

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06773

研究課題名(和文) インスリン分泌顆粒の動員過程を制御するしくみの定量理解

研究課題名(英文) Development of novel approach for evaluating intracellular insulin granule behavior

研究代表者

畠山 裕康 (Hatakeyama, Hiroyasu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：00619067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン分泌を調節する主要な過程のひとつに、細胞内部に存在するインスリン分泌顆粒が細胞膜近傍まで輸送される過程があるが、その制御様式については、従来の計測手法の技術的制約から定量的な知見に乏しかった。本研究では、インスリン分泌顆粒の輸送過程のしくみを理解することを目的として、細胞内部のインスリン分泌顆粒を、きわめて安定で明るい蛍光ナノ粒子である量子ドットで標識して一分子イメージングすることによってインスリン分泌顆粒の動態を定量計測できる手法を開拓し、細胞骨格系による調節について解析した。そして、微小管やアクチンによる輸送制御様式と病態との関連について知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン分泌は生体における血糖制御の中核を担う重要な細胞機能であり、その機能の障害は糖尿病の発症に至る。日本人の糖尿病ではインスリン抵抗性の増悪に比べてインスリン分泌が極端に定値となることが知られており、インスリン分泌機構の全貌理解は社会的急務である。本研究は、インスリン分泌を調節する過程の主要な過程のうち、技術的制約から最も理解に乏しかったインスリン分泌顆粒の輸送について、定量的な知見を得るための新たな手法を開拓し、その制御様式や病態との関連について知見を得たものである。今後のさらなる計測により、インスリン分泌調節とその破綻に関する統合的理解と糖尿病の新規治療戦略の開拓が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mobilization of intracellular insulin granules to the plasma membrane plays a crucial role in regulating insulin secretion. However, the regulatory mechanisms of this mobilization process have been poorly understood due to technical limitations. In this study, an approach for assessing insulin granule behavior based on single-molecule analysis of insulin granule membrane proteins labeled with Quantum dot fluorescent nanocrystals has been developed. This approach allows us to perform high precision analysis of insulin granule behavior. Pharmacological perturbations of cytoskeletal elements revealed that microtubule dynamics and F-actin positively and negatively regulate insulin granule behavior, respectively. Furthermore, chronic treatment with high concentrations of glucose and palmitate resulted in impaired insulin granule behavior and cytoskeletal architecture. Our approach thus provided detailed information regarding insulin granule behavior and its pathophysiological implications.

研究分野：細胞生理学

キーワード：インスリン イメージング 細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

インスリン分泌は生体における血糖制御の中核を担う重要な細胞機能であり、この機能の障害は糖尿病の発症と直結する。特に日本人は、正常耐糖能から糖尿病となるにしたいがい、インスリン抵抗性の増悪と比べてインスリン分泌が極端に低値となることが知られている。したがって、インスリン分泌機構の全貌を理解することは、血糖制御とその破綻による糖尿病発症過程を理解するためにきわめて重要である。

血糖上昇により誘導されるインスリン分泌は、主に  
過程 グルコースが代謝されて細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に至る過程  
過程 インスリン分泌顆粒が細胞膜近傍へと輸送される過程  
過程 インスリン分泌顆粒膜が細胞膜と融合して開口放出される過程  
の3つにより調節される。このうち過程 は古くより知見が豊富に蓄積されており、また、過程 もさまざまな蛍光イメージング技術を用いた計測により急速に理解が進んできた。しかし、過程 は、インスリン分泌を調節する重要な過程である一方で、その制御様式に関する定量的知見が乏しく、学術的問いとして存在している。この理由のひとつとして、従来行われてきた解析手法の技術的限界がある。つまり、この過程を正確に定量理解するためには、細胞内部で起こるインスリン分泌顆粒の動態を数ナノメートルの位置精度かつ数十ミリ秒の時間解像で追跡することが要求されるが、従来の解析では1桁以上低い精度での計測に留まっていた。

研究代表者は研究開始までに、複数のイメージング技術を用いて、インスリン分泌顆粒の開口放出過程やインスリン依存性糖輸送担体 GLUT4 の細胞内輸送制御様式の理解を目指す研究を進めていた(1-5)。後者では、生きた細胞の内部に存在する GLUT4 分子を、一般的な蛍光分子と比べて安定で明るい蛍光ナノ粒子である量子ドットで標識し、位置精度 6 ナノメートルかつ時間解像 33 ミリ秒で動きを抽出することによって、GLUT4 に特徴的な細胞内動態とその分子基盤、およびインスリン抵抗性との関連について知見を得ていた(3-5)。また、この手法を応用して、細胞内部のミオシン分子の動態計測手法も開拓していた(6, 7)。そこで研究代表者は、これらの手法をインスリン分泌顆粒に適用することによって、未だ理解に乏しいインスリン分泌顆粒の輸送過程に定量的な知見を提供し、上述の学術的問いへの回答を提示できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

上述の「研究開始当初の背景」をふまえ、本研究では、インスリン分泌顆粒の輸送過程のしくみの定量理解を目的として、インスリン分泌顆粒の細胞内における動態を高い精度で計測できる独自の手法を開拓することによってアプローチを試みた。

## 3. 研究の方法

本研究では、上記目的の達成を目指し、ラット膵β細胞由来 INS-1 細胞を用いて、はじめに細胞内部に存在するインスリン分泌顆粒を量子ドットで標識し、その動態を評価する方法の確立を目指した。その上で、インスリン分泌顆粒の動きに影響を与えることが予想された細胞骨格系(アクチン線維や微小管)の関与について、および INS-1 細胞に誘導した病態(高血糖高脂血症)モデル下におけるインスリン分泌顆粒動態の計測を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 量子ドットを用いたインスリン分泌顆粒の細胞内動態計測手法の確立

無機化合物である量子ドットは、遺伝子発現できず、また、細胞膜透過性や特定の分子への特異的結合能をもたないため、細胞内の分子を量子ドットで標識するためには工夫が必要である。研究代表者は以前、HaloTag とエレクトロポレーションを用いて量子ドットを効率的に細胞内へと導入し特定の分子と結合させる比較的容易な手法を開拓しており(6)、この手法のインスリン分泌顆粒への応用を試みた。インスリン分泌顆粒の動態を評価するためには、顆粒内容物であるインスリンを標識することが望ましいが、この場合には細胞膜とインスリン分泌顆粒膜の両方を透過させて量子ドットを導入することが必要となり、標識効率の低下が懸念される。そこで本研究では、計測対象分子としてインスリン分泌顆粒膜タンパク質として広く知られる phogrin や亜鉛輸送体 ZnT8 を選択し、その細胞質領域に HaloTag を融合させたタンパク質(以下、HaloTag 融合インスリン分泌顆粒膜タンパク質とする)を INS-1 細胞に発現させ、この細胞に量子ドットを結合させた HaloTag リガンド(HaloTag タンパク質に特異的に 1:1 で結合する低分子化合物)をエレクトロポレーションすることでインスリン分泌顆粒を量子ドット標識することを試みることにした(図1)。まず、HaloTag 融合インスリン分泌顆粒膜タンパク質および別途準備した

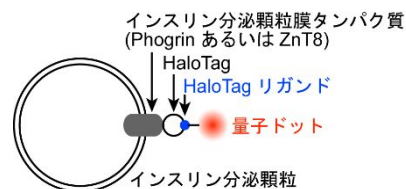


図1 インスリン分泌顆粒の量子ドット標識手法

HaloTag 融合インスリンを一般的な蛍光分子である TMR を結合させた HaloTag リガンドで標識したところ、いずれも細胞内に多数の顆粒状構造を認めた (図 2A)。この顆粒状構造の直径には発現させたタンパク質間で有意な差を認めなかった (図 2B)。また、HaloTag 融合インスリン分泌顆粒膜タンパク質の多くはインスリンと共局在した。したがって、発現させた HaloTag 融合インスリン分泌顆粒膜タンパク質はインスリン分泌顆粒を反映するものと考えた。そこで、HaloTag 融合インスリン分泌顆粒膜タンパク質を発現させた INS-1 細胞に、量子ドットを結合させた HaloTag リガンドをエレクトロポレーションした。この細胞をスピニングディスク共焦点顕微鏡により観察したところ、細胞内部に複数の量子ドット蛍光が検出された (図 3A)。これらの蛍光の多くは 1 ステップの明滅状態をランダムに示したため (図 3B)、1 個の量子ドット蛍光を観察しているものと考えられた。そこで、量子ドット蛍光を 1 秒間に 33 枚の速度で 30 秒間取得し、その動きを平均二乗変位で評価した (図 3C および 3D)。この手法によって評価した HaloTag 融合 phogrin および ZnT8 の動態には有意な差は見出されなかった (図 3E)。なお、HaloTag 融合インスリン、phogrin および ZnT8 を発現させた細胞を、TMR を結合させた HaloTag リガンドで標識してその動態を評価した場合にも、3 者間には有意な差は見出されなかった (図 3F)。これらより、量子ドットを用いてインスリン分泌顆粒の細胞内動態を高い精度で計測できる手法を確立した。

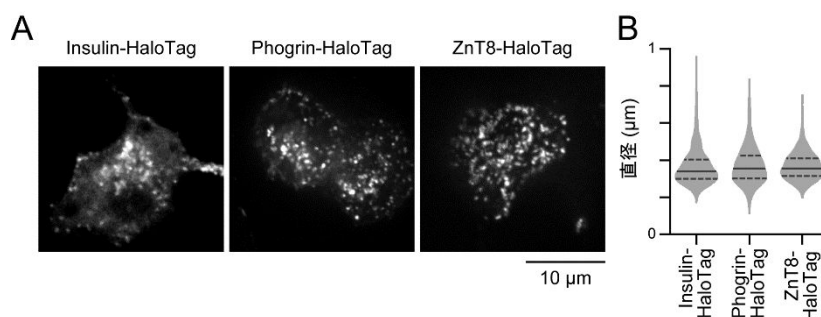


図 2 HaloTag 融合インスリン分泌顆粒膜タンパク質の発現：  
(A) HaloTag 融合インスリン、phogrin、ZnT8 を、蛍光分子 TMR を結合した HaloTag リガンドで標識した場合の蛍光画像。(B) (A)で観察された顆粒状構造の直径。

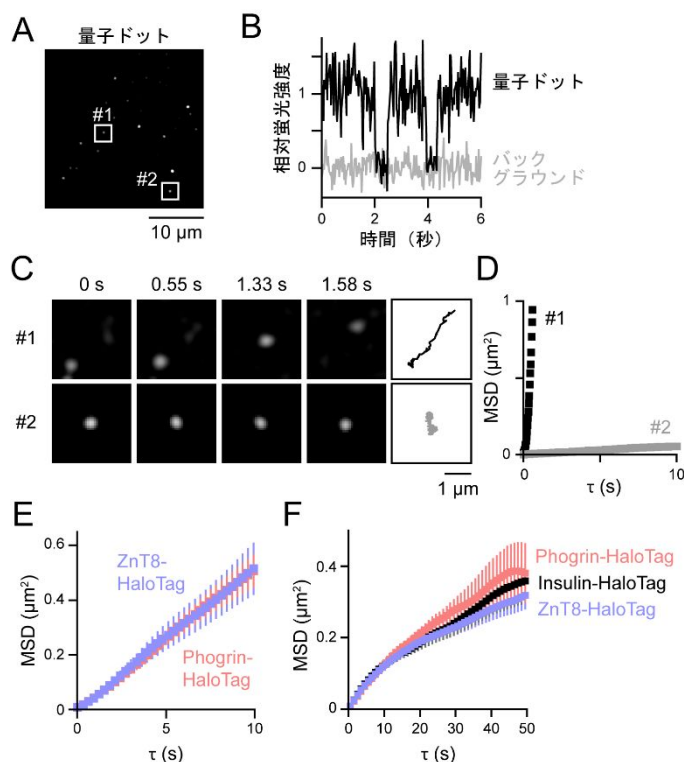


図 3 インスリン分泌顆粒動態の評価：  
(A) ZnT8-HaloTag を発現させた細胞における量子ドット蛍光。(B) 1 個の量子ドット蛍光の輝度の時間変化。(C) (A)に#1、#2 として示す量子ドット蛍光の時間変化と軌跡。(D) (C)の蛍光画像から得た平均二乗変位(MSD)。(E) 量子ドット結合型 HaloTag リガンドを用いた場合の平均二乗変位(MSD)。(F) TMR 結合型 HaloTag リガンドを用いた場合の平均二乗変位(MSD)。



(2) インスリン分泌顆粒の動態に対する細胞骨格系の関与

微小管やアクチン線維のような細胞骨格系は、インスリン分泌顆粒を含むさまざまな細胞内構造体の輸送に重要な役割を担うものと考えられる。ここでは、(1)で確立した手法を用いて、薬理的に微小管やアクチン線維を変化させたときのインスリン分泌顆粒の動態を評価した。まず、微小管不安定化薬である nocodazole と微小管安定化薬である paclitaxel はいずれもインスリン分泌顆粒の動態に対して抑制作用を示した(図4)。このことから、微小管は、その構造自身だけでなくダイナミクスもインスリン分泌顆粒の動態に重要であることを示唆した。一方、アクチン線維については、アクチン不安定化薬である latrunculin B はインスリン分泌顆粒の動態を促進した一方、安定化薬である jasplakinolide はインスリン分泌顆粒の動態を抑制した(図5)。したがって、アクチン線維はインスリン分泌顆粒の動態に対して抑制的に作用するものと示唆される。

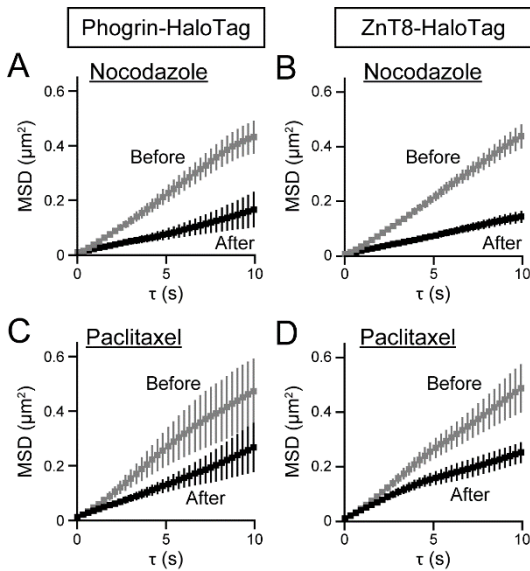


図4 インスリン分泌顆粒動態に対する微小管阻害薬の作用：微小管不安定化薬 Nocodazole (A, B)および安定化薬 Paclitaxel (C, D)の作用。

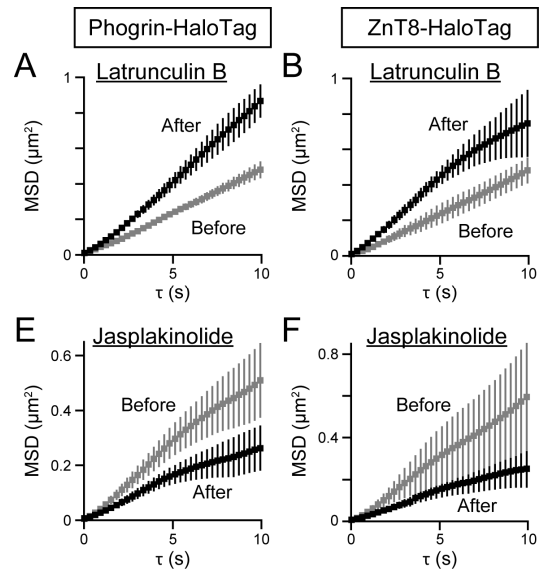


図5 インスリン分泌顆粒動態に対するアクチン阻害薬の作用：アクチン不安定化薬 Latrunculin B (A, B)および安定化薬 Jasplakinolide (C, D)の作用。

(3) 病態モデル下におけるインスリン分泌顆粒の動態

INS-1 細胞を高濃度のグルコースおよびパルミチン酸存在下で培養すると、糖脂肪毒性によるインスリン分泌低下を来することが知られている。そこで、この条件下におけるインスリン分泌顆粒動態を計測したところ、有意な抑制を認めた(図6A)。同条件下ではアクチン線維の増大を認め(図6B) インスリン分泌顆粒動態の抑制に關与する可能性が示唆された。

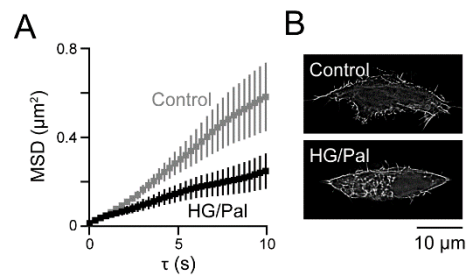


図6 病態モデル下におけるインスリン分泌顆粒の動態：INS-1 細胞を高濃度のグルコースおよびパルミチン酸存在下で培養後のインスリン分泌顆粒動態(A)およびアクチン線維(B)

< 参考文献 >

1. Hatakeyama H, Kishimoto T, Nemoto T, Kasai H, Takahashi N. J Physiol. 570(Pt 2):271–82. 2006
2. Hatakeyama H, Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kasai H. J Physiol. 582(Pt 3):1087–98. 2007
3. Hatakeyama H, Kanzaki M. Traffic. 12(12):1805–20. 2011
4. Hatakeyama H, Kanzaki M. Mol Biol Cell. 24(6):809–17. 2013
5. Hatakeyama H, Kanzaki M. J Physiol. 595(16):5603–21. 2017
6. Hatakeyama H, Nakahata Y, Yarimizu H, Kanzaki M. Mol Biol Cell. 28(1):173–81. 2017
7. Gardini L, Calamai M, Hatakeyama H, Kanzaki M, Capitanio M, Pavone FS. Methods Mol Biol. 1814:425–48. 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hatakeyama Hiroyasu, Oshima Tomomi, Ono Shinichiro, Morimoto Yuichi, Takahashi Noriko	4. 巻 14
2. 論文標題 Single-molecule analysis of intracellular insulin granule behavior and its application to analyzing cytoskeletal dependence and pathophysiological implications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1287275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2023.1287275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野 新一郎、畠山 裕康、大嶋 友美、福田 英一、高橋 倫子
2. 発表標題 アクチン細胞骨格系によるインスリン分泌顆粒の細胞内挙動調節
3. 学会等名 第252回生理学東京談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山 裕康、小野 新一郎、大嶋 友美、高橋 倫子
2. 発表標題 Roles of F-actin in intracellular insulin granule behavior analyzed by single-particle tracking
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 新一郎、畠山 裕康、大嶋 友美、高橋 倫子
2. 発表標題 Live-imaging analysis of F-actin actions on intracellular insulin granule behavior
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山 裕康、大嶋 友美、高橋 倫子
2. 発表標題 Imaging analysis of granule dynamics within insulin-secreting cells
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山 裕康、大嶋 友美、高橋 倫子
2. 発表標題 インスリン分泌顆粒の細胞内挙動の可視化計測
3. 学会等名 第251回生理学東京談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山 裕康
2. 発表標題 細胞内一分子計測に基づく生理機能の理解を目指して
3. 学会等名 次世代研究者シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山 裕康、大嶋 友美、小野 新一郎、高橋 倫子
2. 発表標題 Single-molecule analysis for cytoskeletal dependence of intracellular insulin granule behavior
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山 裕康、小野 新一郎、大嶋 友美、高橋 倫子
2. 発表標題 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
3. 学会等名 インスリン分泌顆粒の細胞内動態の定量評価に基づくアクチン作用の解析
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畠山 裕康、小野 新一郎、大嶋 友美、高橋 倫子
2. 発表標題 第36回北里大学バイオサイエンスフォーラム
3. 学会等名 一分子計測系に基づき解析したインスリン分泌顆粒の細胞内動態とアクチンの役割
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大嶋 友美、畠山 裕康、高橋 倫子
2. 発表標題 第101回日本生理学会
3. 学会等名 Facilitative action of glucose on insulin granule behavior in mouse pancreatic islet cells
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------