

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460386

研究課題名(和文) TBP-2/Txnipによるインスリン抵抗性機構の解明とケミカルバイオロジー

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of insulin resistance by investigating TBP-2/Txnip and chemical biology

研究代表者

増谷 弘 (MASUTANI, Hiroshi)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：50252523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Thioredoxin interacting protein (Txnip)/TBP-2は、癌抑制、糖代謝制御に重要な役割を果たす。今回、Txnipの分子機構を明らかにするために、プロテオミクス解析を行い、Txnipと相互作用する分子の候補を同定し、新たな2型糖尿病薬と抗癌剤開発のための基盤を提供した。また、スクリーニングにより、糖によるTxnip発現誘導を抑制し、糖取り込みを改善し、動物実験にて血糖値を低下させる効果を示す低分子化合物を得た。さらに、Txnip蛋白質の発現制御経路を明らかにした。これは、未知のシグナル制御機構を明らかにし、新たな糖代謝制御改善薬の開発につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：Thioredoxin interacting protein (Txnip)/TBP-2 plays an important role in cancer suppression and glucose metabolism. To elucidate the molecular mechanism of Txnip, we performed proteomics analyses and identified interacting molecules with Txnip. This finding provides a basis for developing approaches to control diabetes and cancer. We also performed screening and identified low molecular weight compounds which suppress glucose-induced augmentation of Txnip expression, enhance glucose uptake and ameliorate high glucose in an animal model. Using these compounds, we revealed the regulatory pathway of Txnip expression. These results open the road to unveil the unknown signal transduction pathway and to develop novel drugs to control diabetes.

研究分野：病態生化学

キーワード：Txnip 糖尿病 癌 インスリン抵抗性 低分子化合物 スクリーニング ケミカルバイオロジー 創薬

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らが同定した thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)(Nishiyama, Masutani et al., *J Biol Chem*, 1999) は、thioredoxin interacting protein (Txnip)とも呼ばれ、アルファ アレスチンファミリーに属する分子である。Txnip/TBP-2 は核に局在し、G 蛋白質共役受容体の共役分子であるベータアレスチンと相同性を持ち、蛋白質相互作用により、蛋白質分解、シグナル伝達の制御に働くと想定される。Txnip は、絶食応答、膵臓ベータ細胞インスリン分泌・アポトーシス (小胞体ストレス制御)、インスリン抵抗性の調節などエネルギー代謝制御に重要な役割を果たすことで近年注目されている。研究代表者らは、Txnip^{-/-}マウスと肥満 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスとの交配により、高血糖が顕著に改善することを示した。さらに、Txnip の欠損が筋肉においてインスリン抵抗性を改善し、Txnip が Akt などのシグナルを制御し、糖による発現誘導機構を明らかにした (*Endocrinology* 2009; *Nature Communications*, 2010 ; *PLoS One*, 2012)。

今日、2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性 (インスリン高値にも関わらずインスリンが作用しにくい状態) は大きな問題であるが、その機構は必ずしも明らかではなく、その解明と克服が重要な課題である。Txnip は遊離脂肪酸や高血糖により誘導され、インスリン抵抗性を悪化させる因子であると考えられる。Txnip の作用の分子機構の解析や糖による Txnip の発現誘導を抑制することは糖代謝制御にとって重要である。また、糖負荷によって、細胞内転写活性化が起こるが、そのシグナル制御機構は解明されていない。糖による Txnip の発現誘導阻害を指標にしたスクリーニングにより、細胞内糖シグナルに影響を与える化合物やインスリン感受性を改善する化合物を同定できる可能性がある。また、糖シグナルやインスリン抵抗性制御機構の

解析のために得られた化合物をツールとして用いることができる。

2. 研究の目的

本研究は、Txnip によるインスリン抵抗性調節機構を明らかにするため、その作用の分子機構の解析を行う。さらに、その発現制御による糖代謝制御法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) Txnip の分子機構の解析。

Flag-HA- Txnip を恒常的に発現する細胞を作成し、その細胞の核抽出物を HPLC によるゲルろ過により高分子画分をとる。Txnip の含まれる画分を用いて、Flag 磁気ビーズと HA 磁気ビーズによる二段階のタンデムアフィニティ精製を行い、SDS-PAGE で分離後、銀染色を行い、マスマスペクトロメトリー解析により、Txnip と相互作用する分子を同定する。さらに、この分子が Txnip との蛋白質相互作用がどのような分子機構で調節するかを検討する。また、Txnip と Nedd ファミリーユビキチンリガーゼとの協調作用によるシグナル伝達機構を解析する。

2) Txnip の発現を指標にした糖による細胞内転写活性化シグナルを制御する化合物の同定。

Txnip プロモーター-ルシフェラーゼを恒常的に発現した C2C12 細胞株を作成し、その細胞を用いて、糖による Txnip 発現誘導を抑制する低分子化合物のスクリーニング系を作成する。低分子化合物のスクリーニングを行い、候補を同定する。その候補について、細胞毒性の検討を行う。また、2-デオキシグルコース代謝速度測定キットを用いて、脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞において糖の取り込みについて検討する。絞りこまれた候補について糖による転写活性化機構やインス

リンシグナル制御などを検討し、さらにマウスでの検討を行う。さらに同定した候補についてどのような機構で糖による Txnip 発現誘導を抑制しているかについてのシグナル経路を検討する。さらに、類縁化合物による検討を行う。

