

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09822

研究課題名(和文) セレノプロテインPを標的とした新規糖尿病治療薬の結晶構造解析に基づく開発

研究課題名(英文) Structural analysis of the interaction between selenoprotein P and its receptors

研究代表者

菊地 晶裕 (Kikuchi, Akihiro)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：90321752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：セレノプロテインP (SeP) は、肝臓と骨格筋にインスリン抵抗性を惹起するヘパトカインである。本研究では、SePとその受容体との相互作用を分子間相互作用解析および複合体の結晶構造解析により明らかにし、SeP阻害剤の候補化合物を構造に基づいて探索することを目的とした。骨格筋のSeP受容体であるLRP1は500kDaを超える大きな分子であり、期間中にSeP/LRP1複合体の結晶化に成功するまでには至らなかった。しかしながら、分子間相互作用解析の結果、SePは脳や精巢のSeP受容体であるApoER2と極めて特異的な相互作用様式で強固に結合することを解明することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の増え続ける2型糖尿病に対し、従来の概念には依存しない新しい治療法の開発が求められている。肝臓から分泌されるセレノプロテインP (SeP) は2型糖尿病の病態を悪化させる要因の1つであり、SePの作用を阻害する化合物は新しい治療薬に結びつくと考えられる。

本研究ではSePと受容体との詳細な相互作用様式を検討した。その結果、SePは既知の様式とは全く異なる相互作用様式で受容体に結合することが明らかとなった。得られた知見はSePが受容体に結合できなくなるような化合物の探索に極めて有用な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Selenoprotein P (SeP) is a diabetes-associated hepatokine. Analysis of the interaction between SeP and its receptors makes it possible to screen new compounds as potential anti-diabetic drugs. In this study, we have analyzed the interaction between SeP and its receptors such as ApoER2 by surface plasmon resonance (SPR) binding analysis.

SPR revealed the unique binding mode; 1) SeP binding to ApoER2 was quit strong, 2) the SeP binding site would not be the ligand binding domains but the other domains such as the beta-propeller domain in ApoER2. The strong binding of SeP to the receptor would have an advantage in uptake of selenium to cells. To investigate more details of the interaction, we are now trying to crystallize SeP/receptor complex. Also, the interaction between SeP and LRP1 that is the receptor in the skeletal muscle will be analyse by SPR.

研究分野：代謝・内分泌学

キーワード：2型糖尿病 ヘパトカイン セレノプロテイン LDL受容体ファミリー タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

研究代表者のグループでは、セレノプロテイン P (SeP) が肝臓から分泌されるヘパトカインであり、過剰に分泌された SeP は肝臓や骨格筋にインスリン抵抗性を惹起することを先の研究から見出した。さらに、過剰な SeP が受容体を介して細胞内に取り込まれることでシグナル伝達に必要な活性酸素が消去される還元ストレスが誘導され、その結果、運動療法抵抗性が惹起されることも明らかにしてきた。従って、SeP は従来の概念に依存しない新規な 2 型糖尿病の治療標的であると考えられ、SeP 阻害剤を見出すことは新規な 2 型糖尿病治療法の開発に結びつくと考えられる。

SeP の受容体として精巢や脳においては LDL 受容体ファミリーに属する ApoER2 (LRP8) が知られていたが、我々は、骨格筋においては、同じく LDL 受容体ファミリーに属する LRP1 が SeP 受容体であることを解明した。つまり、SeP と LRP1 との相互作用を阻害する化合物を骨格筋に作用されることができれば、SeP により惹起される骨格筋のインスリン抵抗性や運動療法抵抗性が改善することが期待できる。そのような阻害剤を探索するためには、SeP と LRP1 との相互作用様式を詳細に解明することが重要であり、SeP/LRP1 複合体の結晶構造解析や分子間相互作用解析 (Biacore) はそのための最適な手法である。

2. 研究の目的

本研究では、分子間相互作用解析装置 (Biacore) を用いて SeP とその受容体 (LDL 受容体ファミリー) との相互作用様式を明らかにすることを目的とした。また、SeP/LRP1 複合体の結晶構造解析により相互作用様式を原子レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) LDL 受容体ファミリーの固定

Biotin acceptor sequence を用いてセンサーチップに固定する方法を利用した。具体的には、既報を参考にして LDL 受容体ファミリー (細胞外ドメイン) の C 末端側に biotin acceptor sequence を付加した組み換えタンパク質を調整し、それをストレプトアビジンで修飾したセンサーチップに固定した。このように固定することで、すべての受容体が細胞膜で発現している時と構造上の自由度がほぼ同様となることが期待され、また、受容体のリガンド結合ドメイン等がセンサーチップにより覆われてしまうことも回避できるため、より vivo での環境に近いと考えられる状態での相互作用解析が可能となる (図 1)。

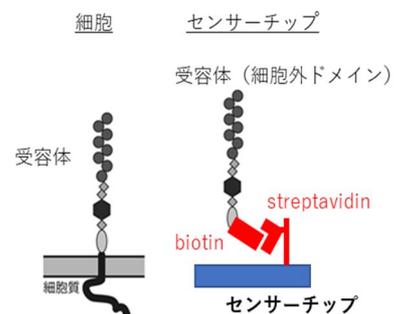


図 1 vivo により近い環境を再現し得る新規なセンサーチップへの固定化法の模式図

(2) シス테인置換体 SeP と受容体との相互作用解析

SeP は肝細胞の特異的なメカニズムによって翻訳されるセレノシス테인を 1 分子あたりに 10 個含むため、既存の技術では組換え体を得ることは困難である。研究代表者の先行研究で確立した方法によりヒト血液から高純度に精製することは可能であるが、測定条件の検討を行うことも考慮すると、相互作用解析に必要な十分な量を確保することは困難であると考えられる。そこで、すべてのセレノシス테인をシス테인で置換したシス테인置換体 SeP (cSeP) を組み換えタンパク質として動物細胞で発現させて精製した。Biacore を用いて得られた cSeP と (1) で固定した受容体との相互作用を解析した。

(3) 天然型 SeP と受容体との相互作用解析

(2) で測定条件を検討した後、Biacore を用いてヒト血液から精製した天然型 SeP と (1) で固定した受容体との相互作用を解析した。

(4) SeP と LRP1 複合体の結晶構造解析

結晶構造解析は原子レベルでのタンパク質間相互作用を解明するには極めて有効な手法である。そこで、SeP/LRP1 の結晶化を試みた。

4. 研究成果

(1) LDL 受容体ファミリーの固定

SeP 受容体である ApoER2 と LRP1 (図 2) の発現系を構築した。それぞれ細胞外ドメインの C

末端側に biotin acceptor sequence を付加して動物細胞での発現を試みたところ、ApoER2 に関しては測定に必要な量を得ることができた。しかし、LRP1 では僅かな発現量(ウェスタンブロットでは発現が確認できたものの、CBB 染色では発現が確認できない程度)であった。要因として、LRP1 には多くのドメインが存在すること、巨大であること (500kDa 以上) などが考えられる。そこで、LRP1 に関しては、ドメインごと、例えば、“リガンド結合ドメイン II” や “リガンド結合ドメイン III” の発現系を構築したが、それらも発現量が不安定であり、測定や結晶化に十分な量の精製タンパク質を得ることは困難であった。

そこで、本研究では LDL 受容体ファミリーの代表例として ApoER2 に着目し、SeP との相互作用解析に用いた。リガンドが結合しなくなることが知られている変異をリガンド結合ドメインに導入した 2 種の変異型 ApoER2 (変異型 1 と変異型 2) も調整し、それぞれをストレプトアビジンで修飾したセンサーチップに固定した。Biacore を用いて既知のリガンドと ApoER2 との相互作用を解析したところ、既報と同様の解離定数を得ることができ、また、変異型 ApoER2 には結合が見られなかったことから、それぞれの ApoER2 が期待通りにセンサーチップ上に固定ができた結論した。



図2 本研究で着目した LDL 受容体ファミリーに属する SeP 受容体

(2) シス테인置換体 SeP と ApoER2 との相互作用解析

研究代表者の先行研究において構築した発現系を用いて調整した cSeP と野生型 ApoER2 との相互作用を解析したところ、EDTA 存在下においても cSeP は ApoER2 から解離しないほどに強く結合することが明らかとなった。0~100 nM における cSeP 濃度依存的な測定を行ったが、強い結合のために解離定数を求めることは困難であった (図 3)。さらに、変異型 ApoER2 においても野生型 ApoER2 と同様の強い結合が見られた (図 3)。細胞を用いた cSeP と ApoER2 との相互作用解析に関する報告によると、cSeP は ApoER2 のリガンド結合ドメインではなく、β-プロペラドメインに結合することが報告されており、本研究の結果はその報告と矛盾しない。非特異的な結合であることを否定することは出来ないが、cSeP は極めて特異的な相互作用様式により ApoER2 と相互作用することが示唆された。

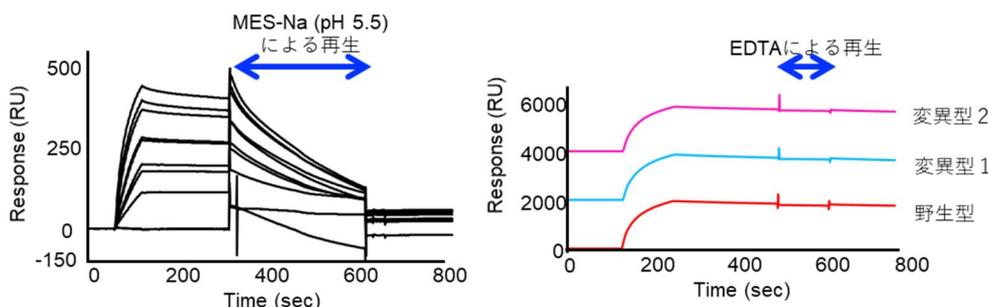


図3 cSeP と ApoER2 との相互作用解析 (左)cSeP の濃度依存性、(右)cSeP と野生型 ApoER2 または変異型 ApoER2 (変異型 1 と変異型 2) との結合

(3) 天然型 SeP と ApoER2 との相互作用解析

cSeP と ApoER2 との特異的な相互作用様式は 10 個のセレノシスチンをシスチンに置換したことが影響していることも否定できない。そこで、ヒト血液から天然型の SeP を高純度に精製し、野生型 ApoER2 との相互作用を解析した。その結果、天然型 SeP においても cSeP と同様、ApoER2 と強く結合することが明らかとなった。0~100 nM における SeP 濃度依存的な測定を行ったが、解離定数を求めるには至らなかった。なお、本研究では EDTA による再生ではなく、酸性条件下 (MES-Na, pH 5.5) での再生を行ったため、測定の途中で固定した ApoER2 が分解等を受けている可能性もある。そこで、SeP との相互作用解析を行った後のセンサーチップを用いて既知のリガンドとの相互作用解析を引き続き行った。その結果、固定した直後のセンサーチップを用いた時と同様の濃度依存性を示したことから、SeP で観測された結合はセンサーチップ上の ApoER2 の分解等による影響ではないことが分かった。

(4) SeP と LRP1 複合体の結晶構造解析

(3) の結果から相互作用部位を推定し、複合体形成に適した組み換え LRP1 を用いて複合体の結晶化を行う計画であったが、安定した LRP1 発現系を構築できず、研究期間中に複合体の結晶化に成功するまでには至らなかった。

本研究での結果は、SeP は LDL 受容体ファミリーに属する受容体と特異的な相互作用様式で強固に結合することを示唆している。SeP はヘパトカインとしての機能のみならず、肝臓に貯蔵されているセレンを全身に運ぶセレントランスポーターとしての機能も有している。セレンは生体必須微量元素であるため、セレンを細胞内に効率よく取り込むメカニズムとして、SeP が受容体に強く結合する、受容体ごと細胞内に取り込まれる、細胞がセレンを必要とするまでは SeP は分解されずに細胞内に留まり、セレンが必要となった時には受容体との結合が弱まるような構造上の変化が引き起こり SeP がリソソームで分解される、または、受容体ごとリソソームにおいて分解される、と想定することは合理的である。実際、少なくとも膵細胞においては細胞に取り込まれた SeP が 48 時間後でも分解されずに細胞内に留まっていることが報告されている。つまり、取り込まれた SeP が速やかに分解されるわけではなく、細胞内の SeP/受容体複合体を制御することでセレン供給を調節している可能性があり、そのためには、受容体が他のリガンドとは異なる相互作用様式で SeP を結合するモデル、すなわち、本研究の結果が示唆するモデルは適切であると思われる。

