

インスリン抵抗性による心筋恒常性の破綻機構

東京大学医学部附属病院 循環器内科
都島 健介

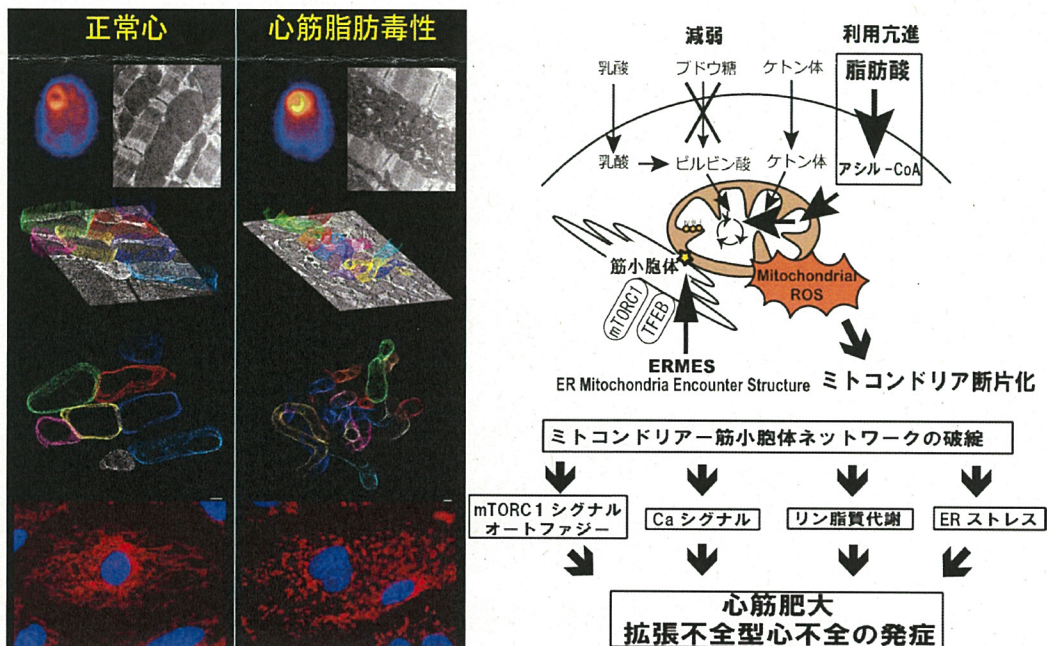
1. 研究の目的

心筋では、ミオシン収縮、膜電位の維持、SERCA による筋小胞体へのカルシウムの再取り込みなど大量のエネルギーを必要としている。その需要に応えるために、健全な成熟心筋細胞にはミトコンドリアが豊富に存在し、基質を好氣的に酸化することで効率的に ATP を産生する。心筋ミトコンドリアは基質選択に柔軟性があり、ストレスに応じて脂肪酸、ブドウ糖、乳酸、ケトン体、アミノ酸を選択して酸化基質として利用することができる。インスリンやグルカゴン、カテコラミンなどのホルモンの働きで、心筋は空腹時や運動時には脂肪組織から動員される遊離脂肪酸を主に利用し、食後にはブドウ糖を多く利用する。近年我々は、インスリン抵抗性の心筋では基質選択の柔軟性が失われ、心筋代謝が脂肪酸に過度に依存するようになり、その結果としてミトコンドリアの形態異常と機能不全を伴う心臓拡張不全の病態を呈することを明らかにした（下図）。この研究で新たに取り入れた3次元電子線トモグラフィ技術により、2次元では小さく細分化したミトコンドリアが集積しているように見えていた形態変化は、実は細く長く複雑な形態をしたミトコンドリアが同じ平面で何度も切られていることが初めて明らかになった。このような複雑なミトコンドリア形態変化は酵母や培養細胞で観察されるミトコンドリアダイナミクスでは説明できず、生体の心筋ではもっと複雑な修飾を受けていることが示唆された。心筋におけるミトコンドリア代謝がその形態に与える影響を理解するために、ミトコンドリアや筋小胞体、T管などの詳細な3次元構造を明らかにする必要があり、本研究では、

- ① APEX(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ)電子顕微鏡による心筋微細構造解析技術の開発
- ② ミトコンドリア-筋小胞体ネットワークの電顕3次元イメージング技術の開発
- ③ ミトコンドリア-筋小胞体ネットワークによるmTORC1シグナルの制御機構

の3つの研究を通して、代謝および細胞内シグナルのハブとして重要なミトコンドリア-筋小胞体ネットワークを理解することを目的とする。

インスリン抵抗性による心筋拡張障害のメカニズム (心筋脂肪毒性仮説)

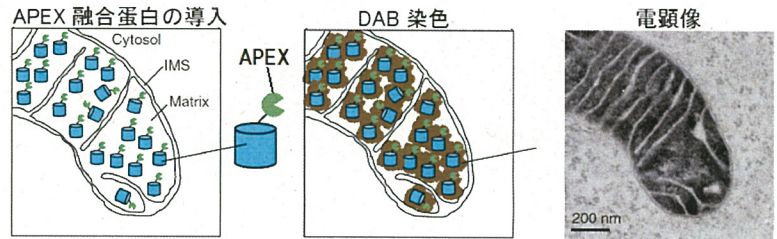


2. 研究計画、材料、方法

① APEX(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ)電子顕微鏡による心筋微細構造解析技術の開発

構造蛋白にとみ、収縮弛緩を休みなく繰り返している心臓は、心筋を単離する過程で構造が急速に変化するためサルコメアやミトコンドリア-SRなどの微細構造変化を観察することが難しかった。また、細胞構造をナノメートルの分解能で解析する技術は電子顕微鏡(電顕)が標準的だが、既存の標識蛋白は組織固定処理で活性が失われることが課題であった。これらの問題を解決するため我々は、組織固定法と回収法を改善して心筋ミトコンドリアの電子線トモグラフィーによるミトコンドリアダイナミクスの3次元構造解析に成功した。本研究では電子線トモグラフィーにAPEX技術を導入し、微細構造の3次元イメージング技術を開発する。

APEXは28kDaの単量体ペルオキシダーゼで電顕用固定処理を加えても酵素活性が失活せず、オルガネラや目的蛋白質の局在を同定するための電顕用標識タグとして活用されている(右図、Nat Biotechnol. 30:1143)。本研究では筋小胞体膜およびインスリンシグナル分子AKTの標識プローブの開発を行う。



② ミトコンドリア-筋小胞体ネットワークの電顕3次元イメージング技術の開発

①で開発したプローブをアデノ関連ウイルスによりマウス心臓に発現させ、電子線トモグラフィー技術により3次元観察を行う。通常の透過型電子顕微鏡は加速電圧が100kV程度であり、標本をナノメートルスケールで薄切する必要がある、マイクロメートルスケールの細胞内小器官の全体像を3次元で観察することは難しかった。我々は超高压顕微鏡を用いてミトコンドリア-筋小胞体の3次元構造を観察する準備を進めている。超高压顕微鏡は加速電圧を1000kV以上まで上昇させることにより、5μm程度の切片を観察することが可能である。現在、名古屋大学超高压電子顕微鏡施設と共同で観察準備を進めている。

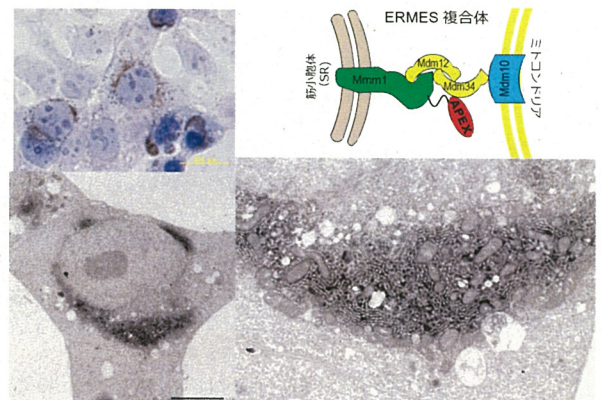
③ ミトコンドリア-筋小胞体ネットワークによるmTORC1シグナルの制御機構

我々は、心筋脂肪毒性モデルマウスであるACSL1トランスジェニック動物の心臓において、ミトコンドリア形態に異常あることを報告した。我々の予備データではこのマウスの心臓においてmTORC1シグナルおよびオートファジーに異常があることを見出している。本マウスのミトコンドリア3次元構造およびmTORC1シグナル分子の局在を①および②のイメージング技術で明らかにする予定である。

3. 研究成果

① APEX(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ)電子顕微鏡による心筋微細構造解析技術の開発

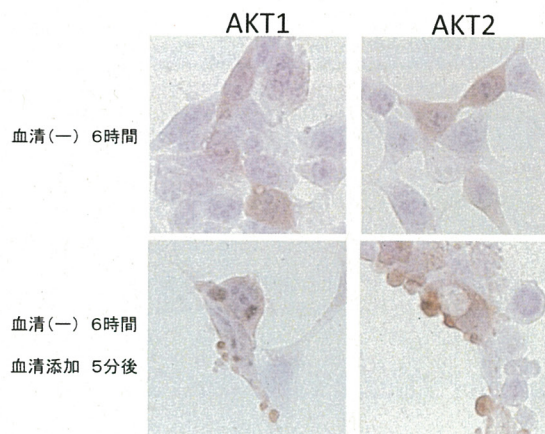
我々は、心筋におけるミトコンドリア-SRの3次元構造を明らかにするために電子顕微鏡用のプローブ開発を行った。酵母ではミトコンドリア-小胞体(ER)はER-Mitochondria Encounter Structure(ERMES)構造を介してリン脂質の交換を行い、Ca濃度の調節などにも必要な構造であることが明らかになっているが、哺乳類の細胞でERMES構造とhomologは同定されていない。近年、酵母ERMES複合体の構成タンパクMMM1のSMPドメインと哺乳類のタンパク質PDZD8のSMPドメインが機能的に相同であり、PDZD8がミトコンドリア-筋小胞体の繫留およびCa動態制御に重要であることが報告された(Science 358:623)。我々は、PDZD8-APEX2の融合タンパクの発現ベクターを作成し、HEK293T細胞を用いた予備実験でER膜の標識プローブとして活用できることを確認した(右図)。現在、マウスの心臓組織に標識プローブを発現



させ超高压顕微鏡で観察する準備を進めている。

次に、インスリンシグナル伝達分子AKT1およびAKT2の成熟心筋内での局在にも着目している。心筋の主要なAKTであるAKT1およびAKT2はお互いに相補的な役割を持っているが、個別の働きも持っているが、その詳しい分子メカニズムは明らかになっていない。我々はAKT1およびAKT2の機能の違いは局在の違いと関連しているとの仮説を立てているが、成熟心筋で詳細なAKTの局在を明らかにした報告はない。APEX2とAKT1およびAKT2との融合蛋白を作成して顕用の

プローブを開発した。293T細胞を用いた予備実験で、既報通りに細胞内局在が血清の刺激により速やかにlamellipodia細胞膜に遊走することを確認した。心筋細胞のT管—筋小胞体—ミトコンドリアなどでのシグナル伝達活性化の場所についても、超高压顕微鏡を用いた解析を準備中である。



4. 最後に

本研究では、生体心筋細胞のオルガネラ微細構造およびシグナル活性化の時空間制御機構を、超高压顕微鏡およびAPEX2標識技術を組み合わせた解析方法を構築しつつある。本研究に最初のチャンスを与えていただいたアステラス病態代謝研究会研究助成に心から感謝申し上げます。また、研究の構想および技術面で多大な助言を頂いた東京大学大学院医学系研究科細胞生物学・解剖学講座教授の吉川雅英先生、名古屋大学超高压電子顕微鏡施設特任准教授の荒井重勇先生に心から御礼申し上げます。