

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06634

研究課題名(和文) 糖尿病を予防するキネシン分子モーターによる蛋白質品質管理の空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Mouse molecular genetics of kinesin molecular motor preventing diabetes

研究代表者

田中 庸介 (Tanaka, Yosuke)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：90302661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キネシン-1分子モーターの糖尿病における役割を探るため、KIF5B遺伝子をマウスの膵細胞にて特異的に欠損させた。すると膵島からのグルコース刺激性インスリン分泌が特に第二相で減弱し、耐糖能異常を生じた。膵細胞では、グルコース刺激性のCa<sup>2+</sup>トランジェントおよびアクチンリモデリングが低下した。その分子機序として、キネシン-1がERでのタンパク質折り畳みを制御するHsp70からHsp90へのシャペロン交換を担い、Ca<sub>v</sub>1.2の発現に必須であることを同定した。またこれに関連した細胞外小胞の分泌機構を発見した。以上のことから、糖尿病に抗するキネシン-1による新しいERの機能的制御機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キネシン-1はこれまで小胞体の形態を制御する分子モーターであると考えられてきたが、本研究ではこれに加え、熱ショックタンパク質の交換によるタンパク質折り畳み機構に大きな機能的意義を担っていることを発見し、小胞体の分子細胞生物学を大きく進展させた。さらにこの機構が膵細胞のインスリン分泌を司るCa<sub>v</sub>1.2タンパク質の発現や、細胞外小胞の分泌制御に必須であることを発見し、キネシン-1の新たな細胞生物学的役割を解明した。

これらの発見は学術の発展のみならず、キネシンのトランスレーショナルリサーチの重要な基盤として糖尿病や老化の新しい治療法開発への道を拓くものであり、人類の健康と福祉に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：We generated pancreatic beta-cell-specific conditional knockout (cKO) mice for the kinesin-1 molecular motor KIF5B. They were suffered from glucose intolerance mainly because of significant decrease in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), especially in its second phase. In cKO beta cells, glucose-stimulated calcium transients, actin remodeling, and full-fusion exocytosis of insulin granules were diminished. At the molecular level, we identified abnormalities in heat-shock-protein-induced quality control of protein folding in the ER, leading to significant decrease of the voltage-gated calcium channel, Ca<sub>v</sub>1.2. We also identified a new regulation mechanism of extracellular vesicle secretion through those processes. Accordingly, we show a novel kinesin-1-mediated anti-diabetic mechanism through the ER quality control of beta cells, which augments the stimulation-secretion coupling for GSIS. These results will greatly enhance the translational research of kinesins.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：糖尿病 キネシン ER 細胞内カルシウム カルシウムチャネル 熱ショックタンパク質 細胞外小胞  
インスリン分泌

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病は文明世界における生活習慣病の最たるものであり、肥満等による末梢のインスリン抵抗性を代償する膵β細胞からのインスリン分泌の破綻により発症に至る [Kasuga, J Clin Invest 2006]。この機序に関係する膵β細胞糖毒性の際、GSK3 経路の活性化が生じ [Sacco et al., Cell Metab 2019]、GSK3 によるキネシン-1 軽鎖のリン酸化はモーター活性を抑制する [Morfini et al., EMBO J 2002]。さらに、キネシン-1 の欠損により第二相インスリン分泌が著明に障害されるが [Cui et al., Diabetes 2011]、その分子機序となる膵β細胞の刺激分泌連関 (図1) におけるキネシン-1 の関与はこれまで不明であった。

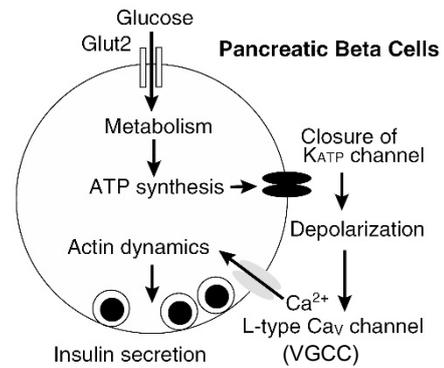


図1 膵β細胞の刺激分泌連関

(2) 小胞体 (ER) における蛋白質品質管理 [Ellgaard et al., Science 1999; 細川, 化学と生物, 2005] において、Hsp70-Hsp90 分子シャペロン間のクライアント蛋白質授受は重要な役割を担う [Luengo et al., Mol Cell 2018; Genest et al., JBC 2018]。このチェックポイント通過に失敗するとクライアント蛋白質は Hsp70 型のまま滞留し小胞体関連分解 (ERAD) へと向かう [Donnelly et al., JBC 2013]。この授受の場の細胞内局在はまだ明らかとなっておらず [Vembar et al., Nat Rev Mol Cell Bio 2008; Leitman et al., DNA Cell Biol 2013]、小胞体に局在するキネシン-1 の働きも不明であった [Gupta et al., Traffic 2008; Wozniak et al., JCS 2009]。

### 2. 研究の目的

ERAD/ERQC は主に生化学的観点から解析が進んでいたが、本研究では斬新な分子遺伝学モデルを用い、形態学的な観点から新知見を得ることを目的とした。申請者はキネシンによるシグナル伝達複合体の細胞内動態の可視化に成功しているが [Tanaka et al., Neuron 2016; Wang et al., Cell Rep 2018]、本研究はこの観点に基づき立案され、キネシン生物学の背景からこれまで困難であった ERAD/ERQC の空間的制御の解明を図った。

### 3. 研究の方法

本研究では「膵β細胞小胞体におけるキネシン-1の機能は何か、小胞体制御因子群の細胞周縁部への移動は何をもたらすか」を研究課題の核心をなす学術的な「問い」として設定し、具体的には以下の3点について検討した。

1. 膵β細胞特異的なキネシン-1ノックアウトマウスを用いて、グルコース負荷時の血糖変動・膵島における刺激分泌連関の各ステップの表現型を時間軸に沿って検索した。
2. キネシン-1ノックダウンMIN6細胞を用いて、VGCC蛋白質のERADにおけるキネシン-1の役割をシャペロン群との結合変化を焦点として生化学的に解析した。
3. キネシン-1欠損マウス膵β細胞の初代培養系を用いて小胞体シャペロン群の動態をイメージングし、ERADにおけるキネシン-1の作用点を解明した。

### 4. 研究成果

(1) 膵β細胞特異的なキネシン-1欠損マウスのインスリン刺激分泌連関の解析

膵β細胞特異的キネシン-1 欠損マウスと対照群マウスを用い、膵β細胞におけるインスリン刺激分泌連関を解析した。グルコース腹腔内注射による耐糖能試験(IPGTT)を行うと、**図2**のように顕著な耐糖能異常が示された。次に、単離膵島をグルコース刺激し ATP/ADP 比・インスリン分泌量を経時的に測定した。前者には有意な差は認められなかったが、後者のインスリン分泌量は**図3**のように ①基底分泌量の顕著な増加 ②グルコース刺激第一相の顕著な減少 ③グルコース刺激第二相の廃絶 の表現型を示した。

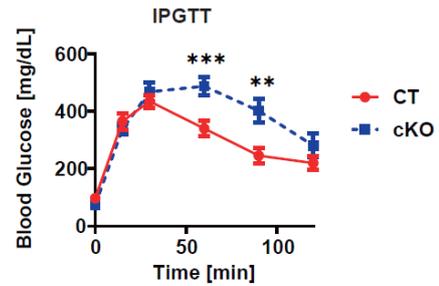


図2 キネシン-1膵β細胞特異的欠損(cKO)マウスと対照群マウス(CT)における耐糖能試験。cKOマウスは有意な耐糖能低下を示している。

そこで膵β細胞をグルコース刺激し、インスリン顆粒のダイナミクスを TIRF 顕微鏡や高速コンフォーカル顕微鏡を用いてライブイメージングした。その結果、キネシンが欠損すると**図4**のようにインスリン顆粒の細胞表層におけるスタビリティが減少することがわかった。この表現型は、アクチン脱重合剤によってレスキューされたため、グルコース依存性のアクチンダイナミクス変化の障害が関与していることが示唆された。実際、グルコース刺激による表層のアクチンリモデリングは、キネシン欠損により顕著に障害されていた。

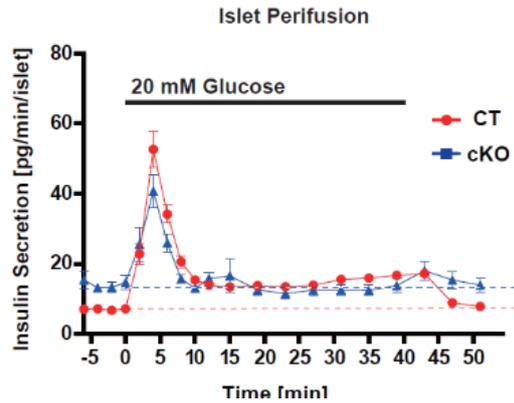


図3 膵島還流試験におけるグルコース刺激性インスリン分泌の比較。

このグルコース刺激性の膵β細胞のアクチンリモデリングは、pSFK/Rho family GTPase 経路ならびに  $K_{ATP}$ /脱分極/VGCC/ $Ca^{2+}$ 上昇経路のシナジーによってもたらされる。そこで両者をイメージングによって定量すると、**図5**のようにいずれの経路も廃絶していることがわかった。ただし  $Ca^{2+}$ イオノフォアによってアクチンリモデリング

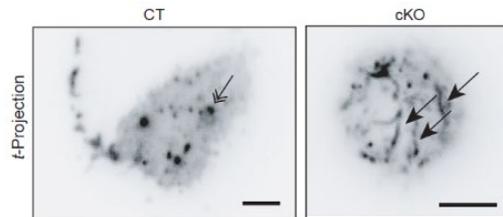


図4 初代培養膵β細胞におけるインスリン顆粒の時間プロジェクション。キネシン-1欠損細胞(cKO)ではインスリン顆粒の細胞膜への full fusion exocytosis が減少し、表面直下の long-range transport が増加する。

が回復できたため、キネシン-1欠損膵β細胞を電気生理学的に評価したところ、顕著な  $Ca^{2+}$ 内向き電流密度の減少ならびに基底状態での脱分極傾向が認められた。

## (2) キネシン-1による膵β細胞の小胞体関連分解抑制機構の生化学的解析

そこでMIN6細胞においてキネシン-1をノックダウンし、VGCC ( $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v2.3$ ),  $K_{ATP}$  サブユニット (Kir6.2, SUR1)、その制御因子である PIPK5αタンパクや PIP<sub>2</sub>の発現量を蛍光抗体法・イムノブロットにより比較したところ、

