

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591333

研究課題名(和文)細胞骨格制御による肥満・メタボリックシンドローム治療の基礎的基盤の確立

研究課題名(英文)Role of the microtubule-associated protein in insulin-dependent glucose uptake

研究代表者

阪上 浩(SAKAUE, Hiroshi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60372645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は脂肪細胞に特異的に発現するsynucleinの新たなアイソフォームを同定し、このsynuclein蛋白が細胞骨格に結合すること、糖輸送担体GLUT4と微小管上で共局在していること、さらにはノックアウトマウスが高脂肪食による肥満形成に抵抗することを見出した。さらに、この新たなsynuclein蛋白による細胞骨格制御を介した脂肪細胞肥大化の制御機構を明らかとし、synucleinを治療標的とした新たな肥満・メタボリックシンドローム治療の基礎的基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：We identified adipocyte-specific tubulin binding protein (synuclein) in WAT of C57BL/6 mice during the development of obesity. The aim of this study is to reveal the role of synuclein in tubulin regulation in adipose tissue function. Immunofluorescence staining demonstrated that synuclein can co-localized with tubulin and enhance the staining of tubulin in 3T3-L1 adipocytes. We next examine the effect of synuclein knockdown in insulin-dependent glucose uptake and triacylglycerol (TG) accumulation in 3T3-L1 adipocytes. synuclein knockdown decreased glucose uptake, TG accumulation and GLUT4 vesicles with plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes. Synuclein knockout suppressed body weight gain for long term maintenance on a high-fat diet and enhance insulin sensitivity in mice. These observations suggest that synuclein can affect glucose uptake and lipid accumulation in adipose tissue by regulating tubulin polymerization.

研究分野：Diabetes

キーワード：Adipocyte Obesity Diabetes

1. 研究開始当初の背景

申請者は、肥満で発現が増強する脂肪細胞特異的遺伝子を DNA マイクロアレイ解析によって網羅的に解析した結果、脂肪細胞に発現する synuclein の新たなアイソフォームを同定しが、申請者は脂肪細胞の細胞骨格制御に着目し、脂肪細胞での微小管 (microtubule) 制御と、それに関連する糖輸送担体 GLUT4 輸送における synuclein の生理的機能を解明すること、synuclein の肥満による発現誘導におけるエピゲノム制御機構を解明すること、さらには synuclein の全身のエネルギー代謝の制御機構を解明することで、新たな脂肪蓄積制御の分子機構を明らかとし、synuclein を治療標的とした新たな肥満・メタボリックシンドローム治療の基礎的基盤の確立を試みた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、申請者が新たに見出した微小管 (microtubule) 結合蛋白 synuclin による脂肪細胞肥大化の制御機構を明らかとし、synuclin による糖代謝制御機構を治療標的とした小分子化合物などの創薬や医療への応用における基盤確立にある。このため synuclin ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの解析や細胞骨格との結合様式の解析、synuclin 結合タンパクの同定、DNA メチル化による synuclin 発現制御機構の解析を通じて、synuclin による糖代謝制御機構を明らかとし、synuclin の微小管 (microtubule) との結合阻害ペプチドの肥満モデルマウスへの投与によって、阻害薬開発の可能性を探索するために本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) 糖輸送担体 GLUT4 のインスリン依存性細胞膜へトランスロケーションにおける synuclein と細胞骨格との相互作用の生理的意義の解明: synuclein を過剰発現させた培養脂肪細胞並びに synuclein ノックダウンした脂肪細胞を用いて、GLUT4 小胞の細胞内輸送機序における synuclein の生理的役割を、微小管沈降アッセイ、GLUT4 蛍光抗体染色法、HA-GLUT4 染色、2-DIG 取り込み実験を用いて、microtubule 並びに GLUT4 と相互作用の観点から明らかとする。

(2) 高脂肪食給餌および過食誘導 synuclein ノックアウトマウスの解析: synuclein ノックアウトマウスにおいて、糖負荷試験、インスリン感受性試験などの各種負荷試験及び代謝ケージを用いたエネルギー消費量測定試験の実施、脂肪組織における各種シグナル伝達分子の活性化の検討、糖・脂質代謝に関わる各種遺伝子発現変化の検討 (DNA マイクロアレイ解析)、各種アディポサイトカインの濃度変化の有無等の解析を高脂肪食給餌にて行い、肥満発症時のエネルギー代謝調節や肥満病態形

成における脂肪細胞での synuclein の生理的機能を明らかとする。

(3) synuclein の脂肪細胞特異的トランスジェニックマウスを作製: 個体での synuclein 作用を検討するため、脂肪細胞特異的に synuclein を発現するトランスジェニックマウスを、脂肪酸結合タンパク質 FABP4/aP2 のプロモータ 5.4kb を用いて作製することで、肥満誘導時の synuclein 発現増強と同様な状態を再現し、脂肪組織でのエネルギー代謝調節機構における糖代謝関連分子の発現を DNA マイクロアレイ解析により明らかとする。

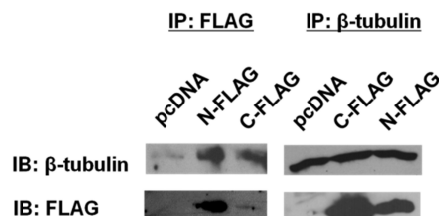
(4) synuclein プロモータ領域のエピゲノム解析: synuclein プロモータ領域を高脂肪食給餌マウスから経時的に単離し、パイサルファイト 処理後に DNA メチル化の割合をパイロシーケンス法にて解析することで、synuclein 発現制御と肥満との関連を明らかとする。

(5) microtubule と結合に必要な synuclein の結合部位の同定: synuclein の微小管 (microtubule) との結合部位と結合に必要な残基を明らかとするため、synuclein の部分発現組み換え蛋白や微小管 (microtubule) 結合部位の残基を変異させた組み換え蛋白を作製し、微小管沈降アッセイにて結合に必要な残基を明らかとする。さらに結合阻害ペプチドを作成し、マウス生体内の脂肪細胞に導入することで、synuclein の生体での分子標的としての意義を明らかとする。

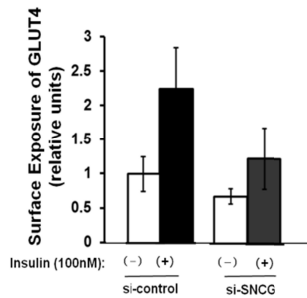
(5) synuclein 結合蛋白複合体の同定 脂肪細胞内での synuclein の相互作用蛋白を明らかとする。

4. 研究成果

(1) インスリンシグナルは最終的に、糖輸送担体 GLUT4 の特異的な小胞輸送機構に伝達されるが、GLUT4 小胞は核周囲の微小管 (microtubule) 構造により格納されており、さらにインスリン依存性の細胞膜への GLUT4 の移動にも微小管 (microtubule) が関与している。申請者が見出した新たな synuclein アイソフォームは actin filament ではなく microtubule と結合しおり (下図)、さらに糖輸送担体 GLUT4 と microtubule 上で共局在していることが判明した。

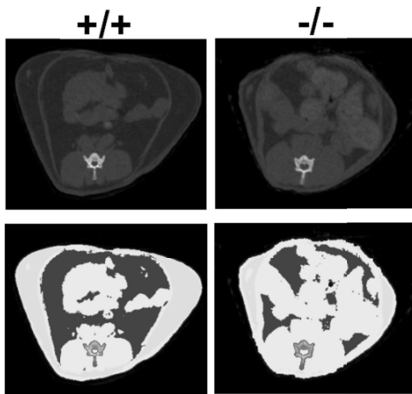


さらに、synuclein ノックダウンした脂肪細胞では GLUT4 小胞の細胞内膜への動員が抑制された (下図)。

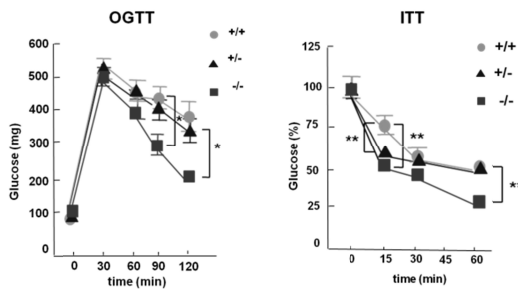


以上のことから、synuclein は microtubule の制御を介してインスリン依存性の GLUT4 の細胞膜動員を制御することが明らかとなった。

(2)高脂肪食を給餌した synuclein ノックアウトマウスでは脂肪蓄積の阻害が認められる(下図)。



さらに糖負荷試験、インスリン感受性試験の結果(下図)、良好な糖処理能力とインスリン感受性を示した(下図)。



以上のことから、synuclein の肥満形成における役割が明らかとなった。

(3) synuclein を過剰発現する脂肪細胞を作製したが、明らかなフェノタイプを示さなかったため、トランスジェニックマウスは作製しなかった。

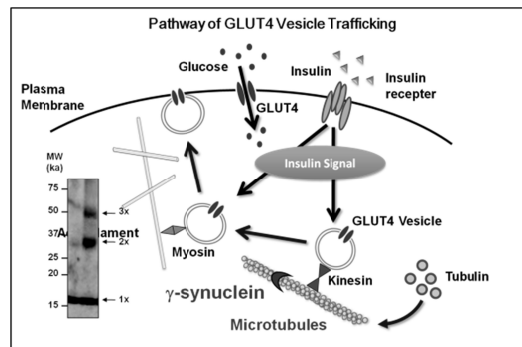
(4) synuclein プロモータ領域を高脂肪食給餌マウスから経時的に単離し、バイサルファイト処理後に DNA メチル化の割合をパイロシーケンス法にて解析したが、肥満によって明らかにメチル化の程度に差を示さなかった。

(5) microtubule と結合に必要な synuclein

の結合部位を同定し、結合に必要な残基を明らかにした。現在、結合阻害ペプチドを試みている。

(6) synuclein 結合蛋白を電気泳動後に銀染色にて同定を試みたが、コントロールに対して優位な蛋白は見いだせなかった。

今回の GLUT4 小胞との microtubule 関与による細胞膜動員のメカニズムの一部が明らかとなった(下図)。特に、synuclein はインスリン抵抗性増加や血糖悪化に作用していることが推測され、糖尿病の新規治療ターゲットとなる可能性を見出した。



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 7 件)

Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Tsutsumi R, Yoshida T, Nii Y, Okahisa N, Iwata S, Tsukayama M, Hashimoto R, Taniguchi Y, Sakaue H, Hosaka T, Shuto E, Sakai T. *Nutr Metab (Lond)*. 11:32,2014,doi: 10.1186/1743-7075-11-32. 査読有。

Enhancement of endothelial function inhibits left atrial thrombi development in an animal model of spontaneous left atrial thrombosis. Mawatari K, Yoshioka E, Toda S, Yasui S, Furukawa H, Shimohata T, Ohnishi T, Morishima M, Harada N, Takahashi A, Sakaue H, Nakaya Y. *Circ J*. 78:1980-1988, 2014. https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/78/8/78_CJ-13-1398/_article. 査読有。

Deletion of hypoxia-inducible factor-1 in adipocytes enhances glucagon-like peptide-1 secretion and reduces adipose tissue inflammation. Kihira Y, Miyake M, Hirata M, Hoshina Y, Kato K, Shirakawa H, Sakaue H, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S. *PLoS One*. 9:e93856, 2014. doi:

10.1371/journal.pone.0093856. 査読有.

Albumin-normalized serum zinc: a clinically useful parameter for detecting taste impairment in patients undergoing dialysis. Tsutsumi R, Ohashi K, Tsutsumi YM, Horikawa YT, Minakuchi J, Minami S, Harada N, Sakaue H, Sakai T, Nakaya Y. Nutr Res. 34:11-16, 2014. doi: 10.1016/j.nutres.2013.10.009. 査読有.

Cysteine string protein 1 (CSP1) modulates insulin sensitivity by attenuating glucose transporter 4 (GLUT4) vesicle docking with the plasma membrane. Jambaldorj B, Terada E, Hosaka T, Kishuku Y, Tomioka Y, Iwashima K, Hirata Y, Teshigawara K, Thi Kim Le C, Nakagawa T, Harada N, Sakai T, Sakaue H, Matsumoto T, Funaki M, Takahashi A, Nakaya Y. J Med Invest. 60:197-204, 2013. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/3.4/60_197/_article. 査読有.

Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates neointimal hyperplasia after vascular injury. Hirata Y, Kurobe H, Nishio C, Tanaka K, Fukuda D, Uematsu E, Nishimoto S, Soeki T, Harada N, Sakaue H, Kitagawa T, Shimabukuro M, Nakaya Y, Sata M. Eur J Pharmacol. 699: 106-111, 2013. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.057. 査読有.

Telmisartan ameliorates insulin sensitivity by activating the AMPK/SIRT1 pathway in skeletal muscle of obese db/db mice. Shiota A, Shimabukuro M, Fukuda D, Soeki T, Sato H, Uematsu E, Hirata Y, Kurobe H, Maeda N, Sakaue H, Masuzaki H, Shimomura I, Sata M. Cardiovasc Diabetol. 11: 139, 2013. doi: 10.1186/1475-2840-11-139. 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

ATBP, Adipocyte-specific Tubulin-Binding Protein, Can Control Cytoskeletal Structure, and Insulin Stimulated Glucose Uptake. Masashi Kuroda, Rie Okitsu, Mari Kondo, Kasumi Nakagawa, Toshio Hosaka, Nagakatsu Harada, Hiroshi Skaue 75th Scientific Session of American diabetes association. 2015 年、6 月 8 日、Boston(USA).

興津理絵、黒田雅士、保坂利男、坂東正浩、原田永勝、中屋豊、阪上浩 細胞骨格制御分子による糖取り込み機構の解析 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年、5 月 23 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

細胞骨格制御分子による糖取り込み機構の解析 興津理絵、阪上浩、保坂利男、高橋友奈、黒田雅士、Bayasgalan Jambaldorj、原田永勝、中屋豊 第 87 回日本内分泌学会総会 2014 年、4 月 25 日、福岡国際会議場

(福岡県・福岡市)

細胞骨格制御分子による糖取り込み機構の解析 興津理絵、阪上浩、保坂利男、高橋友奈、黒田雅士、Bayasgalan Jambaldorj、原田永勝、中屋豊 第 34 回日本肥満学会 2013 年、10 月 11 日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

肥満と肥満症の基礎研究の進歩 脂肪細胞の肥大と増殖 黒田雅士、阪上浩 日本臨床社 5(66-70), 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪上 浩(SAKAUE, Hiroshi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 60372645

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
該当なし