

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670099

研究課題名(和文)単離骨格筋線維内における小胞輸送動態の超解像ナノ計測手法の確立

研究課題名(英文)Live-imaging analysis of vesicle trafficking dynamics in isolated skeletal muscle fiber

研究代表者

神崎 展 (Kanzaki, Makoto)

東北大学・医工学研究科・准教授

研究者番号：10272262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスより単離/培養した骨格筋線維内において、空間分解能6 nmというナノ計測を単一分子レベルで実現し、GLUT4およびトランスフェリン受容体分子の輸送動態を定量的に計測することに世界で初めて成功した。また、これまで電子顕微鏡に依存してきた微細構造の観察が超解像顕微鏡により達成できることを確認した。これらの研究成果は、構造的に特殊なためライブイメージング解析が困難であった骨格筋のオルガネラ膜や輸送小胞の細胞生物学的研究に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to develop a novel approach for quantifying intracellular vesicle trafficking dynamics utilizing Quantum-dot-based single molecule imaging in a isolated skeletal muscle fiber from mouse. Intracellular dynamics of GLUT4, an insulin-responsive glucose transporter, as well as of transferrin receptor (TfR) were successfully quantified with this novel approach. In addition, the superresolution G-STED microscopy was employed to observe intracellular vesicles and organelles containing GLUT4 and/or TfR.

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：細胞内小胞輸送 ライブイメージング 骨格筋 GLUT4

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、その強力な収縮機能を発揮するために非常に特徴的な細胞内小器官形態を呈している。細胞質内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) による収縮制御機構やアクチン系での力の発生機構については、我が日本において最も先導的な生理学的・生物物理学的研究がなされてきた。一方、その細胞内オルガネラ膜構造（筋小胞体、T管構造やゴルジ装置など）も極めて特殊であるが、筋収縮活動に伴うそれらの構造的・機能的適応調節メカニズムはもちろんのこと、それぞれのオルガネラ膜構造の形成・成熟・維持過程については未解明の課題が山積している。

この研究の遅れは、その機能と構造の特殊性から、骨格筋線維内のオルガネラ膜構造を顕微鏡にてライブイメージング解析することが困難であることが原因にある。さらには、細胞内における膜構造や小胞の生命動態を「定量的」に解析できる優れた手法が存在しなかったことが原因である。

2. 研究の目的

本研究では同時に開発してきた生細胞内分子動態挙動解析手法を応用して、(1) マウス骨格筋組織より単離した筋線維内における小胞輸送の動態を世界最高精度にて定量評価できる超解像ナノ計測手法を確立することを目的とした。特に、(2) 生理的に重要な意義を持つインスリン応答性糖輸送担体 (GLUT4) を含有する小胞輸送動態解析系を中核として、さらに再循環エンドソームの積荷分子輸送動態も同時に定量比較解析する。さらに、(3) 骨格筋線維の輸送小胞やオルガネラ膜構造の超微細構造について G-STED 超解像顕微鏡を駆使した観察もあわせて遂行する。

3. 研究の方法

マウス骨格筋線維の単離培養と量子ドットによる積荷分子の特異標識方法の確立
生筋ファイバー内の小胞群に存在する各種積荷分子を無機ナノマテリアルである量子ドット (Qdot) で特異標識することにより、単一分子の視覚化とその挙動ナノ計測を可能にする (図 1)。

