

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790649

研究課題名（和文）：

骨格筋の糖脂質代謝におけるフィラミンの生理的役割に関する解析

研究課題名（英文）：

The expression of actin-binding protein filamin in the skeletal muscle of diabetic rodents

研究代表者

勅使川原 匡 (TESHIGAWARA KIYOSHI)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・民族薬物研究センター・薬効解析部・研究員

研究者番号：40403737

研究成果の概要（和文）：

骨格筋におけるインスリン抵抗性は、2 型糖尿病の早期に現れる病態の一つであることから、糖尿病の発症や進展の原因となっている可能性がある。本研究では、アクチンフィラメント結合タンパクの一つであるフィラミンの発現量が、2 型糖尿病ラットの骨格筋において、正常ラットと比べて有意に増加していることを明らかとした。この結果は、骨格筋の糖脂質代謝に対してフィラミンが何らかの関与をもつ可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

The insulin resistance in skeletal muscle causes the onset and the development of type 2 diabetes mellitus. However, its molecular mechanism is unclear. In this study, we clarified the expression of filamin, which is one of actin-binding proteins, increased in the skeletal muscle of diabetic rodents compared with the normal rodents. This data indicate that filamin may have a physiological function for glucose metabolism in the skeletal muscle involved in the development of type 2 diabetes mellitus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：フィラミン、糖脂質代謝、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

インスリンはエネルギー代謝調節作用における生体必須のホルモンであり、主に肝臓や骨格筋、脂肪組織において糖取込みや中性脂肪の合成促進・分解抑制を制御している。生体におけるインスリンの作用障害はインスリン抵抗性と呼ばれ、2型糖尿病を特徴付ける最も重要な病態の一つとなっている。特に骨格筋でのインスリン抵抗性は、2型糖尿病における種々の代謝障害のうち最も早期に現れるものの一つであることから、糖尿病の発症や進展の原因となっている可能性があり、骨格筋におけるインスリンの作用機序を解明することは極めて重要な研究課題といえる。

Filamin は、アミノ末端にアクチン結合領域、カルボキシル末端に二量体形成領域をもち、二量体を形成する分子量 280kDa のタンパク質である。幅広い組織発現分布をもつ Filamin A、B と骨格筋・心筋に特異的に発現する Filamin C の 3 種類のアイソフォームが存在する。Filamin の生理機能は、アクチンフィラメントに結合することでアクチンフィラメントの 3 次元構造の形成に関与し、細胞の形態や運動性を調節することが古くから知られている。また、アミノ末端にアクチンフィラメント、カルボキシル末端付近に様々なタンパク質が結合することにより、Filamin がセカンドメッセンジャー様の情報伝達の足場となっていることが分かっている。しかし、膜タンパクを主とした 20 種類以上のタンパク質が Filamin と結合することが報告されているものの、それぞれのタンパク質とアクチンフィラメントに対して Filamin がどのような生理機能を担っているかについては、ほとんど明らかとなっていない。

近年、Filamin A がインスリン受容体と結合して、インスリン依存性の MAPK 経路の活性化を抑制すること、初代培養骨格筋細胞において Filamin C が Akt によってリン酸化されること、運動後の骨格筋において Filamin A が Akt によってリン酸化されること、さらに、肥満マウスの脂肪組織において Filamin A の発現量が増加することなどが報告されている。

2. 研究の目的

インスリン情報伝達機構の解明、および 2 型糖尿病の病態改善を目的として、骨格筋のインスリン依存性の糖脂質代謝における Filamin の関与の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 野生型 (C57BL/6 マウス) および 2 型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) ・ラット (Zucker fatty ラット) の各種組織における Filamin の発現分布様式を RT-PCR 法やウェスタンブロット法を用いて検討した。RT-PCR 法には、それぞれの Filamin アイソフォームに特異的なプライマーを設計して使用した。また、ウェスタンブロット法には、市販の Filamin A モノクローナル抗体と Filamin C ポリクローナル抗体を使用した。

(2) 筋管細胞株 (C2C12 細胞および L6 細胞)、脂肪細胞株 (3T3-L1 細胞) の分化過程における Filamin の発現量の変化を RT-PCR 法やウェスタンブロット法を用いて検討した。

(3) 脂肪細胞株 (3T3-L1 adipocyte) にヒト Filamin A cDNA をエレクトロポレーション法にて一過的に過剰発現させ、その後、インスリン刺激によるグルコース取り込み量の変化を検討した。

(4) 筋管細胞株 (C2C12 細胞および L6 細胞) にインスリンやグルコースの刺激投与をおこない、その後、Filamin の発現量の変化をウェスタンブロット法によって検討した。各刺激時間は 9 時間・18 時間の短時間投与、24 時間・72 時間の長時間投与でおこなった。長時間投与に際しては、12 時間毎に培地交換をおこなった。インスリンの投与濃度は 100nM、グルコースの投与濃度は 5mM・25mM・30mM・50mM でおこない、インスリン・グルコースの単独投与または同時投与の実験条件で検討した。

(5) 野生型マウス (C57BL/6) に絶食処置・絶食後再摂食処置をおこない、その後、骨格筋 (ヒラメ筋) における Filamin の発現量の変化をウェスタンブロット法によって検討した。

4. 研究成果

(1) Filamin A、B は幅広い組織発現分布をもつが、骨格筋・心筋においては Filamin C が特異的に発現していると考えられている。しかし、骨格筋において Filamin A が発現していることを示唆する報告も散見される。

