

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591046

研究課題名（和文）SUMO 縮合酵素 Ubc9 によるインスリン感受性増強メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of Insulin Sensitivity Regulation by the SUMO conjugating enzyme, Ubc9

研究代表者

柴田 宏 (SHIBATA HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：20235584

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂肪細胞におけるグルコース輸送のインスリン感受性発現調節機構について検討を行い、SUMO 化縮合酵素 Ubc9 が GLUT4 の細胞内ターゲティングと蛋白寿命を介してインスリン感受性発現を調節する重要な機能蛋白であることを示した。さらに、GLUT4 蛋白寿命の調節に、エンドソームからトランスゴルジネットワークの輸送に関与するレトロマー複合体が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we showed that SUMO-conjugating enzyme Ubc9 regulates the insulin sensitivity of glucose transport via GLUT4 subcellular targeting and turnover in adipocytes. In addition, we showed that the retromer complex which is involved in the endosome-to-TGN transport plays an important role in the regulation of GLUT4 turnover.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：代謝学・細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン感受性, 脂肪細胞, 糖輸送, SUMO 化, Ubc9, GLUT4, レトロマー複合体

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国における2型糖尿病やメタボリックシンドローム患者数の増加は重大な医学的・社会的懸念となっており、その病態の解明と治療法の確立は喫緊の課題といえよう。この2つの疾患の病態には末梢組織のインスリン感受性の低下(=インスリン抵抗性)が大きく関与すると考えられているが、末梢におけるインスリン感受性グルコース輸送を担う骨格筋および脂肪細胞のインスリン感受性が発現・維持される機構、またその破綻メカニズムの全体像は未だ明らかではない。

骨格筋や脂肪細胞のグルコース輸送システムは、極めて高いインスリン感受性を示し、インスリン刺激後、細胞内へのグルコース取込みは10-40倍にも活性化される。この高いインスリン感受性が発現・維持されるためには、インスリン受容体以降のシグナル伝達機構に加えて、インスリン感受性グルコース輸送を担う GLUT4 の蛋白発現量とその細胞内局在(インスリン感受性 GLUT4 貯蔵コンパートメントへのターゲティング)が重要であり、これら3つのファクターのいずれかの異常は、インスリン感受性の低下をもたらすと考えられる。

例えば、脂肪細胞やマクロファージ由来の TNF- α や遊離脂肪酸は、「入力シグナル」としてのインスリン・シグナルを阻害することによりインスリン抵抗性をもたらすことが知られているが、一方、肥大した脂肪細胞や慢性的にインスリン刺激を受けた脂肪細胞では、GLUT4 の細胞内ターゲティングの変化により、「出力装置」であるグルコース輸送システム自体のインスリン感受性が低下する。しかし現在、このような GLUT4 の細胞内ターゲティングや蛋白寿命と関連したインスリン感受性調節メカニズムは完全には解明されていない。

2007年に申請者らは、脂肪細胞において、SUMO化縮合酵素である Ubc9 が、(1) GLUT4 特異的なインスリン感受性コンパートメント(GSC; GLUT4-specific Storage Compartment)への GLUT4 ターゲティングを促進するとともに、(2) GLUT4 分解を抑制して発現量を増加させ、(1)(2)両者の作用によりグルコース輸送のインスリン感受性を増強する重要な機能分子であることを報告した(Liu et al. Diabetes 56: 1977, 2007)。Ubc9 以外に、このような作用をもつ機能分子として最近 Kandror のグループによって報告された Sortilin がある(Shi & Kandror, Dev Cell 9: 99, 2005)。興味深い点として、GLUT4 の GSC へのターゲティングが増加あるいは減少した状況では、GLUT4 の蛋白分解がそれぞ

れ抑制あるいは促進された。すなわち、GSC へターゲティングされることにより GLUT4 は分解から保護されることがわかった。このことから、申請者は、一見無関係に見える Ubc9 の2つの作用は、実は貯蔵(GSC)あるいは分解(リソソーム)という異なる2方向への GLUT4 ソーティングのスイッチングというモデルで一元的に説明可能であるという作業仮説の着想に至った。すなわち、Ubc9 が十分量発現している通常の状態では GLUT4 は GSC へターゲティングされることにより、分解が抑制されて発現量が維持される。しかし、Ubc9 発現量の減少等により GLUT4 のソーティングが分解系方向へシフトすると蛋白分解による発現量の減少だけでなく GSC へのターゲティングも減少し、インスリン感受性の低下をもたらすというモデルが想定された。本研究は、申請者らが得たこれらの知見にもとづき、GLUT4 のソーティングのスイッチングがどのように調節されているのか、また Ubc9 がスイッチングにどのように関わっているかを明らかにすることにより、細胞内ターゲティングと蛋白寿命の制御の観点に立った新たなインスリン感受性調節機構を解明することを目的として行われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) GLUT4 の分解制御機構を明らかにし、分解機構における Ubc9 の作用点を明らかにすること、(2) Ubc9 の標的結合分子を明らかにすること、(3) GLUT4 の細胞内ソーティングにおいて GSC あるいはリソソームへのソーティングが互いに排他的関係にあることを実証し、GLUT4 の運命決定のスイッチ機構を明らかにすること、の3点である。