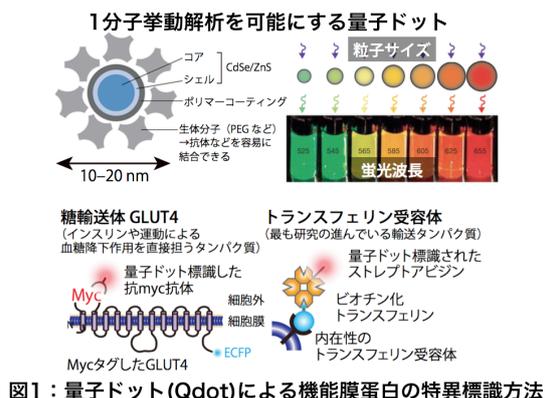


図1：量子ドット(Qdot)による機能膜蛋白の特異標識方法

GLUT4 分子を Qdot にて特異標識するため、exofacial-Myc-GLUT4-EGFP を骨格筋特異的に発現する myc-GLUT4-EGFP-Tg マウスを作製し、この Tg マウスから筋繊維を単離後ガラスボトムディッシュ上にて培養して実験を行った (図 2)。

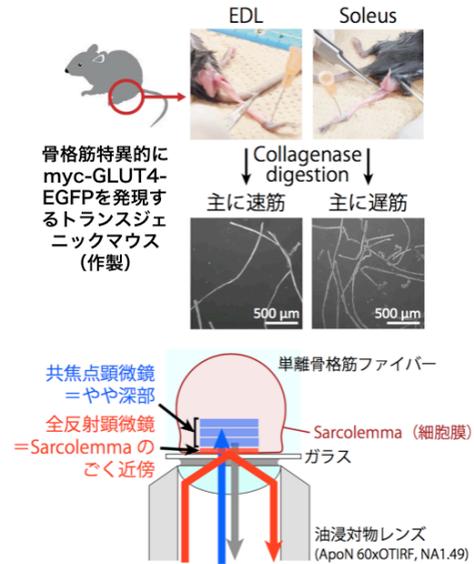


図2：マウス骨格筋ファイバの単離培養法とその細胞内小胞輸送系のLive-imaging観察手法を確立

4. 研究成果

(1) GLUT4 分子を Qdot にて特異標識するため、exofacial-Myc-GLUT4-EGFP と Qdot 標識抗 myc 抗体 (Fab) を利用し、再循環エンドソームに存在するトランスフェリン受容体 (TfR) は Qdot で標識された Tf を取り込ませることにより特異的に標識することができた (図 3)。

(2) さらに、生筋ファイバ内において運搬過程にある小胞動態を単一分子レベルで可視化してナノメートルスケールで観察することにより、世界で初めてこれらの輸送活性を定量的に計測することに成功した。GLUT4 含有小胞の輸送動態はトランスフェリン受容体に比して有意に制限されているが、インスリン刺激により繫留状態から解放されることを見出した。

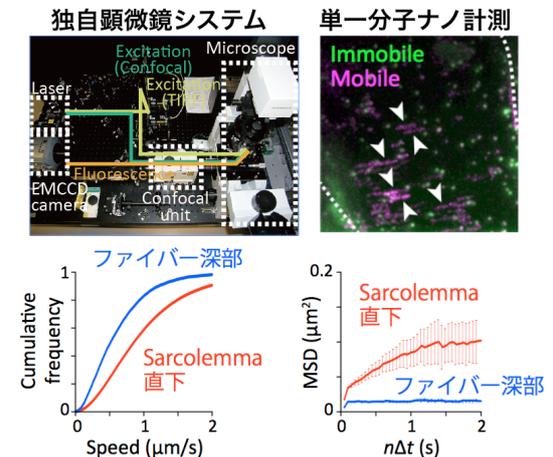


図3：生筋ファイバ内のTfR動態のナノ計測

(3) 単離培養した骨格筋ファイバ内の GLUT4 小胞の形態を G-STED 超解像顕微鏡を用いて観察した。電子顕微鏡観察で報告されていたその微細構造の特徴について、超解像顕微鏡によって確認できただけでなく、本手法により極めて簡便に回折限界を超えた微細小胞形態と精密なその分布状態を画像計測することを可能にした (図 4)。

G-STED超解像顕微鏡による観察
(Supramolecule, Nanosystem)

