

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500994

研究課題名(和文) インスリン感受性機構と脂肪酸の質との関係の解明

研究課題名(英文) The investigation of the interaction between insulin sensitivity and fatty acids

研究代表者

保坂 利男 (Toshio, Hosaka)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60403698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪培養細胞を使った実験から、インスリン感受性糖取り込みに必須であるインスリン依存性GLUT4の細胞膜移行に小胞結合蛋白であるCSP1がネガティブに作用しており、その発現がインスリン抵抗性関与していることを見出した。また、脂肪酸結合蛋白Xは、CSP1と結合して、CSP1とは逆の効果を認め、インスリン感受性に関与していることを見出した。さらなる脂肪酸との関係、細胞骨格の関与、ノックアウトマウスの解析の確実化による新規糖尿病治療薬開発の足掛かりとなった。

研究成果の概要(英文)：Insulin stimulates GLUT4 vesicle recruitment from its intracellular storage site to the PM. Cysteine string protein 1 (CSP1) is a SNARE-binding protein involved in the vesicular trafficking of neurotransmitters and other exocytic processes. In this study, we found that CSP1 is involved in insulin resistance by interrupting GLUT4 vesicle docking with the PM. The fatty acid binding protein X has reported to bind CSP1. The down-regulation of fatty acid binding protein X increases the CSP1 expression and decrease the insulin stimulated GLUT4 translocation. We are now investigating and confirming the preliminary result about the role of the fatty acid binding protein X in GLUT4 translocation and diabetes to exam the interaction with specific fatty acid and cytoskeleton and analyze the knockout mice, belonging to find the new targets of diabetes treatment.

研究分野：インスリン感受性

キーワード：glut4 トランスロケーション 細胞骨格 脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病では、インスリン分泌障害と同時にインスリン抵抗性が認められる。インスリン抵抗性とは、インスリンがインスリン感受性臓器である筋肉、脂肪組織において、糖をうまく取り込めない状態であり、その病態の解明には、それらの組織において、インスリン作用(インスリンのインスリンレセプター結合)後の糖取り込みのメカニズムを明らかにする必要がある。その中でも必須な機構は、インスリンによる GLUT4 のトランスロケーションである。今日までこの分野において、世界中で数々の研究がなされてきたにもかかわらず、いまだに解明されていない。一方、必須脂肪酸の1つである 3系不飽和脂肪酸は、最近になって G タンパク共役型受容体に結合してインスリン依存性糖取り込みを増強すると推測されている。現在まで脂肪酸と GLUT4 小胞トランスロケーションとの関与の報告はなく、全くのブラックボックスであり、この関係の分子レベルの解明は新規糖尿病治療薬の候補となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ラットの脂肪細胞、培養脂肪細胞から GLUT4 小胞構成の解析から SNARE complex に関与している CSP1(Cysteine string protein 1)を同定、また、CSP1 の初期解析過程で CSP1 に結合を認め脂肪酸とも結合すると推測される新規脂肪酸結合蛋白 X を同定した。本研究では、CSP1 の解析と同時に、脂肪酸結合蛋白 X の GLUT4 小胞結合の意義の解析を足掛かりに脂肪酸とインスリン感受性との関係を明らかにする目的で主に以下のアプローチで解析をおこない、脂肪酸とインスリン感受性/抵抗性のメカニズムを解明することで将来的な新規の糖尿病治療、メタボリック症候群治療薬および機能性食品開発などの布石とする。

(1) 脂肪酸結合蛋白 X の糖脂質代謝への関与を明らかにする。

(2) CSP1 と脂肪酸結合蛋白 X の GLUT4 細胞膜輸送への関与の検討

(3) CSP1 と脂肪酸結合蛋白 X の結合部位、様式と脂肪酸結合蛋白 X に結合する新たなタンパクの解析

(4) 種々の遊離脂肪酸(多価不飽和脂肪酸、単価飽和脂肪酸、多価飽和脂肪酸、および 3系多価不飽和脂肪酸)と脂肪酸結合蛋白 X の結合の解析。

(5) 脂肪酸結合蛋白 X ノックアウトマウス解析によるインスリン抵抗性、脂肪酸代謝などへの脂肪酸結合蛋白 X の役割を明らかとする。

(6) ヒトでの脂肪酸結合蛋白 X 遺伝子変異と

肥満、インスリン抵抗性の関係を明らかにする。

(7) 脂肪酸結合蛋白 X と結合する脂肪酸の生理的、病態的な糖代謝への関与を明らかにして脂肪の質と生活習慣病との関係を明らかとする。

## 3. 研究の方法

(1) 脂肪酸結合蛋白 X 及び CSP1 の糖脂質代謝への関与の検討

インスリン感受性 3T3-L1 培養脂肪細胞株を用いて、脂肪酸結合蛋白 X と CSP1 の shRNA またはプラスミドをアデノウイルスに組み込んで発現をノックダウン、過剰発現後にインスリン刺激後の糖取り込み、脂肪合成・分解などのアッセイやウエスタンブロット法などを行い GLUT4 トランスロケーションおよび糖脂質代謝への関与の解析を行う。

(2) 脂肪酸結合蛋白 X と GLUT4 小胞との結合に関する分子生物学的解析

CSP1 と結合することの意義を CSP1 と脂肪酸結合蛋白 X 両方の種々の Tag 付き欠失蛋白を遺伝子改変法を使い作製して、Cos7 細胞株などに共発現をおこなって免疫沈降法などで解析をおこなう。同様な方法で脂肪酸結合蛋白 X に結合するタンパクの同定をおこなう。

(3) 脂肪酸結合蛋白 X と特異的結合脂肪酸の検討

種々の遊離脂肪酸(多価不飽和脂肪酸、単価飽和脂肪酸、多価飽和脂肪酸、および 3系多価不飽和脂肪酸)との結合をバキュロウイルスを用いて精製した脂肪酸結合蛋白 X と *in vitro* で結合させた後、低相液体クロマトグラフィーを用いて解析を行い特異的な結合脂肪酸の同定をおこなう。

(4) 脂肪酸結合蛋白 X ノックアウトマウスの解析

別の臓器に脂肪酸結合蛋白以外の働きを持った類似タンパクのアイソフォーム解析から脂肪酸結合蛋白 X をクローニング後海外で作製済である脂肪酸結合蛋白 X のノックアウトマウスに高脂肪(60%脂肪)食を与えて週齢後の体重、血糖、血清脂質(中性脂肪、コレステロール、遊離脂肪酸)、アディポサイトカインなどのパラメータの解析を行うと同時に、糖、インスリン負荷試験、グルコースクランプ法、さらに骨格筋、精巣上体脂肪、肝臓の臓器の組織学的解析、糖脂質代謝関連タンパクの遺伝子解析をおこなう。

(5) 特異的脂肪酸の糖脂質代謝に対する効果の検討

(3) で同定した脂肪酸結合蛋白 X に結合する脂肪酸を餌に混ぜて肥満モデルマウスに与えることで肥満モデルマウスの体重や血清糖脂質解析などの解析および上記ノック

アウトマウスと同様な解析をおこなう。また、やせ型マウスに高脂肪餌に上記脂肪酸を混ぜて与えることでの糖脂質代謝関連の生理学的、遺伝子学的解析もおこなう。

#### (6)脂肪酸結合蛋白 X と糖尿病、肥満、インスリン抵抗性に対するヒトでの検討

臨床倫理委員会 / Institutional Review Board (IRB) の承認のもと 2 型糖尿病、肥満、メタボリック症候群と脂肪酸結合蛋白遺伝子の SNIP の解析をおこなう。

#### 4. 研究成果

(1) CSP1 は、GLUT4 の細胞膜融合を低下させてインスリン依存性糖取り込みを低下させる。

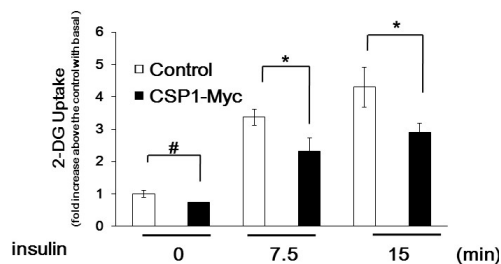


図1 CSP1を過剰発現するとインスリン依存性の糖取り込みが低下する

Control: コントロール、CSP1-Myc: Mycタグ付きCSP1過剰発現  
# p<0.05, \* p<0.01

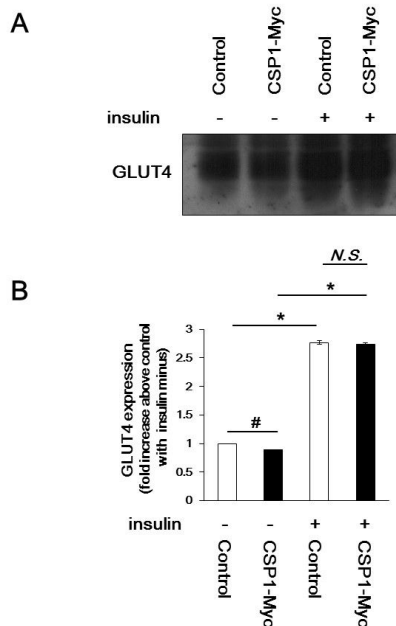


図2 CSP1の過剰発現は、GLUT4の細胞膜動員に影響は与えず細胞膜融合に関与する。

# p<0.05, \* p<0.01 N.S. not significant

GLUT4と結合するCSP1を過剰発現するとインスリン依存性糖取り込みが有意に低下する(図1)。さらに、細胞膜へのGLUT4の動員は、変わらなかった(図2A,B)。この機構は、SNARE

タンパクである syntaxin4 と VAMP2 の結合を抑制する所で GLUT4 の細胞膜融合を抑制していることを見出して論文として報告した。

(2)CSP1 はインスリン抵抗性状態で発現が増加する。

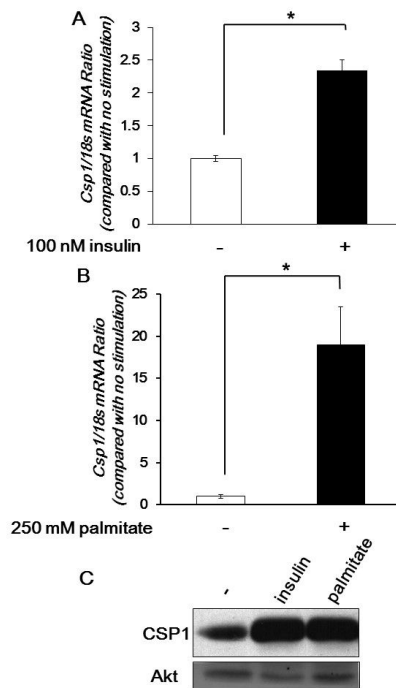


図3 CSP1はインスリン抵抗性状態では発現が増加する。  
Palmitate: パルミチン酸 \* p<0.01

CSP1 の糖尿病への関与を調べるために、高インスリンと悪玉脂肪酸であるパルミチン酸で脂肪細胞を刺激すると CSP1 の mRNA レベル(図 3A,B)、タンパクレベル(図 3C)で発現量が増加した。また、肥満糖尿病マウスの脂肪細胞においてもコントロール非肥満マウスと比べて CSP1 の発現量は増加していた。それらから、CSP1 の増加はインスリン抵抗性増加、血糖悪化時にさらに増加して増悪させることが考えられた。

(3) 脂肪酸結合蛋白 X は、CSP1 と相反する作用をする。

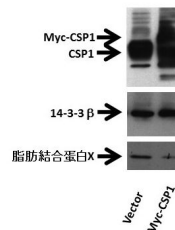


図4 CSP1を過剰発現すると脂肪酸結合蛋白の発現量は減少する。

既報から、CSP1 と脂肪酸結合蛋白 X は、結合することがわかっており、その関係について精査をおこなった。図 4 に示すように CSP1 を過剰発現すると脂肪酸結合蛋白 X は、発現

量が低下した。結合部位などは現在も探索中である。

(4) 脂肪酸結合蛋白 X は GLUT4 の細胞膜動員を低下させる。

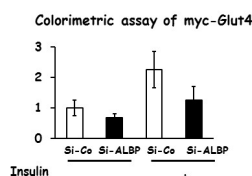


図5 脂肪酸結合蛋白Xをノックダウンするとインスリン依存性 GLUT4細胞膜動員を低下させる。

Colorimetric assay:細胞膜に動員されたGLUT4を発行色で定量的測定  
Si-Co:コントロールSiRNA, Si-ALBP:脂肪酸結合蛋白XのSiRNA

脂肪酸結合蛋白を SiRNA でノックダウンすることでインスリン依存性 GLUT4 の細胞膜動員は低下した。また、その機序には細胞骨格タンパクが関与しており現在確実化の研究を行っている。また、ノックアウトマウスに関しては、研究協力者として、徳島大学代謝栄養学教室で解析をおこなっており、ノックアウトマウスは高脂肪食で体重増加が抑制されて、血糖値は個体レベルでは改善するがこれに関しては、中性脂肪の蓄積に脂肪酸結合蛋白 X が関与して、それが阻害されるために脂肪量が減るためと推測された。

今回の CSP1、脂肪酸結合蛋白 X の研究で未だブラックボックスであった GLUT4 小胞との関与による細胞膜動員のメカニズムの一部が明らかとなった。特に、CSP1 は、インスリン抵抗性増加や血糖悪化に作用していることが推測され、糖尿病の新規治療ターゲットとなる可能性を見出した。

脂肪酸結合蛋白 X は、脂肪酸と GLUT4 細胞膜動員の関連を示唆させる結果であり、目的、方法にある検討は現在進行中である。近日中に論文をおこない、脂肪酸との関係詳細が判明すれば、インスリン抵抗性の新しいアプローチとして、食事のバランス、質などの糖尿病予防食育などにも貢献でき、CSP1 同様に新規糖尿病治療薬の開発につながるものと思われる。

#### 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 1 件)

CSP1 modulates insulin sensitivity by attenuating GLUT4 vesicle docking with the plasma membrane. Bayasgalan Jambaldorj, Eri Terada, Toshio Hosaka, Yuka Kishuku, Yukiko Tomioka, Kaori Iwashima, Yohko Hirata, Kiyoshi Teshigawara, Chung Thi Kim Le, Tadahiko Nakagawa, Nagakatsu Harada, Tohru Sakai, Hiroshi Sakaue, Toshio Matsumoto, Makoto Funaki, Akira Takahashi and Yutaka Nakaya. The Journal of medical

investigation 2013 Aug; 60(3,4) 197-204 査読あり。

〔学会発表〕(計 4 件)

ATBP, Adipocyte-specific Tubulin-Binding Protein, Can Control Cytoskeletal Structure, and Insulin Stimulated Glucose Uptake. Masashi Kuroda, Rie Okitsu, Mari Kondo, Kasumi Nakagawa, Toshio Hosaka, Nagakatsu Harada, Hiroshi Skaue 75<sup>th</sup> Scientific Session of American diabetes association. 2015 年、6 月 14 日

興津理絵、黒田雅士、保坂利男、坂東正浩、原田永勝、中屋豊、阪上浩 細胞骨格制御分子による糖取り込み機構の解析 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年、5 月 23 日

細胞骨格制御分子による糖取り込み機構の解析 興津理絵、阪上浩、保坂利男、高橋友奈、黒田雅士、Bayasgalan Jambaldorj、原田永勝、中屋豊 第 87 回日本内分泌学会総会 2014 年、4 月 24 日

細胞骨格制御分子による糖取り込み機構の解析 興津理絵、阪上浩、保坂利男、高橋友奈、黒田雅士、Bayasgalan Jambaldorj、原田永勝、中屋豊 第 34 回日本肥満学会 2013 年、10 月 11 日

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

保坂利男(HOSAKA TOSHIO)

杏林大学大学院・医学研究科・講師

研究者番号: 60403698

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

阪上浩(SAKAUE HIROSHI)

徳島大学大学院・栄養生命学教育部・教授

研究者番号: 60372645