

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461328
 研究課題名(和文) 糖尿病病態形成ヘパトカイン・セレノプロテインPおよびその受容体の結晶構造解析

 研究課題名(英文) Structural analysis of selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine

 研究代表者
 菊地 晶裕 (Kikuchi, Akihiro)

 金沢大学・医学系・博士研究員

 研究者番号：90321752
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： セレノプロテインP (SeP) は糖尿病病態を形成するヘパトカインである。本研究ではSePの立体構造情報を基盤としてSeP阻害剤の候補化合物を見出すことを目標とした。

結晶化を行うため、ヒト血漿から高純度に天然型SePを精製する手法の確立し、あわせて、システイン置換体SePの発現・精製手法も確立することが出来た。研究期間内に良質な結晶を得るには至らなかったが、ホモロジーモデリングからSePの立体構造モデルを提示することが出来た。

また、骨格筋ではLRP1がSePの取り込み受容体として機能すること、骨格筋に取り込まれたSePは運動抵抗性を誘導する要因となっていることを解明することが出来た。

研究成果の概要(英文)： Selenoprotein P (SeP) is a diabetes-associated hepatokine. Structure based drug design for SeP should be one of useful techniques for screening new compounds as potential anti-diabetic drugs.

To solve the crystal structure, we have established a purification protocol of SeP from human plasma. In addition, we have established a expression and purification protocol of cysteine-substituted SeP. A homology modeling revealed that the N-terminal domain of SeP has a characteristic tertiary structure termed the thioredoxin fold, except a insertion of long loop. Such insertion may be a receptor-interacting region.

Also, we found that LRP1 is a SeP receptor in the muscle and SeP causes exercise resistance through LRP1. Biacore analysis showed that SeP specifically binds one of ligand binding domains of LRP1. Detailed analysis is now in progress.

研究分野：分子糖尿病学、構造生命科学

キーワード：セレノプロテインP、ヘパトカイン、結晶構造解析、ホモロジーモデリング、LDL受容体ファミリー、タンパク質相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

セレノプロテイン P (SeP) は、肝臓に貯蓄したセレンを全身に運ぶセレン輸送体として知られていた肝臓由来の分泌タンパク質である。近年、研究代表者らのグループでは、SeP が肝臓と骨格筋にインスリン抵抗性を誘導することで高血糖を発症させる “ヘパトカイン” (肝臓由来の分泌タンパク質) であることを解明した。そのため、SeP は従来の概念に依存しない新しい 2 型糖尿病治療の標的分子であると考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

本研究は、立体構造に基づいた薬剤設計の手法 (Structure Based Drug Design) を用いて SeP のインスリン抵抗性誘導作用を阻害する化合物を探索し、新規な糖尿病治療の開発に向けた基盤研究を行うことを目的とした。

具体的には、(1) 研究代表者の先行研究で得られた SeP 結晶を用いて SeP の結晶構造解析を行う、(2) SeP の骨格筋における取り込み受容体を探索し、SeP が受容体に結合した状態での結晶構造解析を行う、(3) 立体構造を基盤としたコンピュータシミュレーションから SeP の阻害剤や受容体拮抗薬となる候補化合物を探索する、(4) 培養細胞を用いて候補化合物の SeP の阻害作用を評価する、ことを目指した。

3. 研究の方法

(1) SeP の結晶構造解析

SeP は特異的な機構によって翻訳されるセレノシステインを 1 分子中に 10 個含むため、既存の技術では組換え体を得ることが困難である。そこで、既報の方法を改良してヒト血漿から高純度な SeP を精製し、結晶化スクリーニングを行う。X 線回折実験に適した良質な SeP 結晶を得る手法を確立した後に、放射光施設のビームラインなどを用いて回折実験および結晶構造解析を行う。位相決定は、分子内にセレンを有していることから、セレン原子の異常分散効果を用いる。

ヒト血漿から精製した SeP を用いて良質な結晶が得られない場合にはすべてのセレノシステインをシステインに置換したシステイン置換体 SeP の発現系を構築し、その結晶化および結晶構造解析を行う。

(2) 取り込み受容体の探索

すでに精業においては ApoER2 が SeP の取り込み受容体であることが報告されている。しかし、研究代表者のグループでは、インスリンの主要標的臓器の 1 つである骨格筋に ApoER2 の遺伝子発現がほとんど認められないことを確認していた。そこで、siRNA 導入

による網羅的な候補遺伝子のロックダウンを行い、骨格筋における SeP 取り込み受容体の探索を行う。SeP の細胞への取り込みは、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx1) の発現量を指標にしてスクリーニングすることが可能である。

4. 研究成果

(1) SeP の結晶構造解析

ヒト血漿から精製した天然型 SeP の結晶化

SeP にはプロテアーゼ認識部位が存在するため (図 1)、ヒト血漿中には全長 SeP のほか、C 末端側が切断された SeP (ショートフォーム) も存在している。

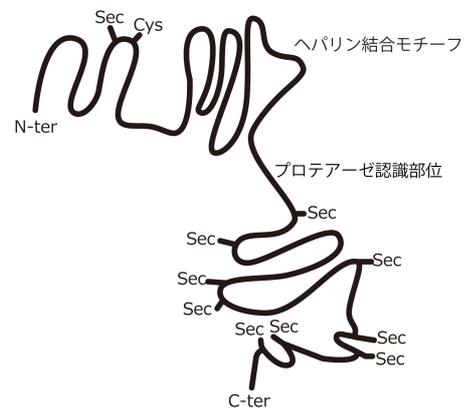


図 1 SeP の構造。分子内にプロテアーゼ認識部位が存在し、N 末端ドメインと C 末端ドメインに切断され得る (Sec: セレノシステイン)。

既報による精製法はヘパリン結合モチーフなどの性質を利用していることから、全長とショートフォームとの分離が不十分であったり、または、精製の途中で全長 SeP が切断されてしまったりすることが避けられず、精製試料の SDS-PAGE (クマジー染色) には全長 SeP のみではなく、ショートフォームの存在が確認できることもあった (図 2 左)。そこで本研究では、既報による精製法を改良し、収率は従来法に比べて低下したが、全長 SeP のみを高純度に精製する手法を確立した (図 2 右)。

この手法で精製した SeP を用いて結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることが出来なかった。SeP は糖鎖修飾を受けており、その不均一性が結晶化を不利にさせていると考えられた。そこで、N-グリコシダーゼ (PNGase) を用いて精製 SeP から糖鎖を切断し、再び、結晶化スクリーニングを行ったところ、微結晶を得ることに成功し、回折実験を行った。しかし、30 Å 程度の分解能に相当する回折点が確認されるにとどまり、構造解析を行うためのデータを得ることは出来な

かった。その後、糖鎖を切断した SeP を用いて結晶化条件の最適化を行ったが、結晶化の再現性が極めて低かった。血漿中に存在する SeP には N 結合型糖鎖のみではなく、O 結合型糖鎖が存在するという報告もあり、糖鎖切断を行ったとしても、天然型 SeP の結晶化効率が著しく向上するほどの均一な試料を得ることは困難であると判断した。

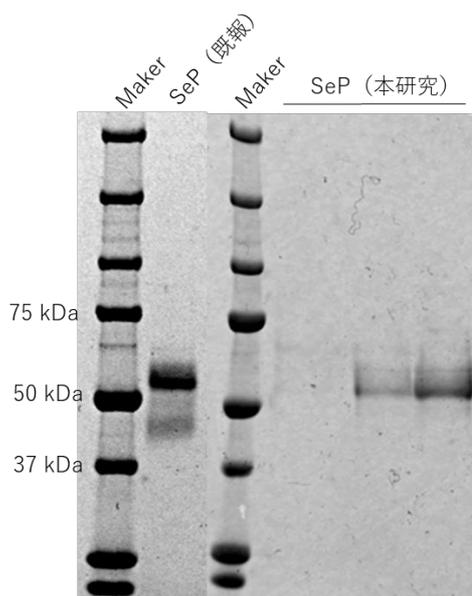


図 2 ヒト血漿から精製した SeP の SDS-PAGE (クマジー染色)。従来法では 50 kDa よりも低分子側にショートフォームのバンドが検出されることもあったが、本研究で確立した精製法では全長 SeP のバンドのみが検出された。

システイン置換体 SeP の結晶化

そこで、全てのセレノシステインをシステインに置換したシステイン置換体 SeP の発現系を構築し、システイン置換体 SeP の構造解析を行うことにした。

C 末端側に PA-tag を付加したシステイン置換体 SeP の発現系を構築し、HEK293 細胞にて発現させた。アフィニティークロマトグラフィーを用いて上清からシステイン置換体 SeP を精製したところ、SDS-PAGE (クマジー染色) でシングルバンドとして検出された。また、円偏光二色性 (CD) スペクトルにおいて、少なくともヘリックスとシートを有していることが確認できた。結晶化スクリーニングを行ったところ、針状結晶を得ることが出来たが、結晶化条件の最適化を行っても回折実験に適したサイズに結晶は成長しなかった。システイン置換体 SeP は SDS-PAGE において、アミノ酸組成から計算された分子量よりも大きな分子量を示すことから、天然型 SeP と同様に糖鎖が修飾していると考えられた。そこで、質量分析法により糖鎖修飾の解析を試みたが、定量的な解析が行えないほど複雑な糖鎖修飾を受けていることが明らかになった。結晶化を有利に進める目的で

HEK293 細胞に糖鎖修飾酵素の阻害剤を添加してシステイン置換体 SeP の発現を行ったが、その効果は限定的であった。また、糖鎖修飾に関わる酵素が欠損した HEK293SGnT1(-) 細胞を用いた発現においては、結晶化スクリーニングを行うのに十分なタンパク質量を得ることが出来ず、現段階では回折実験に適した結晶を得るには至っていない。

in silico モデリング

本研究の期間では SeP の結晶構造解析までには至らなかったが、ホモロジーモデリングによる SeP の構造モデル構築を試み、N 末端ドメイン (プロテアーゼ認識部位よりも N 末端側のドメイン) の構造モデルを得ることに成功した。N 末端ドメインはその配列 (一般的には Cys-X-X-Cys と表記されるが、天然型 SeP においては Selenocysteine-X-X-Cys となる (図 1)) や SeP の示す酸化還元活性からチオレドキシンホールドを有することが予想され、実際、図 3 に示すようなチオレドキシンに類似した構造モデルが得られた。しかし、一般的なチオレドキシンホールドを有するタンパク質と比較すると、N 末端側に長いループ構造が見られ、この領域は受容体との結合に重要である可能性も考えられる。

なお、C 末端ドメインは極めて特異的な配列であるため、ホモロジーモデルを得ることは出来なかった。

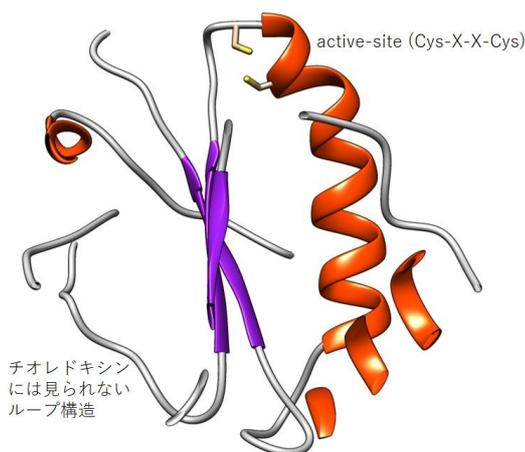


図 3 ホモロジーモデリングにより得られた SeP (N 末端ドメイン) の構造。基本的にはチオレドキシンホールドであるが、SeP の N 末端側には長いループ構造が存在すること、さらに、C 末端ドメインはホモロジーモデルの構築が出来なかったことなどから、SeP はユニークな立体構造を有している可能性が示唆された。

(2) 受容体の探索

筋管細胞による探索

腎尿細管においては megalin が、精巣においては ApoER2 が SeP の取り込み受容体として機能することは既に報告されていた。いずれも LDL 受容体ファミリーに属する膜タンパ

ク質であることから、骨格筋においても LDL 受容体ファミリーが SeP の取り込み受容体であると仮説をたて、C2C12 筋管細胞における LDL 受容体ファミリーの発現を確認した。その結果、LDL 受容体および LRP1 の発現は高く、一方、megalin や ApoER2 の発現が低いことが明らかになった。そこで、LDL 受容体または LRP1 に対する siRNA を C2C12 筋管細胞に導入し、SeP 取り込みを検討したところ、LRP1 をノックダウンした場合にのみ SeP の細胞内への取り込み量が低下し（図 4）、SeP による GPx1 の発現誘導も低下した。さらに、SeP による過酸化水素処置での AMP キナーゼリン酸化抑制作用も LRP1 のノックダウンにより消失した。従って、培養筋管細胞では LRP1 が SeP の取り込み受容体として機能することが明らかとなった。

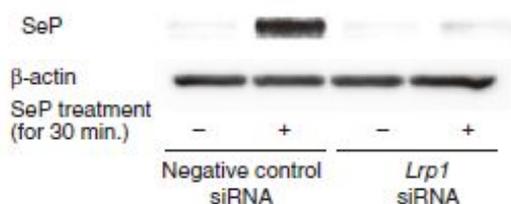


図 4 ウェスタンブロット。C2C12 細胞において LRP1 をノックダウンすると、細胞内への SeP 取り込みが低下した (Nat Med, 23, 508-516 (2017)より引用改変)。

さらに、骨格筋に特異的な LRP1 ノックアウトマウスを作成し、in vivo においても LRP1 は SeP の取り込み受容体として機能することを明らかにした。

これらの結果やヒトを対象にした研究結果により、LRP1 により骨格筋に取り込まれた SeP には、運動により産生される活性酸素種を消去する作用があり、それが運動抵抗性を誘導することを明らかにすることが出来た。従って、SeP と LRP1 の相互作用を特異的に阻害する薬剤が開発できれば、インスリン抵抗性の改善のみならず、運動効果の増強薬としての展開にも期待が持てる。

タンパク質相互作用解析装置 (Biacore) による解析

LRP1 は 600 kDa の 1 回膜貫通型タンパク質であり、40 種以上のリガンドの認識・取り込みを担っていることが知られている。そこで、SeP 取り込みに対する特異的な阻害剤を探索することを目指し、SeP と LRP1 の詳細な相互作用様式をタンパク質相互作用解析装置 (Biacore) により明らかにすることにした。本研究では SeP をセンサーチップに固定し、LRP1 に存在するリガンド結合ドメインをドメインごとに発現させた LRP1 (ドメイン X)、LRP1 (ドメイン Y) および LRP1 (ドメイン Z) をアナライトとして用いた。その結果、SeP は LRP1 のリガンド結合ドメイン Y とのみ強く相互作用することが示唆された (図 5)。

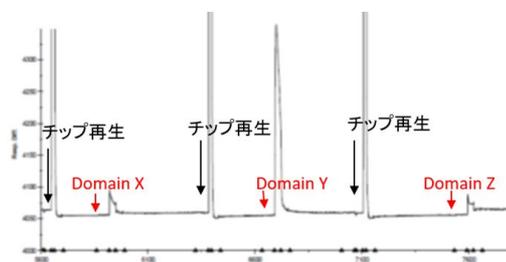


図 5 Biacore による SeP と LRP1 リガンド結合ドメインの相互作用解析。SeP は LRP1 のリガンド結合ドメイン Y と強く相互作用することが示唆された。

しかし、解離定数などの定量的なパラメータを得るには至らなかった。おそらく、センサーチップへの SeP の固定が一様ではなく、受容体との相互作用に重要であることが構造モデルにより示唆されていた N 末端側のループがチップ側に埋もれてしまうことがあり、その場合、アナライトである LRP1 との相互作用がチップにより阻害されてしまうことが定量的なパラメータを得ることが出来なかった要因であると考えられる。

今後、SeP と LRP1 との詳細な相互作用様式を解析するために、LRP1 のリガンド結合ドメインをセンサーチップに固定し、SeP をアナライトとして用いる方法で相互作用解析を行い、解離定数などの定量的なパラメータを求める予定である。

本研究では、SeP を標的とした新規な糖尿病治療の開発に向けた基盤研究を行うため、SeP のインスリン抵抗性誘導作用を阻害する化合物を探索することを目指したが、本研究の期間内には化合物スクリーニングに至らなかった。しかし、ヒト血漿から高純度に SeP を精製する手法の確立し、さらに、システイン置換体 SeP の大量発現と精製法を確立することが出来たため、SeP の構造生命科学研究の基盤を確立することが出来た。また、コンピュータ上で SeP の構造モデルを構築することに成功し、SeP が極めてユニークな立体構造を有している可能性を示すことが出来た。

あわせて、骨格筋における SeP の取り込み受容体が LDL 受容体ファミリーの 1 つである LRP1 であることを明らかにすることに成功した。Biacore による解析から SeP は LRP1 のリガンド結合ドメイン Y と強く相互作用する可能性が示唆され、今後、SeP/LRP1 複合体の立体構造解析を目指すとともに、Biacore を用いたハイスループットな化合物スクリーニングの系を構築し、LRP1 による SeP の取り込みを特異的に阻害する化合物の探索を行う予定である。

なお、本研究を通じ、SeP は細胞内タンパク質分解系とも関連する可能性が示唆されたため、今後、SeP とタンパク質分解系との関連を解明する研究も計画している。

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)

[雑誌論文](計 5 件)

Natsumi Tajima-Shirasaki 以下 16 名(研究代表者は 11 番目) Eicosapentaenoic Acid Downregulates Expression of the Selenoprotein P Gene by Inhibiting SREBP-1c Independently of the AMPK Pathway in H4IIEC Hepatocytes、J Biol Chem (査読有) , On-line publication,2017.5.2 (2017)、 DOI: 10.1074/jbc.M116.747006

Hirofumi Misu, Hiroaki Takayama , Yoshiro Saito, Yuichiro Mita, Akihiro Kikuchi 以下 20 名、Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of ROS and AMPK in muscle、Nat Med (査読有) , 23, 508-516 (2017)、DOI: 10.1038/nm.4295

Akihiro Kikuchi, Toshinari Takamura、Where does liver fat go? A possible molecular link between fatty liver and diabetes、J Diabetes Invest (査読有) , 9, 152-154 (2016) 、 DOI: 10.1111/jdi.12573

Keita Chikamoto, Hirofumi Misu, Hiroaki Takayama, Akihiro Kikuchi 以下 9 名、Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during diet-induced weight cycling in mice、Biochem Biophys Res Commun (査読有) , 478, 1310-1316 (2016)、DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.117

Fei Lan, Hirofumi Misu, Keita Chikamoto, Hiroaki Takayama, Akihiro Kikuchi 以下 21 名、LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance、Diabetes (査読有) , 63, 1649-1664 (2014)、DOI: 10.2337/db13-0728

[学会発表](計 3 件)

Akihiro Kikuchi、Regulation of Insulin Signaling Molecules by Selective Autophagy in Mice with Proteasome Dysfunction and Starvation、2017 Keystone Symposia Conference、2017 年 1 月 22 日-1 月 26 日、Keystone(Colorado, USA)

菊地 晶裕、糖尿病病態形成へパトカイン・セレノプロテイン P の結晶化、第 7 回北陸合同バイオシンポジウム、2014 年 11 月 28 日-11 月 29 日、八尾ゆめの森(富山市)

菊地 晶裕、ビリベルジン還元酵素の立体構造、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都市)

[図書](計 3 件)

菊地 晶裕・篁 俊成、科学評論社、「内分泌・糖尿病・代謝内科」第 44 巻 5 号(2017 年 5 月号)、2017 年、印刷中

菊地 晶裕・篁 俊成、羊土社、「実験医学増刊」(Vol134. No2)、2016 年、45-50
井川 寛章・菊地 晶裕・篁 俊成、科学評論社、「内分泌・糖尿病・代謝内科」第 40 巻 6 号(2015 年 6 月号)、2015 年、453-458

[その他]

ホームページ等

<http://metabology.w3.kanazawa-u.ac.jp>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 晶裕 (KIKUCHI, Akihiro)
金沢大学・医学系・博士研究員
研究者番号：90321752