state of cAMP binding to Epac2A. Also, SU and cAMP synergistically activate Epac2A and its downstream signal Rap1. These data indicate that cAMP and SU cooperatively activate Epac2A through binding to cAMP-binding domain B and cAMP-binding domain A, respectively.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：cAMP Epac2A スルホニル尿素薬 インスリン分泌 膵細胞 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌はインスリン分泌の基本的なメカニズムであるが、ホルモンや神経入力の刺激などによる分泌調節も重要である。GLP-1 や GIP などのインクレチンは、食事の摂取によって消化管内分泌細胞から分泌されるホルモンであり、膵β細胞内の cAMP を増加させ、プロテインキナーゼ A (PKA) 依存性経路と Epac2A (または cAMP-GEFII) 依存性経路を介してグルコース濃度依存性にインスリン分泌を増強する。以前、代表者らは Epac2A が、インスリン分泌促進薬として従来より使用されている SU 薬によって活性化されることを見出した。また Epac2A 欠損マウスでは SU 薬によるインスリン分泌作用や血糖降下作用が低下することから、SU 薬によるインスリン分泌促進作用は部分的に Epac2A を介することを明らかにした。これらの結果は Epac2A が SU 薬とインクレチンの共通の作用標的であることを示しており、Epac2A シグナルが SU 薬とインクレチンの相互作用に関与することが予想された。

Epac2A は cAMP が cAMP 結合ドメインに結合することによって、構造変化を起こし、C 末端に存在する GEF (グアニンヌクレオチド交換領域) が分子表面に露出し、Rap1 が GTP 型に変換されることが明らかになっている。しかし SU 薬による Epac2A の活性化の分子機構は全く分かっていない。SU 薬の SUR1 への結合については、SU 薬が SUR1 分子内の 2 カ所の領域に結合するという 2-site モデルが提唱されている。このモデルでは SU 薬は種類により異なった結合特性を有することが示されている。SU 薬は SU 骨格の左右に 2 つの側鎖 R1 と R2 を有していることから、これらの構造が SUR との結合特性を決めていると考えられる。代表者らの解析により、SU 薬による Epac2A の活性化も SU 薬の種類によって異なることが示されていることが

ら、SU 薬の構造が Epac2A との結合に重要であると考えられる。しかし SU 薬と Epac2A の結合様式は全く解明されていない。また Epac2A 活性化における SU 薬と cAMP の相互作用も不明である。

2. 研究の目的

(1) SU 薬が Epac2A に結合する部位の同定と Epac2A の活性化機構の解明

SU 薬と Epac2A の結合を担うアミノ酸残基の同定から、Epac2A の活性化機構を解明する。また SU 薬の種類による Epac2A への作用の違いを SU 薬の構造に基づいて明らかにする。さらに SU 薬と cAMP を併用した時の Epac2A 活性化機構を明らかにする。

(2) Epac2A を活性化する新たな化合物のスクリーニングとその作用機序の解明

Epac2A を特異的に活性化する低分子化合物を同定する。また同定された化合物によるインスリン分泌効果を細胞、膵島、個体レベルで解明するとともに、血糖降下作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Epac2A における SU 薬と結合するアミノ酸残基のドッキングシミュレーションによる予測

(2) シミュレーションで予測されたアミノ酸残基をアラニンに置換した Epac2A 変異体の作製

(3) 野生型 Epac1、野生型 Epac2A および Epac2A 変異体より作製された Epac2A FRET プローブを用いた FRET 実験

(4) [³H]グリベンクラミドと Epac2A の結合実験

(5) Rap1-GTP アッセイ

4. 研究成果

(1) SU 薬の結合、活性化を担う Epac2A の部位とアミノ酸残基の同定

Epac1 と Epac2A の FRET プローブを用いた

実験の比較から、Epac1 は Epac2A とは異なり、SU 薬によって活性化されなかった。両分子のドメイン構造を比較すると、Epac2A でのみ、cAMP 結合ドメイン A と RA ドメインが存在することから、これらのドメインに SU 薬結合部位が存在することが予想された。そこで構造解析情報に基づいてモデル化した cAMP 結合ドメイン A と既報の RA ドメインを用いた SU 薬のドッキングシミュレーションを行った。その結果、cAMP 結合ドメイン A 内の Cys105、Gly114、Ser116、His124、Arg151 および RA ドメイン内の Asn715 と Glu719 が水素結合を介して SU 薬と相互作用することが予測された。これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を用いて、Epac2A の FRET プローブを用いた実験や Rap1 活性化実験で検証したところ、Cys105、Gly114、Ser116 および His124 が SU 薬の Epac2A への結合に重要であることが示された。次にドッキングシミュレーションによって予測された Epac2A と SU 薬の結合様式と SU 薬の濃度の関係を比較したところ、cAMP 結合ドメイン A と SU 薬の間の水素結合数が多いほど、Epac2A を活性化するのに必要な SU 薬の濃度は低いことが示された。一方、Epac2A を活性化しないグリクラジドは His124 に結合せず、Gly114 だけであった。したがって SU 薬と Epac2A の親和性には SU 薬の種類、つまり SU 薬の側鎖の構造が大きく寄与すると考えられる。

