

**表題：** ラット骨格筋のパルス波刺激によるグルコーストランスポーター4および関連遺伝子の転写レベルの検討

**著者：** 徳毛 悠真

**所属：** 広島国際大学大学院 医療・福祉科学研究科 医療工学専攻

**連絡先：**

〒739-2695 広島県 東広島市 黒瀬学園台 555-36 広島国際大学 保健医療学部 527 研究室

徳毛悠真 E-mail: y-tokumo@hs.hirokoku-u.ac.jp TEL: 0823-70-4541 FAX: 0823-70-4542

**キーワード：**

パルス波刺激、グルコーストランスポーター4、キネシン-1、細胞質ダイニン、2型糖尿病

## 要旨

**【目的】** 生活習慣病の1つである2型糖尿病の病態として、グルコーストランスポーター4 (GLUT4 : Glucose transporter type 4) 貯蔵小胞の細胞質内から細胞膜へのトランスロケーションができないインスリン抵抗性が知られている。本研究ではパルス波による筋刺激が2型糖尿病の非薬物治療の候補となりうるかどうかを微小管モータータンパク質の点から評価するために、ラット骨格筋の GLUT4、キネシン-1 および細胞質ダイニンの転写レベルの変化を逆転写-定量 PCR により精密測定した。

**【方法】** イソフルラン吸入麻酔のもとに F344 ラット (雄、10 週齢) の両側下腿前面を皮膚切開し前脛骨筋を露出して、2本の 25 G 注射針を 2 cm 間隔で刺入し電極とした。その後、無刺激群では麻酔のみを継続し、パルス波刺激群 (パルス電圧 5 V、パルス幅 0.7 ms) では右脚の前脛骨筋のみを 30 ppm あるいは 400 ppm で 30 分から 2 時間刺激した。対照脚と刺激脚の筋試料から AGPC 法により全 RNA を抽出し逆転写反応により cDNA に変換した。定量 PCR は、内在性対照遺伝子 GAPDH 用の VIC、ならびに、GLUT4 (遺伝子記号では SLC2A4)、キネシン-1 重鎖 5B (KIF5B)、細胞質ダイニン重鎖 1 (DYNC1H1)、細胞質ダイニン中間鎖 1 (DYNC1I1)、細胞質ダイニン中間軽鎖 1 (DYNC1LI1) といった標的遺伝子用の FAM の各々の蛍光強度を同時測定し、比較  $C_T$  法で解析して対照遺伝子に対する標的遺伝子の mRNA 相対レベル ( $-\Delta C_T$ ) を算出した。mRNA 相対量は  $2^{-\Delta C_T}$  となる。

**【結果】** 1 時間の 400 ppm パルス波刺激群 (n=7) において、対照脚に比較して刺激脚では筋組織の SLC2A4 mRNA 相対レベルに有意な上昇が認められ、mRNA 相対量の平均上昇率は 1.58 倍であった ( $P<0.01$ 、Wilcoxon 符号付順位検定)。30 ppm でのパルス波刺激群 (n=7) では有意差がみられなかった ( $P=0.12$ )。パルス波刺激完了時の筋断端血液のグルコース濃度は、400 ppm パルス波刺激でのみ刺激脚で有意に低下していた ( $P<0.05$ )。KIF5B および DYNC1H1 の mRNA 相対レベルにも 400 ppm パルス波刺激群でのみ刺激脚での有意な上昇が認められ、mRNA 相対量の平均上昇率は KIF5B で 1.75 倍、DYNC1H1 で 1.65 倍であった ( $P<0.05$ )。1 時間の 400 ppm パルス波刺激による細胞質ダイニンの転

写レベル上昇は、DYNC1H1、DYNC1I1、DYNC1LI1 のすべてのサブユニットで認められたが、30 分間あるいは2時間のパルス波刺激では有意な変化がみられなかった。

**【結論】** パルス波による筋刺激において、400 ppm でのみ対照脚に比べて刺激脚における筋組織の GLUT4 mRNA レベル上昇が2倍以内ではあったが統計学的に有意に増加することが確認できた。これには、GLUT4 の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションに必要なキネシン-1 の重鎖のみならず、細胞質ダイニンの重鎖、中間鎖、中間軽鎖の mRNA レベルの有意な上昇が伴っていた。パルス波刺激した筋組織局所での血中グルコース濃度の有意な低下が同時に認められたことから、本法がグルコース利用の促進による2型糖尿病の非薬物治療法となる可能性が示唆される。

## 研究 I : ラット骨格筋のパルス波刺激による 4 型グルコース輸送体およびモータータンパク質の mRNA レベル上昇

### I - 1. はじめに

研究 I は、速水教授の指導の下で、大学院生の宮本、丹野らと共同で行った。その研究成果は広島国際大学発行の医療工学雑誌に投稿し厳格な査読の後に受理された<sup>1)</sup>。それをこの博士号申請においては副論文として添付したが、この主論文の研究 I では副論文の成果の中から、細胞質ダイニンに関する研究 II に直結する部分を中心に紹介する。

2 型糖尿病の病態として、遺伝、高遊離脂肪酸血症、高サイトカイン血症など種々の誘因による生体のインスリンへの感受性低下（インスリン抵抗性）の重要性が指摘されている<sup>2)</sup>。グルコース分子は疎水性が高い細胞膜を通過できないため、細胞外から細胞内に受動輸送されるためにはグルコーストランスポーター（GLUT）が細胞膜に存在する必要がある<sup>3)</sup>。骨格筋と心筋の横紋筋細胞、および、脂肪細胞にはインスリン依存性のグルコーストランスポーター 4（GLUT4）が存在しているが、2 型糖尿病ではインスリン受容体にインスリンが結合しても細胞内シグナル伝達の不具合により、GLUT4 貯蔵小胞が細胞質から細胞膜へ運搬されず GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションができないため、慢性的に高血糖が持続することになる<sup>4)</sup>。

モータータンパク質はアデノシン 3 リン酸（ATP）の分解によって得られる化学エネルギーを、小胞やミトコンドリア・ゴルジ体などの細胞内小器官を運搬する仕事に変換する<sup>5)</sup>。微小管の上を核近傍から細胞膜方向に順行性輸送を行うキネシン、および、その反対方向に逆行性輸送を行うダイニンが発見され、近年、GLUT4 貯蔵小胞のキネシン-1 による細胞膜への輸送<sup>6)</sup>、また逆に、膜タンパク質としての GLUT4 の細胞質ダイニンによる細胞内取り込みについても精力的に研究されている<sup>7)</sup>。

2 型糖尿病の非薬物治療としては既に運動療法が知られており、血糖コントロール、脂質プロファイルおよび高血圧の改善効果が臨床的に実証されている<sup>8)</sup>。この運動療法、ならびに、ラットの電気鍼刺激モデルにおいて、筋組織内 GLUT4 タンパク質が増加する

ことでインスリン抵抗性が改善するとの報告がある<sup>9) 10)</sup>。しかしながら、運動および電気により刺激された筋における微小管モータータンパク質の変化に関する報告は未だみられない。

本研究では、キネシンとダイニンが2型糖尿病の電気刺激による非薬物療法において貢献するかどうかについて、ラット骨格筋をパルス波で刺激し、筋組織内の GLUT4 および微小管モータータンパク質（キネシン-1 および細胞質ダイニン）の転写レベルを逆転写-定量 PCR を用いて測定し検討した。

## I - 2. 方法

### パルス波刺激装置

周波数 30 ppm のパルス波刺激には臨床で使用される体外式ペースメーカ（モデル 4553、大正医科器械）を使用した。この装置では 30～150 ppm の出力しかできないので、周波数 400 ppm のパルス波発振には副論文の共同実験者の宮本らが製作した小動物実験用ペースメーカを使用した<sup>11)</sup>。汎用ロジック集積回路 TC4069UBP を用いて、CMOS インバータを2つ使った CR 発振回路で方形波を出力し、可変抵抗により発振周波数の理論値を 140～410 ppm（発振周期は 150～440 ms）とした。続く CR 微分回路（時定数 1 ms）と2つの CMOS インバータを用いてパルス幅が 0.7 ms のペーシングパルスに整形した。抵抗分圧回路により出力電圧を 5 V に調節して、ボルテージフォロワ（オペアンプ LM358AN）を介してパルス電圧を出力した。両ペースメーカとも出力するパルス幅ならびに電圧は上記の数値とし、周波数とともに動物実験に使用する前にオシロスコープで確認した。

### パルス波によるラット骨格筋の刺激

広島国際大学動物実験申請許可（AE15 - 028）の下に、動物飼育室ならびに医療工学実験実習室で実験を施行した。F344 ラットを広島実験動物研究所から購入し、その後 1～2 週間、麻酔開始 1 時間前まで通常食摂取と飲水を自由にさせた。揮発性麻酔薬イソフルラン（エスカイン、マイラン製薬）を用いた吸入麻酔の下に F344 ラット（雄、10 週齢、体重 260～300 g）を一個体ずつ愛護的に手術台に固定し、両側の下腿前面を皮膚切開して

前脛骨筋を露出させ、各々の筋に2本の25 G注射針（ステンレス鋼、テルモ）を2 cm 間隔で刺入してマイナス電極およびプラス電極とした。対照群（左前脛骨筋）では、無刺激のまま1時間麻酔のみを継続した。パルス波刺激群（右前脛骨筋）では、右脚の前脛骨筋のみを30 ppmあるいは400 ppmで1時間刺激して目視で筋収縮を確認した。各刺激時間の終了後に、刺激脚と対照脚の前脛骨筋の電極間刺激部分を切断して-80°Cで凍結保存した。ラットは閉創後に麻酔を深くして安楽死させた。

### 骨格筋サンプルからの RNA 抽出

凍結していた筋サンプルを融解し3カ所から5 x 5 x 5 mmサイズの試料を採取し、各々RNA抽出試薬（TRIzol、ThermoFisher Scientific）を入れたエッペンドルフチューブ内でホモジェナイズし、酸性グアニジン-フェノールクロロホルム法により全RNAを抽出して1つにまとめた。分光光度計（NanoDrop2000、LMS）で濃度と純度を計測して、A260/A280が2以上であることから適切なRNA抽出であることを確認した。

### 逆転写一定量 PCR <sup>12) 13)</sup>

抽出したRNAを65°Cで5分間変性させ、このRNAをテンプレートとして逆転写酵素試薬（PrimeScript RT reagent Kit、TAKARA）を用いてcDNAに変換した。定量PCRとしては、各cDNAテンプレートに、内在性対照遺伝子ラットGAPDH用のプライマーとVIC標識TaqManプローブのセット（4352338E、Applied Biosystems）、および、ラットのGLUT4（遺伝子記号ではSLC2A4<sup>14)</sup>、Rn01752377\_m1）、キネシン-1重鎖5B（KIF5B<sup>15)</sup>、Rn01538432\_m1）、細胞質ダイニン重鎖1（DYNC1H1<sup>16)</sup>、Rn00570138\_m1）のプライマーとFAM標識TaqManプローブのセット、ならびに、Taqポリメラーゼ試薬（Premix ExTaq、TAKARA）を混じて反応液とし、リアルタイムPCR装置（MiniOpticon Real-Time PCR Systems、Bio-Rad）にセットして95°Cで3分間変性した後に、95°Cで10秒の変性と60°Cで30秒のアニーリング・伸長を50サイクル施行した。使用したプライマーはエクソンをスパンする設計となっているのでゲノムDNAは増幅されない。VICおよびFAMそれぞれの蛍光強度をサイクル毎に同時測定する2色相対定量とし比較C<sub>T</sub>法で解析して、対照遺

伝子 GAPDH に対する標的遺伝子の mRNA 相対レベル ( $-\Delta C_T$ ) を算出した。mRNA 相対量は  $2^{-\Delta C_T}$  となる。

### 筋局所の血糖値の測定

GLUT4 と血糖値との関連を検討するために、酵素電極法を原理とするアキュチェックアビバストリップ F およびアキュチェックアビバ (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて微量血液中の全血グルコース濃度を測定した。筋断端の血液中グルコース濃度はパルス波刺激脚および対照脚から筋試料を採取する際の切断面からの出血で測定した。

### 統計解析

統計解析ソフトウェア EZR を使用してノンパラメトリック手法により評価した<sup>17)</sup>。同一ラットにおける刺激脚 (右前脛骨筋) と対照脚 (左前脛骨筋) のように対応のある 2 つの実験データの差の有意性については Wilcoxon 符号付順位検定により評価した。なお、危険率は 5 % で検討し、1 % 未満の場合はそれを明示した。

## I-3. 結果

### パルス波刺激が筋組織内の GLUT4 mRNA 相対レベルに及ぼす影響

実験に使用したラットは純系で性別、年齢、体重を揃えたものの測定値には個体差があり、解析は同一ラットにおける対照脚 (左前脛骨筋) と刺激脚 (右前脛骨筋) との mRNA 相対レベルの違いについて Wilcoxon 符号付順位検定により評価した。図 I-1 に示したように、GLUT4 mRNA 相対レベルは 30 ppm 刺激では対照脚と刺激脚の間で有意差はなかったが ( $P=0.12$ )、400 ppm 刺激では 7 例全てにおいてパルス波刺激脚で上昇し平均上昇率は 1.6 倍で、対照脚と刺激脚の間で有意差が認められた ( $P<0.01$ )。

### 筋断端血液のグルコース濃度の変化

図 I-2 に 1 時間のパルス波刺激が完了した後に筋試料を採取する際の筋断端から出血した血液中のグルコース濃度を対照脚および刺激脚で測定し比較した結果を示した。この筋局所の血液中グルコース濃度は、30 ppm パルス波刺激では対照脚と刺激脚の間で有

意差がなかった ( $P=0.34$ )。これに対して 400 ppm パルス波刺激では、対照脚に対してパルス波刺激脚で有意に低下していた ( $P<0.05$ )。

#### 微小管モータータンパク質の mRNA 相対レベルにパルス波刺激がおよぼす影響

図 I - 3 にパルス波刺激の周波数とキネシン-1 重鎖遺伝子 KIF5B の mRNA 相対レベルの関係を示した。前述した GLUT4 と同様に KIF5B についても、30 ppm パルス波刺激群では対照脚と刺激脚の間で mRNA 相対レベルに有意差はみられなかった ( $P=0.28$ )。これに対して、400 ppm パルス波刺激群では対照脚に比べて刺激脚で有意な上昇がみられた ( $P<0.05$ )。図 I - 4 には細胞質ダイニン重鎖 1 遺伝子 DYNC1H1 の mRNA 相対レベルを示した。KIF5B と同様に 400 ppm 刺激でのみ対照脚に比べてパルス波刺激脚で有意な上昇が認められた ( $P<0.05$ )。これらの 400 ppm 刺激群でのパルス波刺激による mRNA 相対レベルの平均上昇率は KIF5B で 1.8 倍、DYNC1H1 で 1.7 倍であった。

#### I - 4. 考察

パルス波による筋刺激において、至適条件 400 ppm でのみ、対照脚に比べてパルス波刺激脚における筋組織の GLUT4 の mRNA レベル上昇が 2 倍以内ではあったが統計学的に有意 ( $P<0.01$ ) に増加することが判明した。

グルコース輸送体のアイソフォームには 13 種類が同定されており、クラス I には GLUT1 から GLUT4 までの 4 種類が含まれる<sup>18)</sup>。GLUT4 は横紋筋と脂肪細胞にタンパク質レベルで発現していることが知られているが、副論文<sup>1)</sup>で報告したように、共同研究者の宮本と丹野の実験でもやはり横紋筋を多く含む骨格筋と心筋で GLUT4 mRNA 相対レベルが高値であることが確認された。インスリン刺激とは別に、筋収縮によるメカニズムでも横紋筋細胞の GLUT4 発現が亢進するという報告があり<sup>9)</sup>、常に収縮と弛緩を繰り返している心筋では GLUT4 の転写レベルが高く維持されている可能性が考えられるが、宮本らの実験結果でも、健康なラットの骨格筋の GLUT4 転写レベルはパルス波刺激前から既に心筋に匹敵するレベルであった。これが、400 ppm のパルス波刺激で対照脚に対する刺激脚の骨格筋の GLUT4 mRNA レベル上昇が 2 倍以内に留まった原因の一つかもしれない



が、他の研究報告でも運動負荷による GLUT4 mRNA レベル上昇は 2～2.5 倍のようである<sup>19)</sup>。

筋小胞体から細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量は、400 ppm パルス波で刺激中の筋組織では活動電位の発生頻度が高い分だけ多いと考えられる。ヒトおよびラットの骨格筋運動において、 $\text{Ca}^{2+}$  を結合したカルモジュリンが CaMK II に結合することで CaMK II が活性化し、histone deacetylase (HDAC) がリン酸化されて myocyte enhancer factor 2 (MEF2) から外れると、ヒストンがアセチル化されて GLUT4 遺伝子の MEF2 結合ドメインがアクセスできるようになり、運動負荷後 3 時間以内に mRNA レベルが上昇することが知られている<sup>19)</sup>。また近年、この筋小胞体から細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  放出が筋芽細胞から骨格筋が形成されるためのシグナルとして働く事実が形態学的に発見されている<sup>20)</sup>。これらの報告は、筋収縮システムを稼働させる電解質  $\text{Ca}^{2+}$  が、同時に筋細胞において複数の遺伝子発現に強く関与している実例として非常に興味深い。

我々は、パルス波での骨格筋刺激による GLUT4 mRNA レベルの上昇には、キネシン-1 重鎖 mRNA レベルの有意な上昇が伴うことを示した。キネシン-1 とは逆に、細胞質ダイニンは細胞膜に存在する GLUT4 を細胞内に取り込み逆行性輸送によりリサイクル処理をする働きを担っていると考えられる<sup>7)</sup>。そうであれば、パルス波刺激によってキネシン-1 と細胞質ダイニンの転写レベルの変化に拮抗関係が得られるのではないかと、私は予想して比較検討したが、結果に報告したとおり、少なくとも転写レベルでは 400 ppm パルス波刺激により細胞質ダイニン重鎖もキネシン-1 重鎖とほぼ同様の mRNA 上昇パターンを示した。この点について、研究 II でさらに細胞質ダイニンのサブユニットごとに検討することとした。

## I - 5. 参考文献

1. 徳毛悠真, 宮本怜於奈, 速水啓介, 丹野福士. ラット骨格筋の低周波パルス波刺激による4型グルコース輸送体およびモータータンパク質の mRNA レベル上昇. 医療工学雑誌 in press.
2. 小川渉. 3. 糖尿病の病態—インスリンの分泌障害か抵抗性か—2)抵抗性. 日内会誌 89:1512-7, 2000.
3. Stöckli J1, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. J Cell Sci 124:4147-59, 2011.
4. Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. J Biol Chem 255 (10): 4758–62, 1980.
5. Mallik R, Gross SP. Molecular motors: strategies to get along. Current Biology 14 (22): R971–82, 2004.
6. Semiz S, Park JG, Nicoloso SMC, et al. Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. EMBO J 22(10):2387-99, 2003.
7. Huang J1, Imamura T, Olefsky JM. Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. Proc Natl Acad Sci USA 98(23):13084-9. 2001.
8. 小川渉. 運動療法の2型糖尿病に対する効果とそのメカニズム. 理学療法学 42(8):769-70, 2015.
9. Lund S, Holman GD, Schmitz O, et al. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. Proc Natl Acad Sci USA 92 (13): 5817–21, 1995.
10. Chang SL, Lin KJ, Lin RT, et al. Enhanced insulin sensitivity using electroacupuncture on bilateral Zusanli acupoints (ST 36) in rats. Life Sci. 79: 967-71, 2006.
11. 宮本怜於奈, 大前 亮, 助永和司, 他. 動物実験用心臓ペースメーカーの製作. 第37回日本生体医工学会中国四国支部大会. 岡山市. 2014.
12. Yoshimitsu M, Hayamizu K, Egi H, et al. The neutrophil/Th1 lymphocyte balance and the

- therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor in TNBS-induced colitis of rat strains. *J Interferon Cytokine Res* 26(5):291-300, 2006.
13. 丹野福士, 速水啓介, 新井翔太, 他. オンライン血液透析濾過の生体適合性の評価のための体外循環白血球内 TNF $\alpha$  mRNA 定量の臨床的有用性. *医療工学雑誌* 10:1-8, 2016.
  14. Bell GI, Murray JC, Nakamura Y, et al. Polymorphic human insulin-responsive glucose-transporter gene on chromosome 17p13. *Diabetes* 38(8):1072-5, 1989.
  15. Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, et al. "A standardized kinesin nomenclature". *J Cell Biol* 167 (1): 19–22, 2004.
  16. King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biology* 2:20-4, 2000.
  17. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transpl* 48:452–8, 2013.
  18. Bell G, Kayano T, Buse J, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13 (3): 198–208, 1990.
  19. Ojuka EO, Goyaram V, Smith JAH. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E322–31, 2012.
  20. Nakanishi K, Kakiguchi K, Yonemura S, et al. Transient Ca<sup>2+</sup> depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation. *FASEB J* 29(5):2137-49, 2016.

## 研究Ⅱ：ラット骨格筋のパルス波刺激による細胞質ダイニンのサブユニット mRNA レベル変化の比較

### Ⅱ－１．はじめに

キネシン-1は順行性に、細胞質ダイニンは逆行性に小胞輸送を行うことが知られているにも関わらず、研究Ⅰの結果ではラット骨格筋の400 ppm パルス波刺激により、少なくとも転写レベルでは細胞質ダイニン重鎖1もキネシン-1重鎖とほぼ同様の上昇パターンを示したため、研究Ⅱでは細胞質ダイニンのサブユニットの観点から詳細に検討を加えた。

キネシン-1は細胞分裂や物質の輸送などに重要な働きをしており、重鎖2本、軽鎖2本のサブユニットから構成された複合体であり、微小管との結合部位を持つストーク領域、モーター部、尾部から成る二量体である<sup>1)</sup>。キネシンは遺伝子ファミリーを形成しており、これはKIFs (kinesin superfamily proteins) と呼ばれ、これらは細胞の生存や形態形成および機能発現に重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。

ダイニンには細胞質ダイニンと軸糸ダイニンがあり、どちらもモータータンパク質である。細胞質ダイニンはほぼ全ての動物細胞に発現し、小胞輸送などの細胞内の物質輸送などに関与する細胞質ダイニン1と、鞭毛や繊毛内の輸送に関与する細胞質ダイニン2がある<sup>3)</sup>。軸糸ダイニンは真核生物の鞭毛や繊毛に特異的に存在し、鞭毛や繊毛の運動に関与している。いずれも生物において重要な役割を果たすが、細胞質ダイニン1において、物質輸送に関して微小管上にてキネシンとの相互関係が報告されているため<sup>4)</sup>、本研究では細胞質ダイニン1（以下：細胞質ダイニン）に着目した。

細胞質ダイニンは微小管上を逆行性に小胞輸送をし、**図Ⅱ－１**のようにDYNC1H1から転写翻訳される重鎖2本、DYNC1H1遺伝子から転写翻訳される中間鎖2本、DYNC1LI1遺伝子から転写翻訳される中間軽鎖2本、DYNLL1遺伝子 / DYNLT1遺伝子 / DYNLRB1遺伝子の3種類の遺伝子から転写翻訳される軽鎖2本からなり、5つのサブユニットが複合するホモ二量体を形成している<sup>5)6)</sup>。

このように、キネシン-1 と細胞質ダイニンはどちらも複数のサブユニットから形成される複合体である。研究 I では 400 ppm パルス刺激において、キネシン-1 重鎖と細胞質ダイニン重鎖の mRNA レベルはどちらも上昇したことを示した。ここで、これらのモータータンパク質において、全てのサブユニットが複合しあい、輸送機能を果たすと考えると、どのサブユニットにおいても研究 I のように同条件下では mRNA レベルの上昇がみられるのではないかと考えた。

よって本研究では、30 ppm あるいは 400 ppm のパルス波刺激が、筋組織内の細胞質ダイニンのうち重鎖、中間鎖、中間軽鎖のそれぞれのサブユニット 1 について、それらの転写レベルにおよぼす影響に違いがあるかどうかについて逆転写-定量 PCR を用いて検討した。

## II-2. 方法

実験方法は研究 1 と同様とした。ただし、パルス波刺激の時間は、30 ppm では 1 時間、400 ppm では 30 分、1 時間、2 時間とした。また、定量 PCR におけるプライマーと FAM 標識 TaqMan プローブのセットとしてはラットの細胞質ダイニン重鎖 1 (DYNC1H1<sup>7)</sup>、Rn00570138\_m1)、細胞質ダイニン中間鎖 1 (DYNC1I1<sup>7)</sup>、Rn00570296\_m1)、細胞質ダイニン中間軽鎖 1 (DYNC1LI1<sup>7)</sup>、Rn00595657\_m1) を用いた。なお本実験では重鎖、中間鎖、中間軽鎖の全てにおいて同定されているサブユニット 1 を選択した。また、細胞質ダイニン軽鎖においては、ラット用の TaqMan プローブが存在しなかったため、本実験からは測定対象から除外した。

実験データの差の有意性について、Wilcoxon 符号付順位検定により評価した。

## II-3. 結果

**パルス波刺激が筋組織内の細胞質ダイニン重鎖 1 mRNA 相対レベルに及ぼす影響**

図 II-2 にパルス波刺激の周波数と細胞質ダイニン重鎖 1 遺伝子 (DYNC1H1) の mRNA 相対レベルの関係を示した。400 ppm で 1 時間パルス刺激を与えた群においては統

計学的に有意に上昇 ( $P<0.05$ ) していたが、他の実験群においては対照脚と刺激脚の間で mRNA 相対レベルに統計学的な有意差はみられなかった (30 ppm で 1 時間刺激 :  $P=0.11$ 、400 ppm で 30 分刺激 :  $P=0.38$ 、400 ppm で 2 時間刺激 :  $P=0.28$ )。

#### パルス波刺激が筋組織内の細胞質ダイニン中間鎖 1 mRNA 相対レベルに及ぼす影響

図 II - 3 にパルス波刺激の周波数と細胞質ダイニン中間鎖 1 遺伝子 (DYNC1H1) の mRNA 相対レベルの関係を示した。DYNC1H1 と同様に、400 ppm で 1 時間パルス刺激を与えた群においては統計学的に有意に上昇 ( $P<0.05$ ) していた。また、他の実験群においては、対照脚と刺激脚の間で mRNA 相対レベルに統計学的な有意差はみられなかった (30 ppm で 1 時間刺激 :  $P=0.28$ 、400 ppm で 30 分刺激 :  $P=0.15$ 、400 ppm で 2 時間刺激 :  $P=0.22$ )。

#### パルス波刺激が筋組織内の細胞質ダイニン中間軽鎖 1 mRNA 相対レベルに及ぼす影響

図 II - 4 にパルス波刺激の周波数と細胞質ダイニン中間軽鎖 1 遺伝子 (DYNC1L1) の mRNA 相対レベルの関係を示した。DYNC1H1、DYNC1H1 と同様に、400 ppm で 1 時間パルス刺激を与えた群においては統計学的に有意に上昇 ( $P<0.05$ ) していた。また、他の実験群においては対照脚と刺激脚の間で mRNA 相対レベルに統計学的な有意差はみられなかった (30 ppm で 1 時間刺激 :  $P=0.16$ 、400 ppm で 30 分刺激 :  $P=0.28$ 、400 ppm で 2 時間刺激 :  $P=0.28$ )。

## II - 4. 考察

本研究の結果から、細胞質ダイニンの各サブユニットにおいて、400 ppm で 1 時間刺激を与えた場合でのみ、対照脚に比べてパルス波刺激脚における筋組織の細胞質ダイニン重鎖 1、細胞質ダイニン中間鎖 1、細胞質ダイニン中間軽鎖 1 のいずれにおいても統計学的に有意 ( $P<0.05$ ) に増加することが判明した。

細胞質ダイニンは、タンパク形成を補助する分子シャペロンなどを含む ATPases associated with diverse cellular activities (AAA) ファミリーに属しており<sup>8)</sup>、多くの生物の

細胞内に存在する。他の AAA タンパク質と同様に 6 個の AAA モジュールからなるリング構造をしており<sup>9)</sup>、微小管との結合部位を持つストーク領域、二量体の形成や中間鎖、中間軽鎖、軽鎖結合に関わるドメインを持つ (図 II-1)。研究 I で既述したように、キネシンは GLUT4 の輸送をすることで知られているが<sup>10)</sup>、細胞質ダイニンにおける GLUT4 の輸送に関しては明らかになっていない。しかし、小胞や細胞内小器官のほとんどはキネシンと細胞質ダイニンの双方により運搬されることから GLUT4 貯蔵小胞も例外ではないと思われる。