4 . 研究成果

(1) プロテオミクス解析により、Txnip と相互作用する分子の候補を同定した (第 74 回日本癌学会学術総会にて発表、投稿準備中)。Txnip がこの分子と相互作用することは、糖代謝だけではなく、その癌抑制作用や免疫制御における分子機構を説明できる可能性があり、エネルギー制御薬、糖尿病治療薬だけではなく、新たな抗癌剤開発のための基盤を提供した。また、Txnip が NEDD ファミリーユビキチンリガーゼと相互作用する結果を得た (第 74 回日本癌学会学術総会にて発表、投稿準備中)。このことは、Txnip を介した蛋白質分解制御がシグナル制御に重要な役割を果たすことを示唆している。

(2) 糖による Txnip 発現誘導を指標とした低分子化合物スクリーニングにより、糖による Txnip 発現誘導を抑制し、糖の細胞内取り込みを改善する 11 個の低分子化合物を得た。これらの化合物 A および B は 2 型糖尿病モデルマウス ob/ob において血糖値を低下させる効果を示した。さらに、得られた化合物を用いてこれらの化合物の働くシグナル経路を解析し、Txnip 蛋白質の発現制御経路を明らかにした。さらに、類縁化合物により、その機能発現に必要な分子構造の部位情報を得た。これは、エネルギー代謝における未知のシグナル制御機構を明らかにする端緒となるばかりでなく、Txnip を応用した新たな糖代謝制御改善薬の開発につながる成果である (投稿準備中、特許出願準備中)。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Matsuoka S, Ishii Y, Nakao A, Abe M, Ohtsuji N, Momose S, Jin H, Arase H, Sugimoto K, Nakauchi Y, Masutani H, Maeda M, Yagita H, Komatsu N, Hino O. Establishment of a Therapeutic Anti-Pan HLA-Class II Monoclonal Antibody That Directly Induces Lymphoma Cell Death via Large Pore Formation. PLoS One. 査読有、11(3), 2016, e0150496. doi: 10.1371/journal.pone.0150496. eCollection 2016.

Nagano S, Takahashi Y, Yamamoto K, Masutani H, Fujiwara N, Urushitani M, Araki T. A cysteine residue affects the conformational state and neuronal toxicity of mutant SOD1 in mice: relevance to the pathogenesis of ALS. Hum Mol Genet. 査読有、24(12), 2015, 3427-39. doi: 10.1093/hmg/ddv093.

増谷 弘 : 酸化ストレスシグナルと酸化ストレス防御、別冊医学のあゆみ、レドックス UPDATE、査読無、2015、10-14.

Taketani, Y., Kinugasa, K., Kitajima, R., Nishiumi, S., Ashida, H., Nakamura, H., Fujita, T., Kanzaki, K., Masutani, H., Yodoi, J. Protective effects of oral administration of yeast thioredoxin against gastric mucosal injury. Biosci Biotechnol Biochem. 査読有、78, 2014, 1221-1230. doi: 10.1080/09168451.2014.915733.

Asami, K., Inagaki, A., Imura, T., Sekiguchi, S., Fujimori, K., Masutani, H., Yodoi, J., Satomi, S., Ohuchi, N., and Goto, M. Thioredoxin-1 attenuates early graft loss after intraportal islet transplantation in mice. PLoS One, 査読有、8, 2013, e70259. doi: 10.1371/journal.pone.0070259. eCollection 2013.

Ogata, F.T., Batista, W.L., Sartori, A.,

Gesteira, T.F., Masutani, H., Arai, R.J., Yodoi, J., Stern, A., and Monteiro, H.P. Nitrosative/Oxidative Stress Conditions Regulate Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) Expression and Thioredoxin-1 (TRX-1) Nuclear Localization. PLoS One、査読有、8, 2013, e84588. doi: 10.1371/journal.pone.0084588. eCollection 2013.

〔学会発表〕(計 5 件)

増谷 弘: Thioredoxin interacting protein による癌抑制・糖代謝制御とケミカルバイオロジー. 招待講演、第 11 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、17-18, March, 2016, 東京.

Hirata, C.L., Tateiri, K., Mizutani, Y., Ito, S., Masutani, H.: Regulation of glucose metabolism and protein degradation by Txnip in cancer suppression. 第 74 回日本癌学会学術総会, Nagoya, 8-10, October, 2015.

Masutani, H., Hirata, C.L.: Development of redox modulating approaches against cancer and diabetes by Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) /Txnip. 17th biennial meeting of society for free radical research international, Kyoto, 23-26, March, 2014.

Hirata, C.L., Masutani, H.: Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) is a multifunctional biostress signal regulator. 17th biennial meeting of society for free radical research international, Kyoto, 23-26, March, 2014.

Masui, S., Murakami, I., Ishii, K., Walenna, N., Chou, B., Itoh, R., Masutani, H., Hiromatsu, K.: *Chlamydia pneumoniae*-induced ER stress activates NLRP3 inflammasome via TXNIP. The 43rd annual meeting of the Japanese society for

immunology, Kyoto, 10-12, December, 2014.

〔図書〕(計 1 件)

増谷 弘: 生体の抗酸化システム、チオレドキシン周辺分子、酸化ストレスの医学、2014, 改訂第二版、44-52

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/MasutaniHP/jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増谷 弘 (MASUTANI, Hiroshi)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号: 50252523

(2) 連携研究者

藤井 信孝 (FUJII Nobutaka)

京都大学・薬学研究科・名誉教授

研究者番号: 60109014

大石 真也 (OISHI Sinya)

京都大学・薬学研究科・助教授

研究者番号: 80381739

伊藤 慎二 (ITOH Shinji)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 50362512