

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08463

研究課題名(和文) GLUT4の空間・時間的運命を制御するインスリン・シグナルの解明

研究課題名(英文) Mechanism of insulin regulation of spatial and temporal fate of GLUT4

研究代表者

柴田 宏 (Shibata, Hiroshi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：20235584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンによるH₂O₂産生亢進メカニズムを明らかにすることは、脂肪細胞および骨格筋におけるインスリン抵抗性の発現メカニズム、を始めとする様々な生活習慣病の病態を解明する上で非常に重要であると考えられる。本研究においては、インスリンによるH₂O₂産生亢進メカニズムに関して、Nox4活性の調節およびNADPH産生の調節という2つの面から検討した。結果として、ERに局在するNox4がインスリンによる翻訳後修飾を介してカベオリンと結合して細胞膜に近接すること、またインスリンがNADPH産生を亢進することを明らかにした。これら2つのメカニズムの関連性に関しては、今後さらに検討を加える必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンによるH₂O₂産生亢進メカニズムを明らかにすることは、脂肪細胞および骨格筋におけるインスリン抵抗性の発現メカニズム、を始めとする様々な生活習慣病の病態を解明する上で非常に重要であると考えられる。また細胞生物学およびシグナル伝達機構の領域においても、新たなインスリンシグナルによる細胞機能の調節機構を提示する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies revealed that insulin downregulates GLUT4 both by depletion of GLUT4 in the GLUT4 storage compartment (GSC) and by accelerating degradation of the transporter in the lysosomes, which is induced by the H₂O₂ production by insulin. In the present study, we investigated the mechanism of insulin-stimulated production of H₂O₂ from two aspects: regulation of Nox4 activity and regulation of NADPH production. We found that Nox4, which is localized in the ER, binds to caveolae through post-translational modification by insulin and binds to the plasma membrane, and that insulin enhances NADPH production. The relevance of these two mechanisms needs to be further investigated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン作用 タンパク質寿命 グルコーストランスポーター 活性酸素 脂肪細胞 NADPHオキシダーゼ 小胞輸送

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

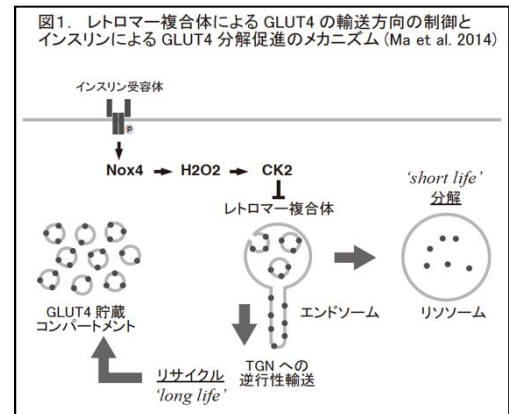
. グルコース輸送システムのインスリン感受性を規定する GLUT4 貯蔵コンパートメント(GSC)への GLUT4 ターゲティング

インスリンは生体のエネルギー代謝にとって極めて重要な調節因子であり、骨格筋および脂肪細胞に作用してインスリン調節性グルコーストランスポーター(GLUT4)を細胞膜にリクルートし、グルコースの取り込みを促進する。骨格筋や脂肪細胞のグルコース輸送システムは、極めて高いインスリン感受性を示し、インスリン刺激後、細胞内へのグルコース取込みは 10–40 倍にも活性化される。この高いインスリン感受性が発現されるためには、GLUT4 が「インスリン感受性 GLUT4 貯蔵コンパートメント(GSC)」へターゲティングされることが極めて重要である。脂肪細胞においては、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴うインスリン感受性の獲得は、GSC の出現と並行する。一方、肥大した脂肪細胞や慢性的にインスリン刺激を受けた脂肪細胞では、GSC の減少に伴い、グルコース輸送システムのインスリン感受性が著明に低下する。2型糖尿病やメタボリックシンドロームでみられる末梢組織のインスリン感受性の低下には、炎症性サイトカイン等によるインスリン・シグナルの阻害に加えて、グルコース輸送システムのインスリン感受性を規定している GSC の減少が大きく関与すると考えられるが、骨格筋や脂肪細胞のインスリン感受性が発現・維持される機構、またその破綻メカニズムは未だ未解明の部分が多い。