また、興味深いことに、細胞質ダイニンは逆行性輸送が終わった後、細胞質ダイニンのサブユニットの運動を制御する LIS1 遺伝子 (遺伝子記号では PAFAH1B1) と複合体を形成しキネシンによって順行性輸送され、更に微小管末端で細胞質ダイニンの連続運動性を向上させるダイナクチンと複合し再び逆行性輸送をするという報告があり<sup>4)11)</sup>、細胞質ダイニンは順行性と逆行性とでは異なる複合体を形成すると考えられている。本実験では 400 ppm で 1 時間のパルス刺激により、測定した全てのサブユニットで mRNA レベルが上昇したため、各サブユニットは独自に機能を果たすのではなく、複合体を形成することで機能を果たすことが示唆される。細胞質ダイニンが輸送のために微小管末端の位置にリセットされるにはキネシンの協力が必要である、という点を考慮すると、キネシンと細胞質ダイニンの各サブユニットにおいて、それぞれの mRNA レベルが同時に上昇するという実験結果は合理的であると考えられる。

しかし、400 ppm で 2 時間刺激した場合、各サブユニットの mRNA レベルを比較しても 1 時間刺激のような有意差は見られなかった。ここで、キネシン-8 (遺伝子番号では KIP3P) による実験において、輸送をする際には微小管との間で摩擦力が発生し、キネシンの速度と効率が制限された、という報告がある<sup>12)</sup>。Volker ら<sup>12)</sup> はさらにキネシン-8に限らず、この摩擦力は他のモータータンパク質においても発生する、と推測している。仮にこの推測が正しければ、本実験に置き換えると、キネシン-1 と細胞質ダイニンの両方にこの摩擦力が発生していることになる。すると、どちらも速度と効率が制限されたことになるため、mRNA レベルの上昇も制限されることが考えられる。これが 1 時間刺激で有意

差が見られたことに対し、2時間刺激では見られなかった原因となりうるのではないかと考える。

既述したように、細胞質ダイニンがキネシンに順行性輸送され元の位置に戻される、という報告はあるが<sup>4)</sup>、キネシンが細胞質ダイニンに逆行性輸送されるという報告はない。さらに、キネシンの順行性輸送後の挙動について報告したものもみられない。キネシンは小胞などの輸送物質が尾部のステム領域に結合すると、運動が活性化することが知られている<sup>1)</sup>。よって逆に考えると、輸送物質が結合していない場合は不活性化の状態といえる。これは仮説にすぎないが、輸送をしていないキネシンは不活性化の状態では微小管上に存在し、細胞質ダイニンに逆行性に輸送され元の位置に戻り、再度、順行性輸送を始めるのではないかと考える。細胞質ダイニンのみが一方向的に元の位置に戻るとなると、キネシンの絶対量が不足し、順行性輸送することができない。ただし、本実験のような mRNA レベルの測定だけではこの仮説を証明することは困難である。今後は、細胞質ダイニンだけでなくキネシンの研究も進め、この仮説の証明に努めたい。



## II - 5. 参考文献

1. Verhey KJ, Hammond JW. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(11): 765-77, 2009.
2. Hirokawa N, Noda Y, et al. Kinesin superfamily motor protein and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(10): 682-96, 2009.
3. Helgo S, Ruta Z, et al. Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature.* 518: 435-8, 2015.
4. 山田雅巳. LIS1 による細胞内ロジスティクスと滑脳症発症の関係. *生物物理.* 51(6): 268-9, 2011.
5. Pfister KK, Fisher EMC, et al. Cytoplasmic dynein nomenclature. *J. Cell Biol.* 171(3): 411-3, 2005.
6. 島知弘, 須藤和夫, 昆隆英. 細胞質ダイニンの構造と機能のモジュール性. *生物物理.* 51(3): 118-23, 2011.
7. Pfister KK, Shah PR, et al. Genetic Analysis of the Cytoplasmic Dynein Subunit Families. *PLoS Genet.* 2: e1, 2006.
8. Neuwald AF, Aravind L, et al. AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Res.* 9, 27-43, 1999.
9. Burgess SA, Walker ML, et al. Dynein structure and power stroke. *nature.* 421, 715-8, 2003.
10. Semiz S, Park JG, Nicoloro SMC, et al. Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. *EMBO J.* 22(10): 2387-99, 2003.
11. 鳥澤嵩征, 古田健也, 豊島陽子. 細胞質ダイニンの運動制御機構. *生物物理.* 55(3): 127-32, 2015.
12. Volker B, Vladimir V, et al. Protein Friction Limits Diffusive and Directed Movements of Kinesin Motors on Microtubules. *Science.* 325: 870-3, 2009.

### III. 結語

パルス波を 30 分間あるいは 2 時間のパルス波刺激を与えた場合には有意差はみられなかったが、1 時間の刺激を与えた場合でのみ、対照脚に比べて刺激脚における筋組織の GLUT4 mRNA レベル上昇が 2 倍以内ではあったが統計学的に有意に増加することが確認できた。これには、GLUT4 の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションに必要なキネシン-1 の重鎖のみならず、細胞質ダイニンの重鎖、中間鎖、中間軽鎖の mRNA レベルの有意な上昇が伴っていた。キネシンは GLUT4 貯蔵小胞の輸送に関わっていることは知られているが、本研究により、細胞質ダイニンも GLUT4 貯蔵小胞の輸送に関わっていることが示唆された。

本研究により、パルス波刺激した筋組織局所での血中グルコース濃度の有意な低下が同時に認められたことから、本法がグルコース利用の促進による 2 型糖尿病の非薬物治療法となる可能性が示唆される。

#### IV. 謝辞

本研究の企画、研究費獲得、実験手技指導から論文作成まで全面的にご指導いただいた速水啓介教授に感謝いたします。動物実験、逆転写-定量 PCR などの丁寧な技術指導ならびに共同実験をしていただいた大学院生の宮本怜於奈さん、卒業研究で臓器別 GLUT4 実験の一部を担当していただいた臨床工学専攻学生の清水加奈子さんと眞鍋大地さん、ならびに、実験指導のみならず英論文検索やデータ解析、統計解析を指導していただいた大学院生の丹野福士さんに感謝いたします。

また、パルス波発生装置の作製をご指導いただいた福永信太郎教授、この主論文の作成に際してご助言をいただいた焼廣益秀教授、山岡薫教授に感謝いたします。

## V. 図のレジェンド

### 図 I - 1. 同一個体でのパルス波刺激による GLUT4 (SLC2A4) mRNA 相対レベルの変化

30 ppm あるいは 400 ppm でのパルス波刺激における同一ラットの対照脚(左前脛骨筋)と刺激脚(右前脛骨筋)での GAPDH を内在性対照遺伝子とした SLC2A4 mRNA 相対レベルの増減を表示した。対照脚に比べて刺激脚で mRNA 相対レベルが増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットは破線で示した。

### 図 I - 2. 骨格筋局所における血液中グルコース濃度にパルス波刺激がおよぼす影響

対照脚およびパルス波刺激脚から筋試料を採取する際の最初の筋切断面からの出血を骨格筋局所の血液としてグルコース濃度を測定した。対照脚に比べて刺激脚でグルコース濃度が増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットでは破線で示した。

### 図 I - 3. 同一個体でのパルス波刺激によるキネシン-1 重鎖 (KIF5B) mRNA 相対レベルの変化

30 ppm あるいは 400 ppm でのパルス波刺激において、同一ラットの対照脚とパルス波刺激脚で GAPDH を対照とした KIF5B mRNA 相対レベルがどう変化するかを表示した。mRNA 相対レベルが対照脚と比較して刺激脚で増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットでは破線で示した。

### 図 I - 4. 同一個体でのパルス波刺激による細胞質ダイニン重鎖 (DYNC1H1) mRNA 相対レベルの変化

30 ppm あるいは 400 ppm でのパルス波刺激における同一ラットの対照脚とパルス波刺激脚での GAPDH を内在性対照遺伝子とした DYNC1H1 mRNA 相対レベルの増減を表示した。刺激脚で増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットでは破線で示した。

## 図Ⅱ－１．細胞質ダイニンの構造

細胞質ダイニンは、重鎖 2 本、中間鎖 2 本、中間軽鎖 2 本、軽鎖 2 本のサブユニットが複合するホモ二量体を形成している。重鎖はモーター部、尾部からなり、6 個の AAA モジュールからなるリング構造をしている。中間鎖、中間軽鎖、軽鎖はステム領域であり、カーゴと結合し、小胞輸送を行う。

## 図Ⅱ－２．同一個体での骨格筋組織内細胞質ダイニン重鎖 1 (DYNC1H1) の mRNA 相対レベルにパルス波刺激が及ぼす影響

30 ppm あるいは 400 ppm でのパルス波刺激において、刺激時間を変化させた際に、同一ラットの対照脚とパルス波刺激脚で GAPDH を対照とした DYNC1H1 mRNA 相対レベルがどう変化するかを表示した。mRNA 相対レベルが対照脚と比較して刺激脚で増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットでは破線で示した。

## 図Ⅱ－３．同一個体での骨格筋組織内細胞質ダイニン中間鎖 1 (DYNC1I1) の mRNA 相対レベルにパルス波刺激が及ぼす影響

30 ppm あるいは 400 ppm でのパルス波刺激において、刺激時間を変化させた際に、同一ラットの対照脚とパルス波刺激脚で GAPDH を対照とした DYNC1I1 mRNA 相対レベルがどう変化するかを表示した。mRNA 相対レベルが対照脚と比較して刺激脚で増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットでは破線で示した。

## 図Ⅱ－４．同一個体での骨格筋組織内細胞質ダイニン中間軽鎖 1 (DYNC1LI1) の mRNA 相対レベルにパルス波刺激が及ぼす影響

30 ppm あるいは 400 ppm でのパルス波刺激において、刺激時間を変化させた際に、同一ラットの対照脚とパルス波刺激脚で GAPDH を対照とした DYNC1LI1 mRNA 相対レベル

がどう変化するかを表示した。mRNA 相対レベルが対照脚と比較して刺激脚で増加したラットの測定値間は実線で、減少したラットでは破線で示した。

図 I - 1.

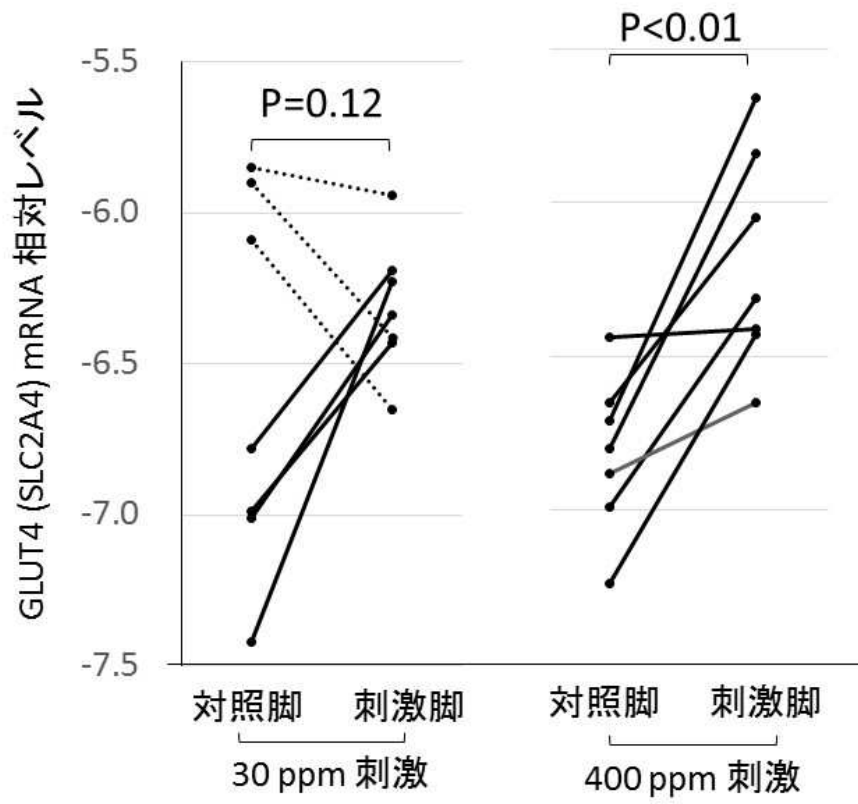


図 I - 2.

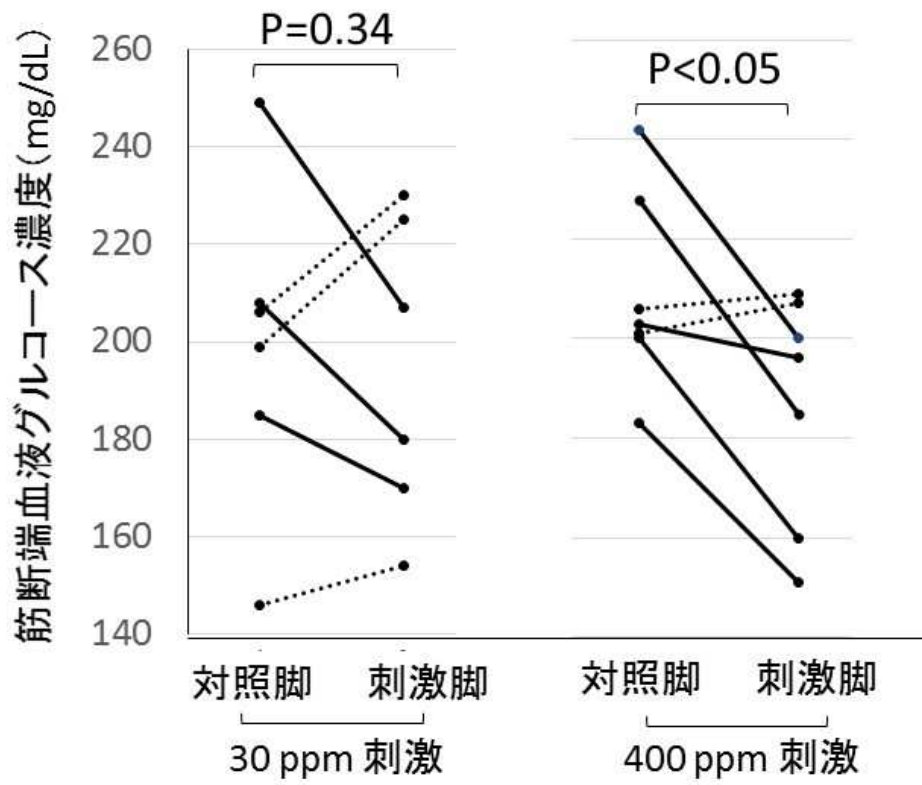




図 I - 3.

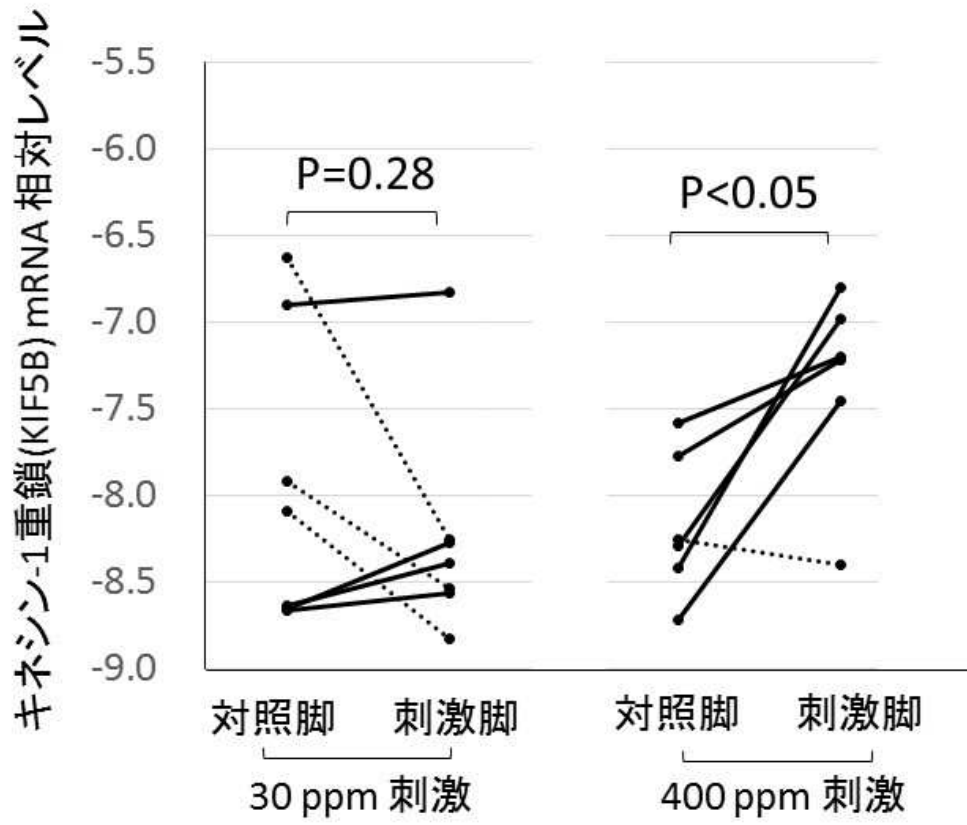


図 I - 4.

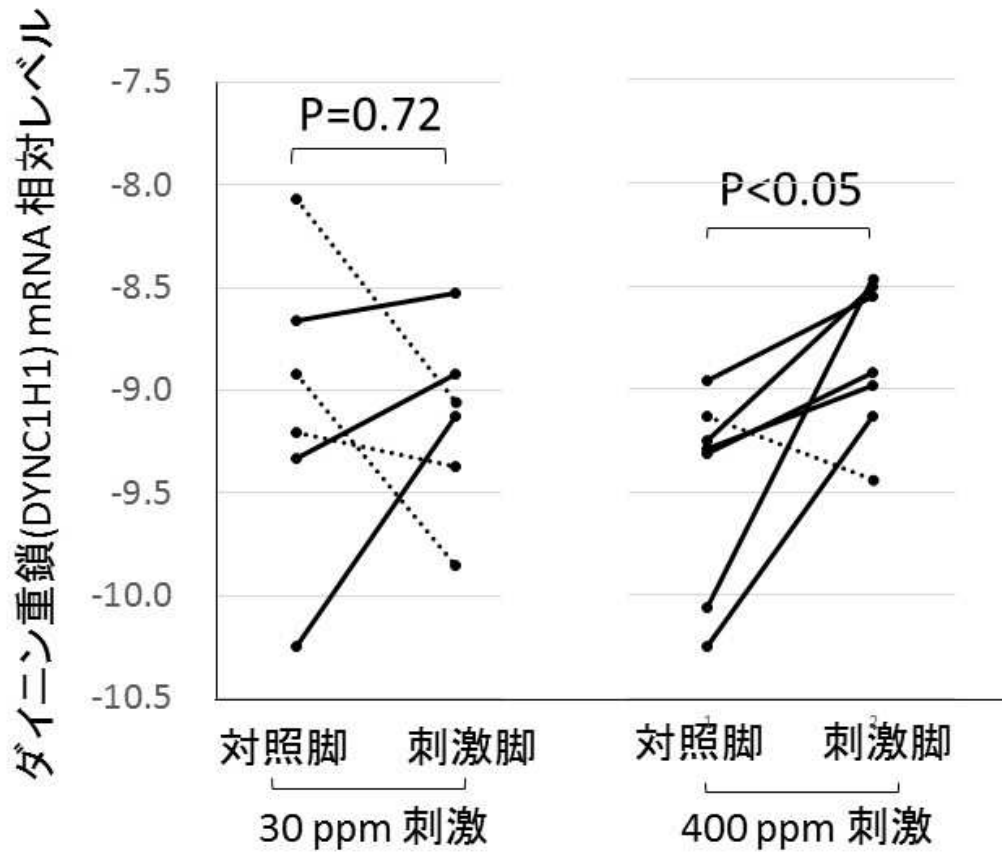


図 II - 1 .

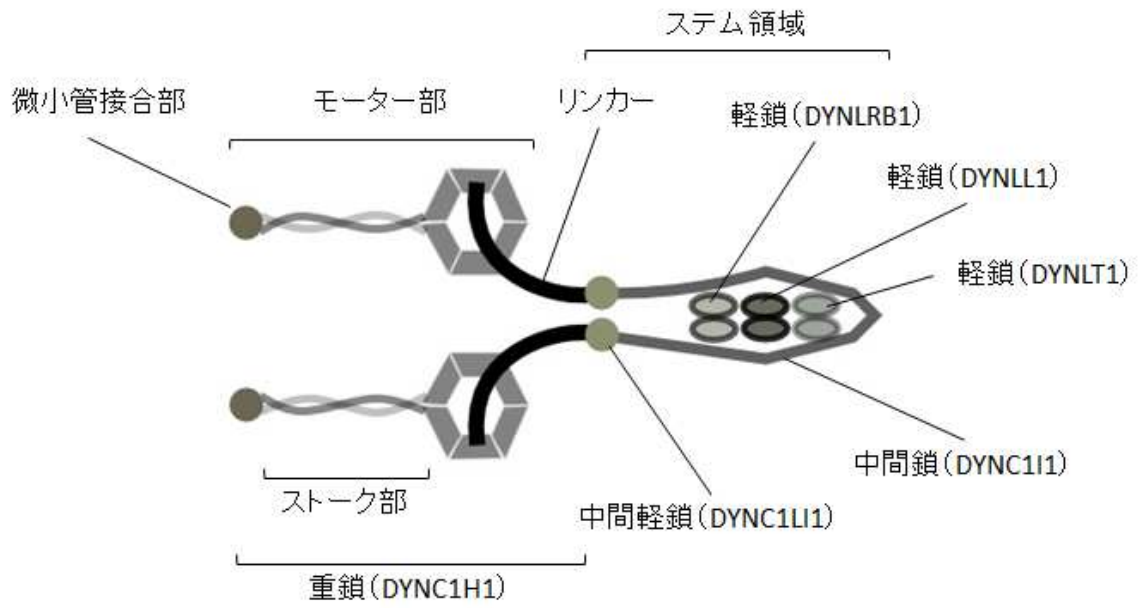


図 II - 2.