3. 研究の方法

GLUT4 の分解機構に関する検討

Ubc9 による GLUT4 分解抑制のメカニズムを明らかにするためには、GLUT4 の分解機構を明らかにし、Ubc9 が GLUT4 分解のどこのステップに作用するかを明らかにすることが重要である。このため、本研究では、まず GLUT4 の分解機構を明らかにするための検討を行った。申請者らのこれまでの検討では、脂肪細胞における GLUT4 の分解はリソソーム阻害剤であるクロロキンやバフィロマイシン A1 で著明に抑制されること、また Ubc9 のノックダウンは GLUT4 の分解だけでなく、トランス Golgi ネットワーク(TGN)蛋白であるマンノース6リン酸受容体やシンタキシン6の分解促進を伴うことから、おそらく GLUT4 は TGN からリソソーム系へソーティングされて

分解される可能性を考えた。また、申請者らは GLUT4 の分解がプロテインキナーゼ CK2 (別名カゼインキナーゼ 2) の阻害剤で著明に抑制されることを見いだした (2007 年, 2008 年, 2010 年の日本糖尿病学会にて報告)。このことから、GLUT4 分解機構のモデルとして、GLUT4 が TGN において何らかの CK2 基質のリン酸化を介して、リソソーム系へソーティングされるという図式が考えられた。そこでこのモデルを検証するために以下の検討を行った。

(1) GLUT4 の分解に CK2 が関与することを RNA 干渉による CK2 ノックダウンにより確認する。このためにはアデノウイルスベクターを用いて CK2 ノックダウン用の shRNA を 3T3-L1 脂肪細胞に導入し、GLUT4 の蛋白寿命を 35S メチオニンラベル法で検討する。すでにウイルスベクターは作製を終了している。

(2) TGN においてリソソーム系へのソーティングに関与し、かつ CK2 の基質であることが知られている蛋白として、GGA

(Golgi-localized γ -ear-containing Arf binding protein) がある。また GGA は TGN からの GSC の生成に関与しているとの報告がある。脂肪細胞には GGA1, 2 および 3 が発現しているが、このうち CK2 リン酸化部位があるのは GGA1 と 3 であった。さらに脂肪細胞の分化に伴う発現量の変化を検討したところ、GGA1 のみが分化に伴って発現量の増加が見られたのに対し、GGA2 発現量は減少し、GGA3 は変化がなかった。そこで GLUT4 の分解に GGA が関与するかどうかを検討するため、野生型とリン酸化部位に変異を導入した GGA1 および 3 をアデノウイルスベクターにより過剰発現させ、GLUT4 蛋白寿命に対する効果を検討した。

(3) GLUT4 がリソソームへソーティングされる経路は TGN からなのか、それとも別の経路が関与しているのかどうかを検討した。一般に、リソソームへの主なソーティング経路として、TGN→後期エンドソーム→リソソームの経路以外に、早期エンドソーム→後期エンドソーム→リソソーム、という経路が知られている。そこで早期エンドソームを経由する経路の関与について、変異ダイナミンの過剰発現により GLUT4 のエンドサイトーシスを抑制した条件下で GLUT4 の分解が抑制されるかどうかを検討する。

4. 研究成果

本研究の成果は以下の 3 点に集約される。

(1) GLUT4 細胞内ソーティングのスイッチにおけるレトロマー複合体の役割：レトロマー複合体は SNX1, SNX2, Vps26, Vps29, Vps35 からなる蛋白複合体であり、マンノース 6 リン酸受容体 (M6PR) などの TGN-エンドソーム間をリサイクリングしている分子の、エンド

ソームから TGN への回収 (retrieval) に重要な機能を果たしている。レトロマーをノックダウンすると、M6PR が TGN へ回収されなくなり default の流れに乗って早期エンドソームから後期エンドソーム、リソソームと輸送されて分解され、発現量が減少する。そこで申請者は、GLUT4 の分解系への輸送にレトロマーが関与しているかどうかを検討するためにレトロマーのコンポーネントの一つである Vps26 のノックダウンを行った。その結果、GLUT4 の減少が見られた。この結果は、GLUT4 がつねにエンドソームから TGN へレトロマーを介して回収されており、この機構が障害されると GLUT4 がリソソーム系へソーティングされて分解されることを示している。

そこで次にインスリンのレトロマーに対する効果を検討した。4-6 時間インスリンした脂肪細胞においてレトロマーか苦コンポーネントの発現量の減少は見られなかった。しかし、その細胞内分布を検討した結果、レトロマーは TGN-エンドソーム膜画分のみならず、GSC 膜画分に大量に存在していること、またインスリン刺激によりレトロマーは細胞内の膜画分から解離することが明らかになった。(2009 年米国糖尿病学会, 2009 年, 2010 年日本糖尿病学会にて発表)

以上の結果は、GLUT4 ソーティングのスイッチングは当初想定された TGN ではなく、エンドソームにおいて生じることを示唆している。

(2) GLUT4 分解におけるプロテインキナーゼ CK2 の役割：レトロマーの GSC 膜画分との結合・解離の制御機構に関して検討を進め、Vps35 の CK2 キナーゼ依存的なリン酸化が Vps35 の膜からの解離に必要であることを見いだした (2010 年日本糖尿病学会にて発表)。

(3) GLUT4 分解における活性酸素の役割：

上記インスリン作用 (GLUT4 分解促進とレトロマーの膜からの解離) は PI3 キナーゼや Erk シグナルには依存せず、CK2 キナーゼ阻害剤により著明に抑制されたことから、通常の代謝調節シグナルや増殖シグナルとは別個の未知のインスリン・シグナル系を介していることが考えられる。我々は、この GLUT4 分解促進のシグナルを明らかにするための検討を行い、NADPH オキシダーゼ阻害剤でこの作用が抑制されること、過酸化水素の投与によりこの効果が再現されること、インスリンが実際に過酸化水素の産生を亢進することから、このインスリン作用に活性酸素の産生が関与していることを明らかにした (2010 年日本糖尿病学会にて発表)。

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1件)

①Furuta, A., Tanaka, M., Omata, W., Nagasawa M., Kojima I., Shibata, H., Microtubule Disruption with BAPTA and Dimethyl BAPTA by a Calcium Chelation-Independent Mechanism in 3T3-L1 Adipocytes, *Endocrine J.*, 査読有, Vol. 56, No. 2, 2009, pp. 235-243

〔学会発表〕 (計6件)

①柴田宏, 馬金輝, 中川裕子, 小島至, インスリンによるレトロマー機能制御におけるCK2の役割, 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010. 5. 29, 岡山市デジタルミュージアム (岡山市)

②馬金輝, 長澤雅裕, 中川祐子, 小島至, 柴田宏, インスリンによる活性酸素産生亢進を介したレトロマー機能の阻害とGLUT4分解促進, 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010. 5. 28, 岡山全日空ホテル (岡山市)

③Shibata, H., Ma, J., Nakagawa, Y., Kodera, T., Yoshida, R., Kojima I., The Role for the Retromer Complex in GLUT4 Trafficking and Degradation in Adipocytes, 第69回米国糖尿病学会学術集会, 2009. 6. 6, メモリアル・コンベンションセンター (ニューオリンズ市, アメリカ合衆国)

④柴田宏, 馬金輝, 中川裕子, 小島至, インスリンによるGLUT4分解促進作用におけるレトロマー複合体の役割と調節, 第52回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009. 5. 22, リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府)

⑤柴田宏, インスリンによるレトロマー複合体の機能制御とGLUT4分解促進機構-酸化ストレスと細胞内トラフィックの接点-, 生体調節研究所シンポジウム「代謝疾患研究の最前線」, 2009. 3. 17, 群馬大学生体調節研究所 (前橋市)

⑥柴田宏, 小俣和香, 長澤雅裕, 中川祐子, 小島至, インスリンによるGLUT4ダウンレギュレーションにおけるプロテインキナーゼCK2の関与, 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008. 5. 22, 東京国際フォーラム, 東京都)

〔図書〕 (計1件)

①柴田宏, 他, 文光堂, Principles and Practice内分泌・代謝「脂肪細胞が分泌するホルモン (アディポカイン) の作用」(編集: 寺内康夫, 鯉淵典之, 後藤英司) 2010, 40-47

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/celphy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 宏 (SHIBATA HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号: 20235584