

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390266

研究課題名 (和文) GLUT4 膜移行を制御するマシーナリー分子群の網羅的同定

研究課題名 (英文) Analysis of proteins regulating GLUT4 translocation

研究代表者

神崎 展 (KANZAKI MAKOTO)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号：10272262

研究成果の概要：

インスリン反応性 GLUT4 膜移行機構に関わる制御蛋白質の同定およびそれらの機能について、生化学的手法および生細胞のイメージング技術を組み合わせることにより解析した。GLUT4 小胞のインスリン反応性獲得には、GLUT4 に直接会合する 3 種類の蛋白 (Sortilin-p75NTR-proNGF) による複合体形成とそれに伴う GLUT4 の蛋白寿命制御が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、この GLUT4 を含む蛋白複合体形成は、細胞内シグナル伝達系を活性化して積極的に筋分化にも関与することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン・GLUT4・脂肪細胞・骨格筋細胞・細胞内小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

インスリンの最も重要な生理作用の一つである血糖降下作用は、インスリン反応性糖輸送担体 GLUT4 のトランスロケーション (膜移行) によって誘導される。このインスリン依存性 GLUT4 膜移行機構は、分化した脂肪細胞と健康な筋肉細胞においてのみ発達しているが、2 型糖尿病の病態ではこの機

構に障害が生じていることが知られている。これまで、この GLUT4 膜移行に関与するインスリン受容体シグナル伝達機構について精力的な研究が推進されてきた。そして、この GLUT4 膜移行に必須の役割を果たすインスリン受容体の初期シグナル (IRS-PI3 キナーゼ系など) については明らかにされている。一方、これらのシグナリング分子群の「化学シグナル」は、最終的な生物反応である

GLUT4 膜移行に至る過程で「GLUT4 含有小胞の形成と運搬に関わるマシーナリー分子群の制御」という「動的な反応」へと変換される必要がある。

しかしながら、GLUT4 分子の局在化や・選別化や運搬に関わるマシーナリー分子群については未だ不明な点が多く、上述の「インスリン受容体シグナル」と「GLUT4 小胞輸送システム」を連結する分子基盤についても不明であった。

また、GLUT4 膜移行は、多種多様な分子群の時空間的な制御によって遂行される細胞内小胞輸送であるため、一般的な生化学的および分子生物学的な手法では解析することが難しい。そのため、研究代表者らは enhanced green fluorescent protein (EGFP) 融合 GLUT4 を利用した生細胞イメージング技術を確立して研究を推進してきた。

2. 研究の目的

- (1) 本研究課題では、これまで主流であった受容体シグナル側からの研究アプローチではなく、「GLUT4 小胞」側から、その選別や局在化などの動的な反応を制御する因子やその調節機構についての研究を推進する。特に、インスリン反応性を獲得した GLUT4 小胞に会合している蛋白群を同定して、生細胞のイメージング手法により解析を行うことにより、GLUT4 挙動の制御に関わるマシーナリー分子 (群) についての理解を深めることを目的としている。
- (2) インスリン反応性 GLUT4 膜移行は、脂肪細胞と筋肉細胞にのみ装備された特殊な小胞輸送系の発達が関与しており、上述の GLUT4 小胞に会合した蛋白群の関与が示唆されているが、インスリン反応性獲得機構については不明である。脂肪細胞の優れたモデルである 3T3L1 脂肪細胞株の場合、その細胞分化過程において高いインスリン反応性が獲得されるが、通常の培養系で得られる筋細胞では、細胞分化を誘導しただけでは、そのインスリン反応性は発達しない。そこで、培養筋肉細胞におけるインスリン反応性 GLUT4 膜移行制御系を人為的に操作することにより成熟させることを試み、この現象に関わる因子と機構について解析する。
- (3) そして、これらのインスリン標的細胞のみが獲得する「GLUT4 小胞輸送系」と「インスリン受容体シグナル伝達系」を連結する機構について解析することを最終目的とした。

