

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461337

研究課題名(和文) 肝臓の糖代謝・脂質代謝におけるEpacの役割の解明

研究課題名(英文) To elucidate the role of Epac in glucose and lipid metabolism in liver

研究代表者

押田 芳治 (Yoshiharu, Oshida)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授

研究者番号：10169295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Epacは新しいcAMP結合タンパク質で、細胞内シグナルの重要な分子である。我々は、グルカゴン作用におけるEpacの役割を初代培養肝細胞を用いて解析を行った。肝臓には、Epac2Cが発現する。グルカゴンは肝細胞のEpacシグナルを活性化した。Epac活性化剤は、グリコーゲン蓄積を抑制した。肝臓における糖新生系酵素の遺伝子発現は優位に増加した。さらに、Epac阻害薬ESI-05はグルカゴンによるグリコーゲン蓄積抑制作用をキャンセルしなかったが、糖新生系酵素の遺伝子発現は、抑制された。以上のことから、肝臓におけるEpac経路の活性化は、グルカゴンによる糖代謝に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epac is a novel cAMP-binding protein, which is important for cAMP signaling. Here we studied the role of Epac in glucose and lipid metabolism by using primary rat hepatocytes. Epac2 mRNA not but Epac1 mRNA was detected in liver and Western blots analysis showed the expression of Epac2C in liver. Rap1 pull-down assay revealed that glucagon activated Epac pathway in primary hepatocytes. An Epac-specific activator, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (ESCA) inhibited glucose-induced glycogen storage. Gene expression of key enzymes regulated gluconeogenesis (G6PC and PEPCK) was increased by ESCA treatment. Epac inhibitor ESI-05 did not attenuate glucagon-induced suppression of glycogen storage. On the other hands, glucagon-induced expression of G6PC and PEPCK mRNA was suppressed by pretreatment of ESI-05. These findings suggest that glucagon regulate hepatic glucose metabolism through Epac pathway.

研究分野：糖尿病学

キーワード：グルカゴン Epac 肝糖産生

1. 研究開始当初の背景

Exchange protein activated by cAMP (Epac)は新しいcAMP結合タンパクとして1998年に発見された。今までcAMPによる細胞内シグナルはプロテインキナーゼA(PKA)によるものと考えられていたが、Epacの発見は、PKAに依存しない新たなcAMPシグナルの発見として非常に意義深い。尾崎らは、Epac2には、膵臓に発現するEpac2Aと副腎に発現するEpac2B、肝臓に発現するEpac2Cの3種類のアイソフォームが存在することを報告している。他のグループから遺伝子発現において肝臓にはEpac1とEpac2が発現していることが報告されている。

膵臓ランゲルハンス島から分泌されるインスリンやグルカゴンは肝臓における糖代謝を制御し血糖値の恒常性維持に重要な役割を果たす。グルカゴンは、低血糖時に膵細胞から分泌され、肝臓に作用し、糖新生やグリコーゲンの分解を促進し、血糖値を上昇させる。また、肝臓において中性脂肪の合成を抑制し、ケトン体の合成を促進する。

グルカゴンは、その特異的受容体に結合して、細胞内cAMP濃度の上昇とそれに続くPKAの活性化を介して、肝臓における糖代謝・脂質代謝を調整していると考えられている。しかしながら、グルカゴン経路におけるEpacの役割は、明らかになっていない。

2. 研究の目的

肝臓には、Epacが発現していると考えられており、グルカゴンの作用の一部をEpacが担っていることが想定される。本研究は、肝臓におけるEpacの糖代謝及び脂質代謝における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 初代肝細胞培養

実験には Wistar 系雄性ラット (6~10

週齢)の肝臓にコラゲナーゼ溶液を灌流して単離、培養した肝細胞を使用した。18時間培養後、初代培養肝細胞を5mMあるいは25mMグルコース存在下に、各種阻害薬、各種刺激薬を添加し、2-3時間培養し、実験に用いた。

(2) 遺伝子発現解析

Epacの遺伝子発現は、脳組織を対照として、肝組織を用いて、RT-PCR法で解析を行った。糖新生系酵素であるglucose-6-phosphatase (G6PC)及びphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)の遺伝子発現は、定量PCR法で解析を行った。内部標準として36B4を用いた。

(3) Epac 蛋白発現と Epac 及び PKA の活性化の解析

蛋白発現は、Epac2の抗体を用いてウエスタンブロット法及び免疫細胞染色を行った。Epacは、GDP/GTP交換因子(GEF)を有しているため、Epacが活性化すると、GTP型Rap1が増加する。そのため、Epacの活性化は、GTP型Rap1をプルダウンすることで評価した。PKAの活性化は、CREB及びリン酸化CREBの抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

(4) グリコーゲン定量と PAS 染色

グリコーゲン定量では、グリコアミラーゼを用いて、グリコーゲンを加水分解したのち、グルコース量をヘキソキナーゼ/グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ法により蛍光光度計を用いてNaDHの蛍光強度を測定し、肝細胞内グリコーゲン量を求め、タンパク量との比で表した。PAS染色は、肝細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、1%過ヨウ素酸水溶液を用いて行った。

(5) 恒常活性型 Epac2C を発現するアデノウイルス(Ad-Epac2C-CA)を用いた解析

Ad-Epac2C-CAは、Dr. Zhang先生より、分与していただいた。500MOIのウイルス

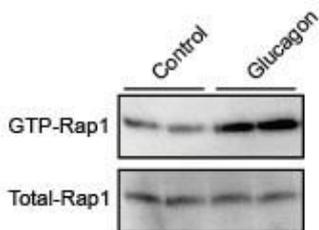
を肝細胞に感染させ、18 時間後に、グリコーゲン量測定と糖新生系酵素の遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝臓における Epac の発現とその活性

まず、肝臓における Epac の発現を検討した。RT-PCR 法によって肝臓には、Epac2 遺伝子の発現は認められたが、Epac1 遺伝子の発現は認めなかった。ウエスタンブロット法では、約 80kDa に Epac2C のバンドを確認できた。また、免疫染色において、肝細胞における Epac2 の発現を確認できた。次に、グルカゴンは Epac を活性化するの

図1 Epac の活性化



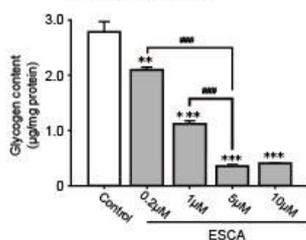
カゴンは Epac を活性化することを確認した(図1)。

(2) Epac 特異的活

性化剤 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (ESCA) のグリコーゲン蓄積と糖新生系酵素の遺伝子発現に対する効果

まず、10 μ M ESCA が、肝細胞において、Rap1 を活性化すること、CREB のリン酸化を促進しないことを確認した。25mM グルコース存在下に ESCA を処置し、3 時間後のグリコーゲンを測定した。ESCA は、濃度依存的にグリコーゲン蓄積を抑制した(図2)。

図2 Epac 活性化剤 (ESCA) のグリコーゲン蓄積への効果

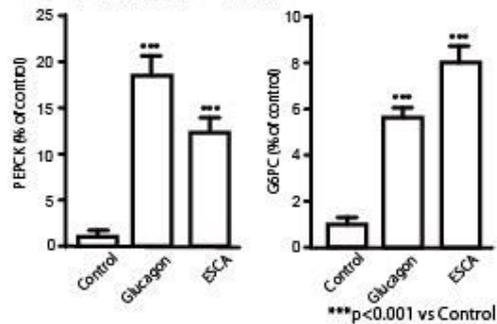


p<0.01, *p<0.001 vs Control; ###p<0.001

PAS 染色においても、5 μ M ESCA 処置により、10nM グル

カゴンと同程度まで、グリコーゲンの蓄積は抑制された。G6PC 及び PEPCK の遺伝子発現は、10 μ M ESCA 処置により有意に増加した(図3)。

図3 Epac 活性化剤 (ESCA) の糖新生系酵素遺伝子発現への効果



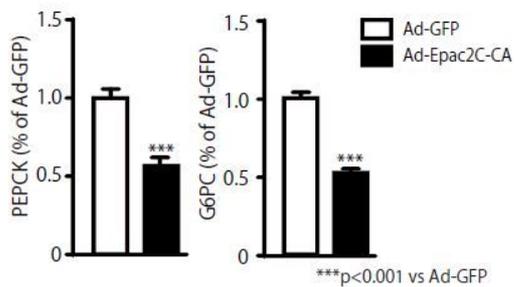
(3) Epac 阻害剤 ESI-05 のグリコーゲン蓄積に対する効果

Epac 阻害剤 ESI-05 前処置により、グルカゴンによるグリコーゲン蓄積抑制作用は、キャンセルされなかった。しかしながら、PEPCK 及び G6PC の発現については、グルカゴンの作用を有意に抑制した。以上のことから、肝臓における Epac 経路の活性化は、グルカゴンによる糖代謝に寄与することが示唆された。

(4) 恒常活性型 Epac2C を発現するアデノウイルスの肝糖代謝への影響

肝臓の糖代謝における Epac の役割を明らかにするために、恒常活性型 Epac2C を発現するアデノウイルス(Ad-Epac2C-CA)を用いてグリコーゲン蓄積に対する効果を初代培養肝細胞を用いて検討した。まず、初代培養肝細胞に Ad-Epac2C-CA を感染させ、CREB のリン酸化を促進しないことを確認した。25mM グルコースによるグリコーゲンの蓄積は対照群 (Ad-GFP) に比べ、有意に低下したがその変化はわずかであった (Ad-GFP, 18.11 \pm 0.82; Ad-Epac2C-CA, 15.59 \pm 0.23, p<0.05) 。しかし、G6PC 及び PEPCK の遺伝子発現は、Ad-Epac2C-CA 群で有意に低下していた(図4)。

図4 恒常活性型 Epac2C の糖新生系酵素
遺伝子発現への効果



これらの結果は、上記結果と矛盾するため、さらなる検討が必要と考えた。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Epac を介した肝糖産生酵素の発現調節について 正木猛史、尾崎信暁、押田芳治、豊田行康 第 62 回日本薬学会東海支部総会・大会 2016 年 7 月 9 日 愛知学院大学 楠元キャンパス (愛知県・名古屋市)

肝臓における Epac の発現とその役割に関する検討 島田渉、尾崎信暁、高木祐輔、館林光亮、押田芳治、豊田行康 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015 年 7 月 4 日 名古屋市立大学 田辺通キャンパス (愛知県・名古屋市)

肝糖代謝における Epac の役割 館林光亮、尾崎信暁、高木祐輔、島田渉、押田芳治、豊田行康 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015 年 5 月 23 日 下関市民会館 (山口県・下関市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押田 芳治 (OSHIDA YOSHIHARU)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授
研究者番号：10169295

(2) 研究分担者

豊田 行康 (TOYODA YUKIYASU)
名城大学・薬学部・准教授
研究者番号：60103264
尾崎 信暁 (OZAKI NOBUAKI)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・特任准教授
研究者番号：70378082
平成 25 年度

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：