

Title	膜貫通ペプチドを用いたインスリン受容体と糖脂質の相互作用解析
Author(s)	二村, 友香
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87826
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (二村友香)

論文題名

膜貫通ペプチドを用いたインスリン受容体と糖脂質の相互作用解析

論文内容の要旨

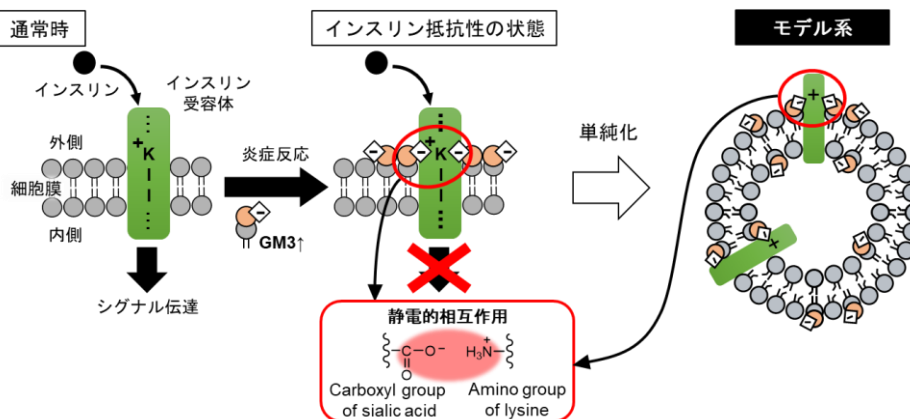


図1

インスリン受容体は血糖値降下シグナルの伝達に関与する一回膜貫通型のタンパク質で、その感受性の低下は、2型糖尿病の発症機序の一つであるインスリン抵抗性を引き起こす原因となる。特に脂肪細胞では、糖脂質の一種であるGM3の発現亢進がインスリン受容体のシグナル伝達を抑制することが報告されている。生化学的、細胞生物学的な検証により、GM3の構成糖であるシアル酸の負電荷と、インスリン受容体の膜貫通部位直上に存在する塩基性アミノ酸の正電荷との静電的相互作用がその要因であることが示唆されたが、細胞膜の不均一性から詳細な解析は困難だった。そこで筆者は蛍光標識したインスリン受容体の膜貫通ペプチドを合成し、これをリポソームに組み込むことで、単純化したモデル系を構築し相互作用解析を行った（図1）。

最初に蛍光標識したインスリン受容体の膜貫通ペプチド（NBD-IR-TM）の合成を行った。この膜貫通ペプチドはFmoc固相合成法では合成が難しく、イソペプチド法とBoc固相合成法を併用することで、初めて合成することができた。次に合成したNBD-IR-TMがLiquid-disordered (Ld)相、糖脂質がLiquid-ordered (Lo)相に主に局在するような相分離GUVを作製したところ、GM3を含む場合には、シアル酸をもたないGM3前駆体のラクトシルセラミド（LacCer）を含む場合と比べて、NBD-IR-TMのLo相への局在が有意に増加した。このことはGM3との相互作用によりNBD-IR-TMがLo相により多く引き込まれたことを示唆している。また、Ld相のみからなるMLV中のNBD-IR-TMの会合状態を測定することで、GM3との相互作用を解析した。その結果、GM3がNBD-IR-TMの会合を阻害した一方、LacCerはこれを阻害しなかった。さらに、GUV中でのNBD-IR-TMの流動性を解析することでGM3との相互作用を調べた。その結果、GUVの構成脂質と同等であったNBD-IR-TMの流動性は、GM3を含む脂質組成にした場合に有意に低下した。これはすなわち、GM3とNBD-IR-TMが相互作用し複合体を形成することで、NBD-IR-TMの動きが遅くなったことを示している（図2左）。

続いて膜貫通ペプチドと糖脂質の相互作用におけるペプチドの電荷の重要性について調べるため、電荷の有無が異なる2種類のモデルペプチドを合成した。これらのペプチドの会合状態がGM3の有無によって変化するか調べたところ、正電荷をもつペプチドの場合にはGM3によって会合が阻害された一方、電荷をもたないペプチドの場合にはGM3による会合状態の変化は見られなかった。これは、GM3が正電荷をもつペプチドとのみ相互作用し、ペプチドの会合を阻害したためであると考えられる。この結果は、膜貫通ペプチドとGM3の相互作用には、それぞれの分子が有する塩基性アミノ酸と酸性糖が重要であることを示している（図2右）。

以上の検証から筆者は、インスリン受容体の膜貫通ペプチドが持つ正電荷とGM3が持つ負電荷による静電的相互作用が、GM3の発現亢進によるインスリン抵抗性の発症に関与することを明らかにした。

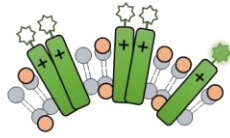
インスリン受容体

GM3 (電荷あり)



Lo相への局在 多
会合の阻害 あり
流動性 低下

LacCer (電荷なし)



Lo相への局在 少
会合の阻害 なし

モデルペプチド

ペプチドの電荷あり



会合の阻害 あり

ペプチドの電荷なし



会合の阻害 なし

図2

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (二 村 友 香)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	深瀬 浩一
	副 査	教授	梶原 康宏
	副 査	教授	島本 啓子

論文審査の結果の要旨

二村友香は「膜貫通ペプチドを用いたインスリン受容体と糖脂質の相互作用解析」と題した研究を実施した。

インスリン受容体は血糖値降下シグナルの伝達に関与する一回膜貫通型のタンパク質で、その感受性の低下は、2型糖尿病の発症機序の一つであるインスリン抵抗性を引き起こす原因となる。特に脂肪細胞では、糖脂質の一種である GM3 の発現亢進がインスリン受容体のシグナル伝達を抑制することが報告されている。生化学的、細胞生物学的な検証により、GM3 の構成糖であるシアル酸の負電荷と、インスリン受容体の膜貫通部位直上に存在する塩基性アミノ酸の正電荷との静電的相互作用がその要因であることが示唆されたが、細胞膜の不均一性から詳細な解析は困難だった。そこで、本研究では蛍光標識したインスリン受容体の膜貫通ペプチドを合成し、これをリポソームに組み込むことで、単純化したモデル系を構築し相互作用解析を行った。

まず蛍光標識したインスリン受容体の膜貫通ペプチド (NBD-IR-TM) の合成を行った。この膜貫通ペプチドは Fmoc 固相合成法では合成が難しく、イソペプチド法と Boc 固相合成法を併用して、合成を達成した。次に合成した NBD-IR-TM が Liquid-disordered (Ld)相、糖脂質が Liquid-ordered (Lo)相に主に局在するような相分離巨大リポソームを作製した。GM3 を含むリポソームでは、シアル酸をもたないラクツシルセラミド(LacCer)を含むリポソームと比べて、NBD-IR-TM の Lo 相への局在が有意に増加した。これは GM3 との相互作用により NBD-IR-TM が Lo 相により多く取り込まれたことを示す。また、Ld 相のみからなるリポソームでは、GM3 が NBD-IR-TM の会合を阻害した一方、LacCer はこれを阻害しなかった。さらに、巨大リポソームでの NBD-IR-TM の流動性を解析し、NBD-IR-TM の流動性は、GM3 をリポソームにおいて有意に低下した。以上の結果は、GM3 は NBD-IR-TM が相互作用して複合体を形成することを示している。

続いて膜貫通ペプチドと GM3 の相互作用におけるペプチドの電荷の重要性について調べるため、電荷の有無が異なる2種類のモデルペプチドを合成した。これらのペプチドの会合状態が GM3 の有無によって変化するか調べたところ、正電荷をもつペプチドの場合には GM3 によって会合が阻害された一方、電荷をもたないペプチドの場合には GM3 による会合状態の変化は見られなかった。この結果は、膜貫通ペプチドと GM3 の相互作用には、それぞれの分子が有する塩基性アミノ酸と酸性官能基が重要であることを示している。

以上のように、二村友香はインスリン受容体の膜貫通ペプチドが持つ正電荷と GM3 が持つ負電荷による静電的相互作用が、GM3 の発現亢進によるインスリン抵抗性の発症に関与することを明らかにした。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。