

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440103

研究課題名(和文) 骨格筋における刺激応答性糖取り込み誘導の新規メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文) Nobel signaling mechanisms for insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle

研究代表者

佐藤 孝哉 (Sato, Takaya)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20251655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは、骨格筋への血中グルコースの取り込みを誘導し、血糖値を調節している。本研究では、骨格筋でのインスリン応答性グルコース取り込みシグナル伝達系におけるRhoファミリーGTP結合蛋白質Rac1の機能と調節機構の解明を目指し、マウス生体レベルでの解析を進めた。その結果、Rac1は、ホスホイノシチド3キナーゼおよび蛋白質セリントレオニンキナーゼAkt2の下流で、グアニンヌクレオチド交換因子FLJ00068を介して活性化され、活性化されたRac1は、RasファミリーGTP結合蛋白質RalAを介してグルコースの取り込みを誘導するという、新規シグナル伝達経路が明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Insulin regulates the blood glucose level by inducing glucose uptake in skeletal muscle. In this study, we aimed to reveal the role and regulatory mechanisms of the small GTPase Rac1 in insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle by using mouse models. We identified a novel signaling mechanism whereby the guanine nucleotide exchange factor FLJ00068 activates Rac1 downstream of phosphoinositide 3-kinase and the serine/threonine protein kinase Akt2. Furthermore, we found that the small GTPase RalA regulates glucose uptake downstream of Rac1 in skeletal muscle.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：インスリン 骨格筋 GTP結合蛋白質 Rac1

1. 研究開始当初の背景

インスリンは血糖値を調節するホルモンの一種で、肝臓、脂肪細胞、骨格筋などを標的とする。骨格筋においては、インスリン刺激にตอบสนองして、血中のグルコースの取り込みが誘導される。骨格筋は、インスリン応答性のグルコースの消費の約 75%を担っており、骨格筋のインスリン抵抗性は、2 型糖尿病の原因の一つと考えられている。骨格筋におけるインスリン応答性のグルコース取り込みは、グルコース輸送担体 GLUT4 を蓄積している小胞 (GLUT4 小胞) が細胞内区画から細胞表面への輸送され、細胞膜と結合・融合されることで GLUT4 が細胞膜表面に蓄積することにより、誘導される。

インスリン受容体の下流で GLUT4 小胞の細胞膜への移行を制御するシグナル伝達系においては、ホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) およびその下流の蛋白質セリントレオニンキナーゼ Akt2 が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。このシグナル伝達系に關与する Akt2 の基質として研究が先行している分子の一つに AS160 が挙げられる。AS160 は、小胞輸送を制御する低分子量 GTP 結合蛋白質である Rab8A と Rab13 に対する GTP アーゼ活性化因子 (GAP) であり、Akt2 によるリン酸化により GAP 活性が抑制され、Rab8A と Rab13 が活性化されるというメカニズムが提唱されている。インスリン応答性の GLUT4 細胞膜移行を制御する Akt2 の基質が他にもいくつか報告されている。しかし、これらの既知のシグナル伝達分子のみではインスリン応答性の GLUT4 の細胞膜移行を説明することはできず、そのメカニズムには現在でも未解明の部分が多い。

研究代表者らは、マウス筋芽細胞株を用い、骨格筋におけるインスリン応答性グルコース取り込みに Rho ファミリーGTP 結合蛋白質の一種 Rac1 が必須であることを示した。さらに、インスリン応答性の Rac1 の活性化を制御するグアニンヌクレオチド交換因子として、FLJ00068 を同定した。このシグナル伝達系は、研究代表者らが他のグループに先行して見出した新規の制御系である。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン刺激にตอบสนองした骨格筋でのグルコース取り込み誘導シグナル伝達系における Rac1 の活性調節メカニズムと作用メカニズムの全容を解明することを目指している。とくに、骨格筋特異的 *rac1* ノックアウト (*m-rac1-KO*) マウスを用いて、マウス生体レベルでの解析を目指す。具体的な内容は、インスリン受容体からのシグナルがグアニンヌクレオチド交換因子 FLJ00068 を介して Rac1 を活性化するメカニズム (Rac1 の上流のシグナル伝達系)

の解明、活性化された Rac1 が GLUT4 小胞の細胞膜への移行と結合・融合を誘導するメカニズム (Rac1 の下流のシグナル伝達系) の解明、に分類される。

3. 研究の方法

(1) GLUT4 の細胞膜移行の検出

マウス骨格筋における GLUT4 の細胞膜移行の検出には、研究代表者らが先行研究において確立したレポーターアッセイを利用する。このアッセイでは、エレクトロポレーション法による遺伝子導入により、マウス骨格筋において GLUT4 レポーター (GLUT4*myc7*-GFP) (図 1) を一過性発現させ、インスリン応答性の GLUT4 の細胞膜移行をマウス生体レベルで検出、定量する。

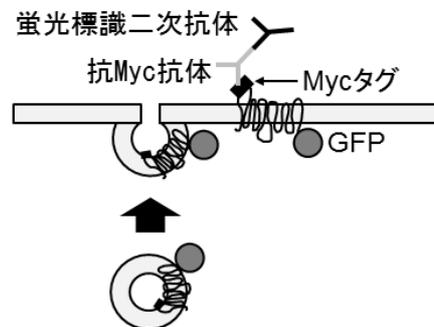


図 1 レポーターアッセイによる GLUT4 の細胞膜移行の検出。細胞外領域に Myc タグを付加、C 末端に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を融合させた GLUT4 レポーター (GLUT4*myc7*-GFP) は、細胞内小胞に存在するときは抗 Myc 抗体で認識されないが、細胞膜表面に局在すると認識される。レポーターの発現は、GFP で検出する。二次抗体の蛍光強度と GFP の蛍光強度から GLUT4 の細胞膜への移行を定量できる。本研究では、このシステムをマウス骨格筋に応用する。

(2) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac1 および Ra1A の活性化の検出

本研究において、インスリンを *in vivo* 刺激 (尾静注) したマウスの骨格筋凍結組織切片および固定した単一骨格筋繊維において、GTP 結合蛋白質 (Rac1 および Ra1A) の活性化を蛍光免疫染色により可視化する新規解析法を確立することに成功した。詳細は、「4. 研究成果」に記載した。この手法により、マウス骨格筋におけるシグナル伝達メカニズムの生体レベルでの解析が大きく進展した。

4. 研究成果

(1) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac1 および Ra1A の活性化の検出

Rac1 および Ra1A などの低分子量 GTP 結合蛋白質は、それらの活性型 (GTP 結合型) が特異的に標的蛋白質に結合し、下流にシグナルを伝達することが知られている。研究代表者らは、先行研究において、Rac1 および Ra1A の特異的標的蛋白質の GTP アーゼ結合ドメインにエピトプタグを付加したペプチドをプローブとし、これを蛍光免疫染色法で検出することにより、培養細胞株における Rac1 および Ra1A の活性化部位を *in situ* で可視化する手法を確立してきた。本研究では、これらのプローブを用いて、マウスの骨格筋凍結組織切片および固定した単一骨格筋繊維において、Rac1 および Ra1A の活性化部位を可視化する手法を確立することに成功した (図 2)。

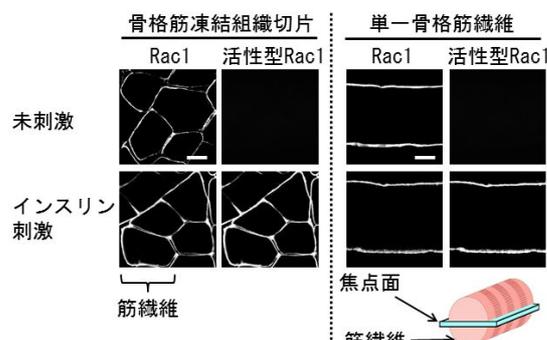


図 2 蛍光免疫染色による Rac1 活性化の *in situ* 可視化。 未刺激またはインスリンを尾静注 (インスリン刺激) したマウスの骨格筋凍結組織切片 (横断面) あるいは固定した単一骨格筋繊維に活性型 Rac1 特異的のプローブを反応させ、これを蛍光免疫染色により可視化した。模式図には、単一骨格筋繊維を観察する際の焦点面を示した。スケールバー; 20 μ m。(発表論文 (雑誌論文) 2 より改変)

(2) インスリン受容体からのシグナルが FLJ00068 を介して Rac1 を活性化するメカニズムの解明

インスリン受容体の下流のシグナル伝達系では、PI3K および Akt2 が重要な役割を果たしている。本研究では、この経路と Rac1 との関係を解析し、Rac1 が Akt2 の下流で機能していることを明らかにした。

エレクトロポレーションを利用した遺伝子導入法により、マウス骨格筋において、PI3K および Akt2 の恒常的活性型変異体を異所性発現させ、Rac1 の活性化およびその FLJ00068 依存性、GLUT4 の細胞膜移行およびその FLJ00068 依存性と Rac1 依存性を検討した。その結果、恒常的活性型 PI3K 変異体と恒常的活性型 Akt2 変異体は、いずれも FLJ00068 依存的に Rac1 を活性化するとともに、FLJ00068 および Rac1 依存的に GLUT4 の細胞膜移行を誘導した (図 3)。

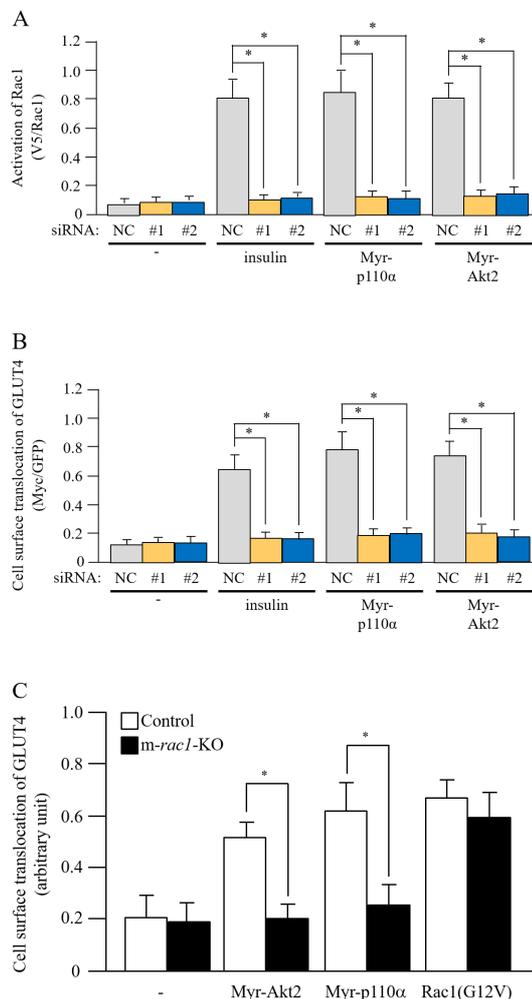


図 3 恒常的活性型 PI3K 変異体および恒常的活性型 Akt2 変異体による Rac1 の活性化と GLUT4 の細胞膜移行の誘導。 (A) 特異的 siRNA で FLJ00068 をノックダウンした筋管 (#1 および #2) とコントロール筋管 (NC) におけるインスリン、恒常的活性型 PI3K 変異体 (Myr-p110) および恒常的活性型 Akt2 変異体 (Myr-Akt2) による Rac1 の活性化。 $p < 0.001$ 。 (B) 特異的 siRNA で FLJ00068 をノックダウンした筋管 (#1 および #2) とコントロール筋管 (NC) におけるインスリン、恒常的活性型 PI3K 変異体および恒常的活性型 Akt2 変異体による GLUT4 の細胞膜移行の誘導。 $p < 0.001$ 。 (C) *m-rac1-KO* マウスとコントロールマウスの筋管における恒常的活性型 PI3K 変異体、恒常的活性型 Akt2 変異体および恒常的活性型 Rac1 変異体 (Rac1(G12V)) による GLUT4 の細胞膜移行の誘導。 $p < 0.001$ 。(発表論文 (雑誌論文) 2、7 より改変)

(3) 活性化された Rac1 が GLUT4 小胞の細胞膜への移行を誘導するメカニズムの解明

脂肪細胞において、低分子量 GTP 結合蛋白質の一種である Ra1A が、インスリン応答

性の GLUT4 の細胞膜移行に関与することが報告されている。そこで本研究では、Rac1 の下流において RalA が GLUT4 の細胞膜移行を制御している可能性を検討した。その結果、PI3K、Akt2 および FLJ00068 の各恒常的活性型変異体は、Rac1 依存的に RalA を活性化する一方、恒常的活性型 Rac1 変異体は、RalA 依存的に GLUT4 の細胞膜移行を誘導することが明らかとなった (図 4)。

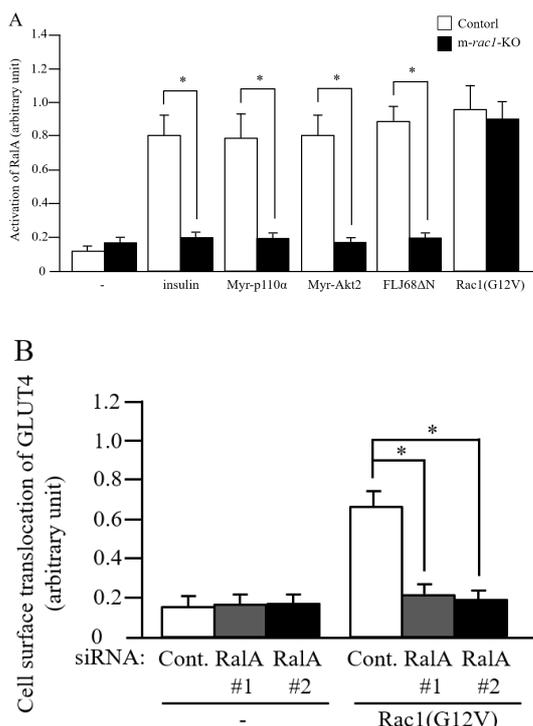


図 4 PI3K、Akt2 および FLJ00068 の各恒常的活性型変異体による RalA の活性化と恒常的活性型 Rac1 変異体による GLUT4 の細胞膜移行の誘導。 (A) *m-rac1-KO* マウスとコントロールマウスの筋管におけるインスリン、恒常的活性型 PI3K 変異体、恒常的活性型 Akt2 変異体、恒常的活性型 FLJ00068 変異体 (FLJ68 ΔN) および恒常的活性型 Rac1 変異体による RalA の活性化。 $p < 0.001$ 。 (B) 特異的 siRNA で RalA をノックダウンした筋管 (RalA#1 および RalA#2) とコントロール筋管 (Cont.) における恒常的活性型 Rac1 変異体による GLUT4 の細胞膜移行の誘導。 $p < 0.001$ 。(発表論文 (雑誌論文) 3 より改変)

(4) 総括

以上の結果より、マウス骨格筋において、インスリン受容体からのシグナルが、PI3K および Akt2 の下流で、FLJ00068 を介して Rac1 を活性化し、活性化された Rac1 は、RalA を介して GLUT4 の細胞膜移行を誘導するという、これまで報告されていなかった新規シグナル伝達経路が明らかにされた。

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)

1. Nobuyuki Takenaka, and Takaya Satoh: ACK1. Encyclopedia of Signaling Molecules (2nd Edition, Sangdun Choi, ed; Springer) in press (査読有)

2. Nobuyuki Takenaka, Yuma Nihata, and Takaya Satoh: Rac1 activation caused by membrane translocation of a guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated insulin signaling in mouse skeletal muscle. PLOS ONE 11 (5), e0155292 (2016) (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0155292

3. Nobuyuki Takenaka, Yukio Sumi, Keiko Matsuda, Junko Fujita, Tetsuya Hosooka, Tetsuya Noguchi, Atsu Aiba, and Takaya Satoh: Role for RalA downstream of Rac1 in skeletal muscle insulin signalling. Biochem. J. 469 (3), 445-454 (2015) (査読有)
DOI: 10.1042/BJ20150218

4. Nobuyuki Takenaka, Yuma Nihata, and Takaya Satoh: Immunofluorescent detection of the activation of the small GTPase Rac1 in mouse skeletal muscle fibers. Anal. Biochem. 476, 5-7 (2015) (査読有)
DOI: 10.1016/j.ab.2014.09.013

5. Nobuyuki Takenaka, Naoto Yasuda, Yuma Nihata, Tetsuya Hosooka, Tetsuya Noguchi, Atsu Aiba, and Takaya Satoh: Role of the guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated plasma membrane translocation of GLUT4 in insulin-stimulated skeletal muscle. Cell. Signal. 26 (11), 2460-2469 (2014) (査読有)
DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.002

6. Takaya Satoh: Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphatases in skeletal muscle and adipocytes. Int. J. Mol. Sci. 15 (10), 18677-18692 (2014) (査読有)
DOI: 10.3390/ijms151018677

7. Nobuyuki Takenaka, Rumi Izawa, Junyuan Wu, Kaho Kitagawa, Yuma Nihata, Tetsuya Hosooka, Tetsuya Noguchi, Wataru Ogawa, Atsu Aiba, and Takaya Satoh: A critical role of the small

GTPase Rac1 in Akt2-mediated GLUT4 translocation in mouse skeletal muscle. FEBS J. 281 (05), 1493-1504 (2014) (査読有)

DOI: 10.1111/febs.12719

8. Takaya Satoh: Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake. Small GTPases 5 (1), e28102 (2014) (査読有)

DOI: 10.4161/sgtp.28102

〔学会発表〕(計8件)

1. 竹中延之, 富士田淳子, 新畑有麻, 佐藤孝哉: マウス骨格筋のインスリンシグナル伝達系において Rac1 調節因子として機能するグアニンヌクレオチド交換因子の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日-2016 年 12 月 02 日, 横浜) 演題番号 3P-0409

2. 植田笙, 新畑有麻, 竹中延之, 佐藤孝哉: マウス脂肪組織において内在性低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化を検出する新規手法. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日-2016 年 12 月 02 日, 横浜) 演題番号 1P-0860

3. Takaya Satoh, and Nobuyuki Takenaka: Insulin signal transduction in skeletal muscle. 4th TKU-OPU Joint Symposium (2016 年 11 月 20 日-2016 年 11 月 21 日, New Taipei City / Yilan County, Taiwan) 演題番号 IL-13

4. 新畑有麻, 竹中延之, 佐藤孝哉: マウス骨格筋において内在性低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化を検出する新規手法. 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015 年 12 月 01 日-2015 年 12 月 04 日, 神戸) 演題番号 1P0193

5. 竹中延之, 松田佳子, 富士田淳子, 佐藤孝哉: マウス骨格筋でのインスリン応答性糖取り込みにおける Rac1 による Ra1A の制御. 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015 年 12 月 01 日-2015 年 12 月 04 日, 神戸) 演題番号 1P0192

6. 竹中延之, 新畑有麻, 北川花穂, 佐藤孝哉: 骨格筋でのインスリン依存性糖取り込みにおける Rac1 の活性制御. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日-2014 年 11 月 27 日, 横浜) 演題番号 1P-0498

7. 松田佳子, スミ有希雄, 竹中延之, 佐藤孝哉: 骨格筋のインスリン応答性糖取り込みシグナル伝達系において Rac1 の下流で機能する Ra1A の役割. 第 87 回日本生化学会

大会 (2014 年 10 月 15 日-2014 年 10 月 18 日, 京都) 演題番号 3P-332

8. 新畑有麻, 竹中延之, 佐藤孝哉: 骨格筋のインスリンシグナル伝達系で Rac1 調節因子として機能するグアニンヌクレオチド交換因子の解析. 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15 日-2014 年 10 月 18 日, 京都) 演題番号 3P-330

〔図書〕(計2件)

1. 佐藤孝哉, 竹中延之: ウェスタンブロット. 「バイオサイエンス実験 入門から応用へ」 (大阪府立大学生命環境科学域自然科学類生物科学課程 編, 大阪公立大学共同出版会) 47-53 (2016)

2. 佐藤孝哉: 「細胞のシグナル伝達-システムとしての共通原理にもとづく理解-」(西田栄介 監訳, メディカル・サイエンス・インターナショナル)(原著: Wendell Lim, Bruce Mayer, Tony Pawson "Cell Signaling: Principles and Mechanisms" Garland Science, Taylor & Francis Group) 第 3 章 / 用語解説 (翻訳) (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~tsato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 孝哉 (SATOH, Takaya)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 20251655

(2) 研究分担者

竹中 延之 (TAKENAKA, Nobuyuki)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号: 20610504

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし