

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## GLUT4小胞輸送に必要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 (PI) 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っていない。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。

## 材料と方法

## 材料

プラスミド

IRAP(1-109)- His8- CBD: pTYB4 IRAP(1-109)- His8- CBD

pTYB4 vector の Chitin binding domain (Intein) の外側に His 配列を8回繰り返した tag を付けて、IRAP(1-109) を ligation させた Vector を作製

pTYB4 vector (New England Biolab)

細胞：3T3-L1 脂肪細胞

## 方法 培養, 継代

培養前駆脂肪線維芽細胞 3T3-L1 fibroblast を 15 cm dish で Medium (DMEM 25 mM Glucose + 10 % CS, 500 units Penicillin/Streptomycin) を使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した. Fibroblast の状態で 100% Confluent から 2 日後に分化導入 Medium (DMEM 25 mM Glucose + 10% FBS with 10 µg/ml Insulin, 0.5 mM IBMX, 100 µM Dexamethazone, 0.1% Troglitazone) に交換する事で, 分化導入を行った (Day0). 分化導入 Medium を 48 ~ 72 時間作用させた. その後は, 2 日おきに Medium 交換 (Medium: DMEM 25 mM Glucose + 10% FBS) を行った. 実験に用いる際は, Day8 ~ Day10 の脂肪細胞を用いた.

## IRAP (1 - 109) -His 8 -Ni Column を用いての L1 細胞株からの結合蛋白の同定

IRAP(1-109)-His8-intein-ベクターが導入された BL21(DE3) から, IPTG を使い融合蛋白を発現, 抽出, その後 2 回にわたるビーズの精製法を用いて, IRAP(1-109)-His8-Ni Column を作製した. このカラムを用いて, まずは, 正常 3T3-L1 脂肪細胞株の細胞分画 [cytosol, LDM (low density microsome)] とのアフィニティークロマトグラフィを行った. その後結合したタンパクを抽出, 濃縮し, SDS-PAGE で分離, CBB 染色で検出されたバンドを切り出し MS 解析 (MALDI-TOF) で結合蛋白の同定をおこなった.

## 結果

### IRAP (1 - 109) に結合したタンパクの MS 解析の結果

図 1 に示したようなサイトゾル, 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 (代表的な蛋白を表 1, 2 に示す). 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. 表 1, 2 で示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同定されている. 一方で GLUT4 小胞に直接結合するとの報告はされていない蛋白も見つかり現在特異的な結合に関して免疫沈降法などを使って確認中である. さらに 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 (表 2).

## 考察

今回のアプローチで GLUT4 小胞の細胞内輸送に関与している細胞骨格蛋白 (gelsolin, vimentin, vinculin) やインスリン応答性 GLUT4 トランスロケーションに関与している微小管のモーター蛋白に関連した KIF5B なども同定されている. さらに GLUT4 を豊富に含む

エンドソーム分画でアクチンと結合し存在することで IRS-PI3K シグナル伝達を保つ機能を果たしていると考えられている膜結合蛋白の spectrin も見つかりしている.

今回の研究代表者らのアプローチでは, 非特異的な結合を最小限に減らした IRAP-N 末端のアフィニティークラムを作製し, これを用いる事で結合候補タンパ

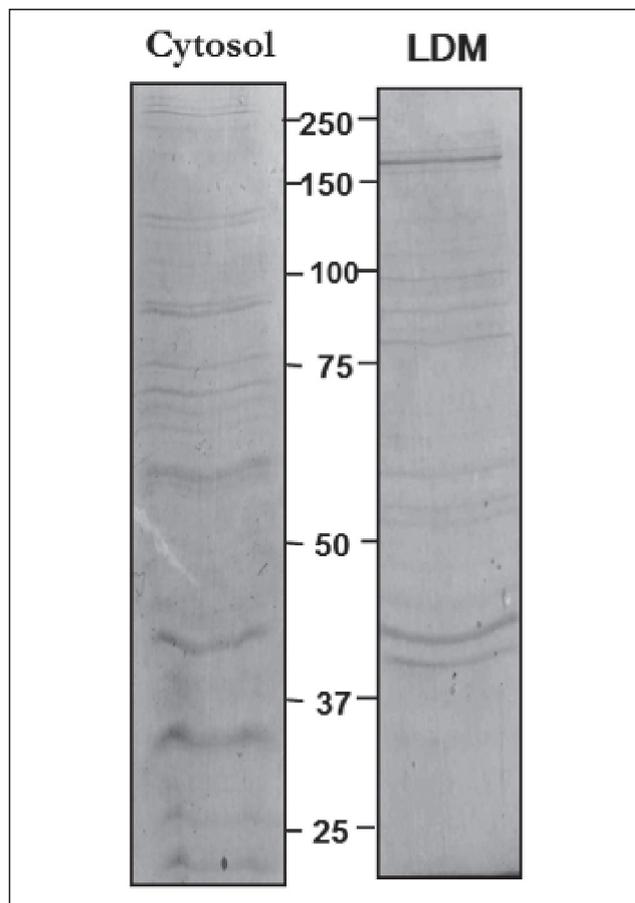


図 1. インスリン刺激後 IRAP1-109 に結合した蛋白. インスリン刺激後 3T3-L1 脂肪細胞から抽出した cytosol, LDM を IRAP1-109 ビーズに結合させ, SDS-PAGE で分離後クマジーブルー染色を行った.

表 1. サイトゾルで同定した代表的な IRAP(1-109) 結合蛋白

Protein	Function
Triosephosphate isomerase 1	Enzyme
Aldolase A	Enzyme
Glutamine synthetase	Enzyme
Pyruvate carboxylase	Enzyme
Annexin A5	膜結合蛋白質
Vimentin	filament protein
Gelsolin	アクチンフィラメントの結合・切断
Vinculin	アクチン結合蛋白

クの同定に成功した。今後、この方法を発展させて、緒言にも述べた遺伝子組み換え法によりインスリンシグナルを改変させたインスリン感受性細胞から効率よくIRAP, GLUT4小胞に結合するインスリン関連タン

表 2. LDMで同定した代表的なIRP(1-109) 結合蛋白

Protein name	Function
MACF1 (microtubule actin crosslinking factor)	cytoskelton associated protein
ACF7 (actin crosslinking family 7)	cytoskelrtal linker protein
KIF3B	motor protein kinesin superfamily protein
Ras	G protein
twinfilin	cytoskelton associated protein
PDZK1	scaffolding protein
pancreastain (chromogranin A)	secreted proten
spectrin	membrane associated protein
Golgin	Golgi associated protien
SUMO1	Ubiquitin modifizer
titin	a gigantic filamentous muscle protein
RanGAP1/RanBP2	G-protein related protein
CaMKK1 alpha	signal protein
FYVE	RhoGEF

パクの同定などの実験を継続して進める予定である。一方で、今回のアプローチから新規の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作製を開始している(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を進めている。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Hirata Y, Hosaka T, Iwata T, Le CT, Jambaldorj B, Teshigawara K, et al. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(1):96-101.
- 2) Li Q, Hosaka T, Shikama Y, Bando Y, Kosugi C, Kataoka N, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mediates 5-HT-induced insulin resistance through activation of EGF receptor-ERK1/2-mTOR pathway. *Endocrinology* 2012;153(1):56-68.

### 学会発表

該当なし

### 特許出願

該当なし