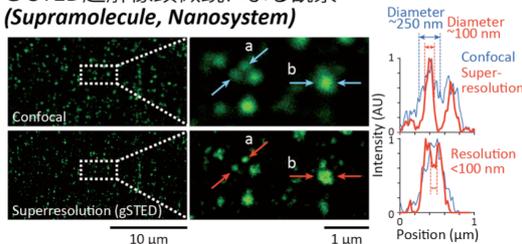


図4：G-STED超解像顕微鏡を用いた骨格筋ファイバGLUT4小胞の観察

(4) myc-GLUT4-EGFP-Tg マウスを 2 光子顕微鏡上に生きたまま固定し、その大腿四頭筋における GLUT4 小胞の運搬過程の全行程をライブイメージング解析できる観察系を構築した (図 4)。電気パルス誘発性の強収縮刺激手法を用いることにより、筋収縮依存性の GLUT4 輸送促進を観察することも可能にした。

これらの研究成果 (1) - (4) により、骨格筋組織 (*in/ex vivo*) において、空間分解能 6 nm というナノ計測を単一分子レベルで実現し、GLUT4 およびトランスフェリン受容体分子の輸送動態を定量的に計測すること

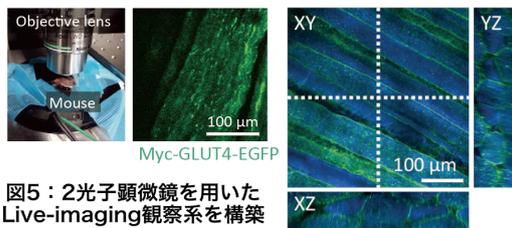


図5：2光子顕微鏡を用いたLive-imaging観察系を構築

に世界で初めて成功した。また、これまで電子顕微鏡に依存してきた微細構造の観察が超解像顕微鏡により達成できることも確認できた。これらの研究成果は、構造的に特殊なためライブイメージング解析が困難であった骨格筋のオルガネラ膜や輸送小胞の細胞生物学的研究に大きく貢献するものである。

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 10 件)

- ① 神崎 展, 電気パルス刺激を用いた収縮型培養骨格筋細胞の創製 機械の研究 68(1): 56-58, 2016 (査読なし)
- ② 金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎 展 プラズマ刺激による細胞膜輸送制御 機械の研究 68(2): 151-154, 2016 (査読なし)

し)

- ③ Chiba K, Tsuchiya M, Koide M, Hagiwara Y, Sasaki K, Hattori Y, Watanabe M, Sugawara S, Kanzaki M, Endo Y. Involvement of IL-1 in the Maintenance of Masseter Muscle Activity and Glucose Homeostasis. (2015) *PLoS One*. 10(11):e0143635. (査読あり) doi:10.1371/journal.pone.0143635.
- ④ Kaneko T, Sasaki S, Hokari Y, Horiuchi S, Honda R, Kanzaki M. Improvement of cell membrane permeability using a cell-solution electrode for generating atmospheric-pressure plasma. (2015) *Biointerphases*. 21;10(2):029521. (査読あり) doi: 10.1116/1.4921278.
- ⑤ 神崎 展, ゴルジ複合体における輸送小胞の選択的な繫留とその意義 実験医学1月号 33(1): 57-58, 2015 (査読なし)
- ⑥ Sasaki S, Kanzaki M, Kaneko T. Highly efficient and minimally invasive transfection using time-controlled irradiation of atmospheric-pressure plasma. (2014) *Applied Physics Express* 7(2): 026202. (査読有り) <http://iopscience.iop.org/article/10.7567/APEX.7.026202>
- ⑦ Suzuki S, Suzuki C, Hinokio Y, Ishigaki Y, Katagiri H, Kanzaki M, Azev VN, Chakraborty N, d'Alarcao M. Insulin-mimicking bioactivities of acylated inositol glycans in several mouse models of diabetes with or without obesity. (2014) *PLoS One* 9(6): e100466 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0100466.
- ⑧ Nagamine K, Okamoto K, Otani S, Kaji H, Kanzaki M, Nishizawa M. Hydrogel-based bioassay sheets for in vitro evaluation of contraction-dependent metabolic regulation in skeletal muscle cells. (2014) *Biomaterial Science*: 252-256. (査読あり) DOI: 10.1039/C3BM60179J
- ⑨ Rütli S, Arous C, Nica AC, Kanzaki M, Halban PA, Bouzakri K. Expression, phosphorylation and function of the Rab-GTPase activating protein TBC1D1 in pancreatic beta-cells. (2014) *FEBS Lett*. 588(1):15-20. (査読あり) doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.050
- ⑩ 神崎 展, 細胞容量調節の「鍵」チャンネル SWELL1 の同定 実験医学 7 月号 32(11):1750-1751, 2014 (査読なし)

[学会発表] (計 20 件) (抜粋)

- ① Kanzaki M and Hatakeyama H. (Keynote Lecture) Cellular Nanoscience and Exercise-induced Health Benefits, International Conference on Fluid Dynamics 2015“Advanced Physical Stimuli and Biological Responses” International Center, Sendai, Oct, 29, 2015
- ② 神崎 展. 生細胞内における単一分子レベルの視覚化解析と分子動態生理学の創造 (講演) 日本動物細胞工学会 2015年大会シンポ

ジウム「細胞工学と測定の新展開」
7/9/2015, 仙台, 片平さくらホール.

- ③ Makoto Kanzaki. Quantum-dot-based Nano metrological Analysis of Intracellular Trafficking Activities in Living Cell. The Joint Symposium of 9th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, and 6th International Workshop on Nano structures & Nanoelectronics. 2015/3/2-4, Tohoku Univ. Katahira Campus, Sendai.
- ④ Malouane A, Carbonell A, Yoshioka M, Kanzaki M, Puymirat J, St-Amand J: Roles of exercise-induced gene, SPARC, against sarcopenia: link between extracellular matrix and mitochondria. 8th Cachexia Conference. Paris, France, Dec 4-6, 2015
- ⑤ Hosoya, M, Uda, Y. Hatakeyama, H, Kanzaki, M: Involvement of Mechanosensitive Transcriptional Network in Contraction-dependent Muscle Fiber Type Conversion Analyzed using the "in vitro Exercise Model", Cell Symposia "Exercise Metabolism", Amsterdam (Netherlands), 7.12-14/2015
- ⑥ Hatakeyama, H. and Kanzaki, M. Coordinated actions of AS160 and Tbc1d1 as a determinant of insulin sensitivity in GLUT4 trafficking, FASEB SRC "Glucose Transport: Gateway to Metabolic Systems Biology", Big Sky (MT, USA), 7.26-31/2015
- ⑦ Hatakeyama, H. Kanzaki, M. AS160 vs Tbc1d1: Cooperative determination of insulin-responsive GLUT4 trafficking activity after exercise-mimetic stimuli, 51st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Stockholm (Sweden), 9.14-19/2015
- ⑧ 神崎 展. インスリン感受性と筋の運動効果. (講演) 第46回徳島大学糖尿病臨床・研究センター講演会, 2014/11/11, 徳島大学糖尿病臨床・研究センター.
- ⑨ 神崎 展 筋の運動効果とインスリン感受性の亢進 第26回バイオエンジニアリング講演会: 東北大学片平キャンパス、仙台 2014年1月12日(仙台)
- ⑩ Hatakeyama, H and Kanzaki, M. Submissive Role of AS160 in Tbc1d1-mediated GLUT4 Trafficking Activation in Response to Ca²⁺ and Insulin. 74th American Diabetes Association Scientific Meeting, San Francisco, USA, 6/16/2014

[その他]

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Makoto_Kanzaki/

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kanzaki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 展 (KANZAKI MAKOTO)

東北大学 大学院医工学研究科 准教授

研究者番号: 10272262