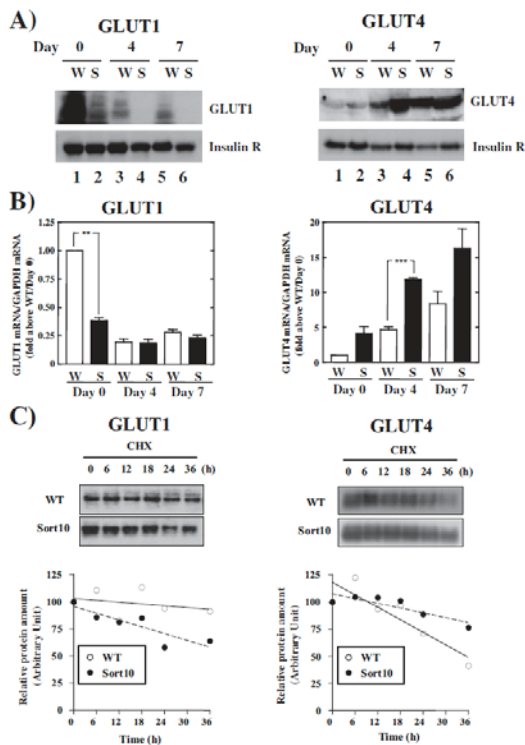
3. 研究の方法

- (1) インスリン反応性 GLUT4 膜移行過程について、生化学的解析および生細胞イメージング解析の両手法において正確にモニターできる独自の実験系 (exofacial Myc-GLUT4-ECFP を恒常発現する 3T3L1 脂肪細胞株と C2C12 筋芽細胞株) を構築する (GLUT4 膜移行解析用細胞株の作製)。
- (2) インスリン反応性を獲得した GLUT4 小胞会合蛋白の生化学的同定するために、抗 myc 抗体を温度感受性磁性ナノビーズに架橋し、インスリン依存性に膜移行した myc-GLUT4-ECFP を特異的に標識することにより GLUT4 貯蔵コンパートメントのみを選択的に回収してそこに含有する蛋白の同定を行う (GLUT4 小胞関連蛋白の生化学的同定)。
- (3) GLUT4 小胞会合蛋白の機能について、一般的な生化学・分子生物学解析を行うとともに、生細胞イメージング解析により GLUT4 膜移行に対する影響について脂肪細胞および筋肉細胞を用いて調べる (GLUT4 会合蛋白の機能解析)。
- (4) GLUT4 小胞の成熟 (インスリン反応性の獲得) 過程について解析するため、筋細胞の人為的収縮活動負荷による運動効果の影響について調べる (筋細胞を利用したインスリン反応性獲得機構およびインスリン受容体シグナルとの関連に関する生化学的解析)。

4. 研究成果

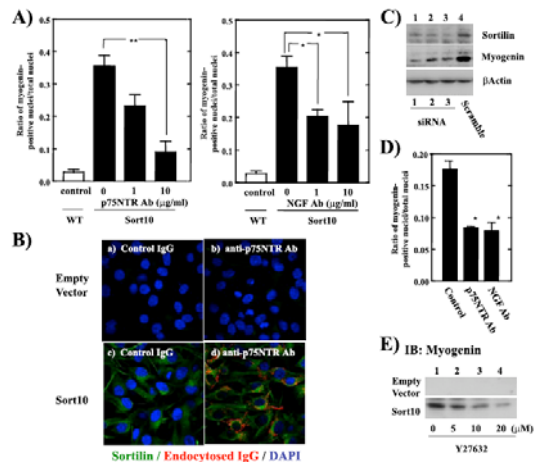
- (1) myc-GLUT4-ECFP を恒常発現する 3T3L1 脂肪細胞株および C2C12 筋芽細胞株を樹立した。これらの細胞の分化を誘導することにより、インスリン刺激に応じた GLUT4 膜移行量を正確にモニターできる測定系を確立した。また、これらの細胞において GLUT4 膜移行過程を生細胞イメージング技術により観察することを可能にした。
- (2) myc-GLUT4-ECFP を発現した 3T3L1 脂肪細胞を利用して、インスリン反応性 GLUT4 含有小胞を素精製することに成功した。この際、温度感受性磁性ナノビーズを利用することによりインスリン反応性を有する GLUT4 小胞のみを選択的に回収することを可能にした。そして、インスリン反応性 GLUT4 含有小胞に会合している蛋白群について生化学的に同定作業を行い、既知の GLUT4 小胞関連蛋白質 (insulin-responsive aminopeptidase:

