

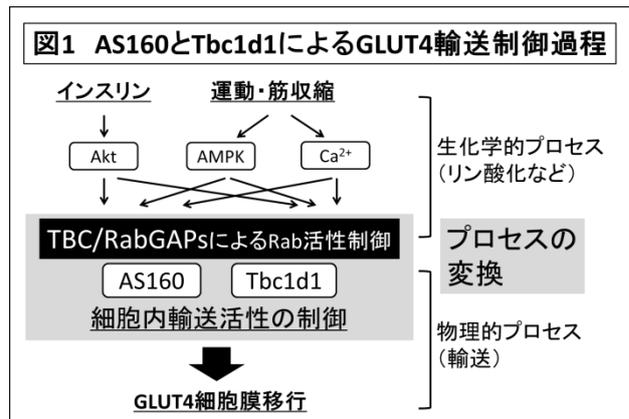
Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部
氏 名	畠山 裕康
研究テーマ	GLUT4 一分子動態に基づく骨格筋細胞における GLUT4 輸送システムの包括的定量解析

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

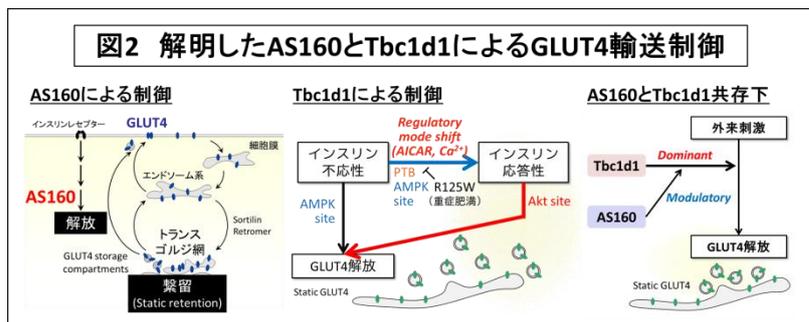
骨格筋においてインスリンと運動は、糖輸送体 GLUT4 の細胞膜移行を誘導することにより血糖降下作用を示す。この過程を制御する重要な鍵分子が TBC ファミリー RabGAP である AS160 と Tbc1d1 である(図 1)。これらの分子の生化学的性質はよく知られていたが、細胞内における GLUT4 輸送の制御様式はほとんど知られていない。これは、従来の GLUT4 輸送研究では細胞内における GLUT4 挙動を高精度に計測することができなかったためである。



私たちはこれまでに、細胞内における GLUT4 の一分子挙動をナノ計測し、その動態を定量評価できる全く新しい手法を独自に開拓した。そして、インスリン応答性 GLUT4 輸送システムとその分子基盤の定量記述やインスリン抵抗性におけるソーティング障害の概念提示等多数の知見を得たのみならず、培養細胞への成熟した GLUT4 輸送システムの再構成にも成功した(MBoC 2010, Traffic 2011)。そして、これらの手法により AS160 と Tbc1d1 が示す GLUT4 輸送制御過程を完全に区別して解明してきた(Traffic 2011, MBoC 2013)(図 2)。すなわち、AS160 と Tbc1d1 の輸送制御様式は全く異なり、AS160 がインスリン応答性の GLUT4 解放を制御する一方で、Tbc1d1 は「インスリン不応性」と「インスリン応答性」の二つの異なる GLUT4 解放制御様式を持ち、運動模倣刺激によって制御様式が遷移して初めてインスリン応答性を獲得する。Tbc1d1 の示すこの特徴的な GLUT4 輸送制御様式が、運動によるインスリン感受性の向上 (GLUT4 細胞膜移行の増強) という「運動効果」を担う可能性を強く示唆する。

重要なことに、骨格筋には AS160 と Tbc1d1 が共存し、骨格筋間でそれらの発現量比が大きく異なる。したがって、骨格筋における GLUT4 輸送制御にはこれら二つの分子間での機能的相互作用を考える必要があり、それが高い運動効果や各骨格筋におけるインスリン感受性の違いを決定している可能性が高い。そこで本研究では、これら両者の共存下における GLUT4 輸送制御に関し、ナノ計測系と再構成系とを用いた計測を行った。その結果、両者の共存下においては Tbc1d1 の作用が支配的であった。ただし、AS160 が存在することにより外来刺激に対する GLUT4 解放がより速く起こり、AS160 は Tbc1d1 を介した GLUT4 解放制御過程を調節する作用を有することが示唆される(図 2)。骨格筋ではこのような複雑な制御様式が運動効果に関与する可能性が示唆される。

現在、この仮説をさらに検証するために、単離骨格筋線維における GLUT4 ナノ計測やより高次標本における高精度イメージング等複数の手法を用いた GLUT4 輸送の計測を進めている。



Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部
氏 名	畠山 裕康
研究テーマ	GLUT4 一分子動態に基づく骨格筋細胞における GLUT4 輸送システムの包括的定量解析

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

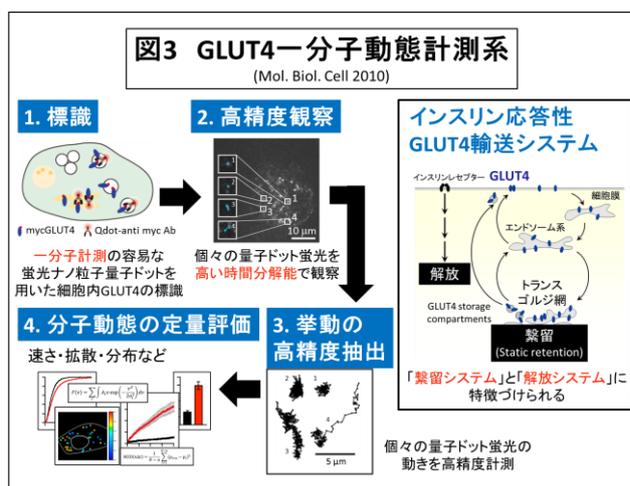
【概要】

本研究では、インスリンや運動によって促進される細胞内への糖取り込みを担う糖輸送体タンパク質 GLUT4 の骨格筋細胞における細胞内輸送システムを「GLUT4 一分子動態」というこれまでにない視点に基づいて包括的に理解することを目的とした。そのために、私たちがこれまでに成熟した GLUT4 輸送システムを構成する主要因子として機能同定することに成功してきた二つの TBC family Rab GTPase 活性化タンパク質、AS160/Tbc1d4 と Tbc1d1 の共存下における GLUT4 動態を私たちが独自に確立してきた高精度計測系を駆使して計測し、これら二つの制御因子の共存下における GLUT4 輸送制御様式を明確に解明するとともに、運動効果(運動によるインスリン応答性向上)の分子基盤と病態との関連について興味深い示唆を得た。また、従来私たちが計測に利用してきた培養細胞のみならずマウス単離骨格筋線維における一分子動態計測にも成功したとともに、さらに生体イメージングの技術等組み合わせながら幅広い階層にて GLUT4 挙動計測を進めている。

【背景・目的】

TBC ファミリー Rab GTPase 活性化タンパク質(TBC/RabGAPs)である AS160/Tbc1d4 と Tbc1d1 は、運動やインスリンが示す血糖降下作用を直接担う糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜移行過程において、上流生化学シグナルを GLUT4 輸送という物理的プロセスへと変換する際に機能する重要な制御因子群である(研究成果報告書「概要」図 1 参照)。これら TBC/RabGAPs は決して新しい分子群ではなく、既に多くの知見が得られているが、それはあくまで「シグナル伝達分子」としての生化学的性質に注目した場合であり、これらの分子群の本来の機能である「GLUT4 輸送制御因子」としての機能はほとんど解明されていなかった。これは、TBC/RabGAPs による GLUT4 輸送制御様式を厳密に解析するためには、細胞内における GLUT4 挙動を正確に計測する必要があるが、従来はこれを可能とする方法が存在しなかったためである。

私たちはこれまでに、細胞内における GLUT4 輸送システムを高精度に定量計測すべく、極めて安定で明るい蛍光ナノ粒子、量子ドットを用いることによって、細胞内における GLUT4 の一分子挙動を極めて高い精度で計測できる新しい実験系を独自に確立してきた(図 3)(Mol. Biol. Cell 2010)。この手法を用いることにより、私たちはこれまでにインスリン応答性 GLUT4 輸送システムとその分子基盤や GLUT4 輸送システムの破綻によるインスリン抵抗性の発症という新規概念の提示等、従来の手法では全く見出すことのできなかった新たな知見を複数見出すことに成功してきた(Mol. Biol. Cell 2010, Traffic 2011, Mol. Biol. Cell 2013)。また、私たちは GLUT4 輸送システムの未成熟な未分化 3T3L1 繊維芽細胞にわずかに二つの因子(sortilin と AS160/Tbc1d4)を外来性に発現させるだけで



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

成熟したインスリン応答性 GLUT4 輸送システムを再構成できることを見出し、このモデル系を用いることによって二つの TBC/RabGAPs の機能をそれぞれ完全に区別して明確に解明することに成功してきた。すなわち、AS160/Tbc1d4 はインスリンに応答した GLUT4 の「解放」を制御する一方で、Tbc1d1 には異なる二つの GLUT4 解放制御様式、「インスリン不応性」と「インスリン応答性」とが存在し、AMPK 活性化や細胞内カルシウム濃度上昇など運動を模倣する刺激を予め与えることによって初めてインスリン応答性を獲得する(研究成果報告書「概要」図 2 参照)。Tbc1d1 の示すこのような特徴的な制御様式が運動効果、すなわち運動後のインスリン感受性増強への関与が示唆される。重要なことに、Tbc1d1 の N 末 PTB ドメインに存在する重症肥満関連変異ではこのようなインスリン応答性獲得が選択的に抑制されており、この過程の病態生理的重要性も示唆した。

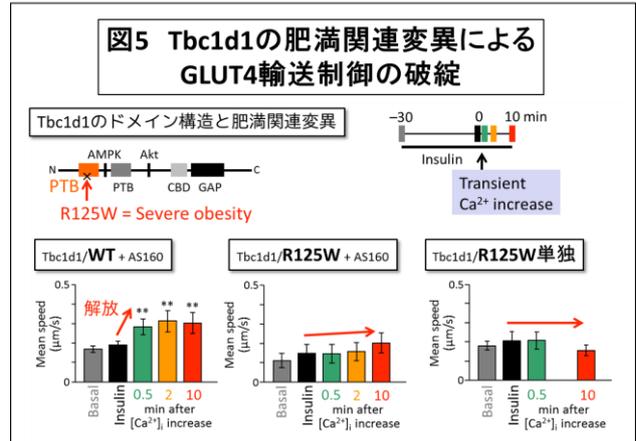
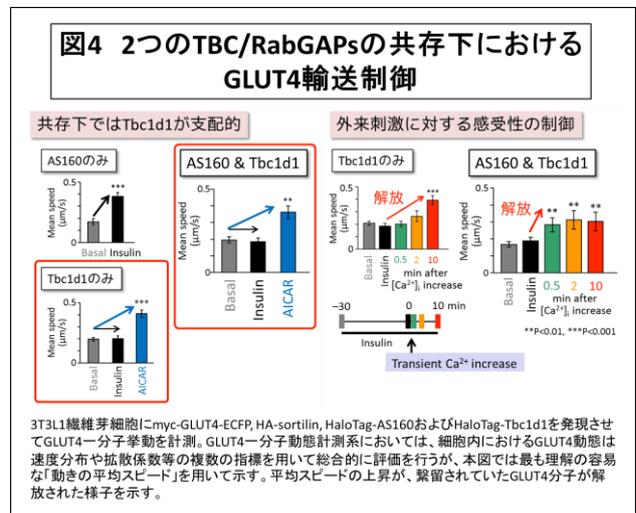
さて、主なインスリン標的組織である脂肪組織と骨格筋において、脂肪組織には AS160/Tbc1d4 のみが主に発現する一方で、骨格筋には AS160/Tbc1d4 と Tbc1d1 の両者が共存する。また、各骨格筋においてこれら両者の量比が大きく異なることも報告されている。したがって、骨格筋において AS160/Tbc1d4 および Tbc1d1 の両者によって制御される GLUT4 輸送過程はより複雑であることが示唆される。そこで本研究では、私たちがこれまでに構築してきた GLUT4 一分子動態計測系と成熟した GLUT4 輸送システムを培養細胞に再構成したモデル系を用いて詳細な計測を行うことにより、AS160/Tbc1d4 と Tbc1d1 共存下における GLUT4 輸送制御について明確に解明することを目的とした。また、より高次の標本、すなわちマウス単離骨格筋線維における GLUT4 一分子動態計測系の確立を目指すとともに、様々なイメージング技術を用いた幅広い階層における GLUT4 挙動計測を試みた。

【結果・考察】

① AS160/Tbc1d4 と Tbc1d1 共存下における GLUT4 輸送制御—モデル系を用いた計測

3T3L1 繊維芽細胞に AS160/Tbc1d4 と Tbc1d1 の両者を発現させたモデル系を用いて GLUT4 一分子動態を計測した結果、両者の共存下においては Tbc1d1 の機能が支配的であることを見出した(図 4 左)。すなわち、Tbc1d1 単独存在下と同様に、インスリンによる GLUT4 解放は示されない一方で AMPK 活性化による顕著な GLUT4 解放を誘導した。Tbc1d1 発現量を様々変化させながら計測することにより、Tbc1d1 によるインスリン応答性 GLUT4 解放の抑制は発現量依存的に示されることも見出した。両者の共存下において AMPK 活性化や細胞内カルシウム上昇のような運動模倣刺激を与えたところ、Tbc1d1 単独の場合と同様にインスリン応答性を獲得し、単独発現時に認められた Tbc1d1 の特徴的な輸送制御様式は共存下においても機能する。ただしこのとき、Tbc1d1 単独で存在するときと比べ、AS160/Tbc1d4 が共存することによって、より早い時間経過で顕著な GLUT4 解放が誘導された。すなわち、これら両者が共存することによって、外来刺激に対する感受性が厳密に制御されている可能性が示唆される。

続いて、Tbc1d1 の N 末 PTB ドメインに存在する肥満関連変異(R125W)による効果を調べたとこ

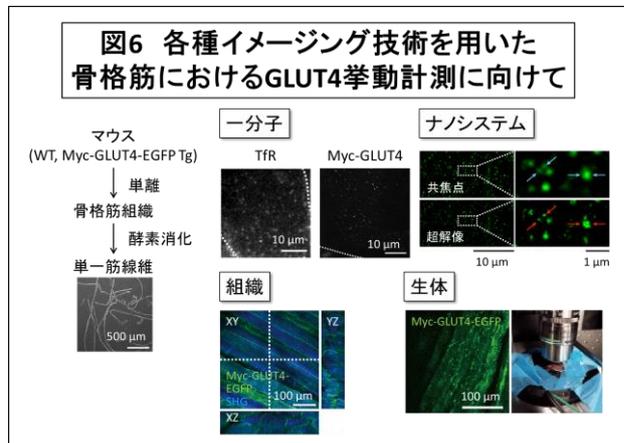


目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

る、野生型で見られたようなインスリン応答性獲得は完全に消失していた(図 5)。このような障害は PTB ドメインの機能を抑制すると考えられる変異によっても見出されたため、これら二つの TBC/RabGAPs には Tbc1d1 の PTB ドメインを介した何らかの機能的相互作用の存在が示唆される。

② マウス単離骨格筋線維における一分子動態計測系の確立

①の計測は全て培養細胞に成熟した GLUT4 輸送システムを再構成したモデル系を用いたものであったが、このようなモデル系から得られた知見が骨格筋における GLUT4 挙動とどのように関連するかについても計測を行うことが必須となる。そこで、単一骨格筋線維における一分子挙動計測系を確立すべく、まずこの標本の単離法を確立した。そして、まず野生型マウスから単離した単一筋線維において内在性のトランスフェリン受容体を量子ドットで標識し、その一分子蛍光を可視化することに成功した(図 6)。さらに、研究グループにおいて樹立した



Myc-GLUT4-EGFPトランスジェニックマウスから単離した単一筋線維において、図 3 に示した方法と同様の手法にて標識を行うことによって、量子ドットで標識された GLUT4 の一分子蛍光の可視化にも成功した。現在までに、条件を最適化することにより効率的に量子ドット蛍光を検出することを可能としたとともに、複数の刺激による挙動変化の検出にも成功している。今後さらに、モデル系において得られた知見に基づく計測を進める予定である。

【今後の課題】

これまでに、モデル系を用いた極めて高精度な GLUT4 挙動計測により、細胞内に構築されたインスリン応答性 GLUT4 輸送システムや運動効果の分子基盤について様々な知見を得ることに成功してきた。このような GLUT4 挙動が生体や組織においてどのように反映されているか知ることで、様々な視点から GLUT4 輸送制御について理解することができるものと考えられる。現在、生体・深部組織イメージングや超解像イメージング等複数の光学イメージング技術を用いることによって、GLUT4 の一分子挙動計測だけでなく、生体や組織における GLUT4 挙動や、これらの間に存在するナノシステム(超分子複合体)について計測ができる実験系の確立を進めている(図 6)。これら複数の手法を組み合わせながら計測を行うことによって、GLUT4 輸送制御について包括的に理解していくことが今後の課題である。

**Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部
氏 名	畠山 裕康

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	
2	
3	
4	

② <論文 PDF 添付なし>

1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015 年 9 月 18 日	欧州糖尿病学会、 <u>畠山 裕康</u> ・神崎 展、AS160 vs. Tbc1d1: Cooperative determination of insulin-responsive GLUT4 trafficking activity after exercise-mimetic stimuli
2	2015 年 8 月 3 日 (招待)	東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター第 14 回講演会、 <u>畠山 裕康</u> 、一分子計測で迫る糖輸送体分子の細胞内輸送システム
3	2015 年 7 月 26-31 日	FASEB Scientific Research Conferences – Glucose Transport: Gateway to Metabolic Systems Biology、 <u>畠山 裕康</u> ・神崎 展、Coordinated actions of AS160 and Tbc1d1 as a determinant of insulin sensitivity in GLUT4 trafficking
4	2015 年 5 月 14 日	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、 <u>畠山 裕康</u> 、「生きている」をみる・はかる
5	2015 年 3 月 7 日	第 3 回骨格筋生物学研究会、 <u>畠山 裕康</u> ・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
6	2015 年 3 月 7 日	第 3 回骨格筋生物学研究会、 <u>畠山 裕康</u> ・海田 翔平・長渕 瑛介・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
7	2015 年 3 月 7 日	第 3 回骨格筋生物学研究会、細谷 雅浩・ <u>畠山 裕康</u> ・土谷 昌広・神崎 展、運動依存性 GLUT4 トランスロケーション気候の解析—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—
8	2014 年 6 月 16 日	米国糖尿病学会、 <u>畠山 裕康</u> ・神崎 展、Submissive Role of AS160 in Tbc1d1-mediated GLUT4 Trafficking Activation in response to Ca ²⁺ and Insulin
9	2014 年 6 月 9-10 日	バイオイメージングインフォマティクスワークショップ 2014、 <u>畠山 裕康</u> ・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
10	2014 年 5 月 24 日	日本糖尿病学会、 <u>畠山 裕康</u> ・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
11	2014 年 2 月 20-22 日	Vivid Workshop 2014、 <u>畠山 裕康</u> 、分子動態に基づく細胞内輸送システムの定量計測
12	2013 年 12 月 17 日	米国細胞生物学会、 <u>畠山 裕康</u> ・神崎 展、Comprehensive viewing of intracellular trafficking activities based on single molecule imaging
13	2013 年 12 月 17 日	米国細胞生物学会、海田 翔平・品川 遼太・ <u>畠山 裕康</u> ・神崎 展、Establishment of intracellular trafficking nanometry in isolated mouse myofibers
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿準備中	本助成により得られた TBC/RabGAPs 共存下における知見に関する論文
2		
3		
4		