

令和元年5月22日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19933

研究課題名(和文)骨格筋への糖取り込みをリアルタイム観察可能な蛍光プローブの開発

研究課題名(英文)Development of fluorescent probe for glucose uptake into skeletal muscle

研究代表者

秋本 崇之(AKIMOTO, Takayuki)

早稲田大学・スポーツ科学大学院・教授

研究者番号：00323460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンによる血糖の取り込みの不全を意味するインスリン抵抗性は、肥満をはじめとして、メタボリックシンドローム、糖尿病、高脂血症など世界的に顕著な増加傾向にある生活習慣病の根本的な背景メカニズムのひとつと考えられている。現在、臨床ではインスリン抵抗性の治療薬として、インスリン抵抗性改善薬やインスリン分泌促進薬が第一選択となっているが、いずれもすべての患者予後を改善するには至っていない。そこで、本研究では生きた細胞や組織への糖の取り込みを観察可能な蛍光プローブを開発した。現在当該技術の特許として国内出願中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって細胞や組織への糖取り込みをモニタリングすることが可能となったため、血糖をコントロールする薬剤の開発等に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance, which means the failure to take up blood glucose by insulin, is one of the fundamental mechanisms behind lifestyle-related diseases that are increasing worldwide, including obesity, metabolic syndrome, diabetes, and hyperlipidemia. At present, several drugs are the first treatments for insulin resistance in the clinic, but none of them have been able to improve the prognosis for all patients. Therefore, in this study, we developed a fluorescent probe that can observe the uptake of sugars into living cells and tissues. We are currently applying for the technology as a patent in Japan.

研究分野：筋生物学, メカノバイオロジー

キーワード：血糖 in vivoイメージング 骨格筋 蛍光顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インスリンによる血糖の取り込みの不全を意味するインスリン抵抗性は、肥満をはじめとして、メタボリックシンドローム、糖尿病、高脂血症など世界的に顕著な増加傾向にある生活習慣病の根本的な背景メカニズムのひとつと考えられている。現在、臨床ではインスリン抵抗性の治療薬として、インスリン抵抗性改善薬やインスリン分泌促進薬が第一選択となっているが、いずれもすべての患者予後を改善するには至っていない。

一方、適度な身体運動がインスリン抵抗性を改善する事はよく知られており、これは糖尿病等の代謝性疾患患者に対する運動療法の科学的エビデンスとなっている。身体運動はインスリン依存性、およびインスリン非依存性に血糖レベルを改善するとされている。また、運動によるインスリン感受性の亢進は運動直後から認められ、運動終了24時間程度まで継続することが知られている。しかしながら、身体運動によるインスリン抵抗性改善のメカニズムはほとんど分かっていない。

申請者はこれまでに、身体運動に起因する物理的的刺激(メカニカルストレス)が骨格筋に与える影響について検討してきた。我々を含めたいくつかのグループの研究結果から、骨格筋の収縮は、通常のインスリンシグナル伝達経路と異なる経路でグルコースの取り込みを制御する可能性が示唆されている。このことは糖尿病等インスリン抵抗性を病態とする疾病の治療において、運動によるインスリン抵抗性改善のメカニズムから新しい治療戦略が生まれる可能性があると考えられる。通常のインスリンシグナル伝達経路と異なるシグナル伝達経路で制御される可能性のあるメカニカルストレス依存性の糖取り込みメカニズムを詳細に検討するためには、血流が維持された状態で収縮可能な生きた骨格筋において、糖取り込みをリアルタイムに可視化する技術の開発が不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、生きた骨格筋組織において、糖取り込みをリアルタイムに可視化する技術を開発する。これを達成するために、糖輸送体の骨格筋組織内動態と糖取り込みを、生きた骨格筋組織や筋細胞で観察するためのベクターの開発を行う。

3. 研究の方法

組み替え糖輸送体の発現ベクターの試作と機能評価を中心に研究を遂行する。これまでの研究(Kanai et al. J Biol Chem, 2004; Reed et al. J Cell Sci, 2013)から、糖輸送体のC-末端領域への蛍光タンパクの挿入は、糖輸送体の局在に影響を与えないと考えられる。また、筋肉に発現する糖輸送体である GLUT4 と構造の近い GLUT3 の立体構造と、我々の予備的な検討の結果、GLUT4 のC-末端側に位置する細胞外領域が蛍光タンパクや人工ペプチドの最適挿入位置であると考えられた。このため、すでに取得済みの mouse GLUT4 cDNA の当該位置に GFP あるいは FLAsH タグに結合するテトラシステインモチーフ(Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys)を組み込んだ発現ベクターを作製し、これをマウス筋芽細胞株 C2C12 より分化させた筋管に導入し、組み替え糖輸送体がインスリン刺激による細胞内動態を検討する。インスリン刺激により組み替え糖輸送体が細胞膜上にトランスロケーションする事が確認されない場合は、他の挿入位置を検討する。同時にグルコースの細胞内への取り込みを蛍光法で評価し、GLUT4 動態と細胞内グルコースの動態の整合性を評価する。

さらに組み込んだ蛍光タンパクを FLAsH タグ、あるいは pH 感受性の GFP 変異体に置き換える事で、細胞膜上に存在する糖輸送体と、細胞内プールの糖輸送体を区別する事が可能かについて、同様にマウス筋芽細胞株 C2C12 より分化させた筋管を用いて検討する。

4. 研究成果

本研究では、mouse GLUT4 cDNA のC-末端領域に SEP タグ、N-末端側に mCherry を組み込んだ発現ベクターを作製し、培養細胞で蛍光タンパクの発現を確認した。次に、これをマウス筋芽細胞株 C2C12 より分化させた筋管に導入し、組み替え糖輸送体がインスリン刺激による細胞内動態を検討した。その結果、通常の培養条件では赤色の蛍光が優位であった筋管細胞がインスリン刺激により、緑色の蛍光強度が増加する傾向を示し、我々が作製した組み替え糖輸送体の発現ベクターが機能的であることが示唆された。

このシステムを、「細胞の等取り込みを可視化するためのキメラタンパク質」として、国内特許出願を行なった。

5. 主な発表論文等

1. N. Kim, J. Kim, C.S. Yoo, K. Lim, T. Akimoto, J.H. Park. Effect of acute mid-intensity treadmill exercise on the androgen hormone level and uncoupling protein-1 expression in brown fat tissue of mouse. J Exerc Nutr Biochem, 22(1), 15-22, 2018

[雑誌論文](計 1件)

佐古博皓, 秋本崇之, 鈴木克彦. 共発現遺伝子ネットワーク解析による遺伝子の機能予測とその

解析. 第3回日本筋学会大会, 小平, 2017.8

佐古博皓, 秋本崇之, 鈴木克彦. 翻訳動態特異的共発現遺伝子ネットワーク解析による遺伝子の機能予測とその解析. 第72回日本体力医学会学術総会, 松山, 2017.9

相澤勝治, 目崎登, 秋本崇之. メカニカルストレスに対する骨格筋局所のアンドロゲン産生の調節機序. 第72回日本体力医学会学術総会, 松山, 2017.9

佐古博皓, 鈴木克彦, 秋本崇之. 翻訳動態特異的な共発現遺伝子ネットワーク解析. 第4回日本筋学会大会, 倉敷, 2018.8

相澤勝治, 秋本崇之, 目崎登. メカニカルストレスによる Egr ファミリー遺伝子発現の応答. 第71回日本体力医学会学術総会, 福井, 2018.9

田中嘉法, 秋本崇之, 狩野豊. in vivo バイオイメージングによる強縮刺激時の乳酸蓄積動態観察. 第71回日本体力医学会学術総会, 福井, 2018.9

秋本崇之. メカニカルストレスによる骨格筋可塑性制御. コロイド先端技術講座 2018, 東京, 2018.11 (invited)

〔学会発表〕(計 8件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 細胞の等取り込みを可視化するためのキメラタンパク質

発明者: 加藤義雄, 古旗祐一, 秋本崇之

権利者: 加藤義雄, 古旗祐一, 秋本崇之

種類: 特許

番号: 2018-204217

出願年: 2018

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

早稲田大学筋生物学研究室

<https://www.waseda.jp/sem-muscle/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 加藤義雄

ローマ字氏名: KATO, Yoshio

所属研究機関名: 産業技術総合研究所

部局名: 生命工学領域

職名: グループリーダー

研究者番号(8桁): 20415657

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。