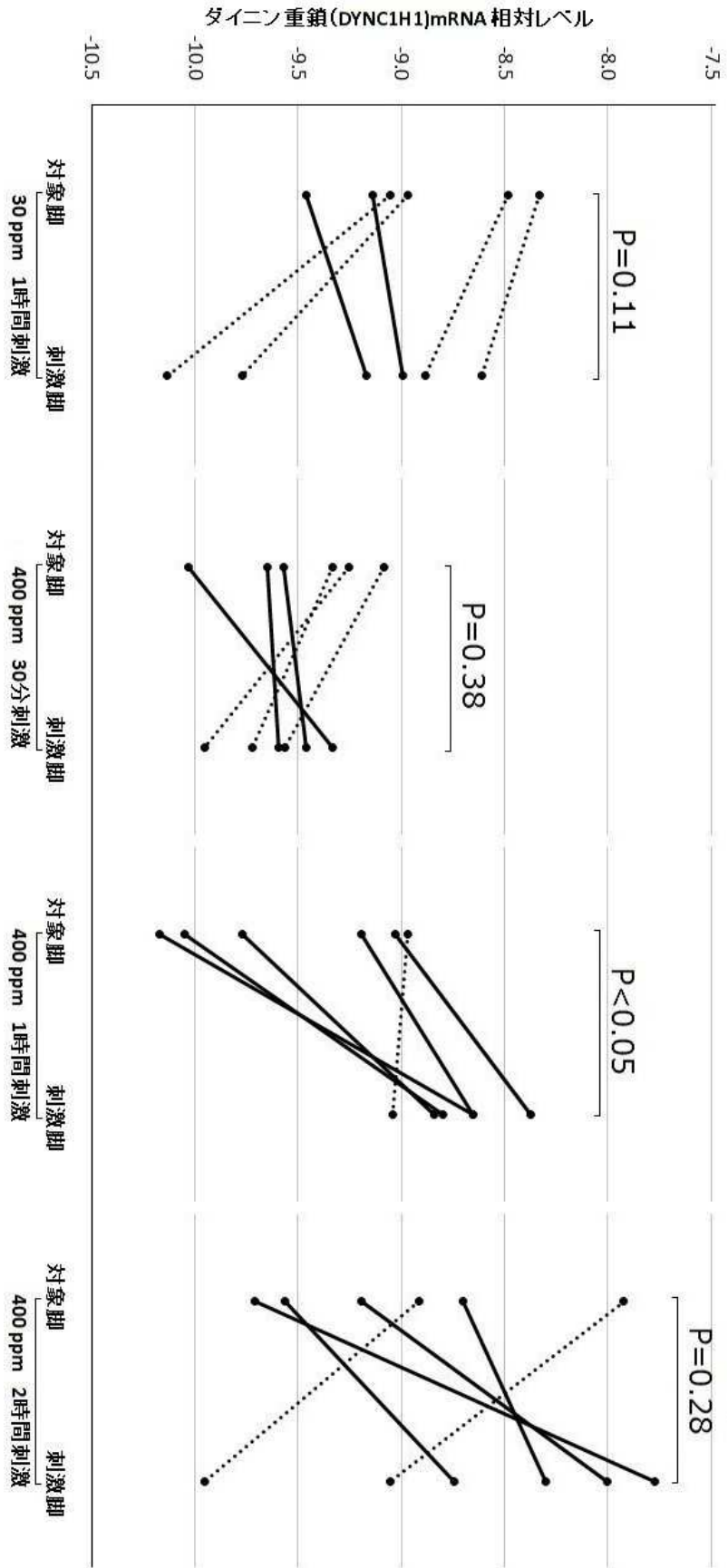


図 II - 3.

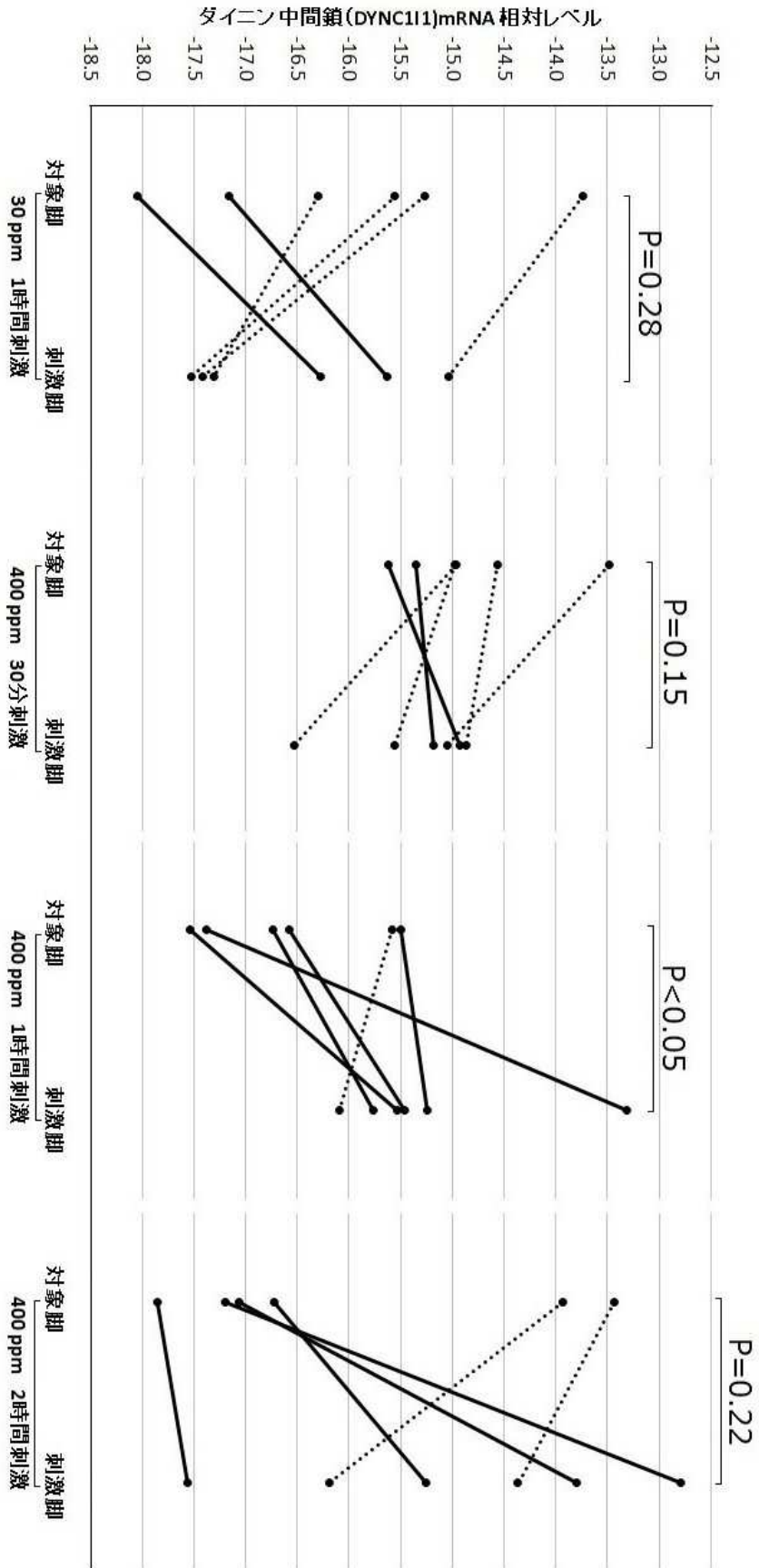


図 II - 4.