. GSC への GLUT4 ターゲティングは GLUT4 蛋白寿命と連関する

GLUT4 の GSC へのターゲティングを促進する因子として、これまでに申請者らのグループとボストン大学の Kandror のグループは、それぞれ SUMO 化縮合酵素である Ubc9(Liu et al. Diabetes, 2007) と Sortilin(Shi & Kandror, Dev Cell, 2005)を報告した。これら 2 つの因子は、共に脂肪細胞において、

(1)GSC への GLUT4 のターゲティングを促進するとともに、
(2)GLUT4 の分解を抑制して発現量を増加させ、結果としてグルコース輸送のインスリン感受性を正に制御する重要な機能分子であることが示された。2つの報告に共通した非常に興味深い点は、GLUT4 の GSC へのターゲティングが促進される条件下では、GLUT4 の蛋白分解速度が遅く(蛋白寿命が延長)、逆に GSC へのターゲティングが減少する条件下では、GLUT4 の分解が促進する(蛋白寿命が短縮)という知見である。このことから、申請者は、一見無関係に見える Ubc9 や Sortilin の 2 つの作用(上記(1)GSC へのターゲティング、および(2)タンパク寿命(分解速度))は、実は GSC とリソソーム



分解系という排他的な 2 方向への GLUT4 ソーティングにより一元的に説明可能であるという作業仮説の着想に至った。その後申請者らは、この仮説の検証作業をすすめて、GLUT4 輸送方向のスイッチングを司る分子実体が、エンドソームからトランスゴルジネットワーク(TGN)への逆行性輸送を担うレトロマー複合体であること、インスリンはレトロマー機能を阻害することで GLUT4 のリソソーム分解系への輸送促進と GSC 貯蔵系へのターゲティングの減少をもたらすことを報告した(Ma et al. J. Biol. Chem., 2014) (図1)。

. レトロマー複合体を阻害するインスリン・シグナルは何か

レトロマー阻害をもたらすインスリン・シグナルを明らかにすることは、インスリン感受性の破綻機構を解明する上で極めて重要な課題である。申請者らは、このインスリン作用が、インスリンの主要なシグナル分子である PI3 キナーゼや Erk1/2 の活性に依存しないという点に着目し、PI3 キナーゼ/Erk 非依存性のインスリン・シグナルを探索し、インスリンによって産生される過酸化水素(H₂O₂)がレトロマーを阻害するシグナル分子として機能していることを明らかにした(Ma et al. 同上)。インスリンが脂肪細胞において

H₂O₂ 産生を促進することは 1970 年代に M. P. Czech らによって報告されていたが、そのシグナル分子としての生理的重要性は、近年になって再び注目され明らかにされつつある。すなわち、H₂O₂ は精緻な調節の下で、細胞内酸化還元シグナルや酸化ストレスにおける中心的役割を果たしており (e.g. H. Sies の総説, JBC 2014)、インスリンや増殖因子のシグナル経路においては、SH 基をもつチロシンホスファターゼ (PTP1B) や PTEN の活性阻害によりチロシンキナーゼや PI3 キナーゼのシグナルを増強するセカンドメッセンジャーとして機能している。さらには H₂O₂ の炎症・がん・概日リズム・老化等における役割も明らかになりつつある。過栄養状態では必然的にインスリン過剰状態を伴うことを鑑みれば、H₂O₂ 産生亢進をもたらすインスリン・シグナルを明らかにすることは、グルコース輸送システムの破綻メカニズムにとどまらず、広く生活習慣病およびその関連疾患の病態解明においても重要な課題といえよう。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪細胞における H₂O₂ 産生亢進をもたらすインスリン・シグナルを明らかにすることにより、GLUT4 の空間・時間的運命、すなわち、上に述べた GSC へのターゲティングと蛋白寿命の制御機構を解明することにある。後述のように、3T3-L1 脂肪細胞においては、インスリン刺激時の H₂O₂ 産生ソースは NADPH オキシダーゼのアイソフォームである Nox4 であると考えられる。したがって、本研究では、インスリンがいかなる機構で Nox4 を介した H₂O₂ 産生亢進をもたらすのかという点を、Nox4 の細胞内局在、翻訳後修飾、分子間相互作用等の各側面から明らかにすることを目的とする。

本研究の独自性は、第1に、グルコース輸送システムのインスリン感受性制御機構を、レトロマー複合体を介した GLUT4 の細胞内ソーティングという独自の観点で明らかにしようとする点にある。インスリン・シグナル機構の障害という観点からのインスリン抵抗性の研究は多いが、本研究のような観点到ったアプローチは独自のものである。第2点として、本研究は、レトロマー阻害をもたらすインスリン・シグナル分子が H₂O₂ であるという申請者らの発見に基づき、H₂O₂ 産生ソースとしての Nox4 を特定し、Nox4 をインスリン作用の新規ターゲットとした独自の研究戦略のもとに行われるという点である。インスリンによる Nox4 活性化/H₂O₂ 産生亢進機構の解明は、インスリン・シグナル研究領域において、新たな PI3 キナーゼ/Erk 非依存性インスリン・シグナルの提示につながることを期待される。

3. 研究の方法

本研究においては、以下の点を明らかにしたい。

H₂O₂ 産生亢進におけるインスリン作用のターゲットの同定: 3T3-L1 脂肪細胞においては、インスリンによる H₂O₂ 産生亢進と GLUT4 分解促進作用は Nox 阻害剤である DPI (diphenyleneiodonium) や Nox1/4 特異的阻害剤 (GKT136901 および GKT137831) により抑制されること、また同細胞における Nox ファミリーの発現を qPCR で検討したところ、Nox4 が他の Nox (Nox1, Nox2, Nox3) と比べて数十倍以上ドミナントに発現していることから、インスリン刺激時の H₂O₂ 産生ソースは Nox4 であると考えられた。したがって、本研究では、インスリンによる Nox4 活性化機構を明らかにする目的で、Nox4 の細胞内局在、翻訳後修飾、分子間相互作用等の各側面から以下の検討を行う。

Nox4 の細胞内局在の検討: ショ糖密度勾配遠心法により Nox4 の局在する細胞内膜画分を同定する。また Nox4 局在に対するインスリンの効果を検討する。これと平行して、Nox4-eYFP と p22phox-eCFP (NADPH オキシダーゼ複合体活性化に必要なサブユニット) を発現した脂肪細胞を用い、インスリン刺激による Nox4-eYFP の細胞内局在の変化を検討する。

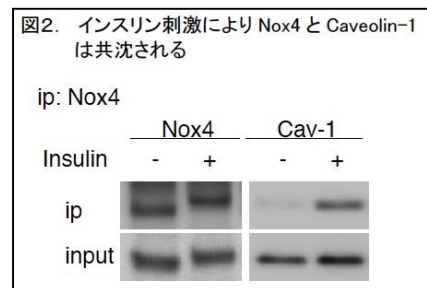
Nox4 と相互作用する蛋白の同定と Nox4 活性化に關与する翻訳後修飾の探索: 予備実験において Nox4-eYFP がインスリン刺激により細胞膜へ局在することが明らかになった。そこでインスリン依存性に Nox4 と結合する細胞膜蛋白の候補として、脂肪細胞に大量に発現しているカベオリンとの結合を免疫沈降法により検討する。カベオリンを候補として選ぶ理由は以下の通りである。カベオリンは Caveolin Scaffolding Domain (CSD) と呼ばれる配列 (アミノ酸 82-101) をもち、Caveolin-Binding Motif (CBM) をもつ種々のシグナル蛋白と結合することが知られている。Nox1-Nox5 の C 端には CBM コンセンサス配列 (X XXXX) が存在すること、カベオリンと Nox2, Nox5 の結合が報告されていること (Chen et al. 2014) から、Nox4 とカベオリンが結合する可能性が十分考えられる。この検討により、結合が見られた場

合には、インスリン・シグナルとの関係を明らかにする目的で、チロシン残基に変異を導入した Nox4 とカベオリン、および CBM 欠失変異 Nox4 (Nox4- CBM) 等を用い、インスリンによるリン酸化の有無、インスリン依存性結合に対する効果を検討する。またインスリンによるリン酸化部位を同定するために、質量分析による Nox4 のリン酸化部位決定にトライする。リン酸化部位が決定した後、リン酸化部位の変異体を 3T3-L1 脂肪細胞にエレクトロポレーション法を用いて発現させ、インスリンによる H₂O₂ 産生に対する効果、GLUT4 分解促進に及ぼす効果を検討する。H₂O₂ 産生は H₂O₂ 特異的蛍光プローブである HyPer (Belousov et al. Nat Methods. 3: 281, 2006) を用いたリアルタイムモニタリング (Ma et al. 2014) により測定する。

