

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20374

研究課題名(和文) インスリン依存的開口分泌調節機構における新規 Akt 標的分子の役割の解明

研究課題名(英文) The role of a novel Akt substrate mediating insulin-dependent exocytosis

研究代表者

長野 公喜 (Nagano, Koki)

九州大学・歯学研究院・特別研究員

研究者番号：60737089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：開口分泌調節タンパク質 tomosyn のインスリンシグナルによる調節の分子機構を解明することを目指した。リン酸化酵素Aktが tomosyn の783番目のセリン(783S) をリン酸化することを示した。SNAREタンパク質の1つである syntaxin4 と tomosyn の結合は、 tomosyn のAktによるリン酸化によって抑制された。S783をアラニンに置換した変異型 tomosyn 発現細胞ではインスリン刺激に伴う GLUT4 の膜発現が損なわれていた。Akt はインスリン刺激に伴って tomosyn の S783 をリン酸化することで syntaxin4 との結合を調節し、GLUT4 輸送を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the molecular mechanisms by which insulin signaling regulate exocytosis-related protein tomosyn, which is implicated in type 2 diabetes. We found that tomosyn on Ser-783 (S783) was phosphorylated by protein kinase Akt, which is activated by insulin signaling. The amount of tomosyn bound to SNARE [soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor)-attachment protein receptors] protein syntaxin4, which is related to GLUT4 (glucose transporter 4) vesicle translocation, was reduced by phosphorylation at Ser-783 by Akt. Insulin stimulation increased GLUT4 in the cell surface to promote glucose uptake, however exogenous expression of the mutant tomosyn attenuated the increase by insulin. Collectively, these results suggest that Ser-783 of tomosyn is a target of Akt and is implicated in the interaction with syntaxin 4, resulting in the modulation of GLUT4 translocation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：開口分泌 リン酸化 インスリン Akt

1. 研究開始当初の背景

肥満・糖尿病を含む生活習慣病はインスリンの分泌や作用の不足などにより発症する。血糖降下作用を持つ唯一のホルモンであるインスリンは骨格筋や脂肪組織に作用して細胞内へのグルコースの取り込みを促進するが、この作用調節機構の破綻が2型糖尿病の一因となることが知られている。これらの組織におけるインスリン依存性グルコース取り込みは、細胞内プールに貯蔵されているグルコーストランスポーター4 (GLUT4) を含む小胞 (GSV ; GLUT4 storage vesicle) が開口分泌の各段階 (targeting, docking, fusion) を通じて細胞膜と融合し、GLUT4 が細胞膜上に発現することによって促進される。GSV の細胞膜への targeting および docking はインスリンシグナルによって活性化されるキナーゼ Akt が様々な基質をリン酸化することで引き起こされることがよく知られているが、最後のステップである細胞膜との融合 (fusion) を引き起こすメカニズムについては未だ不明な点が多く、これら分子機構についての研究が精力的に行われている。膜融合は普遍的膜融合装置である SNARE [soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor] タンパク質群によって制御されている。データベースから、Akt のリン酸化コンセンサスモチーフを持ち、なおかつ膜融合装置である SNARE タンパク質と関連のあるタンパク質を検索したところ、2型糖尿病の病態と関連する遺伝子の1つとしても報告されている tomosyn という開口分泌調節タンパク質を見出した。組換えタンパク質と生細胞を用いた実験から Akt はインスリン刺激依存的に tomosyn のS783をリン酸化することがわかった。

2. 研究の目的

本研究では、インスリンシグナルによる開口分泌調節機構における新しい役者としての tomosyn の役割の解明を目指す。すなわち、インスリン誘導性のグルコース取り込みの促進に Akt による tomosyn のリン酸化がどのような影響を及ぼすか、GLUT4 トランスポーターのステップでも解明の進んでいなかった膜融合過程への tomosyn の関与に焦点を絞り、試験管内実験と生細胞を用いた生理学的実験を組み合わせ分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Akt による tomosyn のリン酸化が

syntaxin4 との結合に与える影響を調べた実験: tomosyn を一過性に発現させた COS7 細胞から免疫沈降によって精製した tomosyn に、100 μ M の ATP、0.2 μ g の His-Akt2 を加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後、GST-Syntaxin4 C を加えた。さらに 4 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、洗浄後のビーズに結合しているタンパク質をウエスタンブロット法で検出した。

(2) 細胞へのインスリン刺激による tomosyn のリン酸化が syntaxin4 との結合に与える影響を調べた実験: tomosyn を一過性に発現した CHO-K1 細胞に 100 nM のインスリン刺激を 10 分間行った後、細胞破碎液を加えて調製した細胞抽出液に GST-syntaxin4 C を加えて 4 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートした。グルタチオンセファロースビーズを加えてさらに 30 分間インキュベートし、洗浄後のビーズに結合しているタンパク質をウエスタンブロット法で検出した。

(3) tomosyn S783 のリン酸化が GLUT4 を含む小胞輸送に与える影響を調べた実験: tomosyn/pcDNA3-FLAG2 および HA-GLUT4-GFP/pEGFP-N1 を一過性に同時発現した CHO-K1 に 100 nM のインスリン刺激を 15 分間行い細胞を固定した後、抗 HA 抗体を用いて細胞の免疫蛍光染色を行った。細胞透過処理をせずに抗 HA 抗体によって染色して得られた蛍光強度と GFP の蛍光強度を比較することで細胞膜に挿入された HA-GLUT4-GFP の割合を測定した。

