

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11397

研究課題名（和文）心筋組織において運動が及ぼす解糖系酵素GAPDHのニトロ化シグナルへの影響

研究課題名（英文）Effects of exercise on GAPDH nitration in cardiac signaling

研究代表者

馬場 猛（BABA, Takeshi）

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80366450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000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ことをこれまで明らかにしてきた。本研究のH9c2細胞株によるGAPDH変異体発現解析系から、インスリンシグナルにおいてはニトロ化されたGAPDHのトリプトファン残基が自身の四量体形成に関与し、その結果解糖系酵素としての活性を上昇させていることが示唆された。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あることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により解糖系酵素GAPDHのニトロ化修飾がインスリンシグナルの制御に本質的な役割を果たすことがわかった。タンパク質翻訳後修飾の制御破綻が、癌、心血管疾患などの病因・病態に関与しており、ニトロ化修飾のシグナル伝達への影響解明は、ダイナミックな高次のシグナル伝達の仕組みを明らかにできるだけでなく、様々な疾患に対する新たな治療開発に結び付くことも期待される。また2型糖尿病モデルラットでは血糖値上昇時にGAPDHのニトロ化が亢進しないことを見出し、今後このモデルラットを用いた運動の効果、特にニトロ化修飾への影響を検討し、糖尿病発症の遅延あるいは糖尿病が引き起こす合併症予防に役立てたい。

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. The GAPDH mutant expression analysis system of the H9c2 cell line in the present study suggests that the nitrated tryptophan residue of GAPDH, by insulin stimulation, is involved in its own tetramer formation, resulting in increased activity as a glycolytic enzyme. 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：インスリン 翻訳後修飾 2型糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は血糖値制御の破綻様式の違いにより1型と2型にわけられるが、遺伝的要因や環境因子によるインスリン感受性低下及びインスリン分泌低下によって高血糖を示す2型が9割以上を占め、このような血糖値制御の破綻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大きく影響する。一般にインスリンの働きによって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考えられているが、これらの組織による糖の取り込みだけが血糖値を低下させる主要因ではないことが示唆されている。このような背景からこれまでに申請者は、ラットの心筋組織における血糖値調節機構の探索を試み、その結果、血糖値上昇時、解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)がリン酸化を受け、酵素活性が亢進することを明らかにし、さらに心筋細胞株でインスリン刺激に伴いGAPDHのトリプトファン残基(311番目)がニトロ化される、といった知見も得てきた。一般的にタンパク質のニトロ化は、炎症などの酸化ストレスを伴う疾患で生体内に生じる活性窒素種により生じ、タンパク質の機能傷害を引き起こすと考えられているが、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ことは今までに報告されておらず、リン酸化やニトロ化修飾がこの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明らかとなればニトロ化修飾の細胞内シグナル伝達への関与、さらに、時空間的にダイナミック変化をもたらす高次のシグナル伝達の仕組みが解明できると期待される。また解糖系としての機能以外の働きも担っているGAPDHのさらなる機能を明らかにし、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、運動が及ぼすGAPDHのニトロ化修飾への影響の検討が糖尿病発症の遅延あるいは糖尿病が引き起こす合併症の予防のメカニズムをも解明できると期待される。

2. 研究の目的

(1) ニトロ化 GAPDH に関与する分子の探索

心筋由来の細胞株においてインスリン刺激依存的に解糖系酵素 GAPDH がリン酸化修飾されるに先だって 311 番目のトリプトファンがニトロ化修飾される。ニトロ化修飾のシグナル伝達への関与を明らかにするために、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH あるいは EGFP 融合 - 変異型 GAPDH(トリプトファンをフェニルアラニンに置換: W311F)を発現する H9c2 変異体細胞株による GAPDH 変異体発現解析系を用いて、ニトロ化に関与する分子の探索を行うことを目的とした。

(2) ニトロ化 GAPDH に関与する分子の同定

H9c2 変異体細胞株においてインスリン刺激後、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) には結合せず、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH にのみ結合する分子を検出し、プロテオーム解析、および抗体によるウエスタンブロット法を用いて当該分子の同定を行う。

(3) GAPDH のニトロ化修飾が酵素活性に及ぼす影響

H9c2 細胞株、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH 細胞株、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH(W311F)細胞株に対してインスリン刺激後、GAPDH 活性にどのような差異があるかを検討することにより、GAPDH のニトロ化修飾が酵素活性にどのような影響をもたらすのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

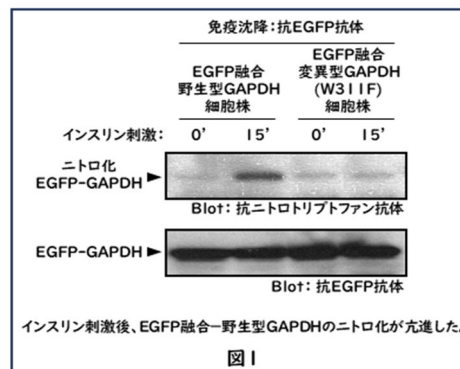
(1) 質量分析法によって決定したインスリン刺激後ニトロ化修飾を受ける GAPDH 311 番目のト

リプトファンをフェニルアラニンに置換した、EGFP-変異型 GAPDH (W311F) あるいは EGFP-野生型 GAPDH を発現する細胞株に対して、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た。細胞溶解液に対して、抗 EGFP 抗体を用いた免疫沈降を行った後、SDS-PAGE によってタンパク質を分子量ごとに分画した。まずは、我々が見出した 6-ニトロトリプトファン(6-N02Trp)に対する抗体を用いたウエスタンブロット法によって EGFP 融合 - 野生型 GAPDH および EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) のニトロ化修飾の差異を確認した。また並行して SDS-PAGE によるタンパク質の分画後、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) には結合せず、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH にのみ結合する分子を検出した。

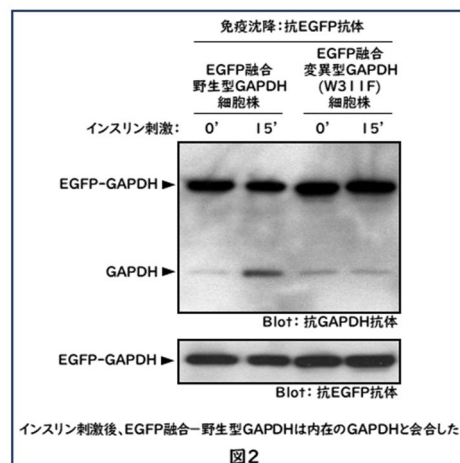
- (2) EGFP 融合 - 野生型 GAPDH あるいは EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) を発現する変異体細胞株に対してインスリン刺激後、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) と比較して EGFP 融合 - 野生型 GAPDH に強く結合していた分子量約 40kDa の分子に着目し、該当するバンドを切り出し、プロテオーム解析、さらに抗体によるウエスタンブロット法によって当該分子を同定した。
- (3) H9c2 細胞株、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH 細胞株、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W/F) 細胞株に対して最終濃度 100nM のインスリンで 15 分間刺激した後、細胞溶解液を調整した。GAPDH の活性測定には GAPDH Activity Assay Kit (Abcam) を使用した。GAPDH によって産生される NADH を比色法を用いてプレートリーダーにて吸光度 (OD₄₅₀) を 2 分毎に 30 分間測定した。

4. 研究成果

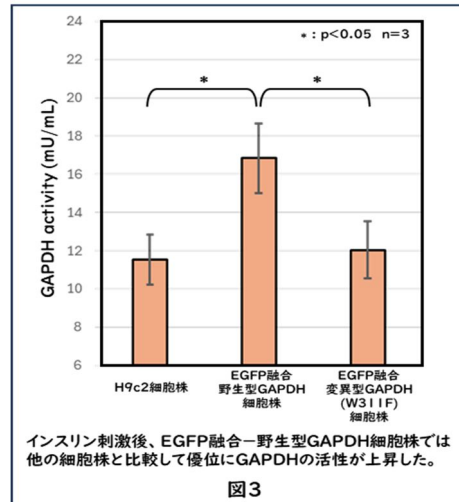
- (1) ウエスタンブロットの結果よりインスリン刺激後、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH はトリプトファンのニトロ化が亢進されていた一方で EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) のニトロ化は亢進されないことを確認した (図 1)。



- (2) 変異体細胞株に対してインスリン刺激後、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) と比較して EGFP 融合 - 野生型 GAPDH に強く結合していた分子量約 40kDa の分子はプロテオーム解析によって、H9c2 細胞株にもともと内在している GAPDH であることが明らかとなった。また抗 GAPDH 抗体によるウエスタンブロットの結果からも EGFP 融合 - 野生型 GAPDH がインスリン刺激後、内在の GAPDH と会合することが確認された一方で、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH (W311F) ではインスリン刺激に伴う内在の GAPDH との会合は検出されなかった (図 2)。解糖系の反応の場合はサイトゾルであり、GAPDH はサイトゾルで四量体を形成して解糖系酵素として機能することが知られているが、本研究によって得られた知見により、トリプトファンのニトロ化修飾が四量体形成にかかわっている可能性が示唆された。



(3) H9c2 細胞株、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH 細胞株、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH(W311F)細胞株でインスリン刺激を行うことにより、全ての細胞株で GAPDH 活性の亢進が認められたが、H9c2 細胞株と比較して、EGFP 融合 - 変異型 GAPDH(W311F)細胞株は同程度の活性上昇であった一方、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH 細胞株ではその活性が優位に上昇していた。EGFP 融合 - 変異型 GAPDH(W311F)細胞株では内在性 GAPDH のみ、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH 細胞株では内在性 GAPDH および EGFP 融合 - 野生型 GAPDH の活性が共に亢進したと推察される。



以上より GAPDH のニトロ化修飾は自身の四量体形成、およびそれに伴う GAPDH 活性の亢進に関与していることが示唆される。

今回の研究成果から、心筋由来の細胞株のインスリンシグナルにおいてはニトロ化された GAPDH のトリプトファン残基が自身の四量体形成に関与し、解糖系酵素としての活性を上昇させ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、インスリン刺激後、EGFP 融合 - 野生型 GAPDH と EGFP 融合 - 変異型 GAPDH(W311F)との結合に差異のある 120kDa の分子も見出ししており、この分子が細胞内輸送タンパク質として機能するミオシン-1c (Myo-1c) であることを示唆する結果を得ている。ニトロ化された GAPDH は Myo-1c によって膜近傍に輸送され、グルコースを速やかに代謝しているのではないかと予想される。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おり、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。本研究の見解により、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可能性がある。また 15 週齢から肥満を呈し、24 週齢で雄の約 90% が血糖値制御システムの破綻によって糖尿病を発症する、2 型糖尿病モデルラット Otsuka Long-Evans TokushimaFatty(OLETF) では血糖値上昇時に GAPDH のニトロ化修飾が亢進しないことを我々はすでに明らかにしている。今後、OLETF を用いて持続的運動トレーニング、レジスタンストレーニングを行い、その効果、特にニトロ化修飾への影響を検討することにより、糖尿病発症の遅延あるいは糖尿病が引き起こす合併症予防のメカニズムを考察することができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uda Munehiro、Yoshihara Toshinori、Ichinoseki Sekine Noriko、Baba Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of hindlimb unloading on the mevalonate and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling pathways in a fast twitch muscle in rats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇田宗弘、吉原利典、関根紀子、馬場猛、吉岡利忠
2. 発表標題 ラットの足底筋におけるPINK1/Parkin経路とその標的タンパク質発現に対する尾部懸垂の影響
3. 学会等名 日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田宗弘、吉原利典、関根紀子、馬場猛
2. 発表標題 後肢除負荷がラットの足底筋におけるミトコンドリアのカルシウム取り込みに関わるタンパク質発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎広明、川上莉乃、岡本あかり、重永綾子、池田啓一、馬場猛、飯泉恭一、冨永光俊、高森建二、松本孝、山倉文幸
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスC.KOR/ StmSlc-Traf3ip2adjmの皮膚における6-ニトロトリプトファン生成
3. 学会等名 日本トリプトファン研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎広明、重永綾子、青木優奈、池田啓一、飯泉恭一、馬場猛、松本孝、山倉文幸
2. 発表標題 調理過程が食肉中のニトロ化トリプトファンに及ぼす影響の解明
3. 学会等名 日本トリプトファン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇田宗弘、吉原利典、関根紀子、馬場猛
2. 発表標題 尾部懸垂がラット速筋の代謝酵素の発現とmTORC1シグナル伝達経路に及ぼす影響
3. 学会等名 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------