

## 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：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293074

研究課題名(和文) Vps10pファミリーのソーティング障害と生活習慣病に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of the Vps10p-family proteins and its sorting disorders in life-style-related diseases

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Vps10p受容体:分泌性リガンド類:複数回膜貫通型蛋白質(GLUT4)からなるTripartite Complex形成が、GLUT4量およびその輸送制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。この過渡的分子複合体は、エンドソーム上で一時的に形成されるため既存方法論では解析が困難であったが、本研究では単一分子視覚化技術により、その高次複合体の形成過程を観察することに成功した。さらに、それらの輸送動態はTbc1dファミリーRabGAP(AS160およびTbc1d1)により調節されることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Physiological relevance of the Tripartite Complex Assembly composed of Vps10p/soluble ligands/GLUT4 was revealed by several experimental approaches including the single-molecule imaging analysis. Live-imaging analysis allowed us to visualize the transient formation of tripartite complex in a living cell and this approach successfully demonstrated that intracellular dynamics of the tripartite complex containing GLUT4 is tightly regulated by Tbc1d-family RabGAPs (AS160 and Tbc1d1).

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：生活習慣病 ソーティング障害 インスリン反応性 糖尿病 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

一般に遅発性に発症する生活習慣病(2型糖尿病, 高コレステロール血症)や進行性認知症などの共通の病理基盤として Vps10p 受容体ファミリーの機能不全が関与する可能性が報告されている。同ファミリーの Sortilin をはじめとして, その Vps10p 領域(小胞内腔側)には多様なリガンド分子と機能膜蛋白が複数種同時に直接結合する。リガンドの結合研究や構造生物学的研究による分子間相互作用に関する理解が深まったが、Vps10p 受容体がさまざまな会合分子群を適材適所にバランスを保ち運搬する仕組みや, その生活習慣病における破綻機序については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では, 生活習慣という長期的な過栄養摂取やバランスの乱れがいかんして Vps10p 受容体の機能障害を惹起し, 広範な生活習慣病発症の原因となっていくのか, その統合的な病態ナノシステム基盤を探索することを目的とした。特に, Vps10p 受容体とその結合分子種として分泌性因子や酵素類(soluble リガンド)だけでなく, 糖輸送担体(GLUT4)やイオンチャネルなどの機能膜蛋白群にも小胞内腔で直接会合するという特殊性に着目した研究を推進する。本目的を達成するために生細胞内のエンドソーム上で一過性に凝集/離散する Vps10p 受容体/GLUT4 を含む蛋白複合体の分子動態を可視化解析できる新たな手法を確立する。

3. 研究の方法

本研究では独自に確立した単一分子視覚化定量解析手法を駆使するが, Tripartite complex に含まれる複数分子種の凝集・分散状態を生細胞内で同時に可視化できる顕微鏡観察系(2系統)を構築した(図1)。

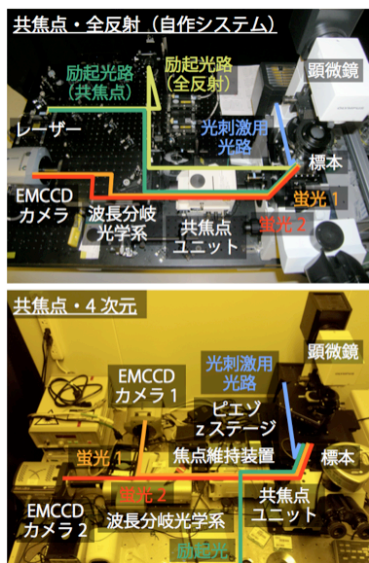


図1: 異波長QDを用いた複数種分子の可視化・動態解析系の構築

また, 液性リガンド量および細胞内 GLUT4 含量は一般的生化学的手法により解析した。Sortilin および GLUT4 のソーティングモチーフの重要性については, 各種の変異体発現ベ

クターを作製して生化学的および分子動態生理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) GLUT4 と Vps10 受容体ファミリーの一つである Sortilin を発現した細胞に対して, 外来性に Vps10p リガンド類であるグラニューリン前駆体や脳由来神経栄養因子(BDNF)前駆体を添加することによって, 直接的な会合能力を持たない GLUT4 タンパク質の細胞内 G 含量が有意に変動することを生化学的解析により確認し, 「Vps10p 受容体(Sortilin):分泌性リガンド類:複数回膜貫通型蛋白質(GLUT4)」からなる Tripartite Complex 形成がこれらの細胞内含量と機能の制御において生理的に重要であることを明らかにした。

(2) Sortilin の細胞質側に突出している C 末端のソーティングモチーフの変異体発現ベクター (Sort/787FLV, Sort/829LL, Sort/792YL, Sort/C783S) を作製し, 機能膜蛋白である GLUT4 (ソーティングと運搬動態) と Vps10p の各種液性リガンド (ProBDNF や ProGranulin の分泌量) に対する作用を定量的に解析したところ, retromer complex の会合に関わる Sort/787FLV および Sort/C783S 変異体において, 有意な障害(分泌量および細胞内含量の両者)が認められた。Sortilin の C 末端領域配列を含み, さらに脂肪酸修飾を施した合成ペプチドを用いた別のアプローチによっても確かめることができた。Sortilin の C 末端領域配列を含み, さらに脂肪酸修飾を施した合成ペプチドを用いた別のアプローチによっても確かめることができた。

(3) 生細胞内のエンドソーム上で一時的に形成される「Tripartite Complex を核とした過渡的分子複合体」は, 既存の方法論では解析が非常に困難であったが, 本研究では図1, 2に示すように単一分子視覚化ナノ計測技術を駆使した解析系を構築することにより, そ

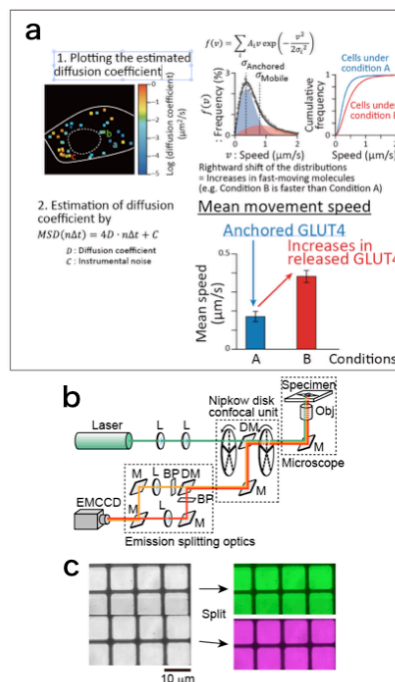


図2: 生細胞内における分子輸送動態の定量評価方法(a) 異波長QDによる異2分子種の同時可視化光学系(b,c)

の高次複合体からなる生体ナノシステムの制御過程について、生細胞内観察することに成功した (図3)。

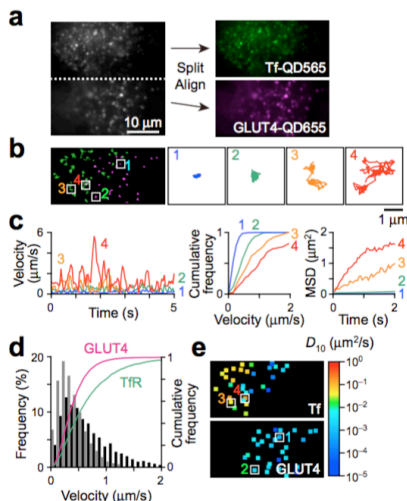


図3：異波長QDを用いた複数種分子の同時動態計測結果  
a)異波長QDイメージ、b,c)分子挙動のナノ計測、  
d)各々の動態スピードe)各々の拡散

インスリン非刺激状態では、GLUT4は極めて遅い分子動態を示すが、TfRとSortilinは比較的に早い動態であった。一方、インスリン刺激はGLUT4動態を有意に賦活化するが、この時Vps10p受容体の液性リガンド類(Granulin前駆体, BDNF前駆体, Tx14ペプチド)を外来性に添加することにより、GLUT4輸送動態に有意な変化(稼動状態の持続)が認められた。この時、Tripartite complexの構成要素とならないTfRの輸送動態には全く影響がないことを確認した。

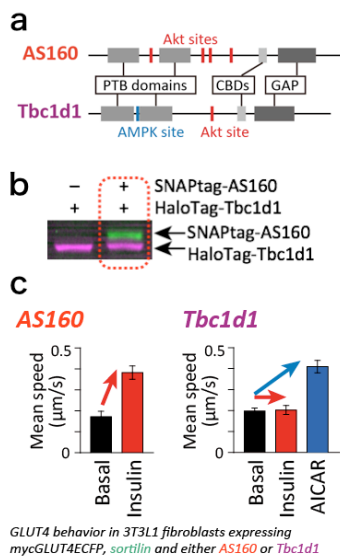


図4：Sortilinと共にAS160/Tbc1d1(a,b)を外来発現させた再構成モデル細胞系とGLUT4分子動態の解析(c)

(4) 図4に示すようにVps10p受容体であるSortilinとGLUT4を外来性に発現させたモデル細胞系を用いた検討から、Sortilinとその液性リガンドとの協調作業を介してソーティングされ適切にトランスゴルジ網(TGN)へと帰還したGLUT4小胞は非刺激時には極めて遅い分子動態(繫留状態)を示

すものの、インスリンや疑似運動(AICAR)刺激を与えてもGLUT4の解放現象は誘導できなかった。しかし、このモデル細胞系にAS160あるいはTbc1d1を発現させることにより、刺激依存性のGLUT4分子動態の賦活化(=GLUT4トランスロケーションの誘導開始)を再現できることを見出した。刺激依存性のGLUT4動態の賦活化プロセスに対して、液性リガンドの有無は影響しないことから、Tripartite complex形成は再循環エンドソーム内のGLUT4分子がTGNへとソーティング(選別輸送)される際に役割を果たすことが示唆された。

これらの研究成果は、細胞内分子動態の恒常性維持と病態におけるその破綻という生活習慣病の病態機序に新解釈を与えただけでなく(図5)、生命分子動態解析学の基盤原理の構築にも資するものである。

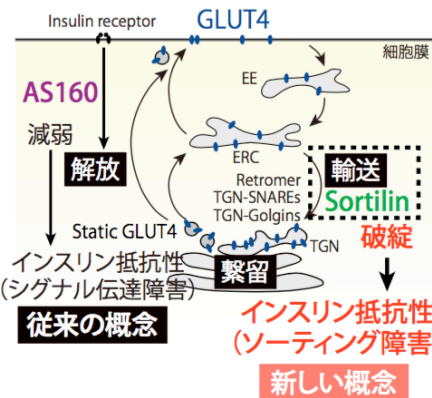


図5：Sortilinを含むTripartite Complex形成によるGLUT4分子の逆行性の選別輸送(ソーティング)制御機構  
このインスリン抵抗性病態ではこのプロセスに破綻がある。

## 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13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)
- 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 Rütti 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 Hatakeyama H and Kanzaki M. Development of dual-color simultaneous single molecule imaging system for analyzing multiple intracellular trafficking activities (2013) *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2013:1418-1421. (査読あり) doi: 10.1109/EMBC.2013.6609776
- ⑪ Suzuki Y, Nath Roy C, Promjunyakul W, Hatakeyama H, Gonda K, Imamura J, Vasudevan Pillai J, Ohuchi N., Kanzaki, M, Higuchi, H and Kaku, M. Single quantum dot tracking reveals that individual multivalent Tatprotein transduction domain stand-alone activates machinery for lateral transport and endocytosis. (2013) *Mol. Cell. Biol.* 33(15):3036-3049 (査読あり) doi: 10.1128/MCB.01717-12
- ⑫ 神崎 展. 微小管アセチル化とエンドサイトシスが細胞進路を決める 実験医学 1月号 32(1):65-66, 2014 (査読なし)
- ⑬ 神崎 展. 細胞融合にかかわるアクチン制御システムとその可視化解析 実験医学 7月号 31(11):1749-1750, 2013 (査読なし)
- [学会発表] (計 26 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” Oct, 29, 2015 International Center, Sendai
- 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, 片平さくらホール. 仙台
- ③ 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. 徳島
- ④ Makoto Kanzaki. Quantum-dot-based Nano metrological Analysis of Intracellular Trafficking Activities in Living Cell. The Joint Symposium of 9<sup>th</sup> International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, and 6<sup>th</sup> International Workshop on Nano structures & Nanoelectronics. 2015/3/2-4, Tohoku Univ. Katahira Campus, Sendai.
- ⑤ 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)
- ⑥ Makoto Kanzaki Muscle Contractile Activity and its Beneficial Effects in Type 2 Diabetes 10<sup>th</sup> International Conference on Flow Dynamics Nov.26,2013, International Center, Sendai.
- ⑦ 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
- ⑧ 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", NH Hotel, Amsterdam (Netherlands), 7.12-14/2015
- ⑨ 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
- ⑩ 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, Stockholmssmassan center, Stockholm (Sweden) 9/14-19/2015
- ⑪ Hatakeyama, H and Kanzaki, M. Submissive Role of AS160 in Tbc1d1-mediated GLUT4 Trafficking Activation in Response to Ca<sup>2+</sup> and Insulin. 74<sup>th</sup> American Diabetes Association Scientific Meeting, Moscone Center, San Francisco, USA, 6/16/2014
- ⑫ Uda, Y., Nakagaito, Y., Fuse, H., Mori, M., and Kanzaki, M. Free Fatty Acids and Exercise Effects on Muscle Fiber Type Conversion Revealed by the "in Vitro

- Exercise Model” 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Dec. 17, 2013. Ernest N. Memorial Convention Center, New Orleans, LO, USA
- ⑬ Hatakeyama H. and Kanzaki M., 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Poster presentation. Comprehensive viewing of intracellular trafficking activities based on single molecule imaging. Dec. 17, 2013. Ernest N. Memorial Convention Center, New Orleans, LO, USA
- ⑭ Kaita S., Shinagawa R., Hatakeyama H. and Kanzaki M., 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Establishment of intracellular trafficking nanometry in single isolated myofibers. Dec. 17, 2013. Ernest N. Memorial Convention Center, New Orleans, LO, USA
- ⑮ Hatakeyama H. and Kanzaki M., FASEB Science Research Conferences -Glucose transport: Gateway for metabolic systems biology. Intracellular trafficking nanometry for quantifying GLUT4 translocation. Jul. 18, 2013. Snowmass Village, CO, USA
- ⑯ Hatakeyama H. and Kanzaki M., 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Development of dual-color simultaneous single molecule imaging system for analyzing multiple intracellular trafficking activities. Jul. 4, 2013. International Convention Center, Osaka, Japan
- ⑰ Hatakeyama H. and Kanzaki M., 73rd Scientific Session of the American Diabetes Association. Molecular basis of Tbc1d1 for acquiring temporal insulin-responsive ability triggering GLUT4 translocation. Jun. 23, 2013. McCormick Place, Chicago, IL, USA

[その他]

ホームページ等

[https://www.researchgate.net/profile/Makoto\\_Kanzaki/](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

### (3) 連携研究者

畠山裕康 (HATAKEYAMA HIROYASHU)

東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教

研究者番号：00619067