

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15093

研究課題名（和文）脂肪細胞における新規インスリンシグナル伝達経路とその破綻による肥満抑制機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel insulin signaling pathway in adipocytes

研究代表者

竹中 延之（Takenaka, Nobuyuki）

大阪府立大学・理学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：20610504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：インスリンは、骨格筋と脂肪組織への糖取込みを刺激し、血糖値を調節している。本研究では、脂肪細胞でのインスリン応答性糖取込みシグナル伝達系での低分子量GTP結合タンパク質Rac1の機能と調節機構を解明するため、脂肪培養細胞モデル3T3-L1とマウス脂肪細胞を用いた解析を行った。解析の結果、Rac1はタンパク質キナーゼ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ることを明らかにした。さらに、活性化されたRac1は、低分子量GTP結合タンパク質Ra1Aの活性化を介して糖取込みを誘導することを示し、脂肪細胞でのRac1を介した新たな糖取込み機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の発症原因の1つに脂肪細胞でのインスリン応答性糖取込み機構の異常が示唆されているが、不明な点が多い。今回の研究により明らかになったRac1を介した新たな糖取込み機構は、糖尿病に対する新たな治療法の創出につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Insulin stimulates glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue, thereby regulating the blood glucose level. In this study, we aimed to clarify the role and regulatory mechanisms of small GTPase Rac1 in adipocyte insulin signaling by using in vitro-differentiated 3T3-L1 adipocytes and mouse models. We identified a novel signaling mechanism whereby the guanine nucleotide exchange factor FLJ00068 activates Rac1 downstream of the protein kinase Akt2. Moreover, we identified the Ra1A regulates glucose uptake downstream of Rac1 in adipocytes.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：糖尿病 Rac1 インスリン 脂肪細胞 糖取込み

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国での肥満者は増加傾向にあり、肥満による糖尿病などの生活習慣病の発症が問題となっている。肥満の発症原因の1つとして、脂肪細胞でのインスリン応答性の糖取り込み機構の異常が挙げられる。

インスリン応答性の糖取り込み機構は脂肪細胞の他に、骨格筋細胞でも存在し、これら臓器での糖取り込みは、糖輸送担体 GLUT4 が担っている。インスリンがこれら臓器に作用すると、インスリン応答性の糖取り込みシグナル伝達系が活性化され、糖輸送担体 GLUT4 が細胞膜へ移行・露出し、糖が取り込まれる。この GLUT4 の制御系としては、ホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K)

セリンスレオニンキナーゼ Akt2 経路が重要とされている。このように、脂肪細胞および骨格筋細胞での糖取り込み機構に共通点は多いが、インスリン応答性の糖取り込みシグナル伝達経路の全容は不明である。

我々はこれまでに、骨格筋細胞での新規糖取り込み調節因子として Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac1 を同定し、そのシグナル伝達経路を明らかにしてきた。一方、脂肪細胞でも Rac1 の発現が認められ、それがインスリンにより活性化されることを明らかにしている (Cell signal. 39;108, 2017)。したがって、脂肪細胞でのインスリン応答性の糖取り込み機構に Rac1 が関与する可能性が高い。しかし、脂肪細胞での Rac1 を介したインスリン応答性の糖取り込み機構は不明であった。

2. 研究の目的

我々は、活性型 Rac1 のみと結合するポリペプチドをプローブとして、培養細胞や生体組織に反応させ、蛍光免疫染色法によるプローブの検出により、内在性の活性型 Rac1 を可視化できる“Rac1 の活性化動態イメージング法”の開発に成功している。また、脂肪細胞特異的 rac1 ノックアウト (Adipo-rac1 KO) マウスの作出にも成功している。そこで本研究ではこれらを用いて、脂肪細胞での Rac1 の機能ならびに Rac1 を介したインスリン応答性の糖取り込みシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Rac1 を介したインスリン応答性の糖取り込みシグナル伝達経路の解析

脂肪細胞でのインスリン刺激依存的に機能する Rac1 の活性調節因子 (PI3K、Akt2 など) や、Rac1 の下流で機能する因子 (低分子量 GTPase RalA など) を同定し、脂肪細胞でのインスリン応答性の糖取り込みシグナル伝達経路を明らかにする。

(2) Adipo-rac1 KO マウス胎児由来初代繊維芽細胞 (MEF) を用いた解析

Adipo-rac1 KO マウス胎児由来初代繊維芽細胞 (分化誘導により脂肪細胞へ分化する) を用いて細胞のサイズ、脂肪蓄積能などへの rac1 ノックアウトの影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Rac1 を介したインスリン応答性の糖取り込みシグナル伝達経路の解析

脂肪細胞培養モデル 3T3-L1 細胞に既知のインスリン応答性の糖取り込み因子である PI3K または Akt2 の恒常的活性型変異体を異所性発現させ、その後 Rac1 特異的阻害剤を添加し、GLUT4 の細胞膜への移行誘導を検討した。その結果、恒常的活性型 PI3K または恒常的活性型 Akt2 による GLUT4 の細胞膜移行および糖取り込み量の増加が認められた。しかし、これらは Rac1 特異的阻害剤処理により有意な抑制が認められた (図 1)。また、インスリン刺激および恒常的活性型 PI3K または恒常的活性型 Akt2 による Rac1 の活性化誘導も認められた。しかし、インスリン刺激による Rac1 の活性化誘導は、Akt2 特異的阻害剤処理により完全に抑制された。また、マウス脂肪組織を用いて、同様の解析を行ったところ、3T3-L1 細胞を用いた解析と同様の結果が得られた。これらのことから、Rac1 が PI3K-Akt2 経路の下流で活性制御を受け、インスリン応答性糖取り込み機構に関与していることが明らかとなった。

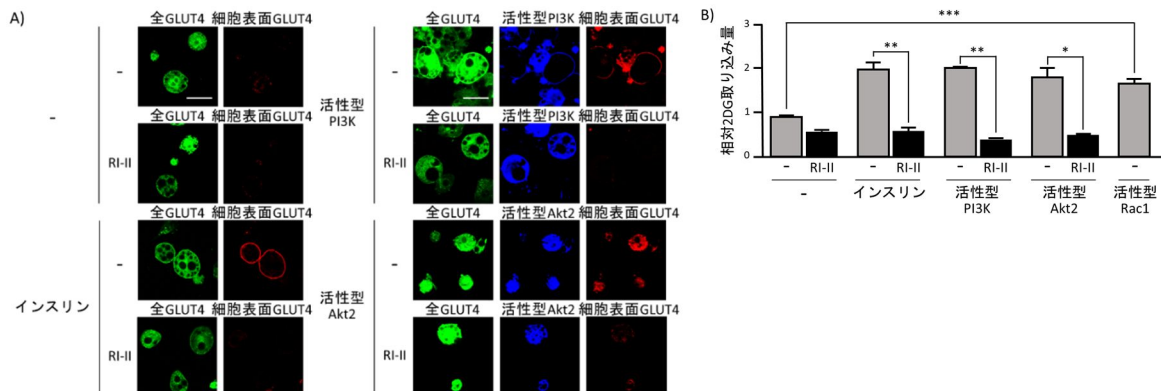


図 1 GLUT4 の細胞膜移行および糖取り込みへの Rac1 阻害剤 RI-II の影響

骨格筋細胞でのインスリン応答性の糖取り込み機構で Rac1 の直接の活性化因子である FLJ00068 の発現が脂肪細胞でも認められた。そこで、FLJ00068 を発現抑制させた細胞を用い、インスリン依存的な GLUT4 の細胞膜移行および Rac1 の活性化誘導の検討を行った。その結果、FLJ00068 を発現している細胞ではインスリン刺激による GLUT4 の細胞膜移行が認められたが、FLJ00068 抑制細胞においては、インスリン依存的な GLUT4 の細胞膜移行が有意に抑制された (図 2)。さらに、インスリンによる Rac1 の活性化誘導も FLJ00068 の発現抑制により有意に抑制された。これらのことから、FLJ00068 は脂肪細胞においても Rac1 の直接の活性制御因子として機能し、糖取り込みに関与することが明らかとなった。

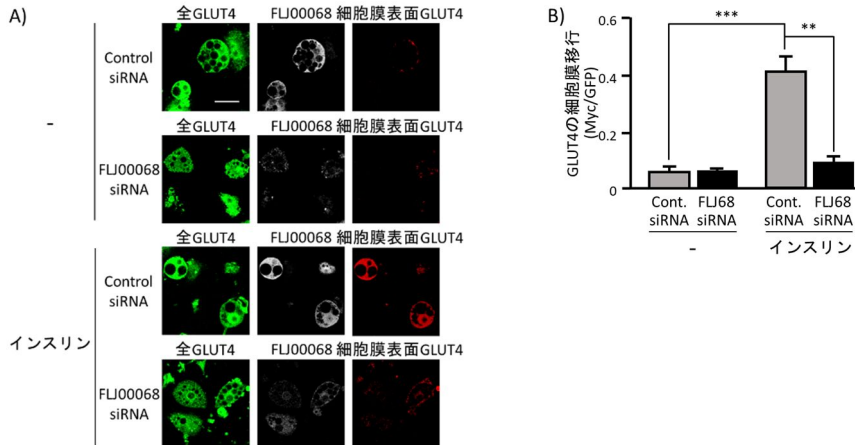


図 2 インスリンによる GLUT4 の細胞膜移行への FLJ00068 の関与

RalA 発現抑制細胞を用いて、恒常的活性型 Rac1 による GLUT4 の細胞膜への移行誘導ならびに活性化動態イメージング法を応用し、RalA の活性化の検討を行った。その結果、RalA 発現抑制細胞において、恒常的活性型 Rac1 による GLUT4 の細胞膜移行の有意な抑制が認められた (図 3A)。また、インスリン刺激による RalA の活性化は、Rac1 特異的阻害剤処理により抑制された (図 3B)。これらのことから、RalA は Rac1 の下流で活性制御され、GLUT4 の細胞膜移行を制御している可能性が示唆された。

以上の結果より、脂肪細胞において Rac1 は PI3K-Akt2 経路の下流で FLJ00068 から活性制御を受け、RalA を介してインスリン応答性糖取り込みシグナル伝達機構に関与している可能性を示した。

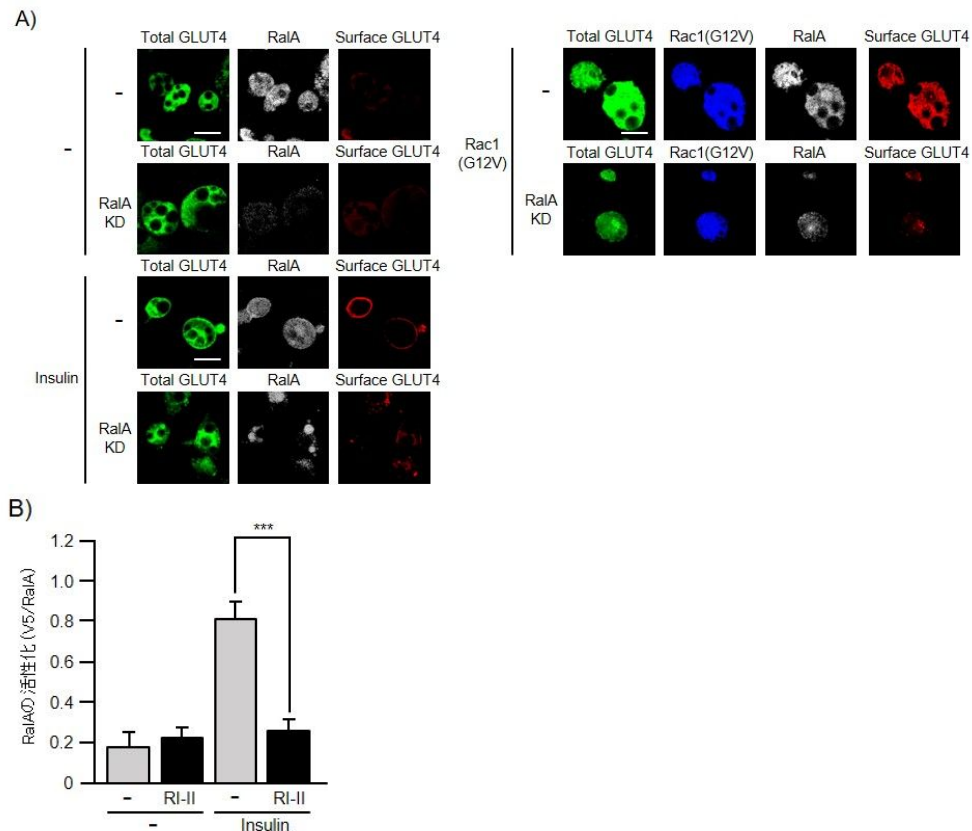


図 3 Rac1 による GLUT4 の細胞膜移行への RalA の関与

(2) Adipo-*rac1* KO マウス胎児由来初代繊維芽細胞 (MEF) を用いた解析

Adipo-*rac1* KO マウスの表現型解析から、このマウスの脂肪細胞は小型化を示すことが明らかとなっている。そこで、Adipo-*rac1*-KO マウスが示す脂肪細胞の肥大化抑制メカニズムを明らかにするため、初代前駆脂肪培養細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系を構築し、解析を行った。その結果、Adipo-*rac1*-KO マウス由来の細胞では、脂肪細胞へ分化はするが、細胞のサイズは小さく、脂肪滴形成の抑制が認められた。したがって、脂肪細胞において、Rac1 が肥大化に關与する可能性がより強く示唆された。現在、この系を利用して、*rac1* 遺伝子欠損による白色脂肪細胞の肥大化抑制機構の解明を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takenaka Nobuyuki, Nakao Mika, Matsui Sayaka, Satoh Takaya	4. 巻 20
2. 論文標題 A crucial role for the small GTPase Rac1 downstream of the protein kinase Akt2 in insulin signaling that regulates glucose uptake in mouse adipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5443 ~ 5457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi:10.3390/ijms20215443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takaya Satoh, Nobuyuki Takenaka	4. 巻 45
2. 論文標題 A critical role for the small GTPase Rac1 in insulin signaling that regulates glucose uptake in skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Research on Chemical Intermediates	6. 最初と最後の頁 5389 ~ 5397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Nobuyuki, Araki Natsumi, Satoh Takaya	4. 巻 14
2. 論文標題 Involvement of the protein kinase Akt2 in insulin-stimulated Rac1 activation leading to glucose uptake in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0212219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Nobuyuki, Nihata Yuma, Ueda Sho, Satoh Takaya	4. 巻 39
2. 論文標題 In situ detection of the activation of Rac1 and RalA small GTPases in mouse adipocytes by immunofluorescent microscopy following in vivo and ex vivo insulin stimulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 108 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中尾 美翔、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 脂肪細胞でのインスリン応答性糖取り込みにおけるタンパク質キナーゼAkt2による低分子量GTP結合タンパク質Rac1の制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 紀子、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞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
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mika Nakao, Nobuyuki Takenaka, Takaya Satoh
2. 発表標題 Regulation of Rac1 by Akt2 in insulin-dependent glucose uptake signaling in 3T3-L1 adipocytes
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiko Hasegawa, Nobuyuki Takenaka, Takaya Satoh
2. 発表標題 Regulation of Rac1 in insulin-dependent glucose uptake signaling in white adipocytes
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiko Hasegawa, Nobuyuki Takenaka, Takaya Satoh
2. 発表標題 Role of the GTP-binding protein Rac1 in insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes
3. 学会等名 7th HCMUT-TKU-OPU-KMITL-DLU-TNU Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaya Satoh and Nobuyuki Takenaka
2. 発表標題 Insulin signal transduction in skeletal muscle and adipose tissue.
3. 学会等名 The 6th TKU-OPU-HCMUT-DLU-TNU Joint Symposium on Chemistry and Natural Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 紀子、植田 笙、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 白色脂肪細胞の肥大化における低分子量GTP結合タンパク質Rac1の機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾 美翔、松井 さやか、植田 笙、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 脂肪細胞のインスリン応答性糖取り込みにおける低分子量GTP結合タンパク質Rac1の機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾 美翔、松井 さやか、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 3T3-L1脂肪細胞でのインスリン応答性糖取込みにおけるRac1によるRalAの制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田 笙、中尾 美翔、松井 さやか、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 マウス脂肪組織において内在性低分子量GTP結合タンパク質の活性化を検出する新規手法
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中尾 美翔、植田 笙、松井 さやか、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 マウス脂肪細胞のインスリンシグナル伝達系におけるGTP結合タンパク質Rac1の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井 さやか、植田 笙、中尾 美翔、竹中 延之、佐藤 孝哉
2. 発表標題 マウス脂肪細胞におけるインスリン刺激に応答したGTP結合タンパク質RalAの活性化メカニズムの解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻細胞生物学研究室ホームページ
<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~tsato/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----