

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461356

研究課題名(和文) カルシウムセンサーDOC2bのリン酸化を介する小胞膜融合調節機構

研究課題名(英文) DOC2b regulates GLUT4 vesicle fusion mediated aPKC activation.

研究代表者

福田 尚文 (FUKUDA, Naofumi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50566867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DOC2bは2つのC2 domainを持つ、Synaptotagminファミリーに属する。以前、我々はDOC2bがインスリン依存性に細胞膜へ移動し、Syntaxin4と結合してGLUT4小胞の膜融合を促進することを報告した。今回、DOC2b^{-/-}マウスで検討した結果、インスリン抵抗性、耐糖能異常を認め、筋肉でのインスリン依存性糖取り込みが低下していた。またDOC2bはatypical PKC(aPKC)と結合し、その結合がDOC2bの細胞膜への移動に重要であることがわかった。DOC2bはaPKCと結合して細胞膜へ移動し、GLUT4小胞の細胞膜融合を促進して、個体の糖恒常性を維持している。

研究成果の概要(英文)：DOC2b is a member of Synaptotagmin family proteins that have tandem C2 domains. We previously found that DOC2b translocated to the plasma membrane and bound syntaxin-4 on insulin stimulation, mediating GLUT4 vesicle fusion. In this study, we investigated the role of DOC2b on systemic glucose homeostasis. DOC2b^{-/-} mice showed insulin resistance and impaired glucose tolerance. Insulin-stimulated glucose uptake was impaired in isolated soleus muscle of the DOC2b^{-/-} mice. We also investigated signaling molecule mediating insulin signal to DOC2b. By immunoprecipitation, we identified an isoform of atypical PKC (aPKC) binding to DOC2b. When kinase dead aPKC or mutant DOC2b was overexpressed in the 3T3-L1 adipocytes, DOC2b did not translocate to the plasma on insulin stimulation. GLUT4 vesicle fusion regulated by DOC2b is important for the systemic glucose homeostasis. An isoform of aPKC is likely to regulate DOC2b translocation and GLUT4 vesicle fusion in response to insulin.

研究分野：糖尿病

キーワード：Glut4 DOC2b atypical PKC

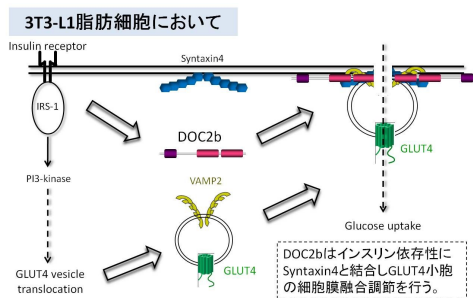
1. 研究開始当初の背景

インスリンは血糖を低下させるホルモンである。その主たる作用点は、筋肉と脂肪における糖輸送（細胞内に糖を取り込む）のステップである。日本人に多い2型糖尿病の発症には、この糖輸送のステップの障害が大きく関わっている。この糖輸送は糖輸送担体と呼ばれる膜蛋白質によって担われ、筋肉・脂肪組織においてはそのアイソフォームである Glut4 (Glucose transporter 4) が多く発現している。

これまで糖取り込みの分子機構解明に向けて Glut4 に関する多くの研究が行われてきた。Glut4 小胞はインスリン非刺激下では核周囲に多く分布する。インスリン刺激により、Glut4 小胞は細胞膜近傍に移動した後に、SNARE 蛋白を介して細胞膜へ膜融合し、Glut4 が表出して糖を取り込むと考えられている。

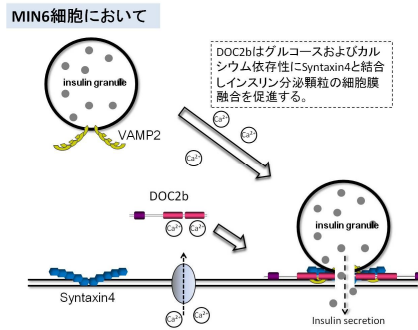
(1) 我々は、培養細胞 (3T3-L1 脂肪細胞) を用いた実験から、カルシウムセンサー DOC2b はインスリン依存性に Syntaxin4 と結合し、Glut4 小胞の細胞膜融合に重要な分子であることを報告してきた (N.Fukuda et al, *Diabetes* 2009)。

図 1



(2) MIN6 細胞を用いた検討では、DOC2b はグルコース刺激を受けてカルシウム依存性に細胞質内から細胞膜へ移動し、Syntaxin1A ではなく Syntaxin4 に特異的に結合し、特にインスリン分泌の第2相に関与していることもわかった。 (BBRC 2009)。