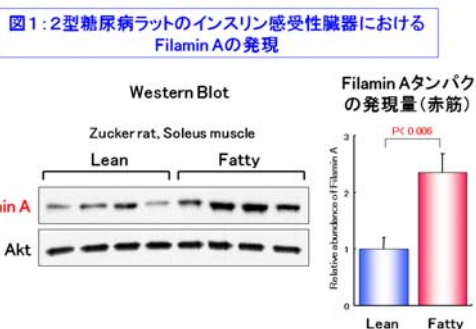
野生型マウスの各種組織における Filamin A mRNA および Filamin C mRNA の発現を RT-PCR 法によって検討したところ、どちらの Filamin アイソフォームも各組織に広く発現がみられた。ただし、Filamin C mRNA の発現量は各種組織で差があり、骨格筋・心筋・肺・精巣などが比較的強発現していた。

加えて、Filamin A タンパクおよび Filamin C タンパクの発現をウェスタンブロット法によって検討しても、どちらの Filamin アイソフォームも各組織に広く発現がみられた。しかし、タンパクレベルでの発現量には各種組織で著しい差があり、mRNA レベルの発現量と必ずしも相関していなかった。

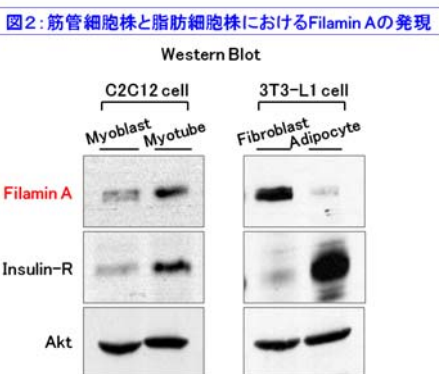
インスリンの主要な感受性臓器である骨格筋・肝臓・脂肪組織における Filamin A/C の各タンパクの発現は、骨格筋において強発現しており、肝臓・脂肪組織においては微弱であった。この結果は、2 型糖尿病モデルラット (Zucker fatty) においても同様だった。

骨格筋を赤筋(ヒラメ筋)と白筋(長指伸筋)に分離し、Filamin A/C の各タンパクの発現量を検討したところ、白筋での発現は弱く、赤筋において強発現していた。

(2) 2 型糖尿病モデルラット (Zucker fatty) の赤筋(ヒラメ筋)における Filamin タンパクの発現量をウェスタンブロット法によって検討したところ、対照ラット (Zucker lean) と比べて有意に増加していた。(図 1)



(3) 筋管細胞株 (C2C12 細胞および L6 細胞) の分化過程における Filamin A/C の発現量は、分化後に増加していた。一方、脂肪細胞株 (3T3-L1 細胞) の分化過程における Filamin A/C の発現量は、分化後に減少していた。(図 2)



(4) 脂肪細胞株 (3T3-L1 adipocyte) にヒト Filamin A cDNA を一過的に過剰発現させ、インスリン応答性のグルコース取り込みに対する影響を検討したが、Filamin 遺伝子を導入された脂肪細胞のほとんどは死滅してしまった。

(5) 筋管細胞株 (C2C12 細胞および L6 細胞) にインスリンやグルコースの刺激投与をおこない、Filamin A/C の発現量に対する影響を検討したが、どちらの Filamin アイソフォームも発現量に変化がみられなかった。

(6) 野生型マウス (C57BL/6) に絶食処置・絶食後再摂食処置をおこない、赤筋(ヒラメ筋)における Filamin A/C の発現量に対する影響を検討したが、どちらの Filamin アイソフォームも発現量に変化がみられなかった。

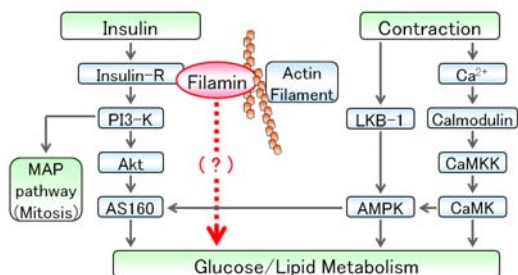
骨格筋における糖取込み機構は、インスリン依存性の PI3-K/Akt 経路の他に筋収縮依存性 (非インスリン依存性) の AMPK 経路や CaMKK 経路が報告されており、その複雑な作用メカニズムは生体の糖脂質代謝における骨格筋組織の重要性を示唆しているといえる。また、CaMKK 経路は、PI3-K/Akt 経路や AMPK 経路と独立した情報伝達経路であるという報告がある。しかし、骨格筋における糖取込みのメカニズムは未だ十分な解明に至っていない。Filamin はインスリン受容体に結合し、また、筋収縮によって Akt を介したリン酸化を受けるといふ既報は、骨格筋の糖取込みにおける複数の情報伝達経路が未だ明らかとなっていない相互作用をもっている可能性を示唆している。

さらに、骨格筋におけるインスリン作用を詳細に解明することは、2 型糖尿病の発症や進展を予防する新たな薬剤標的因子を同定できる可能性をもっている。

アクチンフィラメントに富む筋細胞において Filamin の発現量が高いことは推測可能な事実であるが、加えて、白筋(長指伸筋)に比べて糖脂質代謝に重要に関与する赤筋(ヒラメ筋)において Filamin の発現量が高いこと、糖尿病ラットの赤筋において Filamin の発現量が増加していることは、Filamin が赤筋特有な糖脂質代謝機能に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。また、細胞骨格であるアクチンフィラメントとインスリン作用との相互関係についての解析は、これまで知られていなかった新しい糖脂質代謝機構を発見できる可能性がある。(図 3)

ホームページ等

図3: 骨格筋のインスリン情報伝達機構(概略)



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0件)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勅使川原 匡 (TESHIGAWARA KIYOSHI)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・民族薬物研究センター・薬効解析部・研究員

研究者番号: 40403737

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: