様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成２５年５月１０日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：２３６５８２２２
研究課題名（和文）糖輸送体 GLUT4 の糖膜透過能を活性化する物質を用いたインスリン抵抗性解除の試み
研究課題名（英文）Isolation of drugs which rescue insulin resistance by activating GLUT4 transport activity.
研究代表者
高橋 伸一郎（Shin-Ichiro Takahashi）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：00197146

研究成果の概要（和文）：
我々は、3T3-L1脂肪細胞をGHで24時間前処理した後、インスリンで刺激すると、GLUT4の細胞膜移行に影響を与えず、糖取り込みが抑制されることを示してきた。本研究では、糖膜透過能を制御するAkt基質およびGLUT4の翻訳後修飾を同定するとともに、GLUT4の糖膜透過能を制御する低分子化合物や抗体をスクリーニング､これらの物質の処理が一部のインスリン抵抗性を解除することを細胞レベルで示すことを目的としている。
まず、GH長時間処理によって、インスリン依存的なリン酸化が減少するAkt基質を探索し、AS47タンパク質の同定に成功した。またこのタンパク質をsiRNAによって発現抑制したところ、GLUT4の細胞膜移行に影響を与えずに糖取り込み量を抑制していた。このことから、AS47がGLUT4の糖膜透過能に重要な役割を果たしていることがわかった。
次にGLUT4分子内から翻訳後修飾されうる予想モチーフを網羅的に検索し、その部位に変異を導入したGLUT4変異体を作製した。この変異体をGLUT4が発現していない293細胞に導入し、糖取り込み量を測定した。その結果､リン酸化モチーフに変異を導入したGLUT4変異体(GLUT4-P)が、野生型GLUT4を発現させた場合に比べ糖取り込み能が有意に上昇していた。
また、GLUT4の細胞外ドメインを認識する抗体の単離は既に成功しており、現在糖取り込み能を亢進する抗体の同定を進めている。
このように､GLUT4の糖膜透過能を制御するAkt基質とGLUT4の翻訳後修飾を同定することができた。このAkt基質やGLUT4の翻訳後修飾を制御する低分子化合物も、GLUT4に対する抗体と同様にインスリン抵抗性解除薬の有力な候補となりうる。

研究成果の概要（英文）：
We have reported that chronic GH pretreatment inhibited insulin-induced glucose uptake without affecting insulin-induced GLUT4 translocation. This study was undertaken to identify Akt substrates and GLUT4 postranslational modification that regulate GLUT4 transport activity. In addition, in order to rescue insulin resistance we searched for the small molecular chemicals and antibodies that modulate GLUT4 transport activity.
At first, we succeeded to isolate the Akt substrates, AS47, whose insulin-induced

phosphorylation was suppressed by GH pretreatment. Knockdown of AS47 inhibited insulin-induced glucose uptake without affecting GLUT4 translocation, suggesting that AS47 plays important roles in GLUT4 transport activity.
Next, we searched for posttranslational modification motif in a GLUT4 molecule. GLUT4 was site-directed mutagenized in some modification sites and these mutants were transfected into HEK293 cell. And then glucose uptake was measured. Mutation at the phosphorylation site of GLUT4 (GLUT4-P) significantly enhanced glucose transport activity, suggesting that phosphorylation impaired GLUT4 transport activity.
Moreover, we have already succeeded to isolate antibodies, which recognize GLUT4 extracellular domain.
In this study we succeeded to identify the Akt substrate and GLUT4 posttranslational modification, which play important roles in GLUT4 transport activity. Chemicals or antibodies, which interact with the Akt substrate and GLUT4 could be candidates to cure insulin resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：畜産学・獣医学
科研費の分科・細目：応用動物科学
キーワード：糖輸送体（GLUT）4、糖取り込み、インスリン、成長ホルモン、インスリン抵抗性、脂肪細胞

１．研究開始当初の背景

我々は、3T3-L1脂肪細胞を100 nMの成長ホルモン（GH）で24時間長時間処理した後、インスリンで刺激すると、インスリン依存的な糖輸送担体（GLUT4）の細胞膜移行は正常に引き起こされるにもかかわらず、インスリン依存的な糖取り込みが抑制されることを示した。さらにその分子メカニズムを解析すると、GH長時間処理によって、IRS-2と結合したPI 3-kinase活性が抑制されており、その結果、Aktキナーゼの活性が減弱、一部のAkt基質のリン酸化が抑制されていた。さらに、IRS-2の発現抑制は、インスリン依存的なGLUT4の細胞膜移行に影響を与えず、糖取り込みが抑制された。このことから、IRS-2を介したAkt基質のリン酸化によってGLUT4に何らかの翻訳後修飾が施され、その結果、糖膜透過能が制御される、という仮説を提唱するに至った。

２．研究の目的

そこで、本研究では、GLUT4の糖膜透過能を制御するAkt基質を同定し、さらに糖膜透過能を変化させるGLUT4の翻訳後修飾を同定する。さらには、Akt基質やGLUT4と結合する低分子化合物や抗体をスクリーニングし、これらの物質の処理がGLUT4の糖膜透過能を変化させ、一部のインスリン抵抗性を解除することを細胞レベルで示すことを目的としている。

３．研究の方法

（１）GLUT4 の糖膜透過能を制御する Akt 基質の同定

3T3-L1 脂肪細胞を 100 nM GH で 24 時間処理し、その後 100 nM インスリンで刺激し、

細胞抽出液を調製、SDS-PAGE に供し、phospho-Akt substrate 抗体で immunoblot した。

（２）AS47 の機能解析

（１）の結果から、約 47kDa の Akt 基質のインスリン依存的なリン酸化が GH 24 時間処理によって減弱されていた。そこでこのタンパク質、AS47 を siRNA 法によって発現抑制し、インスリン依存的な GLUT4 の細胞膜移行、糖取り込みを測定した。

（３）GLUT4 の翻訳後修飾が糖取り込み活性に与える影響

GLUT4 の糖膜透過能に影響を与える翻訳後修飾を同定するため、GLUT4 内の翻訳後修飾が予想されるモチーフを検索した。その結果、リン酸化、SUMO 化、糖鎖付加、などの予想モチーフが存在した。そこでそれらの付加サイトに変異を導入した変異体を作成し、これらの変異体を HEK293 細胞に遺伝子導入した。それぞれの変異体が発現された細胞の糖取り込み量を測定し、糖取り込み量に変化の認められる変異体を探索した。

（４）GLUT4 と結合する抗体の作成

GLUT4 の細胞外ドメインを認識する抗体の作成を試みた。

４．研究成果

（１）GLUT4 の糖膜透過能を制御する Akt 基質の同定

十分に分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を 100 nM GH で 24 時間処理し、その後インスリン 1 nM で５分刺激し、細胞抽出液を調製、抗 Akt substrate 抗体で immunoblot した。その結果、47 kDa 付近の Akt 基質（AS47）のインスリン依存的なリン酸化が減少していることが明らかとなった。

（２）AS47 の機能解析

続いて、AS47 を siRNA によって発現抑制したところ、インスリン依存的な GLUT4 の細胞膜移行には影響を与えずに、インスリン依存的な糖取り込みを抑制した。このことから、AS47 は GLUT4 の糖膜透過能を促進するタンパク質であることが示された。

（３）GLUT4 の翻訳後修飾が糖取り込み活性に与える影響

GLUT4 内の翻訳後修飾が予想されるモチーフに変異を入れた GLUT4 変異体を作成し、GLUT4 の発現が認められない HEK293 細胞に導入した。その結果、GLUT4 を発現させると糖取り込み量が促進されるが、リン酸化に変異を入れた変異体（GLUT4-P）は野生型 GLUT4 に比べて有意に糖取り込み能が増加していた。

（４）GLUT4 と結合する抗体の作成

GLUT4 の細胞外ドメインを認識する抗体の作成を行い、現在約２０種類の候補抗体の単離に成功している。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計５件）

1. Yoneyama Y, Matsuo M, Take K, Kabuta T, Chida K, Hakuno F, Takahashi SI. AP-1 complex regulates intracellular localization of insulin receptor substrate-1 required for insulin-like growth factor-I-dependent cell proliferation. Mol. Cell. Biol. 33: 1991-2003 (2013) doi: 10.1128/MCB.01394-12.

2. Fukushima T, Nakamura Y, Yamanaka D,

Shibano T, Chida K, Minami S, Asano T, Hakuno F, Takahashi SI. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity bound to insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, which is continuously sustained by IGF-I stimulation, is required for IGF-I-induced cell proliferation. J. Biol. Chem. 287: 29713-29721 (2013) doi: 10.1074/jbc.M112.393074.

3. Yoshihara H, Fukushima T, Hakuno F, Saeki Y, Tanaka K, Ito A, Yoshida M, Natsume T, Asano T, Chida K, Girnita L, Takahashi SI. Insulin/IGF stimulation abrogates an association between a deubiquitinating enzyme USP7 and insulin receptor substrates (IRSs) followed by proteasomal degradation of IRSs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 423: 122-127 (2012) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.093.

4. Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi SI, Itoh H. Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. EMBO J. 31: 2275-2295 (2012) doi: 10.1038/emboj.2012.97.

5. Yamanaka D, Akama T, Fukushima T, Nedachi T, Kawasaki C, Chida K, Minami S, Suzuki K, Hakuno F, Takahashi SI. Phosphatidylinositol 3-kinase-binding protein, PI3KAP/XB130, is required for cAMP-induced amplification of IGF mitogenic activity in FRTL-5 thyroid cells. Mol. Endocrinol. 26: 1043-1055 (2012) doi: 10.1210/me.2011-1349.

〔学会発表〕(計４件)

1. Hakuno F, Ando Y, Kakino M, Fujimoto H, Chida K, Takahashi SI. Diacylglycerol kinase ζ, negatively modulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. 6th GRS-IGF. Oct. 19th 2012. Munich, Germany.

2. 久保真実子、笠原浩平、曽根芽里、千田和広、伯野史彦、高橋伸一郎. GLUT4の糖膜透過能活性化におけるGLUT4セリン488番目のリン酸化の役割. 第３５回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場

3. 高橋伸一郎. インスリン様成長因子とインスリンの単独プレイと連携プレイ、内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演)、2011年7月7日、仙台

4. 高橋伸一郎、インスリン様ペプチドの進化と生理的異議、第２９回千駄木内分泌懇話会（招待講演)、2011年10月20日、東京

〔図書〕(計　０件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0件）

なし

○取得状況（計　0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/index0.html

６．研究組織

(1)研究代表者
高橋　伸一郎 (Shin-Ichiro Takahashi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授
研究者番号：00197146

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし