

## 学内グラント 報告書

## 平成24年度 学内グラント終了後報告書

## GLUT4 小胞輸送に必須な蛋白同定による糖尿病治療薬の開発

研究代表者 保坂 利男 (大学病院 内分泌内科・糖尿病内科)

## 緒言

我が国には現在約740万人以上が糖尿に罹患していると推測されており、その中の90%以上を2型糖尿病が占めている。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、インスリンによる糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜への動員である。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、いまだに解明はされていない。特にインスリン受容体、phosphatidylinositol(PD)3キナーゼ、Akt2と続く細胞内情報伝達の次のステップから最終段階の GLUT4 の細胞膜動員のステップの間については全くのブラックボックスの状況である。

研究代表者らは、インスリンによる糖輸送機構のインスリンレセプター基質及び下流のPI3-キナーゼアイソフォームを同定して(J Biol Chem 1996;271(10):5317-20, 1997;272(12):7873-82),それぞれの役割を明らかにした。現在インスリンによる糖輸送機構にPI3-キナーゼとAkt2が必須であると考えられている。いくつかの候補分子もあり、研究代表者らも含めて、国内外でAkt2の下流タンパクの同定が長年行われてきたが未解決の状態のままである。同様に一般的な小胞輸送関連タンパクを候補に GLUT4 小胞に関与しているかの研究も精力的に行われてきたが、未だに GLUT4 小胞移動とインスリンシグナルを結びつける必須のタンパクは見つからない。以前より、インスリン存在、非存在下において、ラットの脂肪細胞、培養脂肪細胞から GLUT4 小胞構成タンパクは遊離され解析はされてはきたが、未だにインスリンシグナルに必須のタンパクは見つ

かっていない。研究者代表者も GLUT4 小胞に存在し、インスリンにより細胞膜に移動するほぼ100% GLUT4 と同様な動態を示す膜タンパク IRAP をえさに結合タンパク p115 の同定、解析を行った(Mol Biol Cell 2005;16(6):2882-90)。p115は、インスリン依存性の GLUT4 小胞の細胞内貯蔵部位につなぎ止めておくために必須なタンパクであることがわかった。しかしながらインスリン依存性膜動員関連した蛋白ではなかった。インスリン刺激後に細胞内 GLUT4 小胞は、細胞内貯蔵部位から細胞膜に移動する。現在まで一部明らかとなった小胞関連蛋白だけでは、インスリンの特異性を完全に説明することはできず、新たな細胞内局在関連蛋白(つなぎ止め蛋白など)、細胞膜結合、融合に関連した蛋白の存在が示唆される。小胞のリサイクリングなどで GLUT4 小胞すべてが単離されても、バックグラウンドが影響して、インスリン感受性 GLUT4 小胞における必須タンパクの同定には限界があるものと思われた。そこで本研究では、遺伝子改変培養脂肪細胞(アデノウイルスを使った dominant negative Akt or constitutive Akt 過剰発現細胞株)で GLUT4, IRAP (GLUT4 の小胞に存在し同様の動態を示すタンパク)の細胞内ドメインとの結合する新規タンパク質の同定、解析を行うことで、GLUT4 膜動員に必須のタンパクが同定され、そのタンパクをターゲットとした糖尿病治療薬の開発につながると推測される。

## 結果

## IRAP(1-109)に結合したタンパクのMS解析

サイトゾル、LDMのSDS-PAGEのバンドを切り出して解析することでタンパクを同定した。今回の数回の実験ではインスリン刺激によって明らかに変化を認める IRAP 結合タンパクは SDS-PAGE では見つけることはできなかった。同定したタンパクの中には、GLUT4 のトランスロケーションへの関与が報告されているタンパクも含まれていた。cytosol 及び LDM のどちらにおいても細胞骨格関連タンパクは認められたが、LDM では、G 蛋白やモーター蛋白等も

同定された。

### GLUT 4小胞関連蛋白の解析

GLUT4小胞に直接結合するとの報告はされていない蛋白も数種類見つかっており、その中の1つとして、CSP1 (cysteine string protein 1) について解析した。CSP1はVAMP2とSyn4が発現する膵臓や脂肪細胞などにも発現している事実から、CSP1がGLUT4

小胞の膜結合に関与している可能性を考えた。培養脂肪細胞株 (3T3-L1 細胞) を用いてインスリン依存性 GLUT4 小胞膜輸送におけるCSP1の役割を検討した。その結果、CSP1の過剰発現下で、細胞膜へのGLUT4小胞の発現は低下しなかったが、細胞膜に移動したGLUT4小胞のVAMP2とsyntaxin4の結合低下によりインスリン依存性の糖取り込みが低下した (図1-3)。

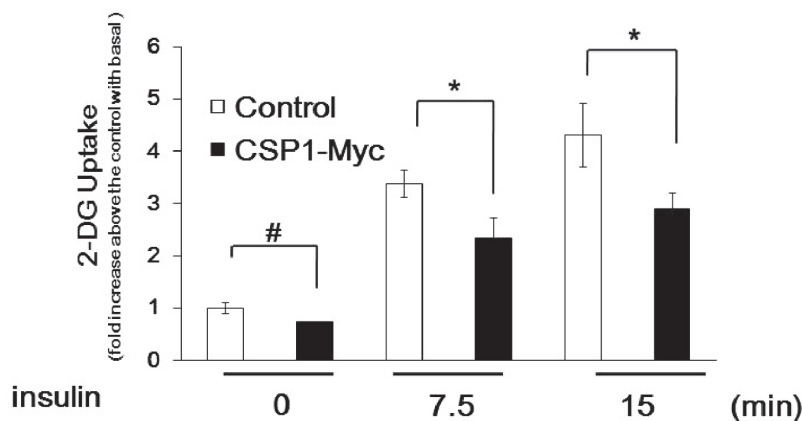


図1. CSP1を過剰発現するとインスリン依存性の糖取り込みが低下する。

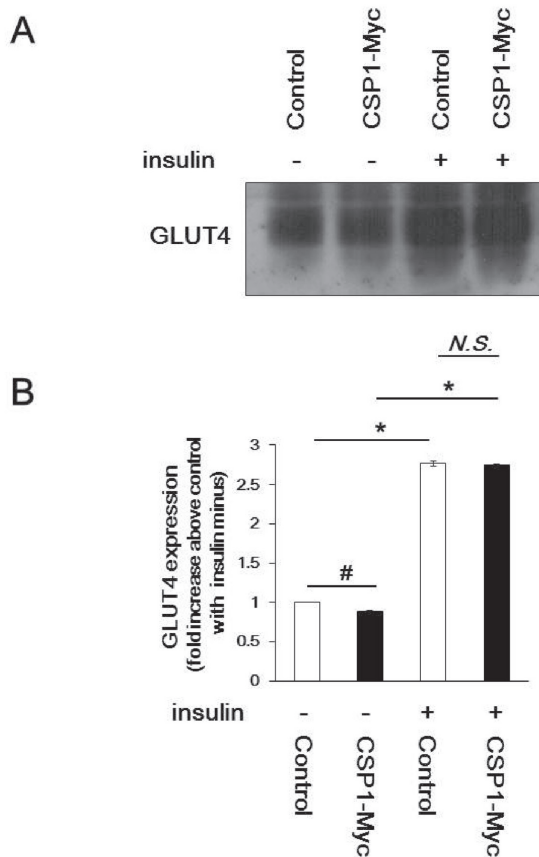


図2. CSP1を過剰発現してもインスリン依存性の細胞膜へのGLUT4のトランスロケーションは低下しない。

対照的に、CSP1のノックダウンはインスリン依存性の糖取り込みを上昇させた(図4)。また、3T3-L1細胞でのCSP1のmRNAおよび蛋白質発現は、高濃度のパルミチン酸と慢性的インスリン暴露により引き起こされた

インスリン抵抗性状態において上昇した(図5)。以上から脂肪細胞においてCSP1は、細胞膜でGLUT4小胞の結合阻害によりインスリン抵抗性に関与していることが示唆された。

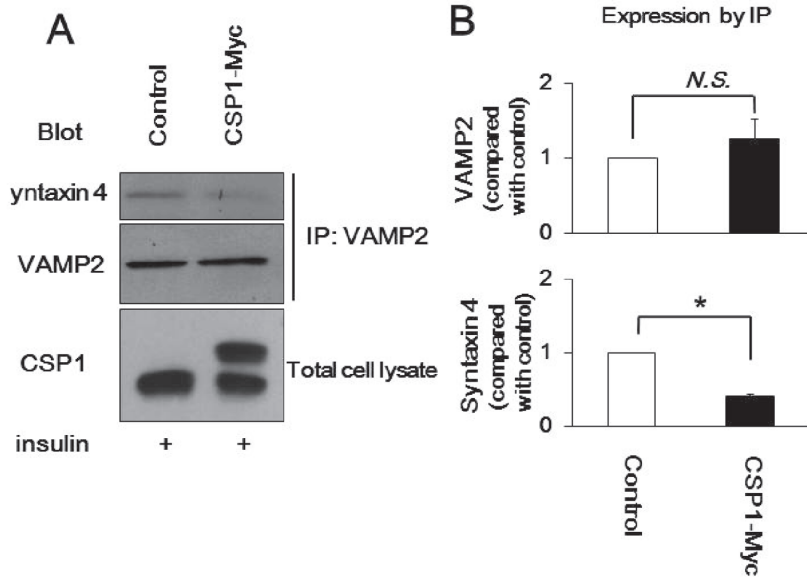


図3. CSP1を過剰発現するとVAMP2とSyntaxin4の結合が低下する (GLTU4の膜融合が低下する)。

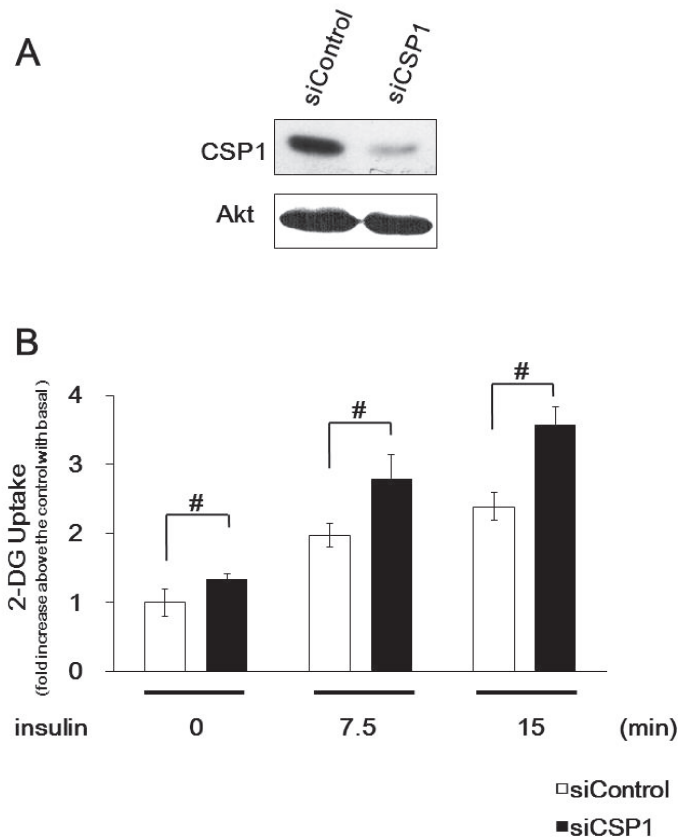


図4. CSP1をノックダウンするとインスリン依存性の糖取り込みが増加する。

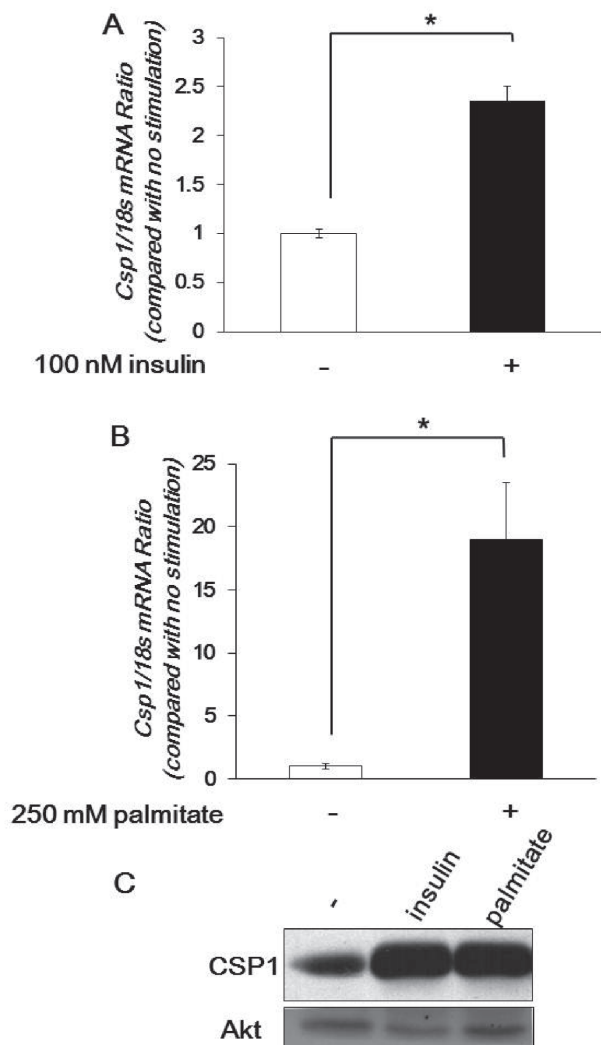


図 5. インスリン抵抗状態（高インスリン血症，高 FFA）で CSP1 の mRNA，タンパク発現量が増加する。

## 考 察

今回のアプローチからさらに CSP1 に結合する新規の GLUT4 小胞に結合する脂肪酸結合蛋白も同定しており，現在機能解析およびノックアウトマウスの解析を共同研究で開始している（詳細非表示）。また，現在同定した機能不明のタンパクや今後見つかるであろう IRAP，GLUT4 小胞結合タンパクの中には，今後の糖尿病治療薬開発につながる可能性を秘めているものもあると考えられ更なる解析は継続している。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Li Q, Hosaka T, Harada N, Nakaya Y, Funaki M. Activation of Akt through 5-HT<sub>2A</sub> receptor ameliorates serotonin-induced degradation of insulin receptor substrate-1 in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2013 Jan 5;365(1):25-35.
- 2) Jambaldorj B, Terada E, Hosaka T, Kishuku Y, Tomioka Y, Iwashima K, Hirata Y, Teshigawara K, Le CT, Nakagawa T, Harada N, Sakai T, Sakaue H, Matsumoto T, Funaki M, Takahashi A and Nakaya Y. CSP1 modulates insulin sensitivity by attenuating GLUT4 vesicle docking with the plasma membrane. *J Med Invest* 2013 (in press).

### 学会発表

- 1) Iuchi T, Hosaka T, Inukai K, Sumita T, Imai K, Ono H, Ishida H, Awata T. Hypothalamic liver kinase B1(LKB1) regulates energy homeostasis via AMPK modification, 5<sup>th</sup> international congress on prediabetes and the metabolic syndrome, April 2013, Vienna, Austria

### 特許出願

該当なし