- IRAP, VAMP2, Syntaxin6, Syntaxin16, Sortilin など)の存在を確認するとともに、いくつかの新規蛋白質を同定した。
- (3) Sortilin と会合能のある p75NTR (low-affinity nerve growth factor receptor) とそのリガンドである proNGF の作用について、特に筋細胞におけるインスリン反応性 GLUT4 小胞輸送系に対する作用とその機構について調べた。Sortilin-p75NTR-proNGF protein complex は GLUT4 と会合することにより、インスリン反応性 GLUT4 膜移行システムの成熟を促進する能力があることを明らかにした。この際、インスリン反応性の獲得には、Ubc9 依存性 SUMO 化修飾を介した GLUT4 の蛋白寿命の延長と GLUT1 の蛋白寿命の短縮の両方が同時に関与する可能性を明らかにした (図 1)。
- (4) これらの成果は、GLUT4 分子の選別・局在制御に関与するマシーナリー分子複合体形成とその機構に関する新知見として非常に重要である。特に、GLUT4 と会合する Sortilin 関連分子群が GLUT1 の蛋白寿命にも影響をおよぼすことから、これらの蛋白複合体はインスリン反応性だけでなく、糖の取り込みシステム全般に対して包括的な制御を行っていることを示唆している。



【図 1 : Sortilin 蛋白質の過剰発現による GLUT4 と GLUT1 の mRNA 発現量 (A, B) と蛋白寿命 (C) の変化】

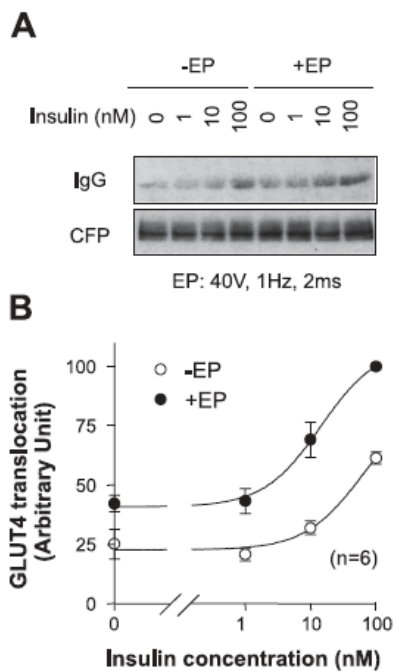
- (5) 上述のようなインスリン反応性 GLUT4 小胞の形成促進作用に加えて、この sortilin および会合分子群は、p75NTR 経路で低分子量 GTP 蛋白 RhoA とそのエフェクター因子である ROCK (Rho kinase) の活性化を介して、骨格筋細胞の分化自体も強く促進する能力があることを発見した (図 2)。GLUT4 と会合能のあるこれらの蛋白複合体がシグナル伝達系を活性化することから、「GLUT4 小胞」を基点とし、そこから「シグナル伝達系」が活性化されるという新しい機構の存在が示唆された。また、現在、GLUT4 小胞に会合しているその他の蛋白分子の機能解析を推進している。



【図 2 : Sortilin-p75NTR-proNGF 蛋白複合体形成 (B) は筋細胞の分化促進する (A, C, D)。この分化促進作用には、低分子量 GTP 結合蛋白 Rho 依存性キナーゼ ROCK が関与している (E)】

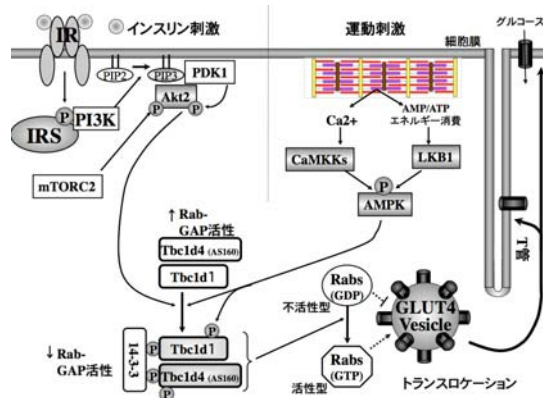
- (6) 培養筋管細胞に対して電気パルス依存性の収縮活動を負荷することにより、筋細胞のインスリン反応性 GLUT4 膜移行システムが有意に改善されることを見いだした (図 3)。

2 型糖尿病によりインスリン抵抗性を惹起した病態であっても、適切な運動刺激は減弱したインスリン反応性を効果的に改善できる。運動はメカニカルストレスやエネルギー消費ストレスなどを発生して、その複合的な刺激が「運動効果」をもたらすと考えられているが、その詳細は全く不明である。本研究結果によって培養細胞系においても、生体と同様にその「運動効果」を誘導することができるようになった意義は非常に大きく、この培養筋細胞系が「運動効果」の分子基盤の解明に大変有効なモデル系となると考えている。



【図3：電気パルス依存性収縮活動負荷によるインスリン反応性 GLUT4 膜移行の改善効果。インスリンによる myc-GLUT4-EGFP 膜移行量を抗 myc 抗体の結合量により定量した(A, B)】

(7) このインスリン反応性を獲得した高度発達型培養筋細胞系を利用することにより、「インスリン受容体シグナル伝達系」と「GLUT4 小胞輸送系」とを関連させる分子基盤について探索し、Tbc1d1 の Ser231 のリン酸化状態が収縮運動刺激により有意に上昇していることを見いだした。Tbc1d1 は、PKB/AKT の基質として同定された AS160(Tbc1d4)と同じファミリーに属しており、AS160 と同様に GLUT4 小胞に存在する低分子量 GTP 結合蛋白 Rab ファミリーの活性を制御する機能を持っているが、その役割については不明である。本研究結果により、インスリン反応性を獲得した筋細胞において、そのリン酸化が亢進していることが明らかになり、インスリン受容体と収縮活動の両方の初期シグナルによりリン酸化が調節されることにより、GLUT4 膜移行の制御に関与していることが考えられた(図4)。「インスリン受容体シグナル系」と「GLUT4 小胞の運搬」に直接関与するマシーナリー分子の一つである Rab ファミリーを関連させる重要な機構であると考えられ、現在その詳細についての解析を継続して推進している。



【図4：Tbc1d1 は「初期シグナル」と「GLUT4 小胞輸送系」を連関するキー因子として機能する】

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 8 件) (すべて査読あり)

- ① Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying contraction-inducibile responses of skeletal muscle (2008) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295 (5):E1191-1204,2008
- ② Ariga M, Nedachi T, Katagiri H, Kanzaki M. Functional role of sortilin in myogenesis and insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes (2008) *J Biol. Chem.* 283(15): 10208-10220.
- ③ Nedachi T, Kadotani A, Ariga M., Katagiri H, Kanzaki M. Ambient glucose levels qualify the potency of insulin myogenic actions by regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes (2008) *Am. J. Physiol Endocrinol Metab* 294(4): E668-678.
- ④ Okutsu S, Hatakeyama H, Kanzaki M, Tsubokawa H, Nagatomi R. Electric pulse stimulation induces NMDA glutamate receptor mRNA in NIH3T3 mouse fibroblasts (2008) *Tohoku J Exp Med.* 215:181-187.
- ⑤ Fujita H, Nedachi T, Kanzaki M. Accelerated *de novo* sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. (2007) *Exp Cell Res* 313(9): 1853-1865
- ⑥ Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Yamada T, Ohihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kanzaki M, Yamamoto TT, Ishibashi S, Oka Y. Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance (2007) *Diabetes* 56(1):24-33.
- ⑦ Nedachi T, Kanzaki M. Regulation of

glucose transporters by insulin and extracellular glucose in C2C12 myotubes. (2006) *Am. J. Physiol. Endocrinol & Metab* 291: E817-828

- ⑧ Kanzaki M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocrine Journal*. (2006) 53: 267-293
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Kadotani A., Katagiri H., Kanzaki M. Involvement of autocrine EGF-Receptor ligands in the palmitate-induced COX-2 expression in C2C12 myotubes. 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting (アメリカ細胞生物学会) 2008/12/13-17, San Francisco, USA
- ② 藤田英明・渡邊朋信・根建拓・樋口秀男・神崎 展・収縮筋細胞内における GLUT4 分子の挙動解析 - 第45回生物物理学会・パシフィコ横浜 (神奈川県)・2007/12/21-23
- ③ 神崎 展 「ナノ蛍光粒子を用いたインスリン反応性 GLUT4 分子挙動変化の解析」第 50 回日本糖尿病学会シンポジウム「小胞輸送と糖代謝調節」2007/5/24-26 (仙台)
- ④ 根建 拓・藤田英明・神崎 展筋のインスリン反応性に対する運動効果の解析-収縮能を有する高度発達型培養筋細胞系の構築-・第50回 日本糖尿病学会 2007/5/24-26 (仙台)
- ⑤ 根建 拓・藤田英明・神崎 展 高度発達型培養筋細胞の作製技術とその糖尿病研究への利用・第47回 生体医工学会 2007/4/25-27 (仙台)
- ⑥ 藤田英明・渡邊朋信・根建 拓・樋口秀男・神崎 展・Qdotを用いたGLUT4分子挙動解析-TIRF顕微鏡による膜融合過程の観察-・第47回 生体医工学会・2007/4/25-27 (仙台)
- ⑦ Fujita H, Watanabe T, Nedachi, T, Higuchi,H, Kanzaki,M Live cell tracking of GLUT4 molecule in 3T3L1 adipocyte using Qdot nano-crystals. 46th The American Society for Cell Biology Annual Meeting(アメリカ細胞生物学会) 2006/12/9-13 (San Diago)
- ⑧ Ariga, M, Nedachi, T, Katagiri, H. Kanzaki, M Sortilin regulates myogenesis and insulin-induced GLUT4 translocation in C2C12 myocytes. 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (第 20 回国際生化学・分子生物学会) P366 (2P-C-145), 2006/6/18-23 (Kyoto)
- ⑨ Nedachi,T, Kanzaki, M. Degradation of

Sir2 by ubiquitin-proteasome pathway that depends upon metabolic states controls C2C12 cell differentiation. 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (第 20 回国際生化学・分子生物学会) P539 (4P-A-028) 2006/6/18-23 (Kyoto)

- ⑩ Nedachi T, Fujita, H, Kanzaki, M Development of insulin-responsive GLUT4 trafficking machinery by forced Ca²⁺ transients in C2C12 myotubes. 66th American Diabetes Association Scientific Sessions, 第 66 回アメリカ糖尿病学会 (Washington DC) 2006/6/9-13 Diabetes 55:(suppl): A242 (1022-P), 2006
- ⑪ 根建拓・藤田英明・神崎 展 新規高度発達型培養筋細胞系における GLUT4 膜移行を指標とした疑似運動刺激効果の検討・第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会・2006年5月25-27日 (東京)

[図書] (計 13 件)

- ① 神崎 展 筋・脂肪におけるインスリン作用 糖尿病 (2009) 6月号 (印刷中) 特集「インスリン作用の原点」編集：江本政弘
- ② 神崎 展 筋肉におけるエネルギー代謝調節とインスリン抵抗性 実験医学増刊号 (2009) 「エネルギー代謝研究の最前線」Vol127-No7, p78-85 監修：岡芳知・片桐秀樹 羊土社
- ③ 神崎 展 インスリン受容体シグナルと GLUT4 小胞輸送系との接点-モーター蛋白質 Myo1c の活性化- 実験医学2月号 27 (3) :407-408, 2009
- ④ 藤田英明・神崎 展 Live cell イメージング技術を用いたインスリン反応性 GLUT4 トランスロケーションの解析 分子糖尿病学の進歩 2008 (2008) p48-55. 監修：矢崎義雄、金原出版
- ⑤ 有賀美也子・根建 拓・神崎 展 GLUT4 小胞輸送とインスリン抵抗性 新時代の糖尿病学1 (2008) p432-436 日本臨床社
- ⑥ 神崎 展 容量依存性カルシウム流入の分子基盤の解明 実験医学 12月号 26 (19):3046-3047, 2008
- ⑦ 神崎 展 PPAR δ と AMP キナーゼを活性化する薬剤は運動効果をもたらす 実験医学 10月号. 26(16) :2592-2593, 2008
- ⑧ 神崎 展 リソソームにおける ClC-1 の働きと酸性オルガネラの成熟 実験医学 8月号 26 (13) : 2092-2093, 2008
- ⑨ 神崎 展 mTOR によるミトコンドリア機能の制御機構 実験医学 2月号 26(3) : 402-403, 2008
- ⑩ 神崎 展 脂質膜の構造変形に関わる

Mechano-enzyme EHDs 実験医学 12 月号 25(19): 3005-3005, 2007

- ⑪ 神崎 展 SUMO 化修飾によるカイニン酸受容体チャネルのエンドサイトーシス 実験医学 8 月号 25(12):1834-1835, 2007
- ⑫ 神崎 展 脂肪細胞の肥大とマトリックスメタロプロテアーゼ 実験医学 24(12):1768-1769, 2006
- ⑬ 神崎 展 pH センサーとしての V-ATPase の役割と細胞内小胞輸送制御 実験医学 24(6):827-828, 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 展 (KANZAKI MAKOTO)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号：10272262