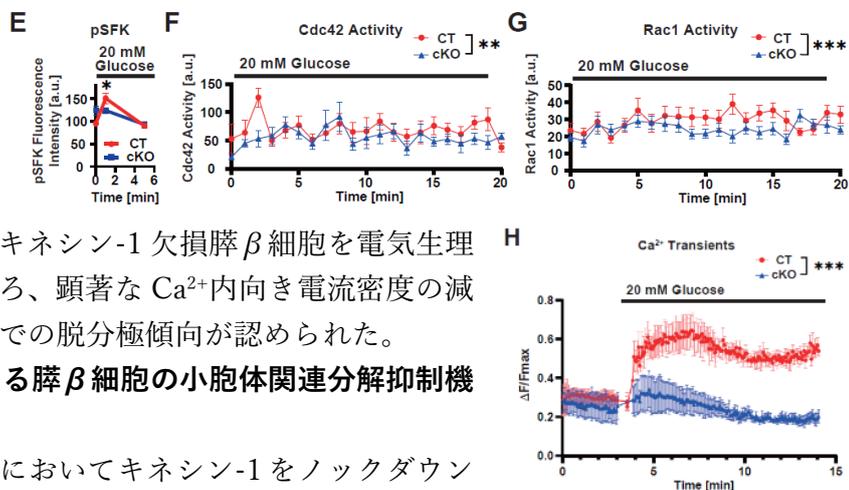


図5 キネシン-1欠損膵β細胞における pSFK/Rho family GTPase 経路(E-G)と  $Ca^{2+}$ トランジェント(H)の廃絶。

図 6,7 のように  $K_{ATP}$  は著変が認めなかったが VGCC, PIPK5 $\alpha$ , PIP<sub>2</sub> は顕著に発現が低下していた。L-type VGCC である Cav1.2 のアゴニスト Bay-K 8644 によりグルコース刺激性インスリン分泌が回復したため、Cav1.2 に焦点を絞り研究をつづけた。

タンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミド(CHX)処理により Cav1.2 タンパク質のターンオーバーを定量的に解析した。するとキネシン-1 欠失細胞において Cav1.2 のターンオーバー速度が亢進し、これは図 8 のようにプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制された。

さらにキネシン-1 と VGCC を膵  $\beta$  細胞で共染色し TIRF-STORM 顕微鏡で観察した。図 9 のように ER における共局在が認められたため、ER におけるタンパク品質管理(ERQC)との関連を追究した。これまでの成果から、キネシン-1 は Hsc70 熱ショックタンパク質との直接結合が示唆されていたため [Terada et al., EMBO J 2010]、ERQC における STIP1 依存性の Hsp70 から Hsp90 へのシャペロン交換 [Genest et al., JBC 2019, 図 10H] に焦点をあて解析した。

キネシン-1 欠失群及び対照群細胞をプロテアソーム阻害

剤で前処理し、ベジクル免疫沈降法ならびに近接ライゲーションアッセイにより、シャペロン群と VGCC、 $K_{ATP}$  等のイオンチャネル間の結合を定量的に解析した。VGCC は

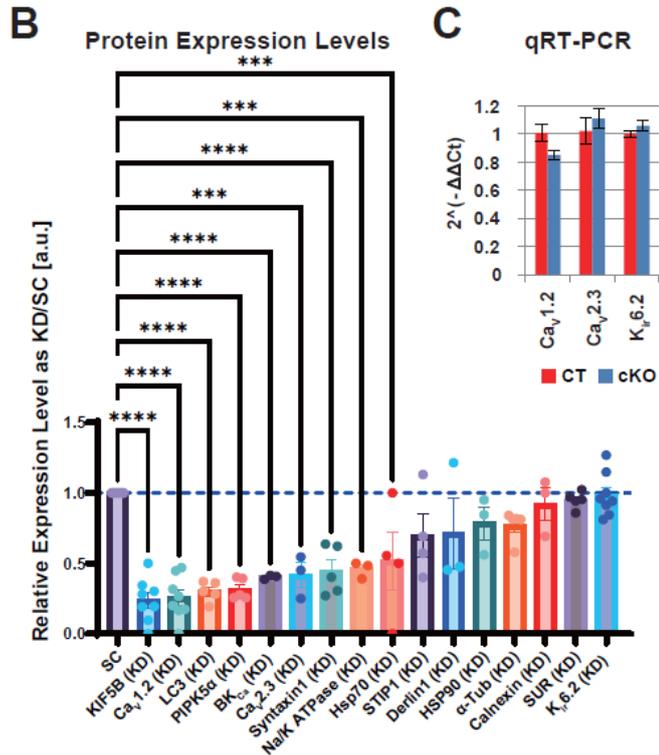


図 6 キネシン-1 欠失細胞のイムノブロットにおける VGCC, PIPK5 $\alpha$  タンパク質の発現低下(B)。mRNA には著変を認めなかった(C)。

