

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790638

研究課題名 (和文) 糖輸送における ANNEXIN の役割の解明

研究課題名 (英文) Clarification of the role of annexin on glucose transport

研究代表者

藤 城 緑 (FUJISHIRO MIDORI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50420211

研究成果の概要 (和文)：我々は最近、インスリン作用の中心にある Akt と結合する蛋白として、annexin を新規に同定した。Akt-annexin 結合の役割を明らかとすることで、糖脂質代謝異常症の病態解明、治療、薬剤開発に繋がたいと考えている。初年度には annexin cDNA をクローニングし、発現ベクターに導入するとともに、アデノウイルスを作成した。これを用いて stable Akt-HepG2 細胞に annexin 蛋白を過剰発現させ、免疫沈降で両者の結合の再確認を行った。また、GST-annexin 融合蛋白抗原を作成し、annexin 特異的抗体を完成させた。次年度には、Akt、annexin 双方の cDNA を短い fragment に分けて、それらに対する GST 融合蛋白を作成した。

研究成果の概要 (英文)：Recently we have discovered a novel Akt binding protein, annexin, which is characterized by Ca²⁺-dependent interactions with cellular membranes. First we produced cDNA encoding human annexin by PCR with primers corresponding to sequences already reported, using the cDNA library from HEK293 cells and generated recombinant adenovirus to express human annexin. We confirmed the association of annexin with Akt using adenovirus system and then made GST-annexin fusion protein to generate the antibody specific against annexin by immunizing rabbits with this antigen. Fragments of both Akt and annexin were designed by PCR using full-length cDNAs as templates to generate GST-fused proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景
- 2 型糖尿病は、患者数の急激な増加とその

重篤な合併症のために、日本のみならず世界中で深刻な社会問題となっている疾患の一

つである。2型糖尿病の病因には、インスリン分泌能の低下とインスリン抵抗性の増大の両者が関与していると考えられている。日本人は遺伝的にインスリン分泌能が低い上に、最近の社会現象である食生活の欧米化、過食、肥満、車社会の発達に伴う運動不足などの、インスリン抵抗性を増大させる種々の因子が加わることで患者数が増加していると考えられている。

インスリンによる血糖降下作用は、インスリン受容体から IRS (インスリン受容体基質)、PI3キナーゼ、Akt/PKB (protein kinase B) へとシグナルが伝達され、最終的に、細胞内の GLUT4 (Glucose transporter 4) が細胞膜に translocation し、細胞外の糖が細胞内へ移動することにより発揮される。Akt から GLUT4 へ至る下流蛋白には、いくつか候補があるが、未だ決定的なものは明らかとされていない。また、内臓脂肪増加に伴うアディポカインの異常がインスリン抵抗性を増大させることが明らかとなってきたが、インスリンシグナル伝達系のどこに障害を与えて抵抗性が増大しているかは、ほとんど明らかにされていない。

インスリン作用には、糖取込み、グリコーゲン合成、DNA 合成の促進、アポトーシスの抑制など多様な働きがある。そのいずれの作用においても、Akt が中心的な役割を果たしていることが明らかとされている。我々の研究グループでは、これまでに、糖尿病モデル動物におけるインスリンシグナル伝達系の解析や糖輸送蛋白 (GLUT) の機能解析、発現調節などを明らかとし、また、新規 PI3 キナーゼサブユニットや Akt 結合蛋白のクローニングなどを進めてきた。具体的には、AGC kinase (protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C-family) の中で Akt と構造が最も良く似ている SGK (serum- and glucocorticoid- regulated protein kinase) に着目し、Akt と比較検討する研究を行ってきた。この結果、グリコーゲン合成においては SGK にも Akt 同様の働きがあるが、その他のインスリン作用は Akt 独自のものであることを解明した。また、活性型の Akt アデノウイルスをマウスに投与して肝に過剰発現させたところ、著明な低血糖、脂肪肝、肝腫大を生じることを発見し、肝における Akt の糖脂質代謝の役割を明らかとした。さらに、Akt に結合する蛋白で、Akt 活性を調整する APE (Akt-phosphorylation enhancer)、CTMP (Carboxyl-terminal modulator protein) の機能解析も行い報告してきた。特に APE は、Akt を bait とした Yeast two hybrid 法により新規にクローニングした 200kDa の蛋白であり、Akt の C 端と結合し Akt 活性を上昇させて、Cell cycle の調整を行うという重要な機能を果たしてお