今後、SeP を標的とした 2 型糖尿病の新たな治療法の開発には、SeP と LDL 受容体ファミリーとの極めて特異的な相互作用を原子レベルでより詳細に解明する必要がある。特に、LRP1 では複数のドメインにより 1 つの SeP を結合していることも考えられる。実際、研究代表者の先行研究では、本研究とはセンサーチップへの固定化法が異なるものの、LRP1 には SeP と強く相互作用するドメインがあることを明らかにしている(図 4)。SeP の結合ドメインとして ApoER2 では -プロペラドメインがその候補ではあるが、LRP1 で推定される SeP 結合ドメインには -プロペラドメインは含まれていない。従って、SeP を強く結合させるためにいくつかのドメインが協調している可能性もある。LRP1 は巨大分子であることから、SeP と全長 LRP1 の複合体を得ることができれば、結晶構造解析のほか、電子顕微鏡による構造解析も可能であり、構造情報から相互作用様式を原子レベルで解明することができるはずである。今後、全長 LRP1 の大量発現系を構築することが課題となる。

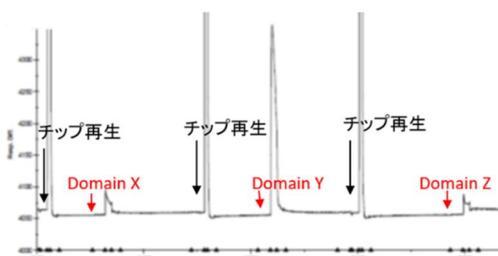


図 4 LRP1 のドメイン Y は SeP 結合ドメインの候補であるが、ドメイン Y には -プロペラドメインは含まれていない

本研究では SeP を標的とした 2 型治療法の開発として LDL 受容体ファミリーとの相互作用に着目したが、*vivo* における SeP の体内動態に関しては未知な部分も多く、未解明な受容体も存在すると思われる。そこで本研究では、SeP と相互作用する LRP1 以外のターゲットを探索する手法として、放射線トレーサー法の開発も行った。予備的な実験として、ラベル化の行いやすさを考慮し、SeP ではなく、別のヘパトカインである leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) を ^{125}I でラベル化してマウスに投与し、その体内動態を追跡した。その結果、LECT2 は短時間で骨格筋に集積し、その後、経時的に徐々に解離していくことが明らかとなった(図 5)。このことは、骨格筋に LECT2 受容体があることを示唆している。LECT2 は骨格筋にインスリン抵抗性を惹起するが、トレーサー法実験により新たな受容体の存在が示唆され、詳細なメカニズムを解明する手がかりを得ることが出来た。今後、SeP においても RI でラベル化することで、*vivo* での体内動態を追跡し、SeP と相互作用する新たなターゲットを見出すことを目指す。

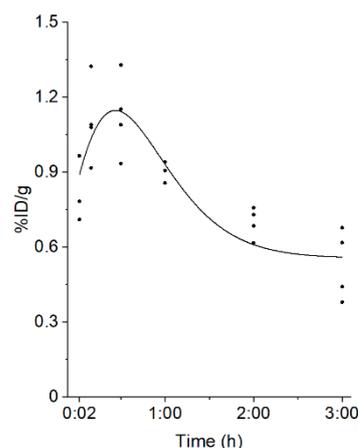


図 5 大腿筋における放射線集積率

本研究の Biacore 測定に関しては横浜市立大学の根谷崎 牧子 先生、矢野 七海希 先生、そして、禾 晃和 先生に多大なご協力をいただきました。深く感謝の意を示します。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mohri Kensuke, Misu Hirofumi, Takayama Hiroaki, Ishii Kiyo-aki, Kikuchi Akihiro, Lan Fei, Enyama Yasufumi, Takeshita Yumie, Saito Yoshiro, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 42
2. 論文標題 Circulating Concentrations of Insulin Resistance-Associated Hepatokines, Selenoprotein P and Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2, during an Oral Glucose Tolerance Test in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 373 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00549	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 -
1. 著者名 Tanimura Jun, Nakagawa Hiromi, Tanaka Takeo, Kikuchi Akihiro, Osada Sachie, Tanaka Yoshiaki, Tokuyama Kumpei, Takamura Toshinari	4. 巻 66
2. 論文標題 The clinical course and potential underlying mechanisms of everolimus-induced hyperglycemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 615 ~ 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ18-0542	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 -
1. 著者名 Hosokawa Kohei, Mizumaki Hiroki, Elbadry Mahmoud I., Saito Chizuru, Espinoza J. Luis, Thi Thanh Dao An, Katagiri Takamasa, Harashima Ai, Kikuchi Akihiro, Kanai Akinori, Matsui Hirotaka, Inaba Toshiya, Taniwaki Masafumi, Yamamoto Yasuhiko, Nakao Shinji	4. 巻 33
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis by SLIT1-mutated hematopoietic stem cells due to a breakdown of the autocrine loop involving Slit1 in acquired aplastic anemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2732 ~ 2766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0510-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igawa Hirobumi, Kikuchi Akihiro, Misu Hirofumi, Ishii Kiyo-aki, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 10
2. 論文標題 p62-mediated autophagy affects nutrition-dependent insulin receptor substrate 1 dynamics in 3T3-L1 preadipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 32 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/jdi.12866	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 -

1. 著者名 Masakazu Sugiyama, Akihiro Kikuchi, Hirofumi Misu, Hirobumi Igawa, Motooki Ashihara, Youichi Kushima, Kiyofumi Honda, Yoshiyuki Suzuki, Yoshiki Kawabe, Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibin E (INHBE) is a possible insulin resistance-associated hepatokine identified by comprehensive gene expression analysis in human liver biopsy samples	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0194798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194798	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 菊地 晶裕、高山 浩昭、柴 和弘、御簾 博文、篁 俊成
2. 発表標題 肥満関連ヘパトカインLECT2のマウスにおける血中半減期および体内動態
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地 晶裕、高山 浩昭、柴 和弘、御簾 博文、箕越 靖彦、篁 俊成
2. 発表標題 肝脂肪化を感知するヘパトカインLECT2のマウスにおける体内動態
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井川 寛章、菊地 晶裕、御簾 博文、石井 清明、金子 周一、篁 俊成
2. 発表標題 インスリン受容体基質(IRS-1)の栄養依存的タンパク質発現変動における選択的オートファジー受容体p62介在性オートファジーの役割
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊地 晶裕、御簾 博文、井川 寛章、篁 俊成
2. 発表標題 新規な肥満関連ヘパトカインinhibin Eの同定と機能解析
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊地 晶裕、高山 浩昭、津金 寛彦、Swe Mar Oo、御簾 博文、柴 和弘、篁 俊成
2. 発表標題 病態形成ヘパトカインLECT2のマウスにおける体内動態
3. 学会等名 金沢大学学際科学実験センターシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 菊地 晶裕、篁 俊成	4. 発行年 2017年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 セレノプロテインPの新たな機能と受容体（「内分泌・糖尿病・代謝内科」Vol.44, No 5の話題を担当）	

1. 著者名 菊地 晶裕、篁 俊成	4. 発行年 2017年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 7
3. 書名 肝臓の糖・エネルギー代謝（「Diabetes Frontier」Vol.28, No.6の特集「糖尿病と肝臓」を分担）	

1. 著者名 菊地 晶裕、箕越 靖彦、篁 俊成	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本糖尿病・肥満動物学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 ヘパトカインの体内動態測定法（「日本糖尿病・肥満動物学会NEWS LETTER」Vol.23, No.2）	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----