

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20810031  
 研究課題名（和文）PKC $\epsilon$ を標的とした2型糖尿病に対する新規低分子化合物による治療薬の開発  
 研究課題名（英文）Generation of novel small-molecule drug targeting protein kinase epsilon for type 2 diabetes mellitus.  
 研究代表者  
 米沢 朋（YONEZAWA TOMO）  
 東海大学・医学部・奨励研究員  
 研究者番号：60515964

研究成果の概要（和文）：我々の研究グループによるゲノムワイドなマイクロサテライト解析の結果、2型糖尿病の感受性遺伝子の一つとしてプロテインキナーゼ C $\epsilon$ （PKC $\epsilon$ ）が同定された。また、*In silico*分子デザイン戦略により6万種類の化合物ライブラリーからPKC $\epsilon$ の活性に変化を与えうる多数の化合物を同定し、分子および培養細胞レベルで効果を確認している。

研究成果の概要（英文）：We identified the susceptible gene as a protein kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) for type 2 diabetes mellitus via genome-wide association study using microsatellites, prompting us to generate the small molecule drug targeting PKC $\epsilon$ . Our *in silico* strategy using 60,000 chemical library identified several potential modulators of PKC $\epsilon$  activity. We also confirmed the effect of modulators on molecular- and cell-based assay.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：2型糖尿病；プロテインキナーゼ C $\epsilon$ （PKC $\epsilon$ ）；低分子化合物；トランスレシヨナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において、糖尿病が強く疑われる成人は約1870万人と推定されている。厚生労働省の報告では、2006年度では2002年の調査に比べ250万人（15.4%）増加し、今後、増加の一途をたどると予測され、迅速に対策を

取る必要のある社会問題である。本研究の目標は、生活習慣病、2型糖尿病に対する新規治療薬の作出を目指す。我々の研究グループによるゲノムワイドなマイクロサテライト解析の結果、2型糖尿病の感受性遺伝子の一つとしてプロテインキナーゼ C $\epsilon$ （PKC $\epsilon$ ）が同定

された。また、我々のin silico 分子デザイン戦略によりPKC $\epsilon$ の活性に変化を与えうる多数の化合物の候補を同定している。そこで、本研究では、PKC $\epsilon$ の活性化を評価する実験系を構築し、新規の2型糖尿病に対する治療薬を作出する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はPKC $\epsilon$ を標的とした阻害活性を持つ新規低分子化合物を作出し、2型糖尿病態への治療効果を検討することである。具体的には、PKC $\epsilon$ の活性化に必須のアダプター蛋白質である $\epsilon$ RACKとの結合阻害により薬効を期待する。以下の実験系を用いて薬効を評価する。(1) 組み換え体を用いたIn vitroでのPKC $\epsilon$ と $\epsilon$ RACKとの蛋白質相互作用を見る系。(2) 哺乳類培養細胞におけるPKC $\epsilon$ と $\epsilon$ RACKとの結合および膜への移行を見る系。(3) マウス膵臓 $\beta$ 細胞株MIN6におけるインスリン合成および分泌や脂肪細胞株3T3-L1における脂肪蓄積へのPKC $\epsilon$ 阻害剤効果を見る系。(4) 糖尿病態モデルdb/dbマウスにおける治療効果を見る系。

## 3. 研究の方法

### (1) In vitro 評価系

PKC $\epsilon$ のV1-2領域をもとに設計された低分子化合物の阻害効果を検討するために、In vitroでのPKC $\epsilon$ と $\epsilon$ RACKとの蛋白質結合を検討する。PKC $\epsilon$ (バキュロウイルスを用いた昆虫細胞の発現系)および $\epsilon$ RACK(大腸菌による発現系)との相互作用が既に多数報告されている。融合蛋白質の接合部分が既に報告されているアミノ酸配列と全く同じになるように発現ベクターを作成中であり、マルトース結合蛋白質(MBP)と融合させた $\epsilon$ RACK(MBP- $\epsilon$ RACK)とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と融合させたPKC $\epsilon$ (GST-PKC $\epsilon$ )を用いてアフィニティーカラムや免疫沈降法を使って評価する。また、代替の方法として、

Native-PAGEで泳動し、蛋白質結合複合体と単量体とをSYPRO Rubyなどの高感度の染色による検出やピアコアによる検出も検討する。実験操作が容易で迅速な方法を採用する予定である。実験系が機能しているかどうかを調べるために既に阻害効果の確認されているペプチドを使い、これと同等以上の阻害効果のものを選別する。

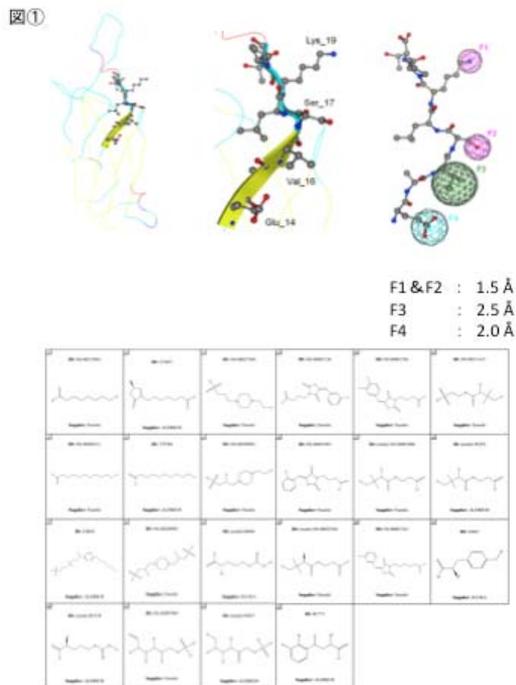
### (2) 培養細胞を用いた評価系

PKC $\epsilon$ の活性阻害効果を高感度に検出するために過剰発現の系で行う。蛍光蛋白質と融合させたPKC $\epsilon$ 、 $\epsilon$ RACKやV1を哺乳類細胞に導入し、細胞内での局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。用いる細胞株は文献での報告が多いCHOと293を予定している。PKC $\epsilon$ が活性化すると細胞内局在パターンが変化し、また、 $\epsilon$ RACKとの局在が一致することが知られている。使用する蛍光タグは全てクラゲ由来の単量体GFPの誘導体で、mVenus-PKC $\epsilon$ (緑)、mCherry- $\epsilon$ RACK(赤)、mOrange-V1(橙)を同時に検出する計画である。これらの蛋白質のN末端にGFP由来の蛍光蛋白質を融合させても $\epsilon$ RACKとの結合や酵素活性には影響がないことが既に報告されている。In vitro評価系同様に、融合蛋白質の接合部分が論文で報告されているアミノ酸配列と全く同じになるように発現ベクターを作成中である。また、発現細胞から蛋白質を回収して膜画分と細胞質画分を抽出し、ウェスタンブロットにより細胞内局在を検出する方法も並行して行う。In vitro評価系同様に、V1-2をポジティブコントロールとして使う予定だが、ペプチドなので細胞膜透過性が極めて低く、細胞へ導入するには前述のエイズウイルス由来の膜透過性ペプチドであるtatとV1-2をシステイン残基でジスルフィド結合させて導入する必要がある。tat-V1-2作製は、東海大学医学部教育・研究支援セン

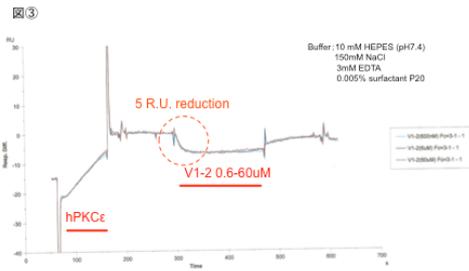
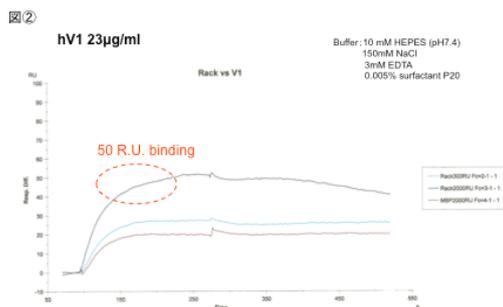
ターに作製を依頼する。当センターは外部利用者からの評価も高く蓄積された知見があり、作製は容易である。上記の方法で上手く行かない場合はPKC の薬理的な活性化剤である Phorbol 2-myristate13-acetate (PMA) で刺激させた状態で化合物を導入しPKC  $\epsilon$  の膜への移行をウェスタンブロットで検出する。CHO でのPMA の指摘濃度は既に報告のある条件を採用する。

#### 4. 研究成果

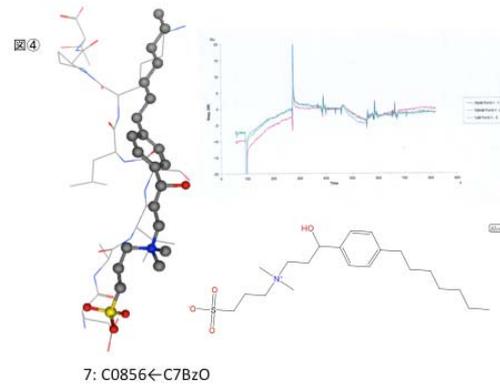
In silico 戦略により、6万種類の化合物ライブラリーから、PKC  $\epsilon$  の部分断片であり、既に報告されているペプチド阻害剤 V1-2 と同様の立体構造を取り得る低分子化合物を22個同定できた (図①)。



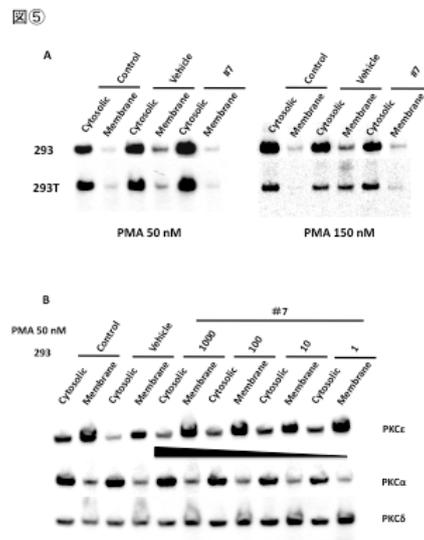
組み換え体ヒト PKC  $\epsilon$  はバキュロウイルスにより、組み換え体  $\epsilon$  RACK および V1 は大腸菌によって作出ができた。それらを用いて、In vitro 評価系を、ビアコアを用いて作出することができた。V1 および PKC  $\epsilon$  共に  $\epsilon$  RACK への結合が確認できた (図②および③)。



PKC  $\epsilon$  と  $\epsilon$  RACKとの結合が強く V1-2 による結合阻害が認められたので(図③)、PKC  $\epsilon$  を用いて、In silico の解析より同定した22個の低分子化合物をビアコアの系により評価した。#7の低分子化合物が、V1-2 同様に PKC  $\epsilon$  と  $\epsilon$  RACK との結合を阻害した (図④)。



In vitro 評価系により単離された#7の低分子化合物を、培養細胞を用いた系により評価した。PMA で刺激させた状態で化合物を導入し PKC  $\epsilon$  の膜への移行を細胞質と膜画分に分離後、ウェスタンブロットで検出した。用いた細胞はCHOと同様の反応が見られたヒト細胞株の293を用いた。培養細胞を用いた評価系によっても、V1-2 同様に、#7はPKC  $\epsilon$  特異的に膜移行を阻害した (図⑤)。



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1件)Tomo Yonezawa, Riho Kurata, Minoru Kimura, Hidetoshi Inoko PKC delta and epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* 2009 3: 96-101.査読有り

〔学会発表〕(計1件)

○米沢 朋、PKC  $\epsilon$  を標的とした2型糖尿病に対する新規低分子化合物による治療薬の開発、東海大学総合医学研究所、第4回研究会、湯河原、10月3日、2008年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米沢 朋 (YONEZAWA TOMO)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：60515964

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：