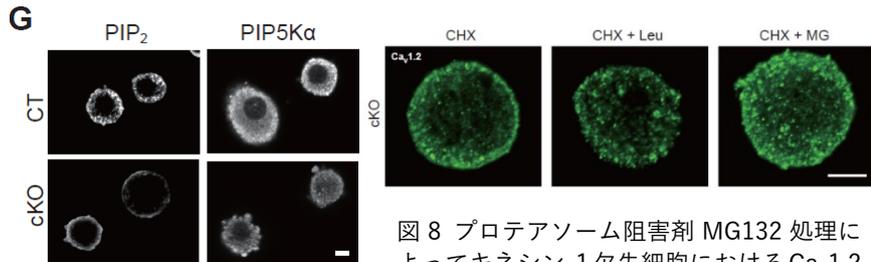


図 7 キネシン-1 欠失細胞の免疫染色における PIP<sub>2</sub> ならびに PIPK5 $\alpha$  の発現低下。

図 8 プロテアソーム阻害剤 MG132 処理によってキネシン-1 欠失細胞における Cav1.2 のターンオーバーが抑制されることを示した免疫染色の結果。

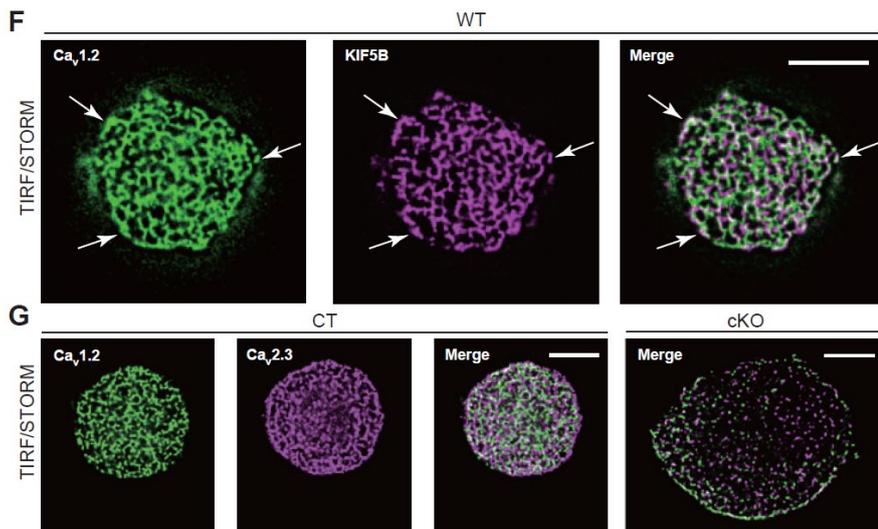


図 9 膵  $\beta$  細胞の表層 ER ネットワーク上における VGCC とキネシン-1 の共局在。TIRF-STORM 顕微鏡により観察した。

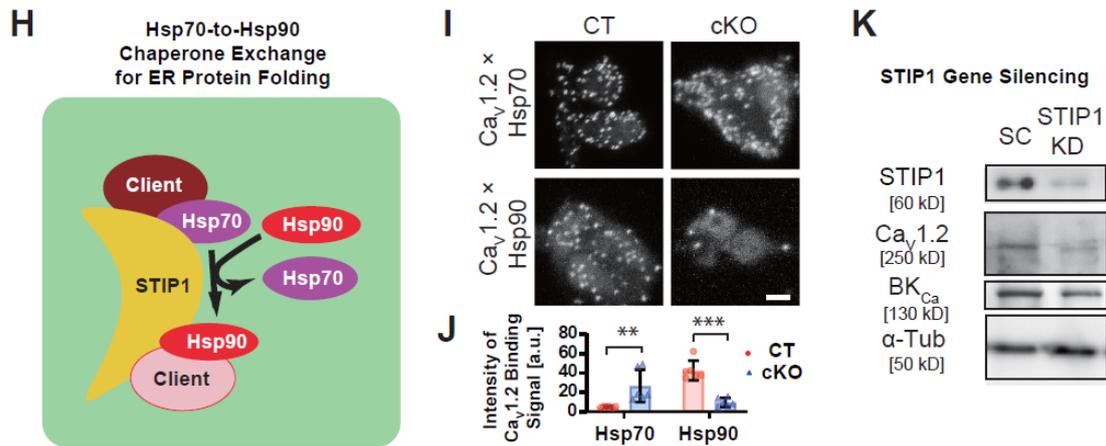


図 10 STIP1 に依拠する ER における Hsp70-Hsp90 シャペロン交換システムのキネシン-1 への依存性。(H) 模式図 (I,J) 近接ライゲーションアッセイ。キネシン-1 欠損細胞では  $Ca_v1.2$  は Hsp90 へと移行せず Hsp70 と結合したままである。(K)  $Ca_v1.2$  発現の STIP1 依存性をみたイムノブロットング。

