

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350880

研究課題名(和文) 骨格筋における新規糖代謝シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) The novel signaling pathway of glucose metabolism in skeletal muscle

## 研究代表者

齋藤 従道 (SAITO, Tsugumichi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80572619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は adaptor protein, phosphotyrosine interaction, pleckstrin homology domain, and leucine zipper containing 1 (APPL1) が培養骨格筋細胞において伸展刺激による促進的に作用することを見出した。そして、そのシグナル伝達は PKC 依存性の経路を介し、リン酸化 PKC はこれまで機能が不明であった non-muscle Myosin II A (NMIIA) に結合することが明らかとなった。本研究から糖取り込みに新たなシグナル伝達機構 (PKC -NMIIA 依存性) が存在することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Expression of adaptor protein, phosphotyrosine interaction, pleckstrin homology domain, and leucine zipper containing 1 (APPL1) promoted glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose uptake in muscle tissues in response to stimulation with insulin, adiponectin, or exercise. We found APPL1 promotes glucose uptake in response to mechanical stretch. APPL1-induced increased glucose uptake was mediated by protein kinase C (PKC). Stretch-induced phosphorylated PKC co-immunoprecipitated with non-muscle myosin IIa (NMIIA). Blebbistatin, an inhibitor of myosin II ATPase activity, suppressed APPL1-mediated stretch-induced glucose uptake and PKC translocation. Taken together these data demonstrate that in response to mechanical stretch, APPL1 enhances glucose uptake by modulating the activation and localization of PKC, as well as its functional interaction with NMIIA.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は糖全体の70%を消費する最大の臓器である。糖の取り込みを制御しているホルモンは唯一インスリンのみであるが、骨格筋においては運動・収縮刺激も糖代謝を制御し、そのメカニズムは不明であるがインスリンシグナルと独立している (Coderre L et al. J Biol Chem 1995)。高齢者、肥満者、糖尿病患者はインスリン作用が減弱しているため、骨格筋での糖代謝機構の解明は新たな糖尿病、肥満などの生活習慣病の予防・治療法に繋がる可能性がある。

### 2. 研究の目的

申請者はこれまで糖代謝研究を行ってきた中でAkt に結合するAPPL1(Adaptor protein containing PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif 1)を同定し、インスリン刺激による糖代謝に関与することを報告した(Saito et al. J Biol Chem 2007)。APPL1 は特に骨格筋で高発現しており、骨格筋での重要な糖代謝制御因子である可能性がある。申請者はAPPL1 を過剰発現させた培養骨格筋細胞に伸展刺激を加えたところ、糖取り込みが増加する事を発見した。そのため、本研究では新規糖尿病/肥満予防・治療法の開発を目的としたAPPL1 依存性シグナル伝達を介した糖代謝メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) APPL1 の機能解析として

免疫染色を用いて細胞内局在の観察

APPL1 を発現阻害、もしくはAPPL1 を過剰発現後に伸展刺激を加え、糖取り込み、そのシグナル伝達機構をタンパクレベルで解析する。

#### (2) 質量分析装置、マイクロアレイを用いてAPPL1 依存性シグナル伝達分子の同定。

(3) 同定された分子の機能解析を生化学的手法にて行い、抗糖尿病創薬のターゲットを見いだす。

### 4. 研究成果

(1) 図1に示すとおり、APPL1 (緑) は基底状態 (Basal) おいて細胞核周辺に局在しており、伸展刺激 (Stretch) によって一部が細胞膜近傍にトランスロケートし、細胞内局在が変化することが明らかとなった。つまり、伸展刺激は APPL1 の何らかの機能を制御している可能性が判明した。

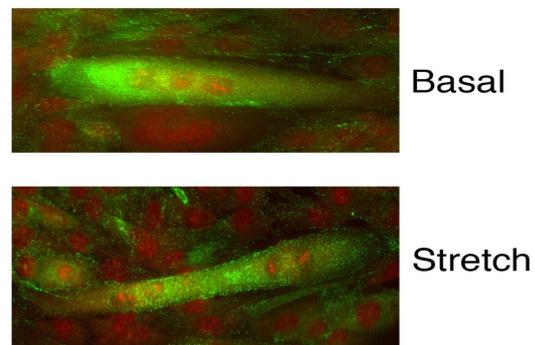


図 1

(2) shRNAにてAPPL1をノックダウンさせたC2C12 myotubesを用いて、伸展刺激による糖取り込みを観察した。図1に示すとおり、APPL1の発現を抑制すると伸展刺激による糖取り込みが有意に抑制されることが分かった。さらに発現ベクターを用いてAPPL1を過剰発現させると図2に示すとおり、基底状態と伸展刺激の両条件において糖取り込みが有意に増加していた。以上からAPPL1は伸展刺激による糖取り込みに促進的に作用することが明らかとなった。

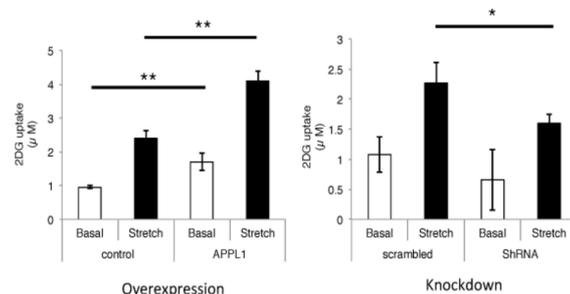


図 2

(3) APPL1による糖取り込み促進作用を認めたため、細胞内シグナル伝達をウェスタンブロットにて検討した。検討の結果、従来からインスリンや運動、筋収縮による糖取り込み、GLUT4トランスロケーションに関与することが報告されているAkt、AMPK、CaMKKといった分子のリン酸化に変化は認めなかったが、PKC $\zeta$ のみ有意にリン酸化(pPKC $\zeta$ )が増強されていた。そこでPKC $\zeta$ に特異的な阻害剤を用いたところ伸展刺激による糖取り込みが有意に抑制されることが確認出来た(図3B)。同時に運動、筋収縮による糖取り込みに重要なAMPKの阻害剤(compound C)を用いた実験においては、伸展刺激による糖取り込みに変化はもたらさなかった(図3A)。つまり、APPL1による伸展刺激による糖取り込み促進作用はAMPK非依存性、PKC $\zeta$ 依存性のシグナル伝達を使用していることが明らかとなった。

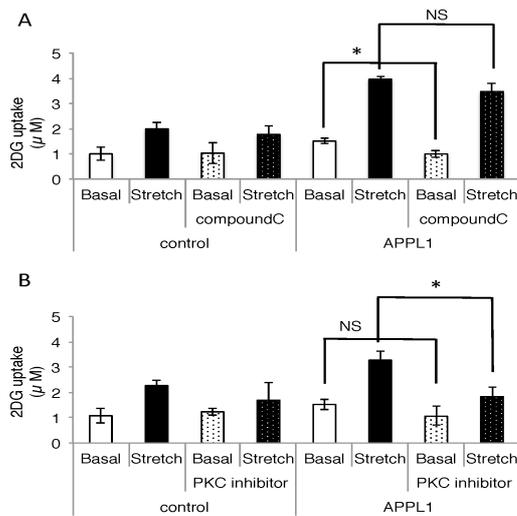


図3

(4) PKC $\zeta$ の作用機序としてその細胞内局在が重要である。そのため伸展刺激によるpPKC $\zeta$ の細胞内局在を細胞免疫染色にて検討したところ、pPKC $\zeta$ は伸展刺激によりリン酸化が増強し、細胞膜へトランスロケートすることが分かった。APPL1によって誘導されるPKC $\zeta$ 依存性シグナル伝達機構を解明する

ため、伸展刺激により誘導されたpPKC $\zeta$ の特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈物を質量分析にて解析した。するとこれまで成熟した筋肉もしくは筋管細胞において機能が不明であったnon-muscle myosin IIa (NMIIA)が同定された。そこで免疫沈降法にて結合状態を確認したところ、controlベクターを発現させた細胞ではNMIIAとの結合は認められなかったが、APPL1を過剰発現した細胞では、伸展刺激によりpPKC $\zeta$ とNMIIAが結合することが確認された(図4)。また興味深いことに、基底状態ではpPKC $\zeta$ はフォスファターゼであるPP2Aと結合し、活性化を制御されている可能性が示唆された。

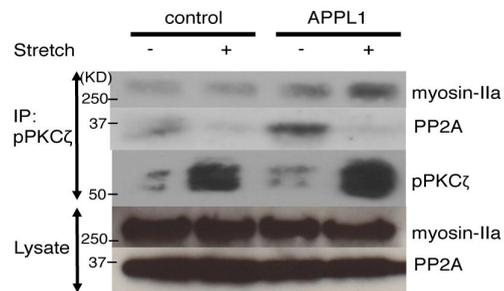


図4

(5) pPKC $\zeta$ とNMIIAの結合状態が糖取り込み促進作用に重要であるかどうかをNMIIAの特異的阻害剤(Blebbistatin)を用いて検討した。Blebbistatin(Blebbi)によりリン酸化pPKC $\zeta$ は減少し、糖取り込みは基底状態近くまで減少した。つまり、APPL1を過剰に発現した状態において、伸展刺激による糖の取り込み作用はpPKC $\zeta$ -NMIIA依存性のシグナル伝達経路である事が判明した(図5)。

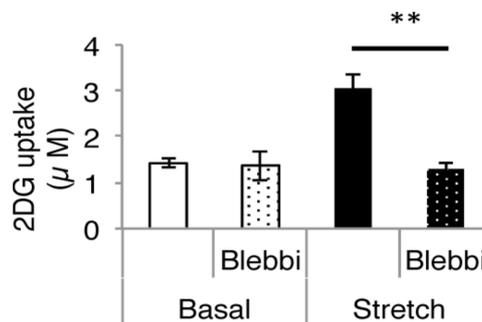


図5

これまで成熟筋管細胞における機能が不明であった NMIIA が糖取り込みに関与することが明らかとなった。

耐糖能異常のあるマウスや糖尿病患者（自検データ）での骨格筋内の APPL1 発現量が減少していることが確認されている。以上我々の結果から糖尿病患者において骨格筋の APPL1 の発現量が低下したため、pPKC $\zeta$ -NMIIA シグナル伝達の活性化が低下している可能性が予想され、このシグナル伝達経路を何らかの方法で活性化することにより、糖取り込み作用が改善し、血糖値を管理できる可能性が示唆された。

#### 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 9 件)

齋藤従道、骨格筋における APPL1 の機能解析、第 36 回日本肥満学会、2015.10.3、名古屋国際会議場（愛知県 名古屋市）

Tsugumichi Saito、APPL1 promotes mechanical stretch induced glucose uptake through the PKC $\zeta$ -Myosin IIa pathway in C2C12 myotubes、欧州糖尿病学会、2015.9.16、国際会議場（スウェーデン、ストックホルム）

齋藤従道、骨格筋培養細胞を用いた伸展刺激による糖代謝機構の解明、第 58 回日本糖尿病学会学術総会、2015.5.24、シーモールパレス（山口県 下関市）

齋藤従道、骨格筋の糖代謝シグナル、群馬代謝研究会、2015.5.5、群馬大学昭和キャンパス（群馬県 前橋市）

Tsugumichi Saito、APPL1 affects on glucose uptake induced by uniaxial stretch in C2C12 myotubes、欧州糖尿病学会、2014.9.14、国際会議場（オーストリア ウィーン）

齋藤従道、骨格筋培養細胞における伸展刺激による糖代謝機構の研究、群馬スポーツ研究会、2014.7.29 群馬大学昭和キャンパス（群馬県 前橋市）

齋藤従道、骨格筋培養細胞を用いた伸展刺激による糖代謝機構の解明、第 57 回日本糖尿病学会学術総会、2014.5.24、ホテル NCB（大阪府 大阪市）

齋藤従道、Glut4 トランスロケーション機構の解明、第 87 回日本内分泌学会総会、2014.4.25、福岡国際会議場（福岡県 福岡市）

齋藤従道、骨格筋の伸展刺激による糖代謝シグナル伝達機構の検討、第 56 回日本糖尿病学会学術総会、2013.5.18 くまもと県民交流会館（熊本県 熊本市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 従道 (SAITO Tsugumichi)

群馬大学医学部附属病院 内分泌糖尿病内科 助教

研究者番号：80572619