(2) cAMP による Epac2A の活性化と SU 薬結合部位の関連性の解析

³H 標識されたグリベンクラミドと Epac2A 変異体の結合実験から、SU 薬が Epac2A に結合するには cAMP の存在が必要であることが示された。さらにそれぞれ単独では Epac2A や Rap1 を活性化させない低濃度のグリベンクラミドおよび cAMP アナログは同時に作用させると相乗的に Epac2A および Rap1 は活性化され、興味深いことに、インスリン分泌細

胞株 MIN6 において、アドレナリン処置により MIN6 細胞内の cAMP レベルが低下した状態ではグリベンクラミドによる Epac2A および Rap1 の活性化が阻害された。これらの結果から、SU 薬と cAMP は協調的に Epac2A を活性化すると考えられた。

以上の結果から現在、代表者らは下図に示すような SU 薬と cAMP による Epac2A の活性化機構モデルを提唱している。Epac2A の cAMP 結合ドメイン A は SU 薬の結合部位であり、低親和性の cAMP の結合部位であるのに対し、cAMP 結合ドメイン B は高親和性の cAMP 結合部位である(図1)。cAMP 非存在下では SU 薬は cAMP 結合ドメイン A に結合できないが、cAMP が cAMP 結合ドメイン B に結合すると、構造が一部変化し、SU 薬が cAMP 結合ドメイン A に結合しやすくなる。このように、SU 薬は cAMP と協調的に作用することで Epac2A を活性化すると考えられる(図2)。

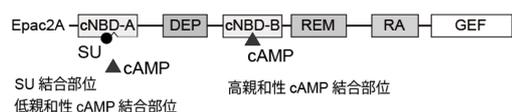


図1 cAMP と SU 薬の Epac2A に対する結合特性

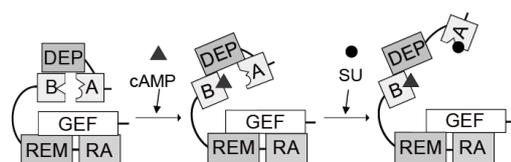


図2 cAMP と SU 薬による Epac2A 活性化のモデル

(3) Epac2A を活性化する新たな化合物のスクリーニングとその作用機序の解明

cAMP 結合ドメイン A に結合し、Epac2A を活性化する分子の候補として、SU 薬および cAMP 様の構造を有する化合物が考えられる。そこで、約 700 万個の市販化合物のデータベースを用いた in silico スクリーニングを行った。その結果、Epac2A に結合することが推測され、しかも SU 薬や cAMP と同一の構造を有さない化合物が 100 個以上選別された。

これらの化合物を用いて、高濃度グルコース存在下、MIN6 細胞からのインスリン分泌を検討したところ、5つの化合物にインスリン分泌増強作用が認められた。化合物の分子構造に基づいた検討から分類された3種類のうち、分泌作用の大きい1種類を化合物 X として、さらにその特性を調べた。化合物 X は SU 骨格を有していないが、構造が類似していた。化合物 X は 10^{-6} M 以上でインスリン分泌増強作用を示し、またその効果はグルコース濃度依存性であった。マウス膵灌流実験から、化合物 X はグルコース応答性インスリン分泌の第1相を増強する傾向があった。これらの特性を有する化合物 X が Epac2A を活性化するかを MIN6 細胞に発現させた Epac2A の FRET センサーでモニターしたが、Epac2A の構造変化、つまり活性化に関する可能性は低かった。また、Epac2A の下流シグナルである Rpa1 の活性化も化合物 X ではほとんど認められなかった。したがって、化合物 X はグルコース応答性インスリン分泌の増強作用は有するがその標的は Epac2A である可能性は低いと考えられる。今後、他の候補化合物でも同様な検討を加えることで、Epac2A を標的とした化合物が同定され、インスリン分泌作用を有する新たな薬剤の開発につながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

原著論文

1. Takahashi H, Shibasaki T, Park J, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Song D, Seino S: Role of Epac2A/Rap1 signaling in interplay between incretin and sulfonylurea in insulin secretion. *Diabetes* 64:1262-1272, 2015.
2. Ghupurjan G, Ogura M, Iwasaki M, Yokoi N, Minami K, Nakayama Y, Harada K, Hastoy B, Wu X, Takahashi H, Kimura K, Matsubara T, Hoshikawa R, Hatano N, Sugawara K, Shibasaki T, Inagaki N, Bamba T, Mizoguchi A, Fukusaki E, Rorsman P, Seino S: Glutamate acts as a key signal

linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Reports* 9:661-673, 2014. 10.1016/j.celrep.2014.09.030.

3. Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, Sugawara K, Ono A, Inoue N, Furuya T, Seino S: Antidiabetic sulfonylureas and cAMP cooperatively activate Epac2A. *Sci Signal* 6: ra94, 2013. 10.1126/scisignal.2004581.
4. Uenishi E, Shibasaki T, Takahashi H, Seki C, Hamaguchi H, Yasuda T, Tatebe T, Oiso Y, Takenawa T, Seino S: Actin Dynamics Regulated by the Balance of Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and Cofilin Activities Determines the Biphasic Response of Glucose-induced Insulin Secretion. *J Biol Chem* 288: 25851-25864, 2013. (UE and ST contributed equally to this work.)
5. Kim M, Platt M, Shibasaki T, Quaggin S, Backx P, Seino S, Simpson J, Drucker D: GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med* 19: 567-575, 2013.

総説

6. 柴崎忠雄、高橋晴美、清野進：インクレチンとスルホニル尿素薬の併用によるインスリン分泌増強における Epac2A シグナルの役割、最新医学 70 巻増刊号 糖尿病と合併症 (前篇) 糖尿病、最新医学社 70:473-497 2015
7. 高橋晴美、高橋利匡、柴崎忠雄、清野進：cAMP とスルホニル尿素薬の相互作用による Epac2A の活性化とそのインスリン分泌における役割、*Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2015 中外医学社 5-11 2015
8. Shibasaki T, Takahashi T, Takahashi H, Seino S: Cooperation between cAMP signaling and sulfonylurea in insulin secretion. *Diabetes Obes Metab* 16 (Suppl. 1):118-125, 2014.
9. 柴崎忠雄、清野進：アクチンダイナミクスによるインスリン分泌の制御機構、*Diabetes Frontier メディカルレビュー* 社 24(5): 502-506 2013
10. 柴崎忠雄、清野進：膵細胞における cAMP 情報伝達系、Epac2A の役割、*Islet*

Equality メディカルレビュー社 2(2):
19-22 2013

11. Shibasaki T: Elucidation of function and role of cAMP sensor Epac2A in insulin secretion. *Diabetol Int* 3: 187-196, 2012 (Online).
12. Seino S, Takahashi H, Takahashi T, Shibasaki T: Treating diabetes today: a matter of selectivity of sulphonylureas. *Diabetes Obes Metab* 14 (Suppl. 1): 9-13, 2012.
13. 柴崎忠雄: インスリン分泌における cAMP センサー Epac2A の機能とその役割の解明、*糖尿病 日本糖尿病学会誌* 55(12): 946-947 2012
14. 高橋晴美、柴崎忠雄、清野進: 糖尿病 基礎分野での進歩 膵細胞における Epac2A の役割、*Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2012 中外医学社 4-9 2012

[学会発表](計 24 件)

招待講演

1. 柴崎忠雄、グブルジャンゲニ、マヒラア シム、岩崎真宏、星川律子、横井伯英、南幸太郎、清野進: 膵β細胞の3次元培養によるインクレチン/cAMP 反応性の誘導、第 87 回日本生化学会大会 2014.10.16 (京都)
2. Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Ono A, Takahashi T, Seino S: Interaction of incretin and sulphonylurea through Epac2A signaling in insulin secretion, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2013.9.25 (Spain, Barcelona)
3. 柴崎忠雄: インスリン分泌: Up to Date、インスリン分泌における cAMP センサー Epac2 の役割、第 50 回日本糖尿病学会近畿地方会(教育講演)、2013.11.23 (京都)
4. Shibasaki T: Role of cAMP Sensor Epac2 in Insulin Secretion, 1st Korea-Japan Diabetes Forum (Symposium), 2013.5.11 (Jeju, Korea)
5. 柴崎忠雄: インスリン分泌における cAMP センサー Epac2A の機能とその役割の解明、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会(リリー賞受賞講演)、2012.5.17 (横浜)

一般演題

6. Takahashi H, Shibasaki T, Park J-H, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Song D-K, Seino S: Interplay between incretin and sulphonylurea through Epac2A/Rap1 signaling in insulin secretion. 10th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress 2014 & 6th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 2014.11.21-24 (Singapore)
7. 下野琴絵、菅原健二、柴崎忠雄、清野進: インスリン分泌増強効果を有する新規低分子化合物の同定とその特性解析、第 87 回日本生化学会大会 2014.10.17(京都)
8. 吾甫尔江艾尼、横井伯英、星川律子、山口拓郎、岩崎真宏、小倉雅仁、南幸太郎、柴崎忠雄、清野進: 膵β細胞におけるグルタミン酸動態の代謝フラックス解析、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.24 (大阪)
9. 下野琴絵、菅原健二、柴崎忠雄、清野進: インスリン分泌増強効果を有する新規低分子化合物の同定とその特性解析、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.24 (大阪)
10. 柴崎忠雄、高橋利匡、高橋晴美、菅原健二、清野進: スルホニル尿素(SU)薬と cAMP の協調作用による Epac2A 活性化、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.23 (大阪)
11. 高橋晴美、柴崎忠雄、高橋利匡、日高志保美、小野愛夏、清野進: インクレチンとスルホニル尿素薬の併用によるインスリン分泌増強における Epac2A/Rap1 シグナルの役割、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.23 (大阪)
12. Shibasaki T, Takahashi T, Takahashi H, Sugawara K, Seino S: Clarification of molecular mechanism underlying Epac2A activation by antidiabetic sulphonylurea drugs, 第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.4 (神戸)
13. Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Ono A, Takahashi T, Seino S: Interaction of incretin and sulphonylurea through Epac2A/Rap1 signaling in insulin secretion, 第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.3 (神戸)
14. Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Seino S: Interaction of incretin and sulphonylurea through Epac2A in insulin secretion, 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism &

- 5th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 2013.11.7 (Seoul, Korea)
15. Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Oiso Y, Seino S: Critical role of actin dynamics regulated by N-WASP and Cofilin in the biphasic response of glucose-induced insulin secretion, American Diabetes Association's 73rd Scientific Sessions, 2013.6.23 (Chicago, USA)
 16. Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, Sugawara K, Ono A, Seino S: Sulfonylureas act as an enhancer of Epac2 activation in cAMP-induced insulin secretion, American Diabetes Association's 73rd Scientific Sessions, 2013.6.23 (Chicago, USA)
 17. Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Ono A, Takahashi T, Seino S: Interaction of incretin and sulfonylurea through Epac2A signaling in insulin secretion, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16 (熊本)
 18. 柴崎忠雄、堰千紘、高橋晴美、清野進：Epac2/Rap1 を介したインスリン分泌における下流シグナルの探索、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013.5.16 (熊本)
 19. Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, Sugawara K, Ono A, Seino S: Identification and characterization of the binding site and properties of antidiabetic sulfonylurea drugs in the cAMP sensor Epac2A, Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, 2013.4.23 (Kyoto, Japan)
 20. Takahashi H, Shibasaki T, Hidaka S, Takahashi T, Ono A, Seino S: Interaction of incretin and sulfonylurea through Epac2 in insulin secretion, Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, 2013.4.23 (Kyoto, Japan)
 21. Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Seino S: Role of actin dynamics regulated by N-WASP and cofilin in insulin secretion in pancreatic β -cells, 第 35 回日本分子生物学会年会、2012.12.13 (福岡)
 22. Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Oiso Y, Seino S: Regulation of actin dynamics by N-WASP and cofilin in pancreatic β -cells and its role in insulin secretion, 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes,

2012.11.27 (Kyoto Japan)

23. 高橋晴美、柴崎忠雄、高橋利匡、清野進：インクレチンと SU 薬によるインスリン顆粒開口分泌、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012.5.19 (横浜)
24. 高橋利匡、高橋晴美、小野愛夏、柴崎忠雄、清野進：SU 薬による Epac2A 活性化機構の解明、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012.5.19 (横浜)

〔図書〕(計 2 件)

1. Seino S, Shibasaki T, Minami K: Beta-Cell Biology of Insulin Secretion, *International Textbook of Diabetes Mellitus (ITDM)*, 4th edition, Ele Ferrannini, Paul Zimmet, Ralph DeFronzo, and George Alberti (Eds), Wiley Blackwell, in press.
2. 柴崎忠雄、清野進：インスリン分泌の基本分子機構、糖尿病学イラストレイテッド 羊土社 22-30 2012

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柴崎忠雄 (SHIBASAKI TADAO)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00323436