

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：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713010

研究課題名(和文)高精度ナノ計測により理解・予測するインスリン抵抗性の分子・構造基盤

研究課題名(英文) Molecular and structural basis of insulin resistance revealed by high precision nanometry

研究代表者

畠山 裕康 (Hatakeyama, Hiroyasu)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが研究開始時までに関拓していたGLUT4ナノ計測系の高精度化とそれを用いたGLUT4輸送制御システムの計測によって、2型糖尿病に特徴的なインスリン抵抗性の分子・構造基盤について理解することを目的とした。そのために、従来用いていた計測システムの持つ欠点を克服した新しい計測システムを構築した。そして、2種類の異なる分子の一分子動態を高精度に同時計測するとともに、一分子動態と細胞内構造体との同時観察に成功した。さらに、より高次な構造と機能を有するマウス骨格筋線維におけるGLUT4ナノ計測を可能とし、この組織におけるGLUT4輸送システムと運動効果の分子基盤に関し知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to understand the molecular and structural basis of insulin resistance, a characteristic etiology of type 2 diabetes, by improving the GLUT4 nanometry and performing high-precision measurements of GLUT4 trafficking regulatory systems. To achieve this, we first established a new experimental and analytical system for performing GLUT4 nanometry, with which we successfully performed simultaneous high-precision imaging of single molecule behavior of two distinct trafficking molecules and observed single molecule behavior and subcellular structures simultaneously. Furthermore, we enabled GLUT4 nanometry in isolated mice skeletal myofibers, which have higher-order structures and functions than cell line cultures, used in previous studies do. Using skeletal myofibers, combined with a cell-based reconstitution model, we revealed GLUT4 trafficking systems and the molecular basis of exercise effects on skeletal muscles.

研究分野：細胞生理学

キーワード：糖輸送体 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

インスリン応答性糖輸送担体 GLUT4 (glucose transporter 4) はインスリンや運動の示す血糖降下作用を直接担う糖輸送担体であり、刺激依存的に細胞内の貯蔵部位から細胞膜へと移行する。2型糖尿病に特徴的なインスリン抵抗性下ではこの過程が障害されており、その生理的・病態生理的重要性から極めて多数の GLUT4 細胞膜移行制御分子群が同定されている。しかし、従来の GLUT4 研究は細胞膜に現れた GLUT4 の量を指標に行われており、この手法では極めて複雑で多様な過程を経て起こる細胞内 GLUT4 輸送を詳細に解析することが不可能であった。報告者らは、従来の GLUT4 研究手法とは全く質の異なる独自の手法により新時代の GLUT4 研究を切り拓いてきた。GLUT4 ナノ計測系と名付けたこの手法では、GLUT4 の細胞外領域に myc タグを付加した myc-GLUT4 を発現させた細胞に対し、極めて安定で明るい蛍光ナノ粒子、量子ドットを結合させた抗 myc 抗体を処理して細胞内 GLUT4 を量子ドットで標識することにより細胞内の GLUT4 を一分子レベルで可視化し、その動きを位置精度 6 nm という高い精度で計測し定量評価することが可能である。この手法を用いることにより、細胞内 GLUT4 分子動態やそれに対するインスリン作用点等従来の GLUT4 研究手法では全く見出すことのできなかった知見を複数提供することに成功していた。特に、①インスリン応答性 GLUT4 輸送システムを理解する上で特に注目すべき律速過程がトランスゴルジ網に存在する「繫留システム」と「解放システム」であり、それらの決定的制御因子としての sortilin と AS160/Tbc1d4 の機能を同定したこと、これに基づき②インスリン応答性 GLUT4 輸送システムの未成熟な 3T3-L1 繊維芽細胞にわずか数種類のタンパク質を外来性に発現させることで成熟したインスリン応答性 GLUT4 輸送システムを部分的に再構成したモデル細胞を構築できること、および③3T3-L1 脂肪細胞に誘導したインスリン抵抗性下において GLUT4 分子動態が顕著に攪乱されていることを発見し、従来インスリンシグナル伝達の障害による疾患と考えられていたインスリン抵抗性に GLUT4 一分子動態障害(sorting disorder)という新たな概念を提示したこと、の3点は重要な知見である。そこで、GLUT4 ナノ計測系と再構成系とを駆使して GLUT4 輸送制御やインスリン抵抗性の分子・構造基盤についてより詳細に解析することにより、GLUT4 一分子動態というこれまでにない観点に基づくインスリン抵抗性の理解と治療戦略の開拓へと発展できる可能性が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、報告者らが研究開始時までに計測を進めていた細胞内 GLUT4 輸送システ

ムとその破綻によるインスリン抵抗性の概念について、より高精度なナノ計測系を構築することにより分子・構造基盤を理解することを目的とした。さらに成熟した GLUT4 輸送システムを再構成したモデル細胞系の高精度化による高次試料における GLUT4 一分子動態の応答や障害を詳細に計測できる系の開拓を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、従来の計測システムでは2つの異なる蛍光分子の画像を同時に取得する点において存在していた欠点を克服した上で、より高精度に GLUT4 一分子動態を計測できる新規計測システムの構築を行った。その上で、複数種の異なる分子に対する一分子動態の同時計測や一分子動態と細胞内構造体との同時観察を試みた。本研究開始時には高次試料として分化した 3T3-L1 脂肪細胞の利用を想定していたが、研究期間中にマウスより骨格筋線維を単離する技術を習得する機会を得たため、この標本と上記計測システムを用いて GLUT4 ナノ計測を可能とする系を構築し、刺激による GLUT4 挙動変化を計測するとともに、GLUT4 輸送システムの再構成系を組み合わせながら骨格筋における GLUT4 輸送制御について詳細な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規計測システムの構築と最適化

研究開始初年度に、従来使用していた計測システムに存在した欠点を改善し、より高感度かつ柔軟に複数の蛍光分子像を取得でき

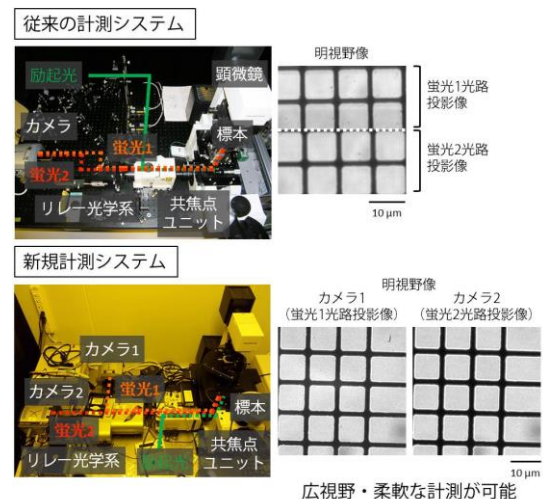


図1 構築した新規計測システム

従来の計測システムでは、2つの異なる蛍光分子の画像を1台のカメラで取得することによる複数の欠点が存在した。新規計測システムでは2台のカメラを利用して画像を取得することによりこれらの点を改善した。その他の改善点も含め、新規システムでは従来に比べより高感度で柔軟な計測が可能。写真右側は各システムにて取得したマイクロメータの明視野像を示す。

る新たな顕微鏡システムを導入した (図 1)。導入当初はピクセルサイズや2台のカメラ間の同期に問題があったが、これらの点を順次解決していくことにより、現在までに研究開始当初に想定していた性能以上の画像を取得することができるシステムの構築を達成した。

(2) 複数種の分子群の同時計測

(1)で構築した計測システムを用い、複数種の分子群の同時計測を試みた。まず、既に従来システムにて計測実績があった GLUT4 とトランスフェリン受容体 (一般的なリサイクリングタンパク質) の一分子動態の同時計測を sortilin を発現させた 3T3-L1 繊維芽細胞にて行うことにより、新規計測システムの検証を行った。その結果、従来の計測システムで得られた結果と同様、GLUT4 分子動態の選択的な抑制が観察され、本システムでも従来と同様の計測が行えることを確認した。続いて蛍光タンパク質を利用した細胞内構造体の可視化と GLUT4 一分子動態の同時計測を行うために myc-GLUT4-EGFP を発現させた 3T3-L1 脂肪細胞を用い、インスリン刺激によって誘導される GLUT4 細胞膜移行過程における GLUT4 一分子挙動と構造変化との同時観察を試みた。その結果、これらの同時観察は可能であったものの、現状では挙動変化と構造変化との間に明確な関連を見出すには至っていない。これは、3T3-L1 脂肪細胞における GLUT4 の局在が極めてヘテロで複雑なものであるために、生理的に意義深い変化を見出しづらいことが理由として考えられる。この点をより詳細に解析するためには、より高次ではあるがより明瞭な細胞内構造体を有する骨格筋線維を用いることが極めて有効であると考えられたため、以下に示すマウス骨格筋線維を用いた GLUT4 ナノ計測を精力的に進めることとした。なお、(1)で構築した顕微鏡システムは他の研究目的でも非常に有効に活用しており、当該研究において細胞内構造体と一分子挙動との関係について明確な知見を得ることに成功している。

(3) マウス骨格筋線維における計測

骨格筋は生体における最大の糖代謝器官である。この組織において GLUT4 はインスリンのみならず運動による血糖降下作用を直接担う。運動はそれ自体が GLUT4 細胞膜移行を誘導するのみならず、インスリン感受性を増強する作用を持つ (運動効果) ことが知られている。しかし、骨格筋線維は他の細胞とは全く異なる特徴的な高次構造を有しており、そのことが詳細な GLUT4 輸送研究を妨げてきた。このような標本において GLUT4 ナノ計測系は極めて有効な手法と考えられる。そこで、申請者らの研究グループにて樹立した myc-GLUT4-EGFP トランスジェニックマウスを用い、このマウスよりヒラ

メ筋および長趾伸筋を単離し、さらに酵素処理によって単一筋線維を調製した上で、この標本における GLUT4 ナノ計測系の確立と挙動計測を行った。細胞内 GLUT4 の量子ドットによる標識は、既に培養細胞において確立していた手法を参考に処理条件 (濃度・時間) を最適化して行った。また、観察時の細胞外液等様々な基礎検討により最適化を行ったことにより、マウス単離骨格筋線維において GLUT4 一分子挙動をナノ計測するために十分な程度の量子ドット蛍光を観察できる条件を設定することができた (図 2A)。また、同様にトランスフェリン受容体についても一分子挙動のナノ計測を可能にするための条件設定を行い、GLUT4 との比較を行うことが可能となった。その結果、ヒラメ筋、長趾伸筋いずれにおいても、トランスフェリン受容体比べて GLUT4 の動きは抑制されており、培養細胞にて見出されていたように GLUT4 選択的な繫留機構の存在が示唆された。そしてここにインスリン刺激を与えることによってトランスフェリン受容体の挙動には有意な変化が認められなかった一方で GLUT4 は動きの顕著な増大が認められ、やはり GLUT4 はインスリンによって繫留機構から解放されるものと考えられた (図 2B)。

(4) モデル系を用いた運動効果の分子基盤解析

インスリンや運動によって誘導される GLUT4 細胞膜移行過程では、上流における生化学的プロセスは下流において GLUT4 輸送という物理的プロセスへと変換される必要がある。この過程を担う重要な分子が TBCファミリー Rab GTPase 活性化タンパク質

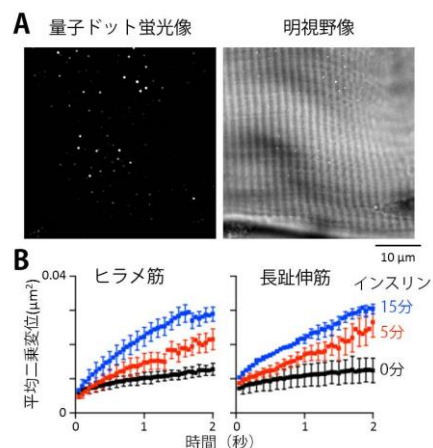


図 2 マウス単離骨格筋線維における GLUT4 ナノ計測

A) 長趾伸筋由来骨格筋線維において myc-GLUT4 を量子ドットで標識したときの蛍光像 (左) と明視野像 (右)。
B) ヒラメ筋および長趾伸筋由来の骨格筋線維における GLUT4 挙動へのインスリンの効果。インスリン刺激前 (黒) および 5 分後 (赤)、15 分後 (青) の平均二乗変位 (傾きが大きいほど挙動がより活発) を示す。

(TBC/RabGAPs)である AS160 と Tbc1d1 である。報告者らはこれまでに、3T3-L1 繊維芽細胞への myc-GLUT4 と sortilin を含む数種類のタンパク質の外來性発現によって構築することに成功した GLUT4 輸送システムの再構成モデルを用い、これら TBC/RabGAPs の個別の機能を明確に解明していた。すなわち、AS160 がインスリン応答性の GLUT4 解放過程を制御するのに対し、Tbc1d1 は AMPK 活性化や細胞内カルシウム濃度上昇のような運動模倣刺激を予め与えておくことによって初めて一過的なインスリン応答性を獲得する。AS160 のみ発現する脂肪細胞に対し、骨格筋にはこの両者が共に発現しており、骨格筋におけるこれらの分子群が司る GLUT4 輸送制御はより複雑である可能性が示唆される。そこで報告者らは、モデル系を用いた詳細な計測によってこれら 2 つの TBC/RabGAPs が共存する条件下における GLUT4 輸送制御について詳細に解析した。その結果、これら両者の共存下においては Tbc1d1 が支配的に機能する一方で、AS160 は Tbc1d1 を介した GLUT4 輸送制御において外來刺激に対する感受性を厳密に調節することを見出した。例えば、インスリン存在下において細胞内カルシウム濃度の一過的上昇により誘導される GLUT4 解放は、AS160 を豊富に発現させた細胞ではより速く誘導された。さらに、AMPK 活性化刺激によるインスリン応答性獲得も、AS160 と Tbc1d1 の両者を発現させた細胞ではインスリン刺激後 5 分という短い時間経過において顕著に誘導された。したがって、運動効果(運動後のインスリン感受性増強)の少なくとも一部には、AS160 と Tbc1d1 による協奏的な作用が重要な役割を担うことが示唆される。重要なことに、AS160 によるこのような調節作用は、Tbc1d1 に存在する重篤肥満と強く相関する変異によって完全に消失し、病態との関連が示唆される。このように、申請者らが構築した再構成系は、分子基盤の詳細な解析が困難な高次標本における GLUT4 分子動態について、個別の輸送過程を区別しながら詳細に計測することを可能にする極めて優れたモデル系であることが分かる。現状、これらの知見について論文の執筆を進めるとともに、AS160 と Tbc1d1 による協奏的な調節作用による骨格筋 GLUT4 挙動への作用についてさらなる検証を進めている。

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 2 件)

- ① Hatakeyama H, Kanzaki M: Development of dual-color simultaneous single molecule imaging system for analyzing multiple intracellular trafficking activities. Conf

Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 査読有, 2013, 2013, 1418-1421, doi:

10.1109/EMBC.2013.6609776

- ② Suzuki Y, Roy CN, Promjunyakul W, Hatakeyama H, Gonda K, Imamura J, Vasudevanpillai B, Ohuchi N, Kanzaki M, Higuchi H, Kaku M: Single quantum dot tracking reveals that an individual multivalent HIV-1 Tat protein transduction domain can activate machinery for lateral transport and endocytosis. Mol Cell Biol., 査読有, 2013, 33, 3036-3049, doi: 10.1128/MCB.01717-12

[学会発表] (計 19 件)

- ① 細谷 雅浩・堰合 茂智・島山 裕康・神崎 展、マウス走行運動モデルと電気パルス強収縮モデルを用いた収縮骨格筋の生物学的応答の解析—GLUT4 制御に関わる分子基盤について—, 第 4 回骨格筋生物学研究会、2016 年 3 月 1 日、松本大学 (長野県松本市)
- ② 島山 裕康・神崎 展、AS160 vs Tbc1d1: Cooperative determination of insulin-responsive GLUT4 trafficking activity after exercise-mimetic stimuli, Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2015 年 9 月 14-19 日、ストックホルム (スウェーデン)
- ③ 島山 裕康、一分子計測で迫る糖輸送体分子の細胞内輸送システム、東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター第 14 回講演会 バイオイメージングセミナー〜細胞イメージング技術が切り拓く医工連携研究の最前線〜、2015 年 8 月 3 日、東海大学湘南キャンパス (神奈川県平塚市)
- ④ 島山 裕康・神崎 展、Coordinated actions of AS160 and Tbc1d1 as a determinant of insulin sensitivity in GLUT4 trafficking, FASEB Science Research Conference "Glucose Transport: Gateway to Metabolic Systems Biology", 2015 年 7 月 26-31 日、ビッグスカイ (アメリカ合衆国)
- ⑤ 細谷 雅浩・宇田 侑平・島山 裕康・神崎 展、Involvement of mechanosensitive transcriptional network in contraction-dependent muscle fiber type conversion analyzed using the "in vitro exercise model", Cell Symposia "Exercise Metabolism", 2015 年 7 月 12-14 日、アムステルダム (オランダ)
- ⑥ 島山 裕康、「生きている」をみる・はかる、東北大学学際科学フロンティア研究所 全領域合同研究交流会、2015 年 5 月 14 日、東北大学 (宮城県仙台市)

- ⑦ 梶山 裕康・神崎 展、GLUT4 一分子挙動計測に基づく TBC/RabGAPs が司る運動効果の分子基盤解析、第 3 回骨格筋生物学研究会、2015 年 3 月 7 日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑧ 梶山 裕康・海田 翔平・長瀬 瑛介・神崎 展、マウス単離骨格筋ファイバーにおける細胞内小胞輸送動態の一分子計測、第 3 回骨格筋生物学研究会、2015 年 3 月 7 日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑨ 細谷 雅浩・梶山 裕康・土谷 昌広・神崎 展、運動依存性 GLUT4 トランスロケーション機構の解析—電気パルス刺激によるマウス骨格筋の強収縮モデルを用いた試み—、第 3 回骨格筋生物学研究会、2015 年 3 月 7 日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑩ 梶山 裕康・神崎 展、Submissive Role of AS160 in Tbc1d1-mediated GLUT4 Trafficking Activation in response to Ca^{2+} and Insulin、74th Scientific Sessions of the American Diabetes Association、2014 年 6 月 16 日、サンフランシスコ（アメリカ合衆国）
- ⑪ 梶山 裕康・神崎 展、一分子イメージングに基づく細胞内輸送システムの定量計測、バイオイメージインフォマティクスワークショップ 2014、2014 年 6 月 9-10 日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）
- ⑫ 梶山 裕康・神崎 展、インスリン応答性 GLUT4 輸送制御における TBC1D family Rab GTPase 活性化タンパク質群の機能解析、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 24 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
- ⑬ 海田 翔平・品川 遼太・梶山 裕康・神崎 展、Establishment of intracellular trafficking nanometry in single isolated myofibers、American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting、2013 年 12 月 17 日、ニューオーリンズ（アメリカ合衆国）
- ⑭ 梶山 裕康・神崎 展、Comprehensive viewing of intracellular trafficking activities based on single molecule imaging、America Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting、2013 年 12 月 17 日、ニューオーリンズ（アメリカ合衆国）
- ⑮ 梶山 裕康、分子動態に基づく細胞内輸送システムの定量解析、北海道大学電子科学研究所 第 2 回蛍光ミニシンポジウム、2013 年 9 月 20 日、北海道大学（北海道札幌市）
- ⑯ 梶山 裕康・神崎 展、Intracellular trafficking nanometry for quantifying GLUT4 translocation、FASEB Science Research Conference “Glucose transport: Gateway for metabolic

systems biology”、2013 年 7 月 14-18 日、スノウマスビレッジ（アメリカ合衆国）

- ⑰ 梶山 裕康・神崎 展、Development of dual-color simultaneous single molecule imaging system for analyzing multiple intracellular trafficking activities、35th Annual International Conference of IEEE Eng Med Biol Soc、2013 年 7 月 4 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
- ⑱ 梶山 裕康・神崎 展、Molecular basis of Tbc1d1 for acquiring temporal insulin-responsive ability triggering GLUT4 translocation、73rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association、2013 年 6 月 23 日、シカゴ（アメリカ合衆国）
- ⑲ 梶山 裕康・神崎 展、Tbc1d1 が示すインスリン不応性およびインスリン応答性 GLUT4 輸送制御とその遷移による「インスリン応答性獲得」の分子基盤、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 18 日、熊本ホテルキャッスル（熊本県熊本市）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶山 裕康 (HATAKEYAMA, Hiroyasu)
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