

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591295

研究課題名(和文) インスリンによるレトロマー複合体の機能制御を介した GLUT4 分解促進機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of insulin-induced GLUT4 down-regulation through retromer inhibition

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) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究により、インスリンによって産生される過酸化水素がプロテインキナーゼCK2を介してレトロマー機能阻害とGLUT4ダウンレギュレーションを起こすことが明らかとなった。本研究の成果は、インスリンによる過酸化水素の産生亢進(酸化ストレス)によりGLUT4の細胞内ソーティング方向のスイッチングが起こり、GLUT4の分解系への輸送促進と、その結果としての蛋白量減少(ダウンレギュレーション)が生じるという、新たなインスリンシグナル機構を示した点で非常に興味深いものである。

研究成果の概要(英文)：Long term insulin stimulation causes GLUT4 depletion. This effect is caused mainly by accelerated lysosomal degradation of GLUT4. We show that insulin acutely dissociated retromer from the LDM membranes of 3T3-L1 adipocytes that was accompanied by disruption of the interaction of Vps35 with sortilin. This insulin effect was dependent on protein kinase CK2 but not PI3-kinase or Erk 1/2. Knockdown of Vps26 decreased GLUT4 to a level comparable with that with insulin stimulation for 4 h. Vps35 with a mutation in the CK2 phosphorylation motif was resistant to insulin-induced dissociation from the low density microsomal membrane, and its overexpression attenuated GLUT4 down-regulation with insulin. Insulin-generated hydrogen peroxide was an upstream mediator of the insulin action on retromer and GLUT4. These results suggested that insulin-generated oxidative stress switches the GLUT4 sorting direction to lysosomes through inhibition of the retromer function in a CK2-dependent manner.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン 活性酸素 レトロマー 脂肪細胞 NADPHオキシダーゼ GLUT4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 酵母が外界の栄養環境の変化に応じて、アミノ酸輸送体の細胞内における輸送方向を細胞膜あるいは液胞へと切り替え、栄養素の取り込みを調節していることはよく知られているが、哺乳類細胞においてもこれと類似した調節機構が見受けられる。インスリンは生体のエネルギー・ホメオスタシス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。しかし一方で、過剰な栄養摂取に起因する長期のインスリン刺激は、インスリン受容体およびシグナル分子の分解促進によりインスリン・シグナル機構を負に制御するとともに、インスリン作用の効果器である GLUT4 の分解促進と細胞内局在変化をもたらす、その結果、末梢組織における“インスリン抵抗性”をもたらす(Liu et al. Diabetes 2007)。これらは過剰なエネルギー流入に対する生体の適応機構とも考えられるが、インスリン作用の“負の側面”であり、2型糖尿病やメタボリックシンドロームの病態に大きく関与していることが想定される。

(2) インスリンが GLUT4 分解を促進するという現象は、以前より知られている(Sargeant et al. 1993)が、そのメカニズムは全く不明である。我々は、インスリンによる GLUT4 分解促進機構に関して、これまで小胞輸送およびインスリン・シグナル機構の両面から検討を行い、インスリン刺激時には GLUT4 のソーティングが、リサイクリング経路からリソソーム分解系方向へスイッチングされることによって、GLUT4 の分解が促進されることを報告した(Liu et al. 2007)。さらに興味深い点として、最近、我々は、この GLUT4 輸送方向のスイッチングは、インスリンによるレトロマー複合体の機能抑制を介すること、またこのインスリン作用には CK2 キナーゼが関与していることを見いだした(2009 年米国糖尿病学会にて発表)。レトロマー複合体は、SNX1+SNX2 と、Vps26+Vps29+Vps35 よりなる 5 量体で、マンノース 6 リン酸受容体(M6PR)やソーチリンのエンドソームからトランスゴルジネットワーク(TGN)への逆行性輸送による回収(retrieval)に関与している。これまでの検討により、レトロマー複合体コンポーネントの一つである Vps26 をノックダウンすると GLUT4 蛋白が著明に減少することから、GLUT4 も、常にレトロマー複合体を介してエンドソームから TGN へ回収されて細胞内をサイクリングしており、この機構が GLUT4 蛋白の分解抑制と発現量の維持に重要であると考えられた。さらに脂肪細胞におけるレトロマーの局在を検討した結果、脂肪細胞においては、レトロマー複合体は意外にもエンドソーム TGN 画分のみならず、インスリン感受性 GLUT4 特異的貯蔵コンパー

トメント(GSC)に大量に存在し、インスリン刺激によってレトロマー・コンポーネントの発現量は変わらないものの、Vps26、Vps29、Vps35 が GSC 膜画分から解離することを見出した。

(3) 興味深い点として、このインスリン作用(GLUT4 分解促進とレトロマーの膜からの解離)は PI3 キナーゼや Erk シグナルには依存せず、CK2 キナーゼ阻害剤により著明に抑制されたことから、通常の代謝調節シグナルや増殖シグナルとは別個の未知のインスリン・シグナル系を介していることが考えられる。我々は、この GLUT4 分解促進のシグナルを明らかにするための検討を行い、NADPH オキシダーゼ阻害剤でこの作用が抑制されること、過酸化水素の投与によりこの効果が再現されること、インスリンが実際に過酸化水素の産生を亢進することから、このインスリン作用に活性酸素の産生が関与していることを明らかにした(2010 年日本糖尿病学会にて発表)。さらに最近我々は、同インスリン作用にはホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C の活性化が関与していることを見いだした(未発表データ)。一方、レトロマーの GSC 膜画分との結合・解離の制御機構に関して検討を進め、Vps35 の CK2 キナーゼ依存的なリン酸化が Vps35 の膜からの解離に必要であることを見いだした(2010 年日本糖尿病学会にて発表)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が得た上記の成績に基づき、インスリン受容体から、活性酸素の産生亢進を介して CK2 キナーゼの活性化が起こり、それがレトロマー複合体のリン酸化による膜からの解離を促進することにより GLUT4 ソーティングのスイッチングが生じ、GLUT4 のリソソームへの輸送と分解が促進されるという作業モデルをさらに詳細に検証し、この GLUT4 蛋白の細胞内における運命決定機構をあきらかにすることにある。

本研究の特色は、第 1 に、インスリン抵抗性をもたらす一因である GLUT4 蛋白分解のメカニズムを、レトロマー複合体の機能制御という、細胞内小胞輸送の観点から明らかにしようとする点にある。このような観点に立ったアプローチはかつて試みられたことはなく申請者ら独自のものである。第 2 点として、レトロマー複合体の制御機構に関してはこれまでに報告がないことから、本研究によりインスリンを始めとした細胞外シグナルによるレトロマー複合体の制御機構の一端が明らかになる可能性がある。第 3 点として、本研究はインスリンによる活性酸素産生亢進が小胞輸送の調節を介してインスリン感受性を調節するというモデルを提起するものであり、末梢標的臓器のインスリン感受性という高次機能の発現・維持・破綻機序の解明につながる事が期待され、新たな糖尿病

やメタボリックシンドロームの治療薬の開発につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究では、上記の作業仮説の検証を生化学的および形態学的方法を含めた様々な手法を用いて行う。特に、現時点でブラックボックスである2つの点に焦点を絞る予定である。すなわち、第1点は、インスリンがいかにして NADPH オキシダーゼを活性化するのか、第2点は、産生された活性酸素(過酸化水素)がいかにして Vps35 のリン酸化を促進するのか、の2点を明らかにすることに主眼をおいて研究を行う予定である。

具体的には、以下の項目について検討を行った。

1. レトロマー複合体の機能制御における CK2 キナーゼの役割の検討:インスリンによるレトロマーの LDM 膜からの解離に關与する CK2 キナーゼの基質を同定し、そのリン酸化の生理的意義を検討する。

2. インスリンによる CK2 キナーゼ活性化機構の検討:CK2 キナーゼは構成的活性化酵素なので、インスリンのホスファターゼに対する抑制効果を検討する。

3. インスリンによる過酸化水素産生促進機構の検討:インスリンによるレトロマー機能制御におけるセカンドメッセンジャーとしての過酸化水素の産生亢進メカニズムを PC-PLC の活性調節の観点から検討する。

4. 過酸化水素の標的分子を明らかにする:レトロマー機能の制御に關与する過酸化水素の標的分子を同定する。

### 4. 研究成果

分化した 3T3-L1 脂肪細胞において、レトロマーは主として LDM 膜の存在していた。脂肪細胞をインスリン刺激することにより、レトロマー複合体が LDM 膜より解離し、このレトロマーの LDM 膜からの解離はレトロマーコンポーネントのひとつである Vps35 とその標的蛋白ソーチリンとの結合の阻害を伴っていた。

このインスリン作用はホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) や MAP キナーゼの活性には依存せず、プロテインキナーゼ CK2 活性に依存していることが、CK2 特異的阻害剤および siRNA によるノックダウンにより示された。

一方、レトロマーコンポーネントのひとつである Vps26 の siRNA を用いたノックダウンにより GLUT4 蛋白量は、長時間インスリン刺激時と同等のレベルまで低下した(約 50%の減少)ことから、レトロマー機能が GLUT4 蛋白量の維持に重要な役割を演じていることが明らかとなった。また同時に、インスリンはレトロマー機能を阻害することにより GLUT4 をダウンレギュレーションする可能性が示唆された。

Vps35 分子内の CK2 リン酸化部位に変異を

導入することにより、インスリン刺激による Vps35 の LDM 膜からの解離が抑制され、GLUT4 のダウンレギュレーションも抑制された。このことから、インスリン刺激は CK2 による Vps35 のリン酸化を促進することにより LDM 膜からの解離を促進し、レトロマー機能を阻害するというモデルが示された。

これらのインスリン作用は過酸化水素の点かで再現されること、過酸化水素産生を阻害した条件下ではこれらのインスリン作用が見られなくなることから、インスリンによって産生される過酸化水素がレトロマー機能阻害と GLUT4 ダウンレギュレーションのシグナル分子(メディエーター)として機能していることが明らかとなった。本研究の成果は、インスリンによる過酸化水素の産生亢進(酸化ストレス)により GLUT4 の細胞内ソーティング方向のスイッチングが起こり、GLUT4 の分解系への輸送促進と、その結果としての蛋白量減少(ダウンレギュレーション)が生じるという、新たなインスリンシグナル機構を示した点で非常に興味深いものである。

### 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4件)

Ma J, Nakagawa Y, Kojima I, Shibata H, Prolonged insulin stimulation down-regulates GLUT4 through oxidative stress-mediated retromer inhibition by a protein kinase CK2-dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem, 査読有, Vol. 289, 2014, 133-142

DOI: 10.1074/jbc.M113.533240

Masubuchi Y, Nakagawa Y, Ma J, Sasaki T, Kitamura T, Yamamoto Y, Kurose H, Kojima I, Shibata H, A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. PLoS ONE, 査読有, Vol. 8, 2013, e54500

DOI: 10.1371/journal.pone.0054500

Sasaki T, Shimpuku M, Kitazumi T, Hiraga H, Nakagawa Y, Shibata H, Okamatsu-Ogura Y, Kikuchi O, Kim HJ, Fujita Y, Maruyama J, Susanti VY, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Saito M, Kitamura T, Miglitol prevents diet-induced obesity by stimulating brown adipose tissue and energy expenditure independent of preventing the digestion of carbohydrates. Endocr J, 査読有, Vol. 60, 2013, 1117-1129

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/endorj/60/10/60\\_EJ13-0333/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endorj/60/10/60_EJ13-0333/article)

Nakagawa Y, Ohtsu Y, Nagasawa M, Shibata H, Kojima I, Glucose promotes its

own metabolism by acting on the cell-surface glucose-sensing receptor T1R3. *Endocr J*, 査読有, Vol. 61, 2014, 119-131  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/61/2/61\\_EJ13-0431/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/61/2/61_EJ13-0431/_article)

〔学会発表〕(計 7 件)

馬 金輝, 小島 至, 柴田 宏, ホスファチジルコリン特異的 PLC は脂肪細胞における活性酸素産生と GLUT4 分解のインスリン・シグナルとして機能する. 2011 年 5 月 19~21 日, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 札幌市

増淵 洋祐, 中川 祐子, 馬 金輝, 小島 至, 柴田 宏, 脂肪細胞における甘味受容体の発現と機能. 2011 年 5 月 19~21 日, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 札幌市

馬 金輝, 小島 至, 柴田 宏, 新規インスリン・シグナル分子 PC-PLC による Nox4 活性化機構. 2012 年 5 月 17~19 日, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 (横浜市)

増淵 洋祐, 中川 祐子, 馬 金輝, 小島 至, 柴田 宏, 甘味受容体による脂肪細胞分化抑制のシグナル機構. 2012 年 5 月 17~19 日, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 (横浜市)

Masubuchi Y, Nakagawa Y, Ma J, Kojima I, Shibata H, A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. 72nd Scientific Session of American Diabetes Association, 2012 年 6 月 8~12 日, ペンシルベニア・コンベンションセンター (米国フィラデルフィア市)

増淵 洋祐, 中川 祐子, 馬 金輝, 長澤 雅裕, 小島 至, 柴田 宏, 甘味刺激による Gs 活性化は微小管脱重合と Rho 活性化を介して脂肪分化を抑制する. 2013 年 5 月 16~18 日, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本市

Masubuchi Y, Nakagawa Y, Ma J, Nagasawa M, Kojima I, Shibata H, Sweet taste receptor regulates adipogenesis through Gs-mediated microtubule disassembly and Rho activation in 3T3-L1 cells. 73rd Scientific Session of American Diabetes Association, 2013 年 6 月 21~25 日, マコーミックプレイス・コンベンションセンター (米国シカゴ市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :

権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/celph/y/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :