

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659448

研究課題名(和文) 体液性調節因子の支配を受けない肝臓の自律的血糖調節機構と新規降血糖薬の開発

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism of blood glucose level in hepatocytes independent of hormonal control and its pharmacological application

研究代表者

渡邊 房男 (WATANABE, Fusao)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40183719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓のグルコキナーゼ(GK)は血糖値を感知して、低血糖時には核へ高血糖時には細胞質へ移行する。このGKの細胞内移行によって、血糖値は調節されている。今回の研究で、ヒト腎由来細胞株HEK293には、グルコースを感知してGKを輸送する機構が欠損している明らかとなった。さらに、GKの移行に関与する蛋白質に対する抗体を作成し、蛋白質の局在性と蛋白質-蛋白質相互作用を測定できるようになった。

研究成果の概要(英文)：In response to hypoglycemia and hyperglycemia, hepatic glucokinase (GK) is localized to the nucleus and the cytoplasm, respectively. The intracellular localization of GK regulates the blood glucose level. In this study, I elucidate that the glucose sensing system or the GK transport mechanism in hepatocytes is impaired in HEK293 cells derived from human kidney. Moreover, antibodies were raised against the proteins involved in GK transport to clarify the protein-protein interaction with GK

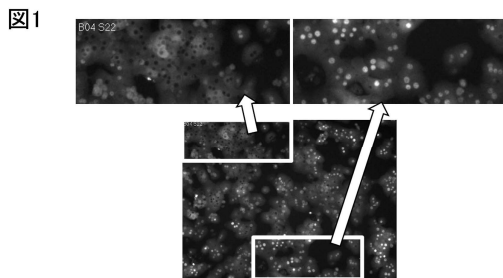
研究分野：細胞生物学

キーワード：グルコキナーゼ グルコキナーゼ調節蛋白質 核 細胞質間蛋白質輸送

1. 研究開始当初の背景

肝臓のグルコキナーゼ (GK) は低血糖時には核へ、高血糖時には細胞質へと移動する。低血糖時に核に移行した GK は核内のグルコキナーゼ調節蛋白質 (GKRP) に阻害されるため、グルコースは再リン酸化を受けることなく細胞外に流出する。このため速やかに血糖値が上昇する。高血糖時に GK は、GKRP と解離して細胞質に移動し活性化されるため、流入してくるグルコースをグルコース 6-リン酸 (G6P) に変化させることができる。G6P はグリコーゲンや中性脂肪に代謝されて肝臓や脂肪組織に蓄えられるため、血糖値は低下する。このように GK は、その細胞内の局在性を変えることで血糖値を調節している。

研究開始当初、この GK の細胞内局在性は、グルカゴンやインスリンのような体液性調節因子によって制御されているといわれていた。その根拠となった実験は、この GK の細胞内局在性を 100 個足らずの細胞を対象とし、単純な画像解析ソフトを用いて手動で定量するものであった。GK が核に局在する細胞群と細胞質に存在する細胞群は大きなモザイク模様をなして存在しているため、観察する写真の部位によって計測結果が異なり、統計学的信頼性の観点から問題が残っていた (図 1 参照)。



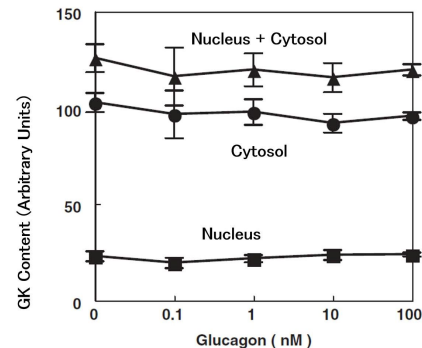
【図 1 説明】 初代培養肝細胞を 200 mg/dl のグルコースを含む培地で 30 分間インキュベーションした後、GK に対する抗体で蛍光染色を行った。この写真から約 100 個の細胞を含む領域を各々抜き出し、GK の核局在性を比較した (上図、左右) この結果は、GK の核局在性を定量的に論ずる場合、100 個程度のサンプル数では、統計的に不十分であることを示している。

2. 研究の目的

申請者はハイコンテツツ蛍光顕微鏡を用いた画像自動解析システムを開発した。これを用いて 2 万個の細胞を単位として GK の細胞内局在性を定量したところ、GK の局在性はグルコース濃度のみ支配されており、グルカゴンにもインスリンにも影響されていなかった (図 2 参照)。このことは肝細胞に

おいて血糖値を感知して GK を輸送し、自律的に血糖値を制御する機構が存在していることを示している。本研究の目的は、この GK 輸送系の血糖値感知機構を明らかにするとともに、この機構を利用した血糖降下薬の創薬の可能性を検討するものである。

図 2



【図 2 説明】 種々の濃度のグルカゴンで初代培養肝細胞をインキュベーションした後、GK の細胞内局在性を測定した。広い範囲でグルカゴンの作用を観察したにも関わらず、GK の細胞内局在性に影響はなかった。

3. 研究の方法

GK の細胞内局在性をハイスループットに測定するために、GK と橙色蛍光蛋白質である単量体型 Kusabira-Orange (mKO) との融合蛋白質を安定に発現する細胞株を作成した。GK の cDNA を PCR 法で調製し、そのコーディング領域の 3'-末端に mKO の cDNA を付加した。これを真核細胞の発現ベクターである pEBMulti-Hyg にサブクローニングした後、肝臓由来の HepG2 細胞及び腎臓由来の HEK293 細胞を形質転換し、ハイグロマイシンを用いて形質転換細胞株を選択した。この結果、融合蛋白質を高発現する HEK293 細胞株を樹立したが、HepG2 細胞においてはその発現量が極めて少なかったため測定ができなかった。これは HepG2 において GK と mKO のリンカー部分が切断されるためであった。リンカー部分の改良を行ったが、改善はなかった。このため融合蛋白質を用いた高能率な実験系の作製を断念し、細胞内での安定性がよい GK を単独に発現させて、その特異抗体を用いて局在性を測定する実験法を採用することにした。

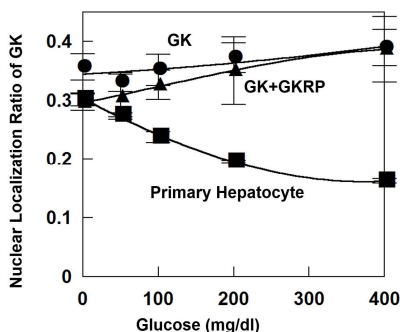
4. 研究成果

(1) HEK293 を用いた研究

融合蛋白質の発現に成功した HEK293 細胞を用いて、GK の細胞内局在性を観察した。この細胞株では、培地中のグルコース濃度を変化させても核-細胞質間の GK の移行は見られなかった。これは GKRP を共発現させて

も同じ結果であった。このことは、肝細胞に存在するグルコース濃度を感知してGKの細胞内局在性を変化させる機構が、ヒト腎細胞由来の HEK293 細胞では欠如していることが示唆された(図3参照)。

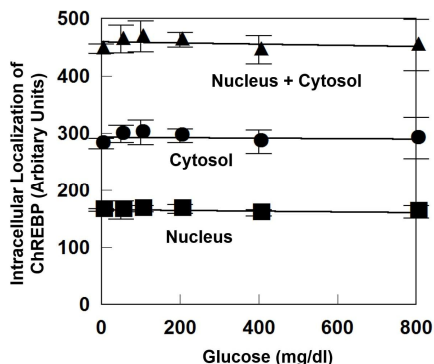
図3



【図3説明】GKを発現させたHEK293細胞を種々の濃度のグルコースを含む培地でインキュベーションした()、グルコース濃度が増加しても、GKの核局在性に影響はなかった。この傾向はGKRPを共発現させても同じであった()、コントロールとして用いた初代培養肝細胞はグルコース濃度の上昇とともに核から細胞質へのGKの移動が見られた()

また炭水化物応答配列結合蛋白質(ChREBP)は、高濃度のグルコースに反応して核に移行する蛋白質である。この蛋白質の核移行のメカニズムは、すでに明らかになっており、まず高グルコースシグナルによってキシルロース5-リン酸依存性プロテインフォスファターゼが活性化される。次にこのフォスファターゼによって普段はリン酸化されているChREBPが脱リン酸化されるとインポーチンによって認識されて、核に移行する。この蛋白質をHEK293細胞に発現させてその細胞内局在性を観察したところ、高グルコース環境においてもChREBPの核移行は見られなかった。このことは、HEK293細胞においては、GKとChREBPの核移行を制御するグルコース感知機構が共通して欠落していることが示唆された。この発見は、平成25年度の日本生化学会大会で発表した。

図4



【図4の説明】グルコース濃度が増加すると核へ移行するChREBPをHEK293細胞に発現させた。グルコース濃度を増加させても細胞内局在性の変化はなかった。

(2) 抗体の作製

GK及びGKRPに対する抗体の作製を行った。現在これらの抗体の精製と蛍光色素 Alexa Fluor 488及び555による標識を行っている。この標識抗体を用いると各々の蛋白質の局在性のみならず、FRETを用いた蛋白質-蛋白質相互作用の測定も可能となる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：渡邊房男

発表演題：「HEK293細胞では、肝細胞のグルコキナーゼの局在性を制御するグルコース感知機構が機能していない」

学会名：第86回 日本生化学会大会

発表日時：平成25年9月13日

発表場所：パシフィコ横浜、神奈川県横浜市西区

〔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：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

渡邊 房男 (WATANABE, Fusao)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40183719