

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591060

研究課題名(和文) 新規糖輸送促進蛋白CLIP170の機能解析

研究課題名(英文) Roles of CLIP170 on glucose transport.

研究代表者

江本 政広 (EMOTO MASAHIRO)

山口大学・医学部・准教授

研究者番号：50294640

研究成果の概要(和文)：インスリン依存性の糖輸送は、インスリン作用の最も基本的ステップである。しかし、インスリンがこのステップをどのように調節しているか未だ良く分かっていない。今回は、微小管(細胞骨格の一つ)に結合する蛋白質の網羅的解析から CLIP170 を同定し、糖輸送における役割を検討した。その結果、インスリン依存性糖輸送(GLUT4 小胞の細胞膜へのトランスロケーション)を調節していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Insulin dependent glucose transport is one of the most important steps for insulin action in peripheral tissues. However, the precise mechanism how insulin regulates glucose transport is still unclear. In this project, CLIP170 was identified as a microtubule plus-end protein by MALDI-TOF MS analysis. This protein had a essential roles on GLUT4-vesicle translocation to the plasma membrane and glucose uptake in response to insulin stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子糖尿病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：グルコース、微小管、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症に肥満などによるインスリン抵抗性とインスリン分泌不全の2要素が重要である。私は前者に注目し、インスリン作用の分子メカニズムの解明に研究の主眼をおいている。具体的には、インスリン刺激により、ブドウ糖は細胞膜の糖輸送担体(GLUT4)を介して細胞内に取り込まれる。このステップには、小胞輸送によって膜まで GLUT4 が輸送されることが重要であり、このステップがインスリン作用の律速段階であ

る。この GLUT4 の細胞内輸送のメカニズムは複雑で、多くのシグナル分子によって調節されている。

## 2. 研究の目的

GLUT4 分子がインスリンによって膜へ輸送されるメカニズムを解明したい。特に、細胞骨格依存性の膜輸送を分子生物学的に、そのシグナル経路を生化学的に解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

培養脂肪細胞を用いる。CLIP170 の細胞内の局在変化は間接蛍光免疫染色と共焦点顕微鏡にて観察する。3重、四重染色により、GLUT4 や細胞骨格との共局在の有無を検討する。CLIP170 に結合し、糖輸送に関連する分子の同定は、免疫沈降法を基本とし、様々な変法を用い、分子の同定には MALDI-TOF MS 質量分析計を使用する。糖輸送活性の測定は、2deoxy-d-glucose の取り込み率で測定する。

### 4. 研究成果

#### (1) CLIP170 の同定

微小管結合蛋白質として CLIP170 を同定した。

#### Analysis of microtubule binding proteins by MALDI-TOF MS

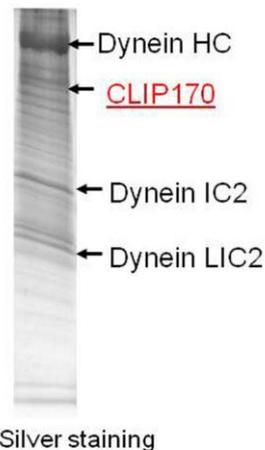


図1. 微小管結合蛋白質の網羅的解析の結果 (矢印: TOF-MS によって同定された蛋白質の一部)

#### (2) CLIP170 の細胞内局在

抗 CLIP170 ポリクローナル抗体を作成し、脂肪細胞内の局在を共焦点顕微鏡を用いて検討した。その結果、細胞内に彌慢性に点状に存在した。同時に微小管、GLUT4 小胞を同時に染色し詳細に観察すると、微小管とはきれいに共局在した。さらに微小管の先端 (+端) で GLUT4 とも共局在した。

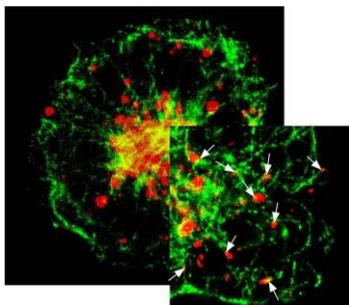


図2. 脂肪細胞を蛍光免疫染色した。赤: GLUT4 小胞、緑: 微小管

#### (3) CLIP170 の機能解析

CLIP170 に特異的 shRNA を用いてノックダウンした脂肪細胞を作成した。この細胞を用いてインスリン依存性糖輸送能を検討した。CLIP170 ノックダウン細胞では、インスリン依存性糖輸送がおよそ半分に抑制された。一方、CLIP170 を過剰に発現すると微小管の形態に異常を認めるため、微小管結合ドメインを欠失した変異体を過剰に発現した細胞を作成した。この細胞においてもインスリン依存性糖輸送は抑制された。

#### (4) CLIP170 と GLUT4 小胞の挙動

前述の CLIP170 変異体を過剰に発現した細胞では、インスリン依存性 GLUT4 小胞のトランスロケーションが強力に抑制された。以上より、CLIP170 は微小管の先端で GLUT4 小胞の移動を調節していると考えられた。

#### (5) CLIP170 調節性シグナルの解析

CLIP170 結合蛋白質の解析から CLIP170-BP (CLIP170 結合蛋白質) を同定した。予備的な実験の結果から、本蛋白質は CLIP170 と細胞膜を結び付ける機能を持っていると考えている。現在、インスリンシグナルによる調節機構を含め、検証中である。

(6) 現在、上記結果をまとめ論文投稿準備中である。また、どのインスリンシグナル分子が、CLIP170 依存性の糖輸送に関与しているのか検討を続けている。このシグナル経路が判明すると新しい糖尿病治療のターゲット分子になると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

① 江本政広、福田尚文、宮崎睦子、谷澤幸生 タンデム C2 ドメイン蛋白質による糖輸送 t p インスリン分泌の調節機構 生体の科学 Vol.61 No.3 金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院 227-232 2010. May-Jun. (査読なし)

② 江本政広 「特集 インスリン作用の原点」 糖尿病 52: 315-340, 2009 (査読なし)

③ Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, Taguchi A, Miyamoto S, Uraki S, Oka Y,

Tanizawa Y. DOC2B: a novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes. *Diabetes* 58:377-384, 2009. (査読あり)

④ Miyazaki M, Emoto M, Fukuda N, Hatanaka M, Taguchi A, Miyamoto S, Tanizawa Y. DOC2b is a SNARE regulator of glucose-stimulated delayed insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 10;384(4):461-5, 2009. (査読あり)

⑤ 田口昭彦、奥屋 茂、江本政広、谷澤幸生 インスリンによる糖取り込み調節の分子機構-GLUT 4 結合蛋白の同定と解析- 糖尿病学の進歩 2008 第 42 集(日本糖尿病学会編) 診断と治療社 25-28 2008 (査読なし)

⑥ Taguchi A, Emoto M, Okuya S, Fukuda N, Nakamori Y, Miyazaki M, Miyamoto S, anabe K, Aburatani H, Oka Y, Tanizawa Y. Identification of Glypican3 as a novel GLUT4-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;369:1204-8. (査読あり)

[学会発表] (計 15 件)

①中林容子、田部勝也、太田康晴、幡中雅行、近藤 学、江本政広、谷澤幸生 セリン・スレオニンキナーゼ GSK-3 は ATF 4 を抑制的に調節する 日本糖尿病学会中国四国地方会第 4 8 回総会 2010 年 10 月 29 日、30 日 松山市 愛媛県県民文化会館

② K.Matsui, M.Emoto, S.Miyamoto, and Y.Tanizawa. A role for SNARE binding protein p34 in GLUT4-vesicle recycling. The 2nd Scientific Meeting of the Asian Association for the Stuey of Diabetes, (Abstract 64p)May 28-29, 2010, 岡山市 岡山全日空ホテル

③ 江本政広、福田尚文、谷澤幸生 GLUT4-vesicle fusion: Role of SNARE regulator DOC2b and calcium 第 5 3 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2010 年 5 月 27 日、28 日、29 日 岡山市 岡山全日空ホテル)

④ 江本政広、西嶋由衣、有好香子、近藤 学、中林容子、鶴 政俊、安藤寿彦、奥屋 茂、谷澤幸生 E-tracking 法による augmentation index は従来の IMT 測定より脳動脈硬化症の評価に有用である 第 5 3 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2010 年 5 月

27 日、28 日、29 日 岡山市 岡山全日空ホテル)

⑤ 奥屋 茂、田部勝也、江本政広、太田康晴、谷澤幸生 新規 Glut 4 結合蛋白 p 61 は脂肪細胞の Glut4 エンドサイトーシスに影響を及ぼす 第 5 3 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2010 年 5 月 27 日、28 日、29 日 岡山市 岡山全日空ホテル)

⑥ Kumiko Matsui, Masahiro Emoto, Sachiko Miyamoto, Yukio Tanizawa. SNARE-binding protein p34 is a regulatory factor of GLUT4 insulin-responsive compartment. 14th International Congress of Endocrinology (abs. *Endocrine Journal* 57:S36), Mar. 2010 国立京都国際会館, 京都

⑦ 江本政広、福田尚文、宮崎睦子、谷澤幸生 Regulation of glucose transport and insulin secretion by a SNARE regulator DOC2b. 第 4 回 Cardio-Diabetes 研究会 2010 年 3 月 20-21 日 大阪 帝国ホテル大阪

⑧ 江本政広、福田尚文、奥屋 茂、谷澤幸生 SNARE regulator と糖尿病 第 1 4 回中国分子病態研究会 広島 2009 年 11 月 14 日 三井ガーデンホテル広島

⑨ 奥屋 茂、田部勝也、江本政広、太田康晴、谷澤幸生 「脂肪細胞の Glut4 結合蛋白 p61 は、発現量変化によりインスリン依存性糖取り込みを調節する」第 47 回日本糖尿病学会中国四国地方会 岡山 2009 年 11 月 6 日-7 日 岡山コンベンションセンター

⑩ 松井久未子、江本政広、宮本幸子、奥屋茂、谷澤幸生 SNARE 結合蛋白 p34 は脂肪細胞における糖輸送を調節する 第 47 回日本糖尿病学会中国四国地方会 岡山 2009 年 11 月 6 日-7 日 岡山コンベンションセンター

⑪ Sachiko Miyamoto, Akihiko Taguchi, Masahiro Emoto, Shigeru Okuya, Naofumi Fukuda, Yoshitaka Nakamori, Mutsuko Miyazaki, Katsuya Tanabe, Hiroyuki Aburatani, Yoshitomo Oka, Yukio Tanizawa. Identification of Glypican3 as a novel GLUT4 binding protein. The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum (September 20, 2008) ホテル阪急インターナショナル 大阪

⑫ Kumiko Matsui, Naofumi Fukuda, Masahiro Emoto, Yoshitaka Nakamori,

Akihiko Taguchi、Sachiko Miyamoto、Shinnsuke Uraki、Yoshitomo Oka、Yukio Tanizawa. Doc2b:A Novel Syntaxin4 Binding Protein Mediating Insulin-Regulated Glut4-Vesicle Fusion in Adipocytes. The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum(September 20, 2008) ホテル阪急インターナショナル

(3)連携研究者  
なし

⑬ 田口昭彦、江本政広、福田尚文、中森芳宜、宮本幸子、田部勝也、岡 芳知、奥屋 茂、谷澤幸生 GPI アンカー蛋白 Glypican 3は Lipid Raftにおいて GLUT 4の糖輸送活性を促進する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(2008年5月22日、23日、24日 東京) 東京国際フォーラム

⑭ 宮崎睦子、江本政広、福田尚文、田口昭彦、宮本幸子、松原 淳、奥屋 茂、谷澤幸生 インスリン分泌機構における DOC 2b の役割 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(2008年5月22日、23日、24日 東京) 東京国際フォーラム

⑮ 奥屋 茂、田口昭彦、江本政広、岡 芳知、谷澤幸生 インスリン依存性糖取り込みを促進する ANK 構造蛋白 p61 は、インスリン抵抗性状態では発現が低下する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(2008年5月22日、23日、24日 東京) 東京国際フォーラム

[図書](計1件)

① 江本政広、谷澤幸生、岡 芳知 抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)抗体臨床検査ガイド 2009～2010(Medical Practice 編集委員会編) 文光堂 509-511 2009 (査読なし)

[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://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~bara-a/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江本 政広 (EMOTO MASAHIRO)

山口大学・医学部・准教授

研究者番号：50294640

### (2) 研究分担者

なし