

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570142

研究課題名（和文）Glut4トランスロケーションに関する新規必須因子BIG2の機能解析

研究課題名（英文）Role of BIG2, a Guanine-Nucleotide Exchanging factor for ADP-Ribosylation Factors, in Insulin-Regulated Glucose Transporter Translocation

研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA KEIJI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：60294039

研究成果の概要（和文）：

インスリン刺激によるGlut4トランスロケーションに対してBIG2は、インスリン存在下および非存在下どちらの場合においてもGlut4小胞形成に必須な因子であることを、in vivoおよびin vitroにおいて明らかにした。そして、BIG2は、リサイクリングエンドソームからのGlut4小胞形成に作用しており、また、このGlut4小胞形成にArf3が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We here show that BIG2 plays an important role in a formation of Glut4 vesicles from endosomal compartment in both basal and insulin-stimulated adipocytes. In 3T3-L1 adipocytes, knockdown of BIG2 by RNA interference led to insufficient insulin-stimulated Glut4 translocation to the plasma membrane. The basal distribution of Glut4 was analyzed by subcellular fractionation. It was shown that the formation of Glut4-vesicles in the BIG2-knockdown cells was strongly repressed. Here, we used an in vitro reconstitution of Glut4-vesicles in order to demonstrate that these Glut4-vesicles are formed from endosomal membranes in a BIG2-dependent manner. Reducing endogenous BIG2 inhibited in vitro formation of Glut4 vesicles from the endosomal compartment prepared from not only unstimulated but insulin-stimulated adipocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物学

キーワード：Glut4、BIG2、Glut4トランスロケーション、インスリン作用

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省発表の「平成18年国民健康・栄養調査の概要」によると、「糖尿病」は約820万人、「糖尿病予備軍」は約1,050万人で、

合計すると約1,870万人となっており、成人の約6人に1人が糖尿病かその予備軍であり、その発症機序の解明が急務である。糖尿病は、血糖値を低下させるために作用する唯一の

ホルモンであるインスリンの標的細胞における作用不全がその発症の大きな要因の一つであると考えられている。そして、インスリンの最も重要な作用の一つが、脂肪組織及び骨格筋に作用し、これら細胞内に貯蔵されているインスリン応答性グルコーストランスポーター (Glut4) の細胞膜への移行 (トランスロケーション) の促進と、その結果起こるグルコースの細胞内への取込みである。そして、このインスリン刺激による Glut4 トランスロケーション機構の破綻が糖尿病発症の主要な原因の一つであると考えられている。

2. 研究の目的

申請者は、3T3-L1 脂肪細胞において BIG2 を siRNA によりノックダウンすると、インスリン刺激による Glut4 トランスロケーションが抑制されることを明らかにしていた。しかし、これまでに Arf のグアニンヌクレオチド交換因子である BIG2 が Glut4 トランスロケーションに関与していることは報告されておらず、その作用も明らかではない。そこで、本研究では、Glut4 トランスロケーションに対する BIG2 の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Glut4 トランスロケーションの解析

3T3-L1 脂肪細胞を 0.1% BSA を含む KRH 緩衝液で 37°C、1 時間インキュベートした後、インスリン刺激する場合は、最終濃度が 10^{-7} M となるようにインスリンを添加し、さらに 10 分間インキュベートした。その後、3% PFA により細胞を固定し、一次抗体に抗 Glut4 抗体、二次抗体に HRP-conjugated 抗マウス IgG 抗体を用い細胞表面の Glut4 を標識した。そして、Infinit F500 (TECAN) を用い、ECL 反応により細胞表面の Glut4 を定量した。

(2) 細胞分画

細胞を 0.25M スクロース緩衝液により洗浄を、テフロンホモジナイザーにより細胞を破碎した。細胞破碎液を 16,000g で 15 分間遠心分離し、ペレット (A) と上静 (B) とに分離した。ペレット (A) を 0.25M スクロース緩衝液に懸濁後、1.12M スクロース緩衝液上に重層し、100,000g で 70 分間遠心分離した。ペレットを核画分 (N) として回収した。中間層を 0.25M スクロース緩衝液で希釈した後、

100,000g で 70 分間遠心分離し、ペレットを細胞膜画分 (P) として回収した。また、(B) の上静は 48,000g で 20 分間遠心分離し、ペレットを high density microsomal 画分 (H) として回収した。そして、上静をさらに 212,000g で 70 分間遠心分離しペレットを low density microsomal 画分 (L) として、上静をサイトゾル画分 (C) として回収した。

(3) in vitro Glut4 小胞再構成

細胞分画により取得した H 画分 (10・g タンパク質を含む) と C 画分 (100・g タンパク質を含む) を反作用緩衝液 (20mM HEPES-KOH (pH7.4), 0.25M Sucrose, 0.1M KCl, 5mM $MgSO_4$, 0.5mM $CaCl_2$, 38mM potassium aspartate, 38mM potassium gluconate, 38mM potassium glutamate, 1mM ATP, 8mM creatin phosphate, 1.5unit/ml creatin phosphokinase, protease inhibitor cocktail (Roche)) と混合し 37°C で 20 分間インキュベートした。その後、48,000g で 20 分間遠心分離し、H 画分をペレットとして回収し、上静をさらに 212,000g で 70 分間遠心分離することで新たに形成された小胞をペレットとして回収し、ここに含まれる Glut4 を抗 Glut4 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

4. 研究成果

3T3-L1 脂肪細胞において、BIG2 を siRNA によりノックダウンすると図 1 のように siRNA の濃度依存的に Glut4 トランスロケーションが抑制される。

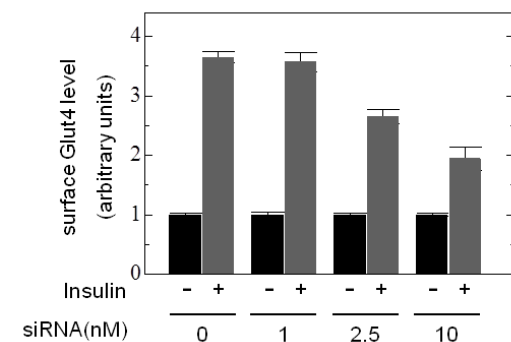


図 1. BIG2 ノックダウンによる Glut4 トランスロケーションの抑制

BIG2 siRNA (0, 1, 2.5, 10nM) により BIG2 をノックダウンした 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリン刺激 (10^{-7} M, 10 分間) の有無による細胞表面の Glut4 レベルを比較した。

なぜ、BIG2 ノックダウンにより Glut4 トランスロケーションが抑制されるのかを明らかにするために、3T3-L1 脂肪細胞を細胞分画により分画し Glut4 の細胞内分布を解析した (図 2)。

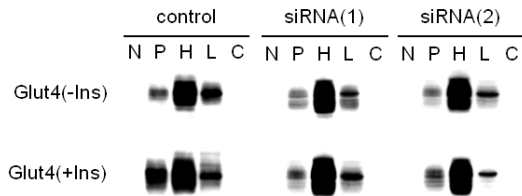


図 2. 細胞分画による Glut4 細胞内分布の解析。
N: 核画分, P: 細胞膜画分, H: high density microsome 画分, L: low density microsome 画分, C: サイトゾル画分, (-Ins):インスリン刺激無, (+Ins):インスリン刺激有り (10 分間)

図 2 に示す様に、BIG2 ノックダウンによりインスリン刺激時の細胞膜画分 (P 画分) で検出される Glut4 は減少しており、Glut4 トランスロケーション解析 (図 1) で見られる結果と同様の結果が得られた。この時、細胞内の Glut4 分布をみると、インスリン刺激の有無にかかわらず、low density microsome 画分 (L 画分) における Glut4 が減少していた。Glut4 小胞は主にこの L 画分に含まれていることから、BIG2 ノックダウンにより Glut4 小胞形成が抑制されていることが示唆された。また、図 3 に示されるように、Glut4 は H 画分に蓄積していることが明らかになった。

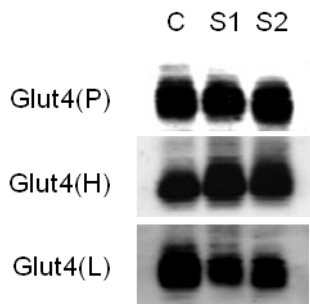


図 3. BIG2 ノックダウンによりインスリン非存在下における Glut4 小胞形成が抑制されH画分にH画分に蓄積する。

C:control, S1:BIG2 siRNA(1), S2: BIG2 siRNA(2); P: 細胞膜画分, H: high density microsome 画分, L: low density microsome 画分

次に、BIG2 の変異体である BIG2 (E738K) を大量発現させた場合の Glut4 トランスロケーションに対する影響を解析した (図 4)。

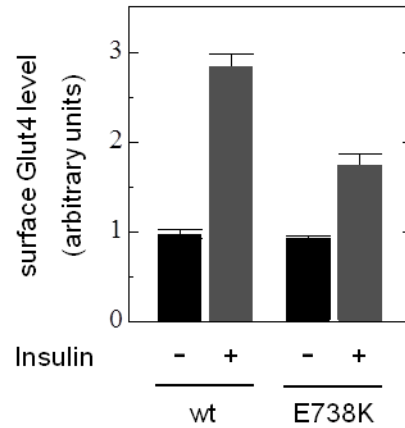


図 4. BIG2 (E738K) は Glut4 トランスロケーションを抑制する。

野生型 BIG2 (wt) または E738K 変異型 BIG2 (E738K) を強発現させた 3T3-L1 脂肪細胞においてインスリン刺激の有無による細胞表面の Glut4 レベルを比較した。

この変異体は、リサイクリングエンドソームからの小胞形成を抑制することが既に示唆されている。また、リサイクリングエンドソームはおもに H 画分に分画される。これらの結果より、BIG2 は、リサイクリングエンドソームからの Glut4 小胞形成に関与していると考えられた。

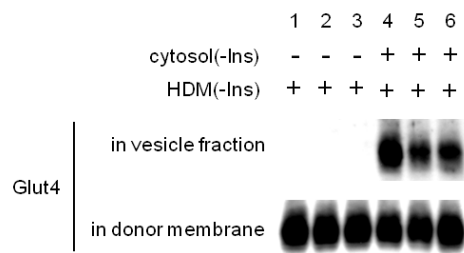


図 5. in vitro Glut4 小胞構成系における Big2 の影響

Lane 1&4: control siRNA, lane 2&5, Big2 siRNA(1), lane 3&6: Big2 siRNA(2)

この様な結果をさらに確認するために、in vitro における Glut4 小胞構成系を確立し、この解析系により Glut4 小胞に対する BIG2 の作用を確認したところ、Big2 をノックダウ

ンすることによりインスリン非存在下において high density microsome 画分からの Glut4 小胞形成が抑制されていることが明らかになった (図5)。また、インスリン存在下においても high density microsome 画分からの Glut4 小胞形成が抑制されているのかを確認するために、インスリン刺激細胞においても同様の解析を行った結果、やはり、インスリン存在下においても high density microsome 画分からの Glut4 小胞形成が抑制されていることが明らかになった (図6)。

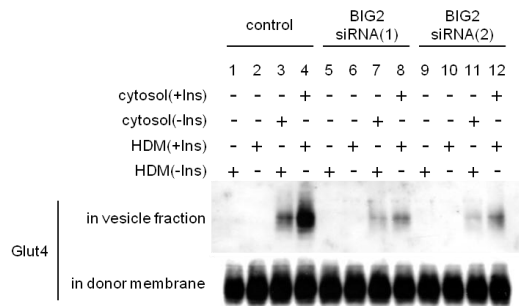


図6. in vitro Glut4 小胞構成系におけるインスリンおよび Big2 の影響

この BIG2 の作用をさらに確認するために、siRNA ではなく抗体を用いて BIG2 の機能を抑制したところ、抗 BIG2 抗体は in vitro における Glut4 小胞形成を抑制した。また、ここに、抗 BIG2 抗体のエピトープ部位を含む BIG2 断片を添加することにより Glut4 小胞形成は回復したため、やはり、BIG2 は high density microsome 画分からの Glut4 小胞形成に必要なとが確認された。

また、BIG2 は Arf のグアニンヌクレオチド交換因子として作用することにより細胞内における小胞形成に関与している。そこで、BIG2 を介した high density microsome 画分からの Glut4 小胞形成にはどの Arf が関与しているのかを明らかにするために、BIG2 をノックダウンした細胞に Arf1~Arf6 各々の活性化型変異体を大量発現させた。図7は、各々の細胞膜 Glut4 レベルを示す。すると、BIG2 がノックダウンされているにもかかわらず、Arf3 の活性化型変異体を導入することにより細胞膜 Glut4 レベルの上昇がみられた。このことから、BIG2 は、Arf3 を介して Glut4 小胞形成を行っていると考えられた。

以上の結果より、BIG2 はインスリン存在下および非存在下どちらの場合においても Glut4 小胞形成に必須な因子であり、特に、

リサイクリングエンドソームからの Glut4 小胞形成を担っていることが明らかになった。また、この Glut4 小胞形成には Arf3 が関与していることが示唆された。

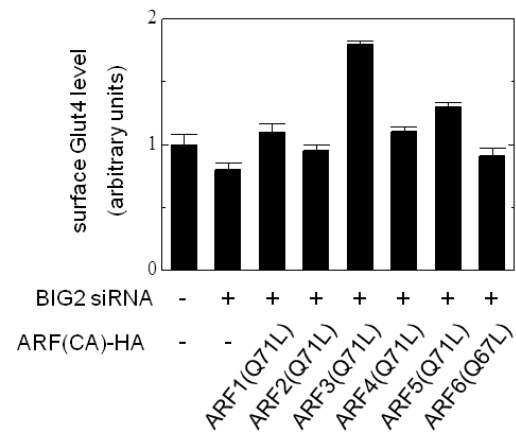


図7. BIG2 は Arf3 の活性化を介して Glut4 小胞を形成に関与する

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Totsukawa G, Kaneko Y, Uchiyama K, Toh H, Tamura K, and Kondo H, VCIP135 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97ATPase-mediated membrane fusion. *The EMBO Journal*, Vol. 30, No. 17, 2011, pp. 3455-3474, doi: 10.1038 (査読有)
2. Yuasa, T, Uchiyama K., Ogura, Y., Kimura M., Teshigawara K., Hosaka T., Tanaka, Y., Obata T., Sano H., Kishi K., and Ebina Y. The Rab GTPase-Activating Protein AS160 as A Common Regulator of Insulin- and Gαq-Mediated Intracellular GLUT4 Vesicle Distribution. *Endocrine J.*, Vol. 56, No. 3, 2009, pp. 345-359 (査読有)

[学会発表] (計4件)

1. Uchiyama, K. and Ebina, Y. Functional roles of TUG and p97/VCP in Glut4 trafficking. (口頭発表) 第34回分子生物学会年会, 2012. 12. 16, パシフィコ横浜(横浜市)
2. Uchiyama, K. and Ebina, Y. Functional roles of TUG and p97/VCP in Glut4

- trafficking. (ポスター発表) 第 34 回分子生物学会年会, 2012. 12. 15, パシフィコ横浜(横浜市)
3. 内山圭司, 坂口末廣, プリオン感染細胞における細胞内小胞輸送の抑制. 第 26 回中国四国ウイルス研究会, 2011. 6. 20, 徳島大学(徳島市)
 4. Uchiyama, K. and Ebina, Y. Role of BIG2, a guanine-nucleotide exchanging factor for ADP-Ribosylation favtors, in insulin-regulated glucose transporter translocation. 第 32 回分子生物学会年会 2009. 12. 9, パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA KEIJI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号 : 6 0 2 9 4 0 3 9