

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01728

研究課題名(和文) インスリンシグナル伝達における解糖系酵素GAPDHのニトロ化修飾の役割

研究課題名(英文) The role of GAPDH nitration in insulin signaling

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系酵素であるGAPDHは、心筋由来H9c2細胞株においてインスリン刺激依存的なリン酸化やニトロ化に伴いその酵素活性が亢進するが、本研究において糖尿病発症ラットではGAPDHのニトロ化、リン酸化の亢進がされずシグナル伝達が破綻している可能性が示唆された。またニトロ化修飾を受けるGAPDHのTrp残基をPheに置換した変異体を用いた実験において、インスリン刺激後のGAPDHのリン酸化の亢進が見られなかった。細胞内シグナル伝達への関与に不明な点が多いタンパク質のニトロ化修飾が、本研究の知見により、シグナル伝達の制御に本質的な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：GAPDH is a catalytic enzyme commonly known to be involved in glycolysis. Increase in GAPDH nitration as well as phosphorylation was observed after insulin stimulation in the H9c2 cell line derived from embryonic rat ventricle. After glucose intraperitoneal injection, the phosphorylation and nitration levels of GAPDH were weak in cardiac muscle of type 2 diabetic rat compared with normal rat. These results demonstrated the possibility that insulin signaling mediated by GAPDH was impaired in the heart of type 2 diabetic rat. GAPDH was nitrated on Trp 311 after insulin stimulation of the H9c2 cell line. We mutated Trp 311 of GAPDH to Phe to prove that the nitration of Trp 311 acts as a trigger for the phosphorylation of GAPDH. The phosphorylation of the W/F GAPDH mutant diminished considerably compared to that of wildtype GAPDH after insulin stimulation in H9c2 cell line. These data suggest that the nitration of GAPDH may play a role in the insulin signal transduction in cardiac muscle.

研究分野：生化学

キーワード：心筋 インスリン 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は遺伝的な要因のほか、環境因子による組織へのインスリン感受性低下および膵臓からのインスリン分泌の低下によって高血糖を示す2型糖尿病が大多数を占める。血糖値制御システムの破綻によるこのような糖尿病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。インスリンの働きにより、血液中の糖が骨格筋や脂肪細胞に取り込まれ、血糖値が低下すると一般的に言われているが、このような糖の取り込み以外にも血糖値を調節する機構の存在が示唆されており、血糖値調節の新たな機構の探索・解明が非常に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、新たな血糖値制御の機構を探索・解明することを試み、ラットの心筋組織においては血糖値上昇時に、またラット心筋由来の H9c2 細胞株においてはインスリン刺激時に、解糖系/糖新生に関わる酸化還元酵素として知られているグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) がリン酸化され、さらにそのリン酸化に伴い GAPDH の酵素活性が亢進することを明らかにしてきた。またこの GAPDH が、近年細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たす可能性が示唆されているニトロ化修飾を受けていることも明らかにしており、リン酸化やニトロ化といった翻訳後修飾がこの新規インスリンシグナルネットワークの制御に本質的な役割を果たしていることが考えられる。

このような GAPDH の多彩な翻訳後修飾の詳細な機構の検討により高次のシグナル伝達の仕組みが明らかになることが期待され、また GAPDH のさら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と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 心筋組織での GAPDH のニトロ化修飾

血糖値制御システムが破綻し糖尿病を発症しているラットにおいて、正常なラットと比較して、心筋組織内のシグナル伝達、特に GAPDH の翻訳後修飾であるニトロ化修飾にどのような差異が生じているのかを検討するために、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) を用いて糖負荷試験を行い、心筋組織における GAPDH のニトロ化修飾の差異を比較、検討し、心筋組織内インスリンシグナル伝達のニトロ化修飾に関する知見を得ることを目的とした。

(2) ニトロ化修飾を受ける GAPDH のトリプトファン残基の決定および GAPDH 変異体発現解析系の構築

GAPDH のニトロ化修飾の役割、つまりこの修飾が GAPDH 自身に、あるいは GAPDH の下流に位置するシグナルにどのような影響を与えているのかを検討するために、まずラット心筋細胞由来の細胞株 (H9c2) に対してインスリン刺激を行った後、ニトロ化修飾を受ける GAPDH のトリプトファン部位を質量分析法によって決定、さらに決定したトリプトファン残基をフェニルアラニンに置換し、N 末端側に親水性ペプチド DYKDDDDK (FLAG タグ) が融合した融合 GAPDH 変異体を発現するプラスミドを構築、GAPDH 変異体細胞株を樹立する。

(3) GAPDH 変異体細胞株の樹立

FLAG - 野生型 GAPDH および FLAG タグ - 変異型 GAPDH を発現する細胞株を樹立し、これら変異体細胞株を用いてニトロ化修飾を受けるトリプトファン残基が GAPDH の機能にどのような役割を果たすかを検討することによりニトロ化修飾によるインスリンシグナルへの影響について詳しく考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 24 週齢の 2 型糖尿病モデルラット (OLETF) およびコントロールラット (LETO) に対して体重 1 kg あたり 5 mL の 20% グルコース溶液を腹腔内に投与し、0 分、30 分、60 分後の血糖値を測定した後、各々のラット心筋を回収し、直ちに細胞溶解液を調製した。これら細胞溶解液に対して、抗 GAPDH 抗体を用いた免疫沈降法、さらに SDS-PAGE によってタンパク質を分子量ごとに分画した後、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たウエスタンブロッ

ット法によってニトロ化修飾の差異を検出した。

(2) ラット心筋細胞由来の細胞株 (H9c2) に対して最終濃度 100nM のインスリンで刺激を行い、刺激後直ちに細胞溶解液を調製し、細胞溶解液に対して、抗 GAPDH 抗体を用いた免疫沈降を行った後、電気泳動を行った。目的のタンパク質である GAPDH を溶出し、タンパク質分解酵素によってペプチドに消化後、質量分析法によってニトロ化修飾を受けたトリプトファン部位を決定した。決定したトリプトファン残基をフェニルアラニンに置換し、GAPDH の N 末端側に親水性ペプチドである DYKDDDDK (FLAG タグ) を融合させた FLAG - 変異型 (mutant W311F) GAPDH および FLAG - 野生型 (wildtype) GAPDH を発現するプラスミドを構築した。

(3) 構築した FLAG - 野生型 (wildtype) GAPDH および FLAG - 変異型 (mutant W311F) GAPDH を発現するプラスミドを H9c2 細胞株にエレクトロポレーション法を用いて各々導入し、変異体細胞株を樹立した。樹立した変異体細胞株を最終濃度 100nM のインスリンで刺激し、細胞溶解液を調製した。各細胞溶解液に対して、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降の後、電気泳動を行い、抗リン酸化抗体によるウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) コントロールラット (LETO) では、グルコース溶液を腹腔内に投与後、0 分、30 分、60 分と血糖値の変動 (95mg/dL、223 mg/dL、156 mg/dL) に伴い GAPDH のニトロ化が亢進していたのに対し、2 型糖尿病モデルラット (OLETF) では、血糖値変動時 (161mg/dL、356 mg/dL、282 mg/dL) に GAPDH のニトロ化の亢進はほとんど観察されなかった (図 1)。これまで我々はコントロールラットである LETO では、血糖値の上昇時に GAPDH のリン酸化が亢進するのに対して、2 型糖尿病モデルラットの OLETF では、血糖値上昇時に GAPDH のリン酸化の亢進が見られないことを確認している (データは示さない)。従って、糖尿病を発症する 2 型糖尿病モデルラ

ットでは血糖値変動時に GAPDH のリン酸化やニトロ化といった翻訳後修飾にほとんど変化が見られず、インスリンシグナル経路が破綻している可能性が示唆された。

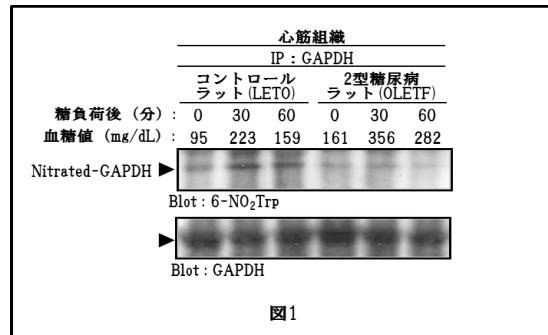


図1

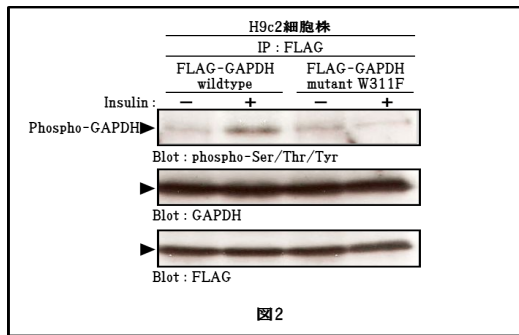
(2) H9c2 細胞株に対して最終濃度 100nM のインスリンで刺激を行い、細胞溶解液を調製し、抗 GAPDH 抗体での免疫沈降後、SDS-PAGE によってタンパク質を分子量ごとに分画、該当するバンドを切り出し、質量分析法によってニトロ化修飾を受ける GAPDH のトリプトファン部位を決定したところ、311 番目のトリプトファン残基がニトロ化修飾を受けていることが明らかとなった (表 1)。この 311 番目のトリプトファン残基をフェニルアラニンに置換し、さらに GAPDH の N 末端側に親水性ペプチドである DYKDDDDK (FLAG タグ) を融合させた FLAG - 変異型 (mutant W311F) GAPDH および FLAG - 野生型 (wildtype) GAPDH を発現するプラスミドを構築した。

表1	
NO ₂ Trp-containing trypsin-digested peptide sequence	
Protein	Peptide sequence
GAPDH	³⁰⁷ K. L I S <u>³¹¹W</u> Y D N E Y G Y S N R. V ³²²

Underlined W indicates nitrated tryptophan residue.
This peptide cleared $p < 0.05$ of the ion scores by the Mascot search.