図 2

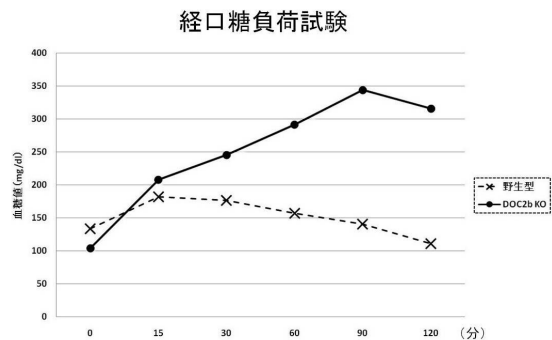


2. 研究の目的

(1) DOC2b^{-/-}マウスの耐糖能異常のメカニズムを明らかにする。

DOC2b^{-/-}マウスを作製し解析した結果、DOC2b^{-/-}マウスは野生型と比較して、ブドウ糖負荷試験において、強いインスリン抵抗性を示した (図 3)。このことは、DOC2b^{-/-}マウスで糖取り込みが低下していることを示唆している。

図 3

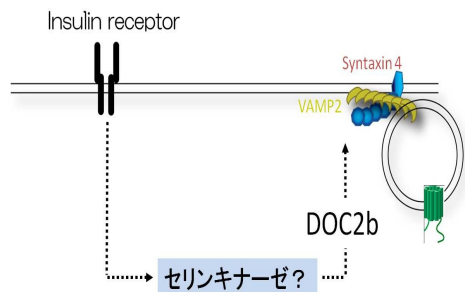


(2) DOC2b リン酸化シグナルを解明する。

これまでの検討からカルシウムセンサー蛋白である DOC2b は double C2 domain を有し、細胞内カルシウムと結合して小胞と細胞膜の融合を促進すると考えられていた。しかし我々の脂肪細胞における検討で、元々、DOC2b は細胞質内に存在し、インスリン刺激によって PI3 kinase 依存性に細胞膜へトランスロケーションすることがわかった。このステップは小胞の細胞膜融合に重要であると考えている。また DOC2b の MID domain に

存在するセリン・スレオニンリン酸化モチーフがインスリン刺激下でセリン・スレオニンキナーゼによるリン酸化を受け、DOC2b リン酸化を起こしていると考えている。

図 4



3. 研究の方法

(1) DOC2b^{-/-}マウスは第一エクソンを除くことによって作製した。DOC2b^{-/-}マウスの耐糖能異常については糖負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

(2) 組織特異的インスリン依存性糖取り込みは筋肉組織を単離し、細胞培養中でインスリン刺激を行い取り込まれた糖を測定した。

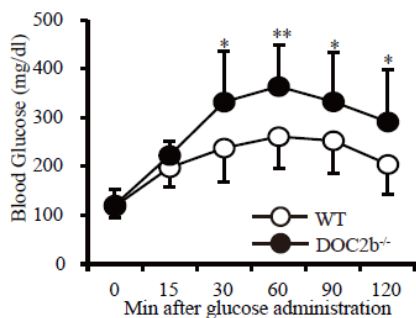
(3) 免疫沈降により、DOC2b と aPKC のインスリン依存性結合について検討した。

(4) 脂肪細胞に、eGFP-DOC2b と aPKC の野生型もしくは変異型を共発現させ、免疫染色を行い、DOC2b の細胞膜への移動を確認した。

4. 研究成果

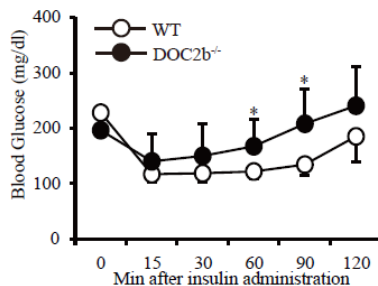
(1) DOC2b^{-/-}マウスの耐糖能異常について検討した結果、DOC2b^{-/-}マウスは経口糖負荷試験で耐糖能異常を認めた。

図 5



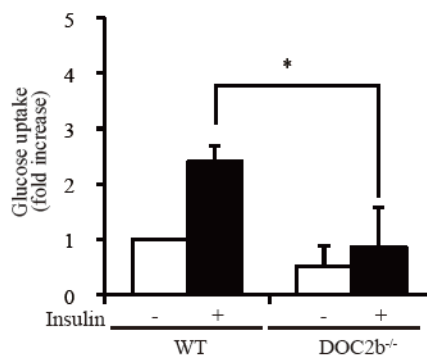
DOC2b^{-/-}マウスはインスリン負荷試験でインスリン抵抗性を認めた。

図 6



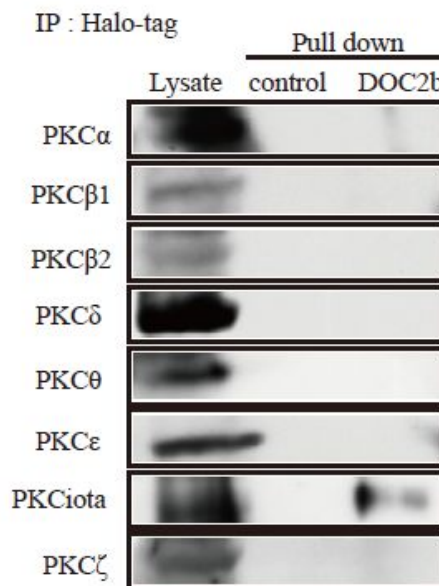
(2) 筋肉組織を単離し、組織特異的な糖取り込みを行った結果、DOC2b^{-/-}マウスでインスリン依存性糖取り込みが低下していることがわかった。

図 7



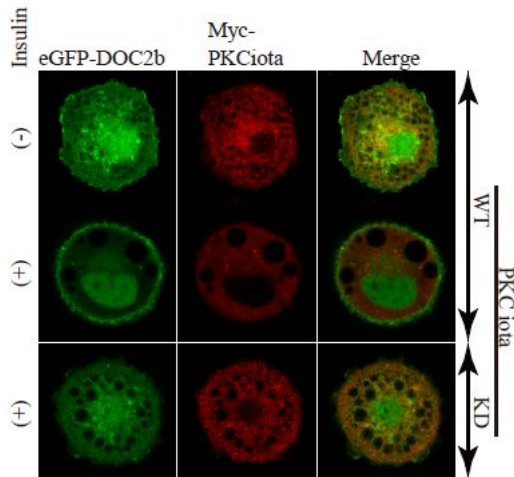
(3) DOC2b と aPKC の結合について検討した結果、PKCιota と結合することがわかった。

図 8



- (4) 脂肪細胞に、eGFP-DOC2b と aPKC の野生型もしくは変異型を共発現させ、免疫染色を行った結果、インスリン依存性に eGFP-DOC2b は細胞膜へ移動したが、aPKC の変異型を共発現させた場合は、eGFP-DOC2b のインスリン依存性の細胞膜への移動は阻害された。

図 9



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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 坂根亜由子 三好淳 佐々木卓也 谷澤幸生

SNARE 調節因子 DOC2b による個体糖代謝調節
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会
2015 年 5 月 21 日-2015 年 5 月 23 日
山口県下関市(グランプラス セント・パルンタイン)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 坂根亜由子 佐々木卓也 三好淳 谷澤幸生

GLUT4 調節因子 DOC2b は aPKC により調節され個体糖恒常性を維持する
第 87 回日本内分泌学会学術総会
2014 年 4 月 24 日-2014 年 4 月 26 日
福岡県福岡市(福岡国際会議場)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 谷澤幸生 坂根亜由子 佐々木卓也 三好淳

GLUT4 vesicle fusion regulator DOC2b is required for systemic glucose homeostasi

S.

International Diabetes Federation 2013
2013 年 12 月 2 日-2013 年 12 月 6 日
オーストラリア(メルボルン)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 谷澤幸生

aPKC は SNARE 調節因子 Doc2b の機能発現に必要である

第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会
2013 年 11 月 15 日-2013 年 11 月 16 日
岡山県岡山市(岡山コンベンションセンター)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 谷澤幸生 坂根亜由子 佐々木卓也 三好淳

DOC2b regulates glucose homeostasis through insulin mediated aPKC activation and GLUT4 vesicle fusion.

2013 年 ICDM & 第 5 回 AASD
2013 年 12 月 7 日-2013 年 12 月 10 日
韓国(ソウル)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 谷澤幸生 坂根亜由子 佐々木卓也 三好淳

SNARE 調節因子 Doc2b の糖恒常性維持における役割

第 63 回日本体質医学会総会
2013 年 10 月 5 日-2013 年 10 月 6 日
福岡県久留米市(久留米大学筑水会館)

野見山隆太 江本政広 福田尚文 松井久未子 谷澤幸生 坂根亜由子 佐々木卓也 三好淳

SNARE 関連蛋白質 Doc2b の糖代謝への役割
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会
2013 年 5 月 16 日-2013 年 5 月 18 日
熊本県熊本市(ホテル日航熊本)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 尚文 (FUKUDA, Naofumi)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：5 0 5 6 6 8 6 7

(2) 研究分担者

谷澤 幸生 (TANIZAWA, Yukio)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：0 0 2 1 7 1 4 2

(3) 連携研究者

なし