4. 研究成果

(1) Akt による tomosyn のリン酸化が syntaxin4 との結合に与える影響

細胞から免疫沈降により調製した tomosyn を GST-Akt2 によって試験管内でリン酸化させた後 GST-syntaxin4 を加えて tomosyn に結合する syntaxin4 の量を測定比較した。tomosyn と syntaxin4 との結合量は tomosyn のリン酸化により低下した。続いて、アスパラギン酸 (Asp) 置換によってリン酸化状態を模倣できることに基づき S783 を Asp に置換した変異体 (tomosyn-S783D) を作製し、同様の試験管内結合実験を行ったところ、tomosyn-S783D に結合した GST-syntaxin4 は野生型に比べて約 60% 程度に低下した。一方、tomosyn-S783A に結合した GST-syntaxin4 は野生体型に結合した量と同程度であった。これらの結果から、Akt による tomosyn のリン酸化が syntaxin4 との結合を抑制することが示された (図1)。

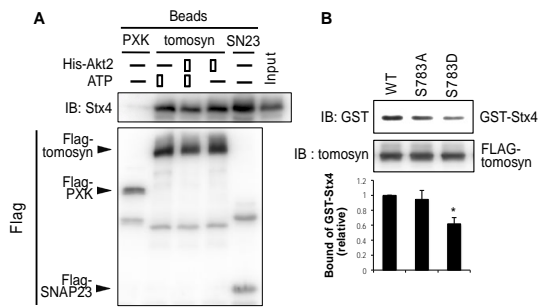


図1 Akt による tomosyn のリン酸化が syntaxin4 との結合に与える影響

(2) 細胞へのインスリン刺激による tomosyn のリン酸化が syntaxin4 との結合に与える影響

CHO-K1 細胞に tomosyn 野生体、tomosyn-S783A あるいは tomosyn-S783D 変異体をそれぞれ強制発現させ、インスリン刺激を行った後の細胞抽出液に GST-syntaxin4 を加え、結合してくる tomosyn を検出した。tomosyn 野生体はインスリン刺激により、恐らく Akt によってリン酸化されることで GST-syntaxin4 との結合量が 40% 程度抑制された。しかしながら、tomosyn-S783A ではインスリン刺激による影響は認められなかった。一方、tomosyn-S783D ではインスリン刺激の有無には無関係に野生体の無刺激時に比し結合量が減少した (図2)。

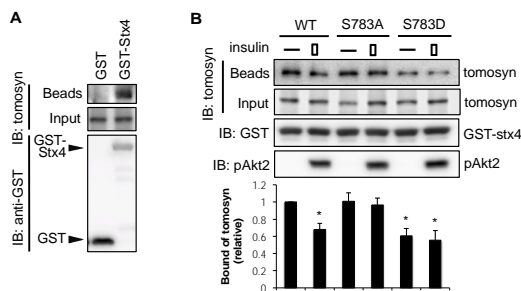


図2 細胞へのインスリン刺激による tomosyn のリン酸化が syntaxin4 との結合に与える影響

(3) tomosyn S783 のリン酸化が GLUT4 を含む小胞輸送に与える影響

野生型 tomosyn 発現細胞ではインスリン刺激に伴う GLUT4 の細胞表面への発現亢進を認めたが、tomosyn-S783A 変異体発現細胞では発現亢進が損なわれていた。この結果から、Akt による tomosyn の S783 のリン酸化がインスリン誘導性 GSV 輸送

において重要であることが示唆された (図3)。

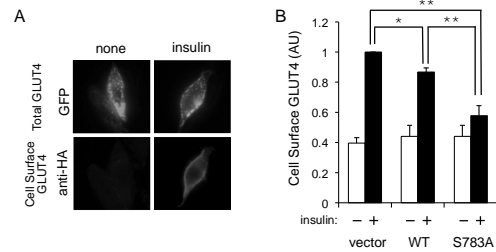


図3 tomosyn S783 のリン酸化が GLUT4 含む小胞輸送に与える影響

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 3 件)

Nagano K, Takeuchi H, Gao J, Mori Y, Otani T, Wang D, Hirata M. Tomosyn is a novel Akt substrate mediating insulin-dependent GLUT4 exocytosis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 査読有. 62 巻. 2015. 62-71 DOI:10.1016/j.biocel.2015.02.013

Tsuka S, Aonuma F, Higashi S, Ohsumi T, Nagano K, Mizokami A, Kawakubo- Yasukochi T, Masaki C, Hosokawa R, Hirata M, Takeuchi H. Promotion of insulin- induced glucose uptake in C2C12 myotubes by osteocalcin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有. 459(3) 巻. 2015. 437-442 DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.123

Shibuya M, Ikari T, Sugiyama G, Ohyama Y, Kumamaru W, Nagano K, Sugiura T, Shirasuna K, Mori Y. Efficient regulation of branching morphogenesis via fibroblast growth factor receptor 2c in early- stage embryonic mouse salivary glands. Differentiation. 査読有. 92(4) 巻. 2016. 216-224 DOI:10.1016/j.diff.2016.05.005

[学会発表](計 1 件)

Nagano K, Kohn D, Mishina Y. Crosstalk between Bmpr1a- mediated signaling and mechanical signaling in osteocytes. Research Day 2017. 2017 年 2 月 15 日. Michigan, USA.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長野 公喜 (Nagano Koki)

九州大学・大学院歯学研究科・医員

研究者番号：60737089