(3) FLAG - 野生型 (wildtype) GAPDH および FLAG - 変異型 (mutant W311F) GAPDH 発現細胞株を最終濃度 100nM のインスリンで刺激すると、FLAG - 野生型 (wildtype) GAPDH はインスリン刺激後にリン酸化が亢進するが、FLAG - 変異型 (mutant W311F) GAPDH はインスリン刺激後、リン酸化の亢進は見られなかった (図 2)。これにより、311 番目のトリプトファンのニトロ化修飾が

GAPDH のリン酸化に重要な役割を果たしていることが示唆された。



今回の研究成果から、心筋細胞のインスリンシグナルにおいてはGAPDHのトリプトファン残基のニトロ化修飾が引き金となり、GAPDHのリン酸化が亢進することが明らかとなった。また今回データは示していないが、H9c2細胞株のインスリン刺激によるGAPDHのニトロ化修飾のレベルは刺激後数分をピークに減少していく。このGAPDHの速やかなニトロ化・脱ニトロ化の知見が、今までに報告されていないニトロ化および脱ニトロ化酵素の存在を示唆するものと考えられ、この知見がニトロ化・脱ニトロ化機構の解明に最もふさわしい現象であり、この詳しい機構の検討により、タンパク質のニトロ化・脱ニトロ化の仕組みが解明されると期待できる。

現在まで、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、生体内に発生する過剰な活性窒素種などによって引き起こされ、タンパク質の機能障害をもたらすと考えられてきたが、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かどうかは不明な点が多く、今までに報告されていない。本研究の知見により、タンパク質のニトロ化修飾が、細胞内シグナル伝達ネットワークの制御に本質的な役割を果たしている可能性が示唆された。

タンパク質の翻訳後修飾の制御破綻が、癌、心血管疾患、神経変性疾患、感染症、自己免疫疾患などの病因・病態にも深く関与することが明らかになりつつあり、これまでに明らかにされていないニトロ化修飾の細胞内シグナル伝達への関与の詳しい検討が、時空間的にダイナミックな高次のシグナル伝達の仕組みを解明する足がかりとなり得るだけでなく、様々な疾患に対する新たな治療開発に結び付くことが期待される。またGAPDHは、細胞死の誘導、あるいは細胞骨格への作用といった解糖系以外の機能も多岐にわたっており、この分子のさらなる機能を明らかにす

ることにより、分子生物学的なインスリン抵抗性のメカニズムの解明だけでなく、糖尿病発症の遅延あるいは糖尿病治療、さらには糖尿病が引き起こす合併症の予防に役立つことが期待される。

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)

[雑誌論文](計3件)

Uda M, Kawasaki H, Iizumi K, Shigenaga A, Baba T, Naito H, Yoshioka T, Yamakura F. (2015) Sumoylated α -skeletal muscle actin in the skeletal muscle of adult rats. *Molecular Cell Biochemistry*. 409:59-66. (査読あり)

Uda M, Kawasaki H, Baba T, Shigenaga A, Yoshioka T, Yamakura F. (2016) Effects of physical exercise on the nitrotryptophan-containing proteins in the rat hippocampus. *Journal of Aomori Society of Sports Medicine*. 15:7-13. (査読あり)

Otsu A, Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Matsuda H, Takahashi N, Nakajima T, Naito H, Baba T, Ogawa H, Tomooka Y, Yamakura F, Takamori K. (2017) Accumulation of immunoglobulin G against *Dermatophagoides farinae* tropomyosin in dorsal root ganglia of NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 15:707-712. (査読あり)

[学会発表](計3件)

宇田宗弘、川崎広明、飯泉恭一、重永綾子、馬場猛、内藤久士、吉岡利忠、山倉文幸、第70回日本体力医学会大会、骨格筋で新たに見出された部資料の異なる α -アクチンの細胞内局在の検討、2015年

Otsu A, Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Iizumi K, Baba T, Naito H, Ogawa H, Nakajima T, Tomooka Y, Yamakura F, Takamori K. Localization of IgG against *D. farinae*-tropomyosin in dorsal root ganglia of NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. 2016.

The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology.

川崎広明、飯泉恭一、重永綾子、馬場猛、酒居一雄、後藤英樹、村井弘道、多々納俊雄、高森健二、山倉文幸、第38回日本トリプトファン研究会学術集会、6-ニトロトリプトファン-イムノクロマト法による検出の試み-、2017年

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