$K_{ATP}$  とは共沈せず、Hsc70, Hsp90 の両方と共沈したため、 $Ca_v1.2$  のみがシャペロン交換システムのクライアントであり、キネシン-1 により発現量が維持されていると推測された(図 11)。さらにキネシン-1 を欠損すると VGCC の Hsp90 との結合が著減した (図 10I,J)。また STIP1 をノックダウンすると  $Ca_v1.2$  の発現は低下した(図 10K)。すなわち、キネシン-1 が欠損すると VGCC は Hsp70 から Hsp90 への授受における品質管理機構から排除され、ERAD 経路へとソーティングされ分解が促進されるものと推測された。



図 11  $Ca_v1.2$  は ER においてキネシン-1 依存性のシャペロン交換システムのクライアントであるが、 $K_{ATP}$  サブユニット  $K_{ir6.2}$  は異なる。

### (3) 膵β細胞小胞体のシャペロン交換におけるキネシン-1 の役割の可視化

膵β細胞の初代培養系において、Hsp90 と KIF5B を共発現して可視化したところ、図 12 に示すように ER シートに近接した微小液滴様構造を形成しダイナミックに内容を交換している像が得られ、一部に液-液相平衡の関与が示唆された。またこれに関連して Hsp90/KIF5B 依存的な細胞外小胞の放出制御機構を同定した。

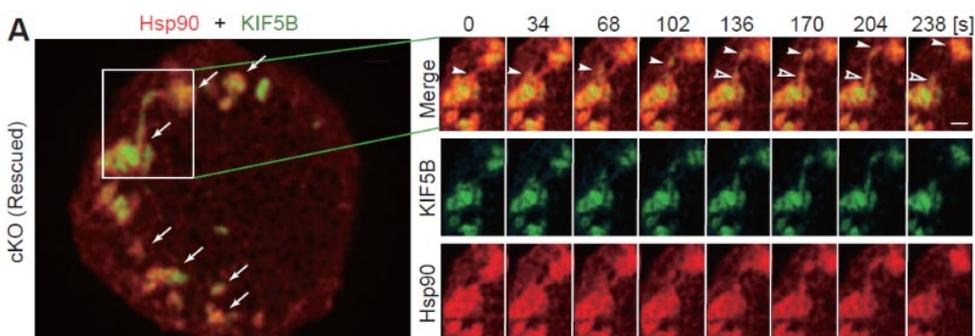


図 12 膵β細胞 ER シート上におけるキネシン-1 と Hsp90 の複合体のダイナミクス。

以上のように、キネシン-1 が ER シートにおける熱ショックタンパク質のシャペロン交換システムを担い、これに依拠する電位依存性カルシウムチャネルの発現を促進して抗糖尿病作用を示すことを解明した。これについて論文投稿し、現在すべての修正意見をクリアし審査中である。また、知財化ならびに 3 件の学会発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yosuke Tanaka
2. 発表標題 PI3K/Rab signaling regionally and conditionally regulates Shh-EV biogenesis for patterning digits
3. 学会等名 ISEV Workshop: Large Extracellular vesicles (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Wang Shuo*, Yosuke Tanaka*, Ying Xu, Sen Takeda, Nobutaka Hirokawa (*Equal contribution)
2. 発表標題 Regionally regulated secretion of sonic-hedgehog-containing extracellular vesicles creates a concentration gradient in developing limb buds
3. 学会等名 ISEV 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yosuke Tanaka*, Ai Morozumi*, Nobutaka Hirokawa (*Equal contribution)
2. 発表標題 Nodal flow transfers polycystin to determine mouse left-right asymmetry
3. 学会等名 ISEV 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 生理活性物質を含有する細胞外小胞を生産する方法	発明者 田中庸介、王碩	権利者 国立大学法人 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-167506	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 生理活性物質を含有する細胞外小胞を生産する方法	発明者 田中庸介、王碩	権利者 国立大学法人 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/017656	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

以下の糖尿病関連の論文は、査読意見を全て満たした改訂版を4/18付で投稿済みであり、近日中にアクセプト見込みである。  
Tanaka Y. et al. Kinesin-1 mediates proper ER folding of the CaV1.2 channel and maintains mouse glucose homeostasis, EMBO Reports, under review

その他、関連して以下の原著論文6報ならびに総説3報を刊行した。

原著

1: Tanaka Y, et al. Dev Cell. 2023 Aug 21;58(16):1447-1461.e6.

2: Wan Y, ... Tanaka Y, Hirokawa N. J Cell Biol. 2023

3: Wang S, Tanaka Y, et al. Dev Cell. 2022 Oct 10;57(19):2273-2289.e11.

4: Morikawa M, Jerath NU, Ogawa T, Morikawa M, Tanaka Y, Shy ME, Zuchner S, Hirokawa N. EMBO J. 2022 Mar 1;41(5):e108899.

5: Yoshihara S, ... Tanaka Y, Hirokawa N. Cell Rep. 2021 Apr 13;35(2):108971.

6: Alsabban AH, Morikawa M, Tanaka Y, et al. EMBO J. 2020 Jan 2;39(1):e101090.

総説

7: 田中 庸介, 生物物理 63(5) 266-269 2023年9月

8: 田中 庸介, 生体の科学 74(4) 376-381 2023年8月

9: Tanaka Y, The expanding universe of kinesin superfamily molecular motors (KIFs) - The postmen who govern the country. In Encyclopedia of Cell biology (Second Edition) pp. 101-109, Academic Press, 2023.

## 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
研究協力者	王 碩  (Wang Shuo)	東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員  (12601)	
研究協力者	野田 光彦  (Noda Mitsuhiko)	国際医療福祉大学・市川病院・病院教授  (32206)	
研究協力者	廣川 信隆  (Hirokawa Nobutaka)	順天堂大学・医学部・特任教授  (32620)	東京大学大学院医学系研究科(当時)
研究協力者	上野 仁之  (Ueno Hitoshi)	杏林大学・医学部・講師  (32610)	東京大学大学院医学系研究科(当時)
研究協力者	楊 文星  (Yang Wenxing)	中国 四川大学	東京大学大学院医学系研究科(当時)

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ファルコンデ アテナ  (Farkhondeh Atena)	米国 国立公衆衛生研究所	東京大学大学院医学系研究科(当時)
研究協力者	両角 愛  (Morozumi Ai)	東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員  (12601)	
研究協力者	丁 偉健  (Ding Weijian)	東京大学・大学院医学系研究科・学術支援職員  (12601)	
研究協力者	長谷川 修造  (Hasegawa Shuzo)	東京大学・医学部・学生  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関