4 . 研究成果

Nox4 の細胞内局在の検討: ショ糖密度勾配遠心法による検討では、Nox4 は小胞体 (ER) 画分に局在しインスリン刺激の影響を受けなかった。ところが Nox4-eYFP と p22phox-eCFP (NADPH オキシダーゼ複合体活性化に必要なサブユニット) を発現した脂肪細胞では、インスリン刺激により Nox4-eYFP の細胞膜近傍への集積が観察された。このことから Nox4 は ER に局在したままで、細胞膜の何らかの分子と結合することにより細胞膜近傍に集積する可能性が想定された。この点に関しては、今後、全反射顕微鏡を用いてインスリン刺激による Nox4 の細胞膜への移行を確かめることが重要と思われる。

Nox4 と相互作用する蛋白の同定と Nox4 活性化に關与する翻訳後修飾の探索: インスリン依存性に Nox4 と結合する細胞膜蛋白の候補として、脂肪細胞に大量に発現しているカベオリンとの結合を検討した。Nox4 とカベオリンの結合を免疫沈降法で検討したところ、インスリン刺激依存性に Nox4 とカベオリンの結合が見られた (図 2)。この結合はチロシンホスファターゼ阻害剤である vanadate 存在下でのみ見られることから、いずれかの蛋白のチロシンリン酸化に依存した結合と考えられた。そこで本研究では、チロシン残基に変異を導入した Nox4 とカベオリンを用い、インスリン依存性結合に対する効果を検討した。リン酸化予測サイトでの検索では、Nox4 の Tyr572 がヒットするので、まずは Nox4-Y572F 変異体に関して検討した。Nox4-Y572F 変異体の発現によりインスリンによる H₂O₂ 産生抑制および GLUT4 分解促進作用の抑制効果が見られたことから、同リン酸化部位がインスリン作用発現において重要な役割を果たしていることが示唆された。カベオリンに関してはインスリンによるリン酸化が確認されている Cav-Y14F 変異を用いた。Cav-Y14F 変異の過剰発現によってもインスリンによる H₂O₂ 産生抑制および GLUT4 分解促進作用の抑制効果が見られた。

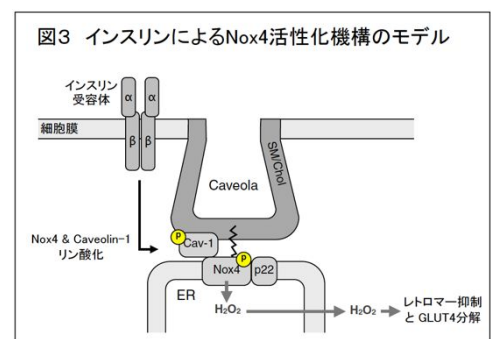


これらの結果から、インスリンによる Nox4 を介した H₂O₂ 産生亢進の機構として、図 3 に示すモデルが考えられる。すなわち、インスリン刺激によりカベオリンおよび Nox4 がリン酸化される。このリン酸化は両者の結合を惹起し、Nox4 の細胞膜への接近をもたらすと同時に、何らかの機構により Nox4 が活性化される。これにより H₂O₂ 産生が亢進し、レトロマー機能が阻害され GLUT4 は GSC へのリサイクリング経路からはずれて、リソソームへとソーティングされ分解が促進する。

インスリンによる Nox4 活性化モデルにおける問題点ともう一つの可能性

これまでの我々の検討により、インスリンによる H₂O₂ 産生亢進は、Nox4 活性に依存している可能性が示されている。したがって、上述のように、想定される一つのモデルは、図 3 に示すような、インスリンが何らかのシグナル機構により、Nox4 あるいは Nox4 と相互作用するタンパク質の翻訳後修飾を惹起することで、細胞内局在の変化やタンパク-タンパク相互作用を介して、

Nox4 酵素活性を活性化する (モデル A)、というものである。このシグナル機構としては、リン酸化カスケード、未知の翻訳後修飾、あるいは未知のセカンドメッセンジャーなどさまざまな可能性が考えられる。



一方、このモデルで問題となるのは、文献上 Nox4 は構成性活性型であり、その活性調節は酵素活性の調節ではなく、発現量に依存する、という報告が多々あることである。しかし、この点に関しては我々が報告したように (Ma et al. 同上)、インスリンによる H_2O_2 産生亢進はインスリン刺激後、数分以内に生じることから、発現量の変化が起きたとは考えにくい。そこで、Nox4 活性が変化せずに H_2O_2 産生亢進をもたらすもう一つの可能性として、基質である NADPH の供給が増加することにより、 H_2O_2 産生が増加するというモデル (モデル B) が考えられる。この場合には、Nox4 の酵素活性は変化せずに、NADPH 産生がインスリン刺激により活性化されることにより、 H_2O_2 産生が増加する。細胞における NADPH 産生は、主にペントースリン酸経路 (PPP) のグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH) とホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (PGD)、および細胞質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (NADP+) (NADP-malic enzyme, NADP-ME) により産生されるが、G6PDH が主要な役割を果たしていると考えられている。そこで本研究において、G6PDH 阻害剤である Dehydroepiandrosterone (DHEA) のインスリン作用に対する効果を検討した。DHEA 処理により、インスリンによる H_2O_2 産生と GLUT4 分解は濃度依存性に抑制されたことから、PPP 経路での G6PDH による NADPH 産生が Nox4 による H_2O_2 産生亢進に重要であることが示唆された。

そこで次にインスリンが G6PDH を活性化するかどうかを検討した。G6PDH は様々な調節を受けるが、インスリン、EGF、PDGF などは正の調節因子として、また cAMP-PKA 系は負の調節因子として知られている。3T3-L1 脂肪細胞を用いて、インスリンの G6PDH 活性に対する効果を検討したが、インスリンによる活性化はみられなかった。この点に関しては、既報と異なる結果であることから、アッセイ系の検討が必要であると考えている。一方、インスリンの NADPH 産生に対する効果を生化学的方法および NADPH に対する蛍光プローブ (iNap sensor (Tao et al. Nature Methods 2017)) を用いて検討した。生化学的方法ではインスリンによる NADPH 産生増加が確認されたが、iNap sensor によるリアルタイムモニタリングでは確認できなかった。後者に関しても、今後測定条件の最適化を検討していく必要がある。

インスリンによる H_2O_2 産生亢進メカニズムを明らかにすることは、脂肪細胞および骨格筋におけるインスリン抵抗性の発現メカニズム、を始めとする様々な生活習慣病の病態を解明する上で非常に重要であると考えられる。また細胞生物学およびシグナル伝達機構の領域においても、新たなインスリンシグナルによる細胞機能の調節機構を提示する可能性がある。本研究においては、インスリンによる H_2O_2 産生亢進メカニズムに関して、Nox4 活性の調節および NADPH 産生の調節という2つの面から検討した。結果として、ER に局在する Nox4 がインスリンによる翻訳後修飾を介してカベオリンと結合して細胞膜に近接すること、またインスリンが NADPH 産生を亢進することを明らかにした。これら2つのメカニズムの関連性に関しては、今後さらに検討を加える必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanimura K, Suzuki T, Vargas D, Shibata H, Inagaki T	4. 巻 66
2. 論文標題 Epigenetic regulation of beige adipocyte fate by histone methylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 115-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0442	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田宏, 鈴木智大, 谷岡安紀子, 谷村恭子, Diana Vargas, Silvia Bolzani, 林真友子, 板橋英之, 稲垣毅
2. 発表標題 脂肪細胞分化制御因子としての鉄イオンの役割とその細胞内動態
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shibata H, Suzuki T, Tanimura K, Vargas D, Hirayama T, Nagasaki H, Inagaki T
2. 発表標題 Role of iron in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells
3. 学会等名 The 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism- At the Cutting Edge of Metabolic Regulation Research
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所 代謝エピジェネティクス分野
<https://epigenetics.imcr.gunma-u.ac.jp>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------