り、我々のグループが世界に先駆けて発見し報告したものである。

このように、我々は Akt がインスリン作用の中心にあるものとして、研究を進めてきた。最近、Akt—GLUT4 間のシグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられる蛋白をクローニングしたので、今回の研究でその詳細な機能解析を進めていきたいと考えている。

我々は myc-TEV-flag の tag をつけた Akt を pcDNA 発現ベクターに組込み、geneticin で selection することで、恒常的に tag 付き Akt を発現する stable Akt—HepG2 細胞を構築した。この細胞を大量に増やして可溶化し、まず抗 myc 抗体—beads を用いて pulldown を行い、myc—Akt に結合してくる蛋白を beads に濃縮した。次に TEV protease で処理することで、beads から Akt—Akt 結合蛋白複合体を外し、今度は抗 flag 抗体—beads を用いて pulldown を行った。最後に flag peptide を用いて、beads から Akt—Akt 結合蛋白複合体を外し、得られたサンプルを、SDS-PAGE、銀染色で解析し、Akt に結合している蛋白をインスリン刺激の有無で比較した。このように、2つの tag の抗体を用いて pulldown を行うことにより、非常に特異性の高い結合蛋白を得ることができ、この中で、インスリン刺激によって、Akt との結合が抑制される約 30kDa のバンドを切り出し、質量分析法で解析したところ、annexin と同定することができた。

Annexin は、カルシウムイオン濃度を感じ取る蛋白の一種として知られている。細胞内のカルシウムイオン濃度によって、細胞膜—細胞内間を移動し、annexin の含まれる vesicle のエンドサイトーシス、エクソサイトーシスを調整していると考えられている。また、抗炎症作用や線溶系の調整、細胞増殖やアポトーシスの制御など多様な働きが知られている。インスリンシグナル伝達系との関連では、GLUT4 vesicle に含まれていること、PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) と結合すること、チアゾリジン誘導体で発現量が増えることなどが報告されているが、その詳細な機能については未だほとんど明らかとされておらず、Akt と annexin の直接の関係に関してはこれまでに報告が無い。

2. 研究の目的

上述の如く、これまでに Akt—annexin に関する報告は無いが、annexin が GLUT4 vesicle に含まれることや PIP2 と結合することなど、インスリンシグナル伝達系に annexin が何らかの役割を果たしていることが示唆されている。また、最近の knockout mouse での研究結果などから、annexin は

PI3-キナーゼ経路を介してグルココルチコイドの抗炎症作用を伝達したり、BAD を脱リン酸化し apoptosis を促進したりすることが明らかとなっている。これらのことは、今回我々の実験でインスリン刺激により Akt と annexin の結合が抑制されたことと整合性がある。Akt—annexin 関係を明らかにすることは、糖尿病の原因であるインスリン抵抗性の解明に非常に重要で、世界に先駆けた最新の情報が得られる可能性があり、独自性の強い研究になることと期待している。

Akt はインスリン作用の中心蛋白であり、糖脂質代謝異常の治療のターゲットになり得ると考えられている。また細胞増殖などにも重要な役割を果たすことから、代謝の他、癌や細胞増殖、免疫などを専門とする多くの分野の研究者が精力的な研究を行っており、大変に競争の激しい分野であるが、未だ、Akt を直接のターゲットとした薬剤などは開発されていない。

Akt—annexin 関係を解明し、Akt と結合する annexin の詳細な機能解析を進め、annexin が新たな糖尿病治療薬のターゲット分子となり得るかを検討することによって、インスリン抵抗性の病因解明や新たな薬剤・治療法の開発に繋がる可能性が期待されると考え、本研究を着想した。

3. 研究の方法

(1) Akt—annexin 結合の確認：Annexin の cDNA をクローニングし、発現ベクターに導入するとともに、アデノウイルスを作成する。我々のグループで既に作成している stable Akt—HepG2 細胞などの培養細胞に発現させ、免疫沈降法で結合の再確認を行う。また、GST—annexin 融合蛋白を作成、それを抗原としてウサギを免疫し、annexin 特異的抗体を作成する。

(2) 両者の結合部位の特定：Akt、annexin それぞれを短い fragment に分けて、各 fragment に対して GST 融合蛋白を作成する。これらの GST 融合蛋白を用いて pull-down を行い、互いにどの部位で結合するかを明らかにする。結合部位が特定できたら、結合部位だけ、あるいは逆に結合部位を除いた変異型の Akt および annexin を作成する。これらの変異型蛋白を発現ベクターに導入、次いでアデノウイルスを作成し、培養細胞に発現させることで、Akt—annexin 結合を自在に調整することができると考えている。

4. 研究成果

初年度はまず始めに、Akt—annexin 間の結合を確認する実験を行った。具体的には、Annexin の cDNA をクローニングし、pcDNA 発現ベクターに導入するとともに、Annexin 蛋

白を発現するアデノウイルスを作成した。このアデノウイルスを、我々のグループで既に作成済みの stable Akt—HepG2 細胞に感染させることで Annexin 蛋白を過剰発現させ、免疫沈降を行って両者の結合の再確認を行った。次に、GST システムを利用して、GST—annexin 融合蛋白を作成し、これを抗原としてウサギを免疫し、annexin 特異的抗体を作成した。

次年度は、Akt、annexin それぞれの cDNA を短い fragment に分けて、各 fragment に対して GST 融合蛋白を作成した。現在はさらに、これらの GST 融合蛋白を用いて pull-down を行い、互いにどの部位で結合するかを明らかにするための実験を進行中である。

最終的に結合部位が特定できた際には、結合部位だけ、あるいは逆に結合部位を除いた変異型の Akt および annexin を作成し、これらの変異型蛋白を発現ベクターに導入した後アデノウイルスを作成し、培養細胞に発現させることで、Akt—annexin 結合を自在に調整した条件下での実験を行っていく。さらには annexin が Akt のリン酸化基質であるかの確認、結合の生理的な役割の解明、GLUT4 translocation への関与の検討なども行っていく。将来的には、我々のグループがこれまでの研究ですでに作成している AMPK の各種変異型 cDNA、アデノウイルス、特異的抗体などを利用して、インスリン非依存的に GLUT4 translocation を促進する経路である、筋収縮や AMPK シグナルへの annexin の関与も検討していきたい。

Akt—annexin 関係の解明によって Akt のインスリン作用において最も重要な部分である GLUT4 translocation に関する役割を特定することができれば、糖脂質代謝異常の病因解明や新たな薬剤、治療法の開発に有用な情報が得られる可能性が期待される。さらには、AMPK や筋収縮と annexin との関連から、運動療法におけるインスリン抵抗性改善作用についても新たな知見が得られれば、高齢や肥満のため運動療法が十分に行えない患者にも有用な、世界に先駆けた新規のインスリン抵抗性改善薬の開発につながることを期待され、社会的にも大きく貢献できると考えている。

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)

- ① Cui X, Kushiyama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, Shiomi M, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T.、

Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy.、Diabetes Res Clin Pract.、査読有、2010 Jan;87(1):57-63.

- ②Egawa M, Kamata H, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Nakatsu Y, Ying G, Jun Z, Tsuchiya Y, Takata K, Kurihara H, Asano T.、Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo cells.、Placenta、査読有、2008 Dec;29(12):1003-8.
- ③Horike N, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Kamata H, Nishiyama K, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H, Asano T.、AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver.、J Biol Chem.、査読有、2008 Dec 5;283(49):33902-10.
- ④ Koketsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima Y, Ono H, Anai M, Kikuchi T, Fukuda T, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T.、Hepatic overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/KAy mice.、Am J Physiol Endocrinol Metab.、査読有、2008 Apr;294(4):E719-25.
- ⑤Fujio J, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ogihara T, Fukushima Y, Anai M, Horike N, Kamata H, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T.、Regulation of gut-derived resistin-like molecule beta expression by nutrients.、Diabetes Res Clin Pract.、査読有、2008 Jan;79(1):2-10.

[学会発表] (計1件)

- ① 藤城緑、長時間高グルコース刺激による肝細胞内インスリン受容体蛋白発現調節および活性調節機構の解明、第52回日本糖尿病学会年次学術集会、2009年5月23日、大阪国際会議場

[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

藤城 緑 (FUJISHIRO MIDORI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50420211

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし