

N-8

膵臓β細胞におけるグルコース濃度変化に応答した脂質修飾タンパク質の解析

Analysis of Lipid-Modification Protein in Pancreatic β Cells in Response to Changes in Glucose Concentration

○松尾康生¹, 松下祥子², 小林勇輝³, 久保田仁奈³, 飯島凌大³, 林亜紀², 早川麻美子², 青山忠², 鈴木佑典²

*Matsuo Kousei¹, Shoko Matsushita², Yuki Kobayashi³, Hina Kubota³, Ryodai Iijima³, Aki Hayashi², Mamiko Hayakawa²,
Tadashi Aoyama², Yusuke Suzuki²

The specific proteins undergoing lipid modification in pancreatic β cells are influenced by glucose concentration and the length of the fatty acid chain. However, the intracellular distribution of these proteins remains unclear. This study investigated the distribution of lipid-modified proteins in the pancreatic β cells. The results showed that these proteins localize to the cell membrane regardless of fatty acid chain length under high glucose concentration conditions. It is considered necessary to elucidate the correlation between lipid modification and insulin secretion levels.

脂質修飾は、タンパク質と細胞膜の相互作用に関わる翻訳後修飾であり^[1]、細胞内から細胞外へ分泌小胞を放出するエキソサイトシスにおいても重要な役割を果たす。その1つとして血糖値を下げるホルモンであるインスリンの分泌が知られており、グルコース濃度変化に応答して膵臓のβ細胞から分泌される。これまでに、インスリンの分泌能を持つ細胞を異なるグルコース濃度下で培養したところ、炭素数16の脂肪酸であるパルミチン酸 (PA) に修飾されるタンパク質の種類が異なることを明らかにした。さらに、炭素数18の脂肪酸であるステアリン酸 (SA) 修飾が PA 修飾されるタンパク質とは異なることを明らかにした。しかし、グルコース濃度及び脂肪酸鎖長の違いによって細胞膜への局在が変化するのは不明である。そこで本研究では、これらの違いに伴う脂質修飾タンパク質の局在を解析することとした。

ラット膵臓β細胞由来のBRIN-BD11細胞に対し、PAアルキン及びSAアルキンを、それぞれ最終濃度100μMとなるよう添加して24時間培養した。その後、アジド末端を持つ蛍光標識試薬をアルキン末端と結合させた。また、細胞小器官に特有のタンパク質を細胞免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてこれらの蛍光を観察した。さらに、脂肪酸アルキン添加後、細胞内外のインスリン量を酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) で測定した。

細胞内のPA及びSA修飾タンパク質の局在を解析した結果、PA修飾タンパク質はグルコース濃度2g/Lにおいて主に小胞体、4g/Lにおいてゴルジ体と共局在していることが分かった。一方、SA修飾タンパク質はグルコース濃度変化に関わらず、主にゴルジ体と共局在していることが分かった。細胞膜に着目して解析したところ、脂肪酸鎖長の差に関わらず、グルコース濃度が4g/Lの条件下において、細胞膜に蛍光が観察された。ELISAの結果、未添加群と比較して、脂肪酸アルキンを添加した条件の細胞内外のインスリン濃度比が約50%減少したことが分かった。

インスリン小胞は、グルコース濃度変化に伴って小胞体からゴルジ体へ輸送されることから、PA修飾タンパク質はインスリン小胞の輸送に関与している可能性が考えられた。一方、4g/Lのグルコース濃度条件下において、脂質修飾されたタンパク質が細胞膜にも局在したことから、これらがインスリン分泌に関与する可能性が考えられた。しかし、脂肪酸アルキンの添加により、インスリン量の低下が見られたことから、脂質修飾に依存した変化であるのかを検討する必要があると考えられた。

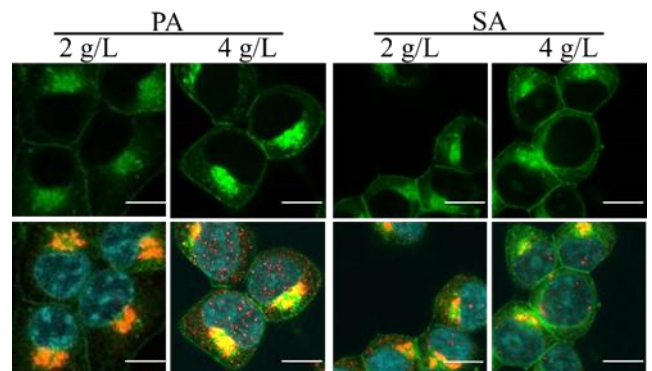


Figure 1. Distribution of lipid-modified proteins (green; upper) and merged images (red: Golgi body, blue: cell nucleus; lower) within cells. (Scale bar: 10 μm)

参考文献

[1] A. Main, W. Fuller, “Protein S-Palmitoylation: advances and challenges in studying a therapeutically important lipid modification”, *FEBS J.*, Vol. 289, No. 4, pp 861-882, 2022.

1: 日大理工・院 (前)・応化, 2: 日大理工・教員・応化, 3: 日大理工・学部・応化