43　キネシンモーターのかかわる代謝疾患の分子機構の解析	田中　庸介

【目的】糖尿病は生活習慣病のうち最大のものであり、わが国における患者とその予備軍の数は 1,000 万人を超えている。病態の核心を担う膵β細胞からのインスリン分泌不全の機序には不明な点が多く、その根本的な治療法は開発途上にある。また非アルコール性肝疾患においては、健康診断を受ける成人の 2～3 割が NAFLD、そのうち約 1～2 割が NASH、さらにそのうち 5～20%が 5～10 年で肝硬変に至るが、NASH/NAFLD の病態生理ならびに治療法は未だほぼ不明である。本研究では、細胞内物質輸送に携わるキネシン分子モーター欠失マウスがこれら代謝疾患の表現型を示す予備的成果から、これらのマウスならびにその初代培養細胞・ノックダウン細胞を実験系として、細胞内物質輸送の新たな観点から疾患病態生理の解明・新規治療法の開発をめざすことを目的とした。

【方法・結果】以下の 2 つの相互に関連するテーマに沿い研究を行った。

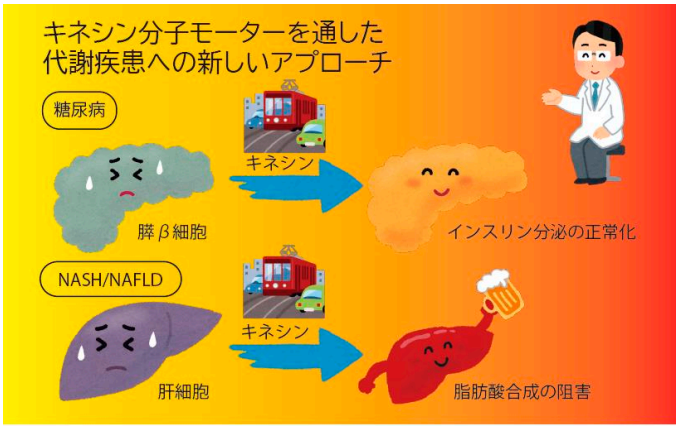
1.　キネシン分子モーターの膵β細胞刺激-分泌連関における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウスはインスリン分泌不全による耐糖能異常を呈しており、膵島還流試験等により特に第二相のインスリン分泌に障害を生じていることが明らかとなった。またβ細胞の刺激ー分泌連関を詳細に解析したところ、グルコース刺激時の電気生理学的あるいは細胞内カルシウムの反応性が顕著に低下していた。そこで、ノックアウトマウスβ細胞およびノックダウン MIN6 細胞について、免疫沈降法等の生化学的手法、近接ライゲーションアッセイ法、超高解像顕微鏡等の形態学的手法を用いて解析し、カルシウムチャネルタンパク質群がタンパク質分解経路の亢進によって不安定化していることを示す結果を得た。これらの成果は、キネシン分子モーターのインスリン分泌制御における新たな役割を示唆し、2 型糖尿病の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

2.　キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウス肝は進行性の脂肪肝・肝線維症の知見を生じ、ヒト遺伝性 NASH 家系においてもキネシン遺伝子変異が同定された。またヒト HepG2 細胞においてキネシン遺伝子のノックダウンを行うと、脂肪滴の顕著な貯留が生じた。表現型レスキュー実験により、キネシン中間ドメインがこの脂肪滴貯留に必要十分であるとの知見を得た。次にこの中間ドメインの遺伝子断片を用いて、BioID 法により結合タンパク質を精製し質量分析法により解析したところ、カルボキシル基転移酵素群が新規キネシン結合タンパク質として同定され、さらにノックアウト肝において酵素活性の異常な上昇を示唆するデータを得た。ヒト線維芽細胞をレトロウイルスベクターにより肝 iHep 細胞に分化させたところ、患者変異群では確かに脂肪滴貯留が亢進しており、これに対してキネシン中間ドメインを強制発現することで表現型の改善が可能になった。これらの成果は、キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新たな役割を示唆し、NASH/NAFLD の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

キネシン分子モーターを通した代謝疾患への新しいアプローチ



43. キネシンモーターのかかわる代謝疾患の分子機構の解析

田中　庸介

東京大学 大学院医学系研究科 細胞構築学講座

Key words：キネシン，代謝疾患，糖脂質代謝，糖尿病，NASH/NAFLD

緒　言

我々のすべての細胞は細胞膜、細胞突起、細胞質深部、細胞核などの異なった機能を持つ多数の部分から成っており、キネシン分子モーターはその間を膜小器官や超分子コンプレックスの形で生体物質をダイナミックに輸送することで、細胞のシグナル伝達・機能分化・恒常性の要となっている。これまでのキネシン分子モーターノックアウトマウスの個体・細胞レベルの解析から、1. 一種類のキネシンの欠失によって細胞内のオルガネラの配置がドラスティックに変化すること［1］、2. キネシンが細胞接着分子・レセプター型ないし非レセプター型チロシンキナーゼ・Rac1GEF・線毛コンポーネント等を輸送・係留することによって細胞内シグナル伝達の新しいモジュレーターとなっていること［2, 3］、3. その結果としてキネシンの機能不全が神経難病・2 型糖尿病発症における脂肪毒性・左右逆位症・感覚麻痺・疼痛の遷延・PTSD 等の重要な疾患を惹起すること［4〜7］が明らかとなってきている。しかしキネシン分子モーターの糖尿病・非アルコール性脂肪肝炎（NASH）・非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）等の代謝疾患における細胞・個体レベルでの役割に関しては、細胞が比較的小型であり拡散によって物質の輸送が可能な範囲であるため、これまでの神経細胞をモデルとした長距離輸送（150 μm 以上）とは異なったパラダイムから切り込む必要があり、国内外を問わずほとんど萌芽的な段階である。そこで本研究においては特にキネシン分子モーターの 1. 膵ベータ細胞からのインスリン分泌機構を調節して特に第二相の分泌を維持する役割、ならびに 2. 肝細胞において脂質代謝を調節して NASH/NAFLD 等の肝疾患を予防する役割、の両者の分子機構解明について、超高解像度顕微鏡・マウス分子遺伝学・質量分析法・ティッシュエンジニアリング等最先端の技術を用いて新たな角度からのアプローチを行い、小型細胞におけるキネシンの役割についての新しい細胞生物学的パラダイムに到達するとともに、キネシン細胞生物学の観点から、これら代謝疾患の新規治療法開発に資することを目的とした。

まず、糖尿病は代表的な生活習慣病の一つであり、膵ベータ細胞からのインスリン分泌の障害はその病態の上で大きな位置を占めている。正常ヒト膵ベータ細胞ではグルコース刺激時において二相性のインスリン分泌を示し、食後数十分にわたって持続的にインスリンが分泌されることによって血糖のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている。特に初期の 2 型糖尿病においては、第一相のインスリン分泌の特異的な低下を第二相のインスリン分泌がかろうじて補填することによって血糖ホメオスタシスが保たれており［8］、第二相のインスリン分泌過程の保護は 2 型糖尿病の増悪を食い止める重要な創薬ターゲットである。この第二相の分泌の維持に関しては、糖代謝の亢進による ATP/ADP 比の上昇が細胞膜上の K_{ATP} チャネルの閉鎖をもたらし、膜電位の脱分極による電位依存性カルシウムチャネルの開口による細胞内カルシウムイオンの増加が、インスリン顆粒の持続的な開口放出を惹起するような刺激－分泌連関が重要な役割を果たしている［9］。これまでに、我々はキネシン分子モーターノックアウトマウスの膵β細胞において刺激－分泌連関の一部に障害が起こっている証拠を得ており、本研究においてはさらにこの系を　用いて、刺激－分泌連関の新たな素過程を細胞生物学的に解析することを第一の目的とした。

一方、NASH/NAFLD は治療抵抗性で予後不良の主要な肝疾患でありその病態生理にはまだ不明な点が多い［10］。これまでに我々はヒト NASH 患者家系のゲノムから特異的なキネシン分子モーターナンセンス変異を検出しており、ノックアウトマウス肝において NASH 様の脂肪貯留を検知、また培養細胞のノックダウン系を用いこの病態モデルを構築したところ、実際に VLDL 分泌不全と中性脂肪の貯留を生じている。本研究においてはこれらの系を用いて、キネシン分子モーターが制御する VLDL 分泌の素過程の分子機構を細胞生物学的に解析することを第二の目的とした。

以上を通じて、キネシン分子モーターの機能低下が関連する二つの重要な代謝疾患の素過程の解明に焦点をしぼり、小型細胞のシグナル伝達制御におけるキネシン分子モーターの役割の新規パラダイムを確立し、併せて糖尿病・NASH/NAFLD の病態にかかわる新しい分子機構の解明ならびにその新規治療法確立のためのモデル系の開発を目的として研究を進めた。

方法および結果

1. キネシン分子モーターの膵β細胞刺激-分泌連関における新しい役割の解明

これまでの予備的実験から、キネシン分子モーターのノックアウトマウスはインスリン分泌不全による耐糖能異常を呈しており、膵島還流試験等により特に第二相のインスリン分泌が障害を受けていることを明らかとしている。さらにノックアウトマウスの初代培養β細胞［5］の解析により、グルコース刺激時の電気生理学的あるいは細胞内カルシウムの顕著な反応性低下が明らかとなった（図 1a)。この分子機構を解明するため、ノックアウトマウスβ細胞ならびにノックダウン MIN6 細胞をモデル系として、以下の実験を行った。

まず、シクロヘキシミドによるタンパク質デグラデーションアッセイを施行し、細胞内でのカルシウムチャネルタンパク質群の安定性低下を示唆するデータを得た（図 1b)。次に、小胞体シャペロン群、キネシン分子モーター、チャネルタンパク質間の相互作用を免疫沈降法等の生化学的手法、近接ライゲーションアッセイ法等の形態学的手法を用いて明らかとし、特に熱ショックタンパク質 Hsc70 シャペロンとカルシウムチャネルの結合の増加を示唆するデータを得た（図 1c)。またキネシンとカルシウムチャネルは共免疫沈降することが明らかとなった（図 1d)。そこで PALM/STORM 法等の超高解像度顕微鏡を用いた観察を行ったところ、このコンプレックスが小胞体上に共局在する形態学的知見を得た（図 1e)。以上のように、キネシン分子モーターはクライアントタンパク質の安定化に寄与することにより糖尿病を予防する膵β細胞の刺激ー分泌連関を支えていると考えられ、現在投稿論文の修正中であるとともにその詳細をさらに明らかとすべく研究を継続している。これらの成果は、キネシン分子モーターのインスリン分泌制御における新たな役割を示唆し、2 型糖尿病の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

2. キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウス肝を解析すると、進行性の脂肪肝・肝線維症の組織像が得られた。さらにヒト家族性 NASH ファミリーのゲノム解析によって、キネシン分子モーターの遺伝子変異が同定された。また、ヒト HepG2 細胞におけるキネシン分子モーターノックダウン系において脂肪滴の顕著な貯留ならびにライブイメージングによる VLDL 顆粒の分泌不全を確認しており、さらに以下の実験を行った。

まず、キネシン分子モーターの各ドメインによる表現型レスキュー実験を行ったところ、中間ドメインが脂肪滴貯留・VLDL 分泌不全の表現型に必要十分であるとの知見を得た。次にこの中間ドメインの遺伝子断片を用いて、BioID 法により結合タンパク質を精製し質量分析法にて配列を決定した。とくに約 120 kDa ならびに約 70 kDa のカルボキシル基転移酵素群を新規結合タンパク質として同定し、GST プルダウン法などの生化学的な手法により結合を確認した。これらの酵素は脂肪酸生合成にかかわっておりその強制発現により HepG2 細胞の脂肪滴貯留が亢進したため、キネシン分子モーターの結合がこれらの酵素活性を直接的に制御している可能性を考えた。そこで野生型とノックアウト肝それぞれの上清の酵素活性を生化学的に比較してみると、実際にノックアウトマウス肝では有意な活性上昇が確認された。さらにキネシン分子モーターに変異をもつヒト NASH 患者家系ならびに対照群の線維芽細胞を用い、これらをレトロウイルスベクターを用いて肝 iHep 細胞に分化させたところ、患者由来の細胞においてたしかに脂肪滴貯留が亢進し、キネシン分子モーター中間ドメインの強制発現によってそれが緩和されることが示唆された（図 2)。以上の知見について論文投稿の準備中であるとともに、その詳細をさらに明らかとすべく研究を継続している。これらの成果は、キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新たな役割を示唆し、NASH/NAFLD の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

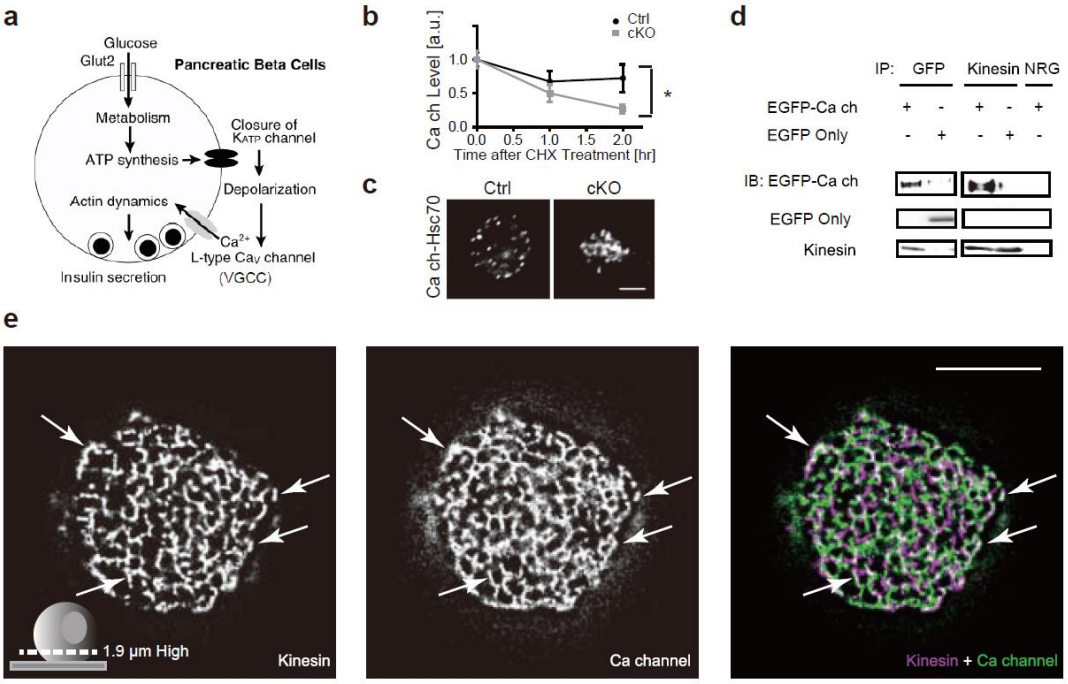


図 1. キネシン分子モーターの膵β細胞における新しい役割

a) 膵β細胞の刺激-分泌連関。キネシン分子モーターはカルシウムチャネル発現を維持する。

b) シクロヘキシミド（CHX）処理によるカルシウムチャネルタンパク質の安定性試験。キネシン分子モーターはその安定性に必須である。mean±SEM、n = 6、* $p < 0.01$、Welch's t-test。

c) カルシウムチャネルと熱ショックタンパク質の近接ライゲーションアッセイ。ノックアウトβ細胞（cKO）の方が対照群（Ctrl）に比して熱ショックタンパク質が多く結合しており、シャペロン依存性のタンパク質分解経路の関与が示唆される（スケールバー：5μm）。

d) カルシウムチャネルとキネシン分子モーターのタグ免疫沈降（IP）。IB：イムノブロッティング。NRG：対照ウサギ IgG。

e) 膵β細胞におけるカルシウムチャネルとキネシン分子モーターの超高解像蛍光顕微鏡像。細胞周縁部の網状構造における共局在が観察された（スケールバー：5μm）。

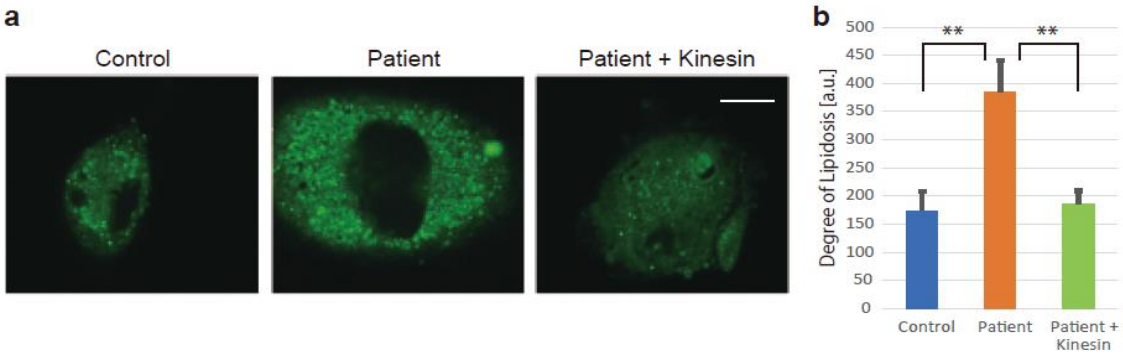


図 2. キネシン分子モーターの肝細胞における新しい役割

a) ヒト NASH/NAFLD 家系由来の iHep 肝培養細胞（Patient）の脂肪染色像におけるキネシン分子モーター発現による脂肪滴貯留の治療の試み（Patient＋Kinesin）。キネシン分子モーターは脂肪滴貯留の抑制に必須な役割を果たし、その中間ドメイン強制発現により対照群（Control）のレベルにまで肝細胞の脂肪滴貯留が抑制されている（スケールバー：10μm）。

b) 上記の統計学的解析。mean±SEM、n = 9～13、** $p < 0.01$、Welch's t-test。

考　察

本研究はキネシン分子モーターの細胞生物学的・生化学的・分子遺伝学的基礎研究をベースとして、重要な生活習慣病である糖尿病・NASH 等の新規モデルマウスならびにモデル細胞系の開発に資するものである。これらの病態の根本で障害されている膵β細胞の刺激ー分泌連関や肝細胞の脂肪酸生合成制御系において、キネシン分子モーターの関与するまったく新しい分子過程を解明し、将来的な臨床応用のための糸口を得ることができた。

まず、ノックアウトマウスならびにノックダウン系等の分子遺伝学的手法を用いてキネシン分子モーターの欠損細胞と野生型細胞を対照しその差を集学的な方法で解析することによって、特にキネシン分子モーターが小胞体上にクライアント分子と共局在することによってその安定性を高めるメカニズム、あるいはキネシン分子モーターが脂肪酸生合成に必須な酵素タンパク質群の活性を直接的に調節するメカニズムを示唆するデータを得た。さらに、キネシン分子断片がこの脂肪酸生合成の制御に必要十分であることを確認し、ヒト NASH 家系からティッシュエンジニアリングの手法を応用して得られた培養肝細胞においても、この断片の遺伝子強制発現によりその脂肪滴貯留の緩和をもたらすことができた。

長大な突起を持たない内胚葉性の消化器系細胞における微小管系分子モーターの役割は、細胞質全体が拡散過程によって容易に到達可能な範囲に含まれるため、これまで神経軸索を実験系として研究されてきた長距離にわたる膜小胞輸送以外の未知の細胞生物学的過程を制御している可能性が高い。具体的には、1. 小胞体のような連続した網目状膜小器官の形態維持ならびに内的流動性の制御、2. 膜小器官あるいは細胞膜からの膜小胞のピンチオフ過程の制御、3. シグナル伝達に関与する酵素群等の微小管上への係留によるタンパク質相互作用の制御、4. 酵素タンパク質の重要な機能ドメインへの直接結合による酵素活性や安定性の制御、5. 逆行性モーターである細胞質ダイニン等との綱引きによるオルガネラ分布の維持、6. 微小管細胞骨格そのものの分子モーターによる制御などの可能性が考えられる。本研究の成果はいずれもこれらの仮説を裏付け、キネシン分子モーターの新たな機能の解明につながるものである。

これまでのシグナル伝達生物学は、遺伝子発現の網羅的解析や細胞内タンパク質リン酸化の変動解析等、生化学的手法によるところが大きかったが、我々は最新鋭光学顕微鏡によるリアルタイム観察やタンパク相互作用の直接イメージング等の先端的手法を駆使して、分子モーターによってドライブされる細胞内もしくは細胞間における機能分子のダイナミックな局在制御を他に先駆けて時空間的に解析することに成功してきている。本研究はカルシウムチャネルや酵素群等の機能分子ダイナミクスの新たな可視化により、糖尿病・NASH をはじめとする生活習慣病についての分子細胞レベルでの解明につながるものであり、特にこれら代謝疾患の病態生理の解明ならびにまったく新たな切り口からの治療戦略の創出への道を拓くと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科細胞構築学・分子構造動態病態学研究室の廣川信隆、アシーエ・エテマード、ヘブライ大学メディカルセンターのオルリ・エルベレーグの諸先生である。また東京大学の門脇孝特任教授、国際医療福祉大学の野田光彦教授、理化学研究所の吉川武男チームリーダーをはじめとする多くの先生方ならびに同僚の先生方のご指導とご協力に心から感謝いたします。

文　献

1) Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, et al. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. Cell. 1998;93(7):1147-58. Epub 1998/07/10. PubMed PMID: 9657148.

2) Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. Nature. 2005;435(7039):172-7. doi: 10.1038/nature03494. PubMed PMID: 15889083.

3) Tanaka Y, Niwa S, Dong M, Farkhondeh A, Wang L, Zhou R, et al. The Molecular Motor KIF1A Transports the TrkA Neurotrophin Receptor and Is Essential for Sensory Neuron Survival and Function. Neuron. 2016;90(6):1215-29. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.002. PubMed PMID: 27263974.
4) Tanaka Y, Hirokawa N. Mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease. Trends in genetics : TIG. 2002;18(12):S39-44. PubMed PMID: 12446157.
5) Yang W, Tanaka Y, Bundo M, Hirokawa N. Antioxidant signaling involving the microtubule motor KIF12 is an intracellular target of nutrition excess in beta cells. Developmental cell. 2014;31(2):202-14. doi: 10.1016/j.devcel.2014.08.028. PubMed PMID: 25373778.
6) Wang L, Tanaka Y, Wang D, Morikawa M, Zhou R, Homma N, et al. The Atypical Kinesin KIF26A Facilitates Termination of Nociceptive Responses by Sequestering Focal Adhesion Kinase. Cell reports. 2018;24(11):2894-907. Epub 2018/09/13. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.075. PubMed PMID: 30208315.
7) Morikawa M, Tanaka Y, Cho HS, Yoshihara M, Hirokawa N. The Molecular Motor KIF21B Mediates Synaptic Plasticity and Fear Extinction by Terminating Rac1 Activation. Cell reports. 2018;23(13):3864-77. Epub 2018/06/28. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.089. PubMed PMID: 29949770.
8) Rorsman P, Renstrom E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. Diabetologia. 2003;46(8):1029-45. Epub 2003/07/25. doi: 10.1007/s00125-003-1153-1. PubMed PMID: 12879249.
9) Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. Journal of cell science. 2009;122(Pt 7):893-903. PubMed PMID: 19295123.
10) Wattacheril J, Issa D, Sanyal A. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) and Hepatic Fibrosis: Emerging Therapies. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2018;58:649-62. Epub 2017/10/24. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052545. PubMed PMID: 29058997.