



3T3-L1脂肪細胞におけるcortical actin networkの GLUT4トランスロケーションに対する機能解析

吉川, 真理

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-09-30

(Date of Publication)

2013-04-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3180

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003180>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



3T3-L1 脂肪細胞における cortical actin network の GLUT4 トランスロケーションに対する機能解析

吉川 真理

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
糖尿病代謝・消化器・腎臓内科
連絡先：吉川 真理
神戸市中央区楠町7-5-2
Tel : (078) 382-5861
FAX(078) 382-2080

(平成16年5月27日受付)

要 約

生体における正常な血糖維持機構の1つとして、脂肪細胞や骨格筋でのインスリン刺激に対するグルコースの取り込みが重要である。この過程で重要な役割を担っているのが、インスリン依存性糖輸送担体GLUT4の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションである。一方、脂肪細胞は細胞膜直下に cortical actin と呼ばれる actin の層状構造を有している。この構造は、3T3-L1 細胞が成熟脂肪細胞へと分化し、強いインスリン感受性を獲得した後に出現する。我々はレトロウイルスベクターにより GLUT4-7myc-eGFP を発現させた 3T3-L1 脂肪細胞を用い、インスリン刺激による GLUT4 のトランスロケーション過程における cortical actin の機能を検討した。GLUT4 は 10^{-7} M のインスリン刺激で細胞表面に露出するが、Latrunculin B で cortical actin 構造を破壊したり、Jasplakinolide にて cortical actin の再構築を抑制すると、GLUT4 はインスリン刺激により細胞膜まで移動はするものの、細胞表面への露出は抑制された。以上より、脂肪細胞において、細胞膜直下の cortical actin 構造は GLUT4 を含有する小胞が細胞膜まで移行するには必須ではないものの、細胞膜へ融合し GLUT4 が細胞表面へ露出するのに重要な役割を担っていることが示唆された。

緒 言

食後高血糖を是正し、正常な血糖を維持する主な機構の一つとして、脂肪細胞や骨格筋でのインスリン刺

激に対するブドウ糖取り込みがある。インスリンがインスリン受容体と結合すると、種々の細胞内リン酸化酵素を介して最終的に細胞内に繫留されているインスリン依存性糖輸送担体 (insulin-responsive glucose transporter 4: GLUT4) を含む小胞 (GLUT4 小胞) が細胞膜へ移行 (トランスロケーション) し、細胞膜と融合する。これにより、糖輸送活性の著明な増加をもたらされ、摂食後の血液中グルコースが骨格筋や脂肪細胞といったインスリン感受性臓器に取り込まれ血糖値が低下する^(1, 2)。

脂肪細胞は、細胞膜直下に cortical actin と呼ばれる F-actin の層状構造を有する。actin とこれに結合する蛋白や actin の脱重合を制御する蛋白はいくつかの細胞内小胞輸送に重要な機能を担っている。3T3-L1 細胞は線維芽細胞から脂肪細胞に分化し、これにともなってインスリン依存性の GLUT4 トランスロケーション機構を備えるなど、高いインスリン感受性を獲得するが、cortical actin 構造も 3T3-L1 細胞においては、脂肪細胞への分化後に出現する。このことから、cortical actin はインスリン感受性を獲得した脂肪細胞特有の機能に関与している可能性が示唆される。そこで我々は、脂肪細胞での GLUT4 のトランスロケーションに注目し、3T3-L1 脂肪細胞において cortical actin が、インスリン刺激下での GLUT4 のトランスロケーション過程において、どの段階でいかに機能しているかを検討した。

方 法

GLUT4-7myc-eGFP を発現した 3T3-L1 脂肪細胞

キーワード：GLUT4, トランスロケーション, cortical actin

の作成

GLUT4 の第一細胞外ループに myc tag を 7 個および細胞内カルボキシ末端に eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) を挿入した GLUT4 コンストラクトをレトロウィルスを用い 3T3-L1 線維芽細胞に導入した⁽³⁾。この 3T3-L1 細胞を insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthine を用い脂肪細胞へ分化誘導した。インスリン依存性の GLUT4 局在およびブドウ糖取り込みの検討には分化 8 日目以降の脂肪細胞を用いた。

2-deoxy-D-glucose の取り込みアッセイ

12 well 培養プレートで上記の方法により分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を 2 時間血清スターブした後, KRH バッファー溶液 (25mM HEPES (pH7.4), 120mM NaCl, 1.2mM KH_2PO_4 , 1mM CaCl_2 , 1mM MgSO_4 , 5mM KCl) にて 10^{-7} M のインスリンで 20 分間刺激し, 5 分間のパルス (0.05mM 2-deoxy-D- ^3H glucose (0.25 $\mu\text{Ci}/\text{well}$)) をおこなった。水冷 KRH バッファーで洗浄後, 細胞を 0.5%SDS で可溶化し, 液体シンチレーションカウンターで細胞内に取り込まれたラジオアイソトープ活性を測定した⁽⁴⁾。

共焦点顕微鏡を用いた GLUT4-7myc-eGFP の細胞内局在の検討

導入した GLUT4-7myc-eGFP の細胞内の局在は eGFP の蛍光で, また細胞表面への露出は細胞外部位に導入した myc tag に対する抗 myc 抗体と Cy5 を結合させた 2 次抗体を用いた細胞表面ラベルを行い, 共焦点顕微鏡にて観察した。

結 果

GLUT4-7myc-eGFP を発現した 3T3-L1 脂肪細胞を 10^{-9} M のインスリンで 20 分間刺激し, 共焦点顕微鏡下に eGFP と Cy5 の蛍光で GLUT4 の細胞内局在を観察したところ, GLUT4 は細胞内から細胞膜まで移行するものの, 細胞表面ラベルでは細胞表面には露出していないことが判明した (図 1 A)。さらに 10^{-7} M のインスリン刺激では細胞膜まで移行した GLUT4 は大部分細胞表面へ露出していた。以上のことより, GLUT4 の細胞膜までの移行には 10^{-9} M のインスリン刺激で十分なものの, 細胞膜表面への露出には 10^{-7} M のインスリン刺激が必要であることがわかった。同時にグルコースの取り込みを検討したところ, 10^{-9} M のインスリン刺激ではほとんど取り込みが増加しなかったが, 10^{-7} M の刺激では著明な取り込みの増

加が認められた (図 1 B)。これは GLUT4 の細胞膜表面への露出におけるインスリン感受性とほぼ同等な用量反応性を示した。

次に, actin 重合を抑制する細胞膜透過性試薬 Latrunculin B にて 3T3-L1 脂肪細胞を処理し, cortical actin 構造を Phalloidin-TRITC で染色したところ, Latrunculin B の濃度依存性に脂肪細胞の cortical actin 構造を保持した細胞が減少していた (図 2 A, B)。なお, この条件で Latrunculin B はインスリンのシグナル伝達には有意な変化を及ぼさなかった。ついで, インスリン依存性の GLUT4 の細胞内局在を検討したところ, GLUT4 の細胞膜までの移行には有意な変化が認められなかったが, 細胞表面への露出は Latrunculin B の濃度依存性に抑制されていた (図 3 A, B)。さらに, 重合した actin に結合し cortical actin を tight に細胞膜直下に安定化し, actin の再構築を抑制する細胞膜透過性試薬 Jasplakinolide で脂肪細胞を処理しても, インスリン依存性の GLUT4 の細胞膜への移行は抑制されないものの, 細胞表面への露出は抑制された (図 4 A, B)。以上の結果より, 細胞膜直下の cortical actin 構造はインスリン刺激による GLUT4 の細胞内から細胞膜までの移行には影響を与えないものの, actin の再構築を介して GLUT4 小胞が細胞膜へ融合し GLUT4 が細胞表面へ露出するのに重要な機能を果たしていることが推測された。

考 察

これまで GLUT4 のトランスロケーション過程が二つの段階に分かれることについての詳細な検討はなされていなかった。今回の我々の検討において, インスリンの濃度を変化させ, GLUT4-7myc-eGFP を導入することでより詳細に GLUT4 の細胞内局在を検討したところ, インスリンは GLUT4 小胞のトランスロケーションを 2 つの段階で制御していることが明らかになった。つまり, 1 つは細胞内から細胞膜までの移動であり, もう 1 つは GLUT4 小胞と細胞膜との融合という 2 つの段階である。また, これまで GLUT4 のトランスロケーションには 10^{-7} M のインスリンが必要と考えられてきたが, 今回の検討で GLUT4 の細胞膜までの移動に必要なインスリン濃度は 10^{-9} M であるものの, 細胞表面への露出に必要な濃度は 10^{-7} M であることが示された。このことより, GLUT4 小胞と細胞膜との融合過程には, 細胞膜までの移行過程よりもより強いインスリン刺激が必要であることが推測された。

F-actin はインスリン刺激による GLUT4 のトランスロケーションとブドウ糖取り込みに関わっていると

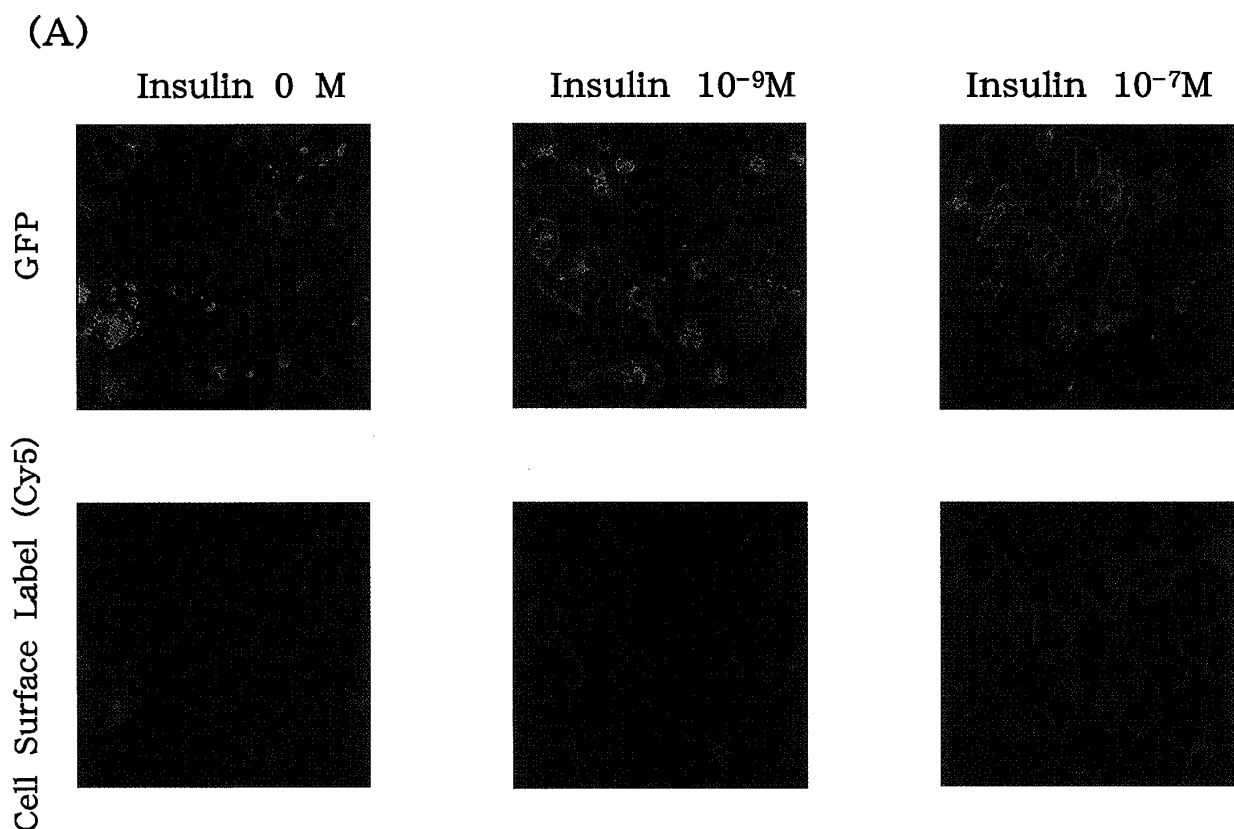


図1(A) GLUT4のインスリン依存性細胞内局在

レトロウィルスで GLUT4-7myc-eGFP を導入した 3T3-L1 脂肪細胞を、 10^{-9} M および 10^{-7} M のインスリンで 20 分間刺激後、抗 myc 抗体で細胞表面ラベルを行い、Cy5 を結合した 2 次抗体を用いて共焦点顕微鏡にて観察した。GLUT4 の細胞内局在は eGFP の蛍光にて (緑)、GLUT4 の細胞表面への露出は Cy5 の蛍光 (青) にて検討した。

(B)

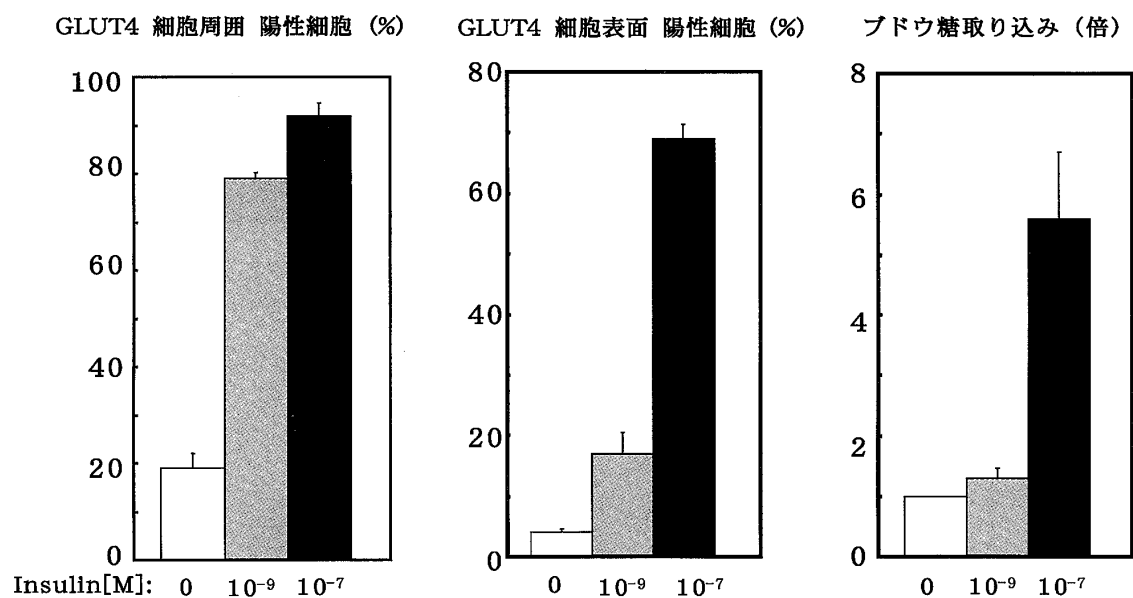


図1(B) GLUT4のインスリン依存性細胞内局在の定量化とブドウ糖取り込み

各インスリン濃度における GLUT4 の細胞膜までの移行と細胞表面への露出を、全 eGFP 陽性細胞に対する比率で定量化した。さらに同じ条件で 10^{-9} M および 10^{-7} M におけるインスリン依存性のブドウ糖の取り込みを検討した。3 回の実験結果から平均±標準誤差を示す。

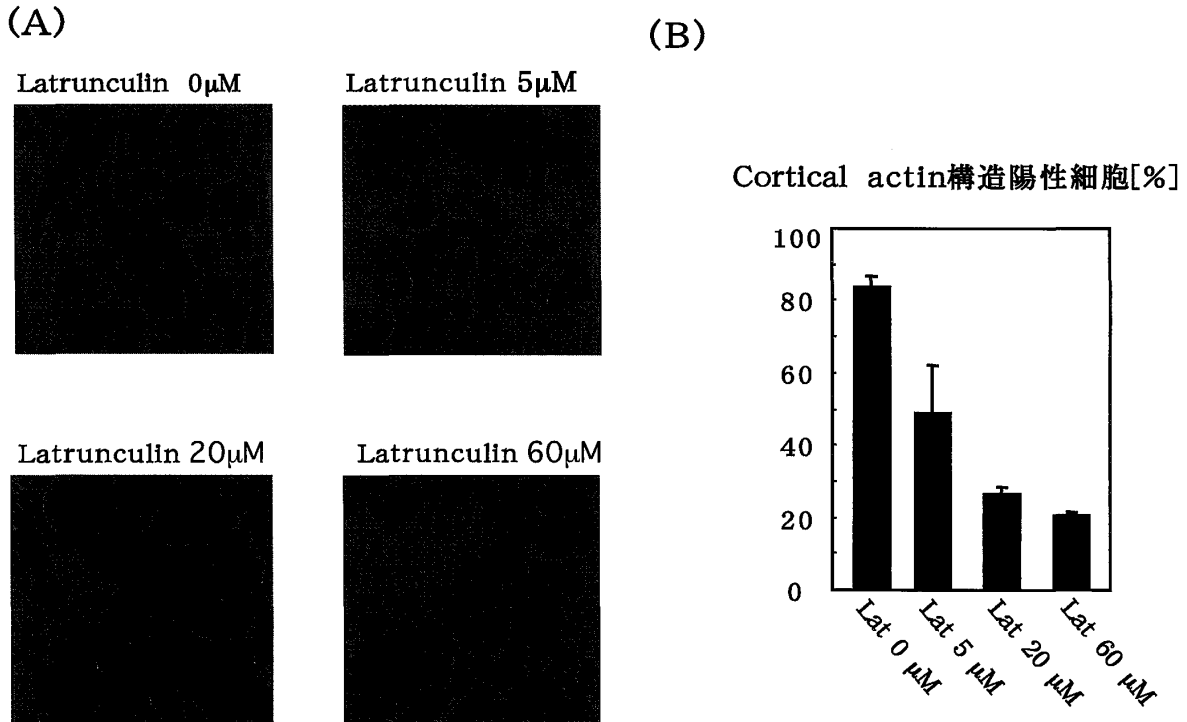


図2 3T3-L1 脂肪細胞における Latrunculin B の cortical actin に対する効果
 (A) それぞれ 5 μ M, 20 μ M, 60 μ M の Latrunculin B を 1 時間処理し, Phalloidin-TRITC を用いて cortical actin を染色し, 共焦点顕微鏡下に観察した。
 (B) Latrunculin B の cortical actin に対する効果を全細胞に対する cortical actin 陽性細胞の比率で示した。3 回の実験結果から平均±標準誤差を示す。

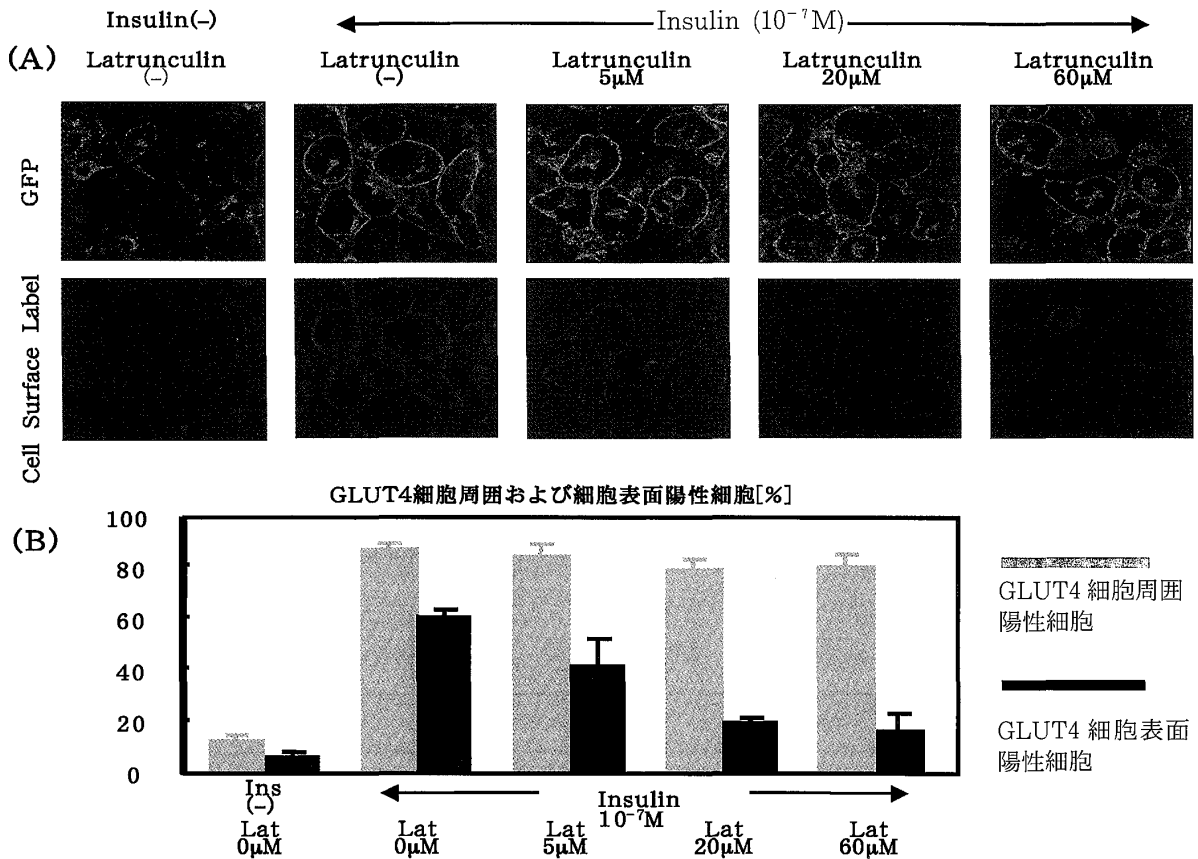


図3 cortical actin 構造のインスリン依存性 GLUT4 局在に対する効果の検討
 図2と同じ手法により Latrunculin B で cortical actin 構造を破壊したときの GLUT4 の細胞内局在を図1と同様の手法で観察し(A), これを定量化した(B)。3 回の実験結果から平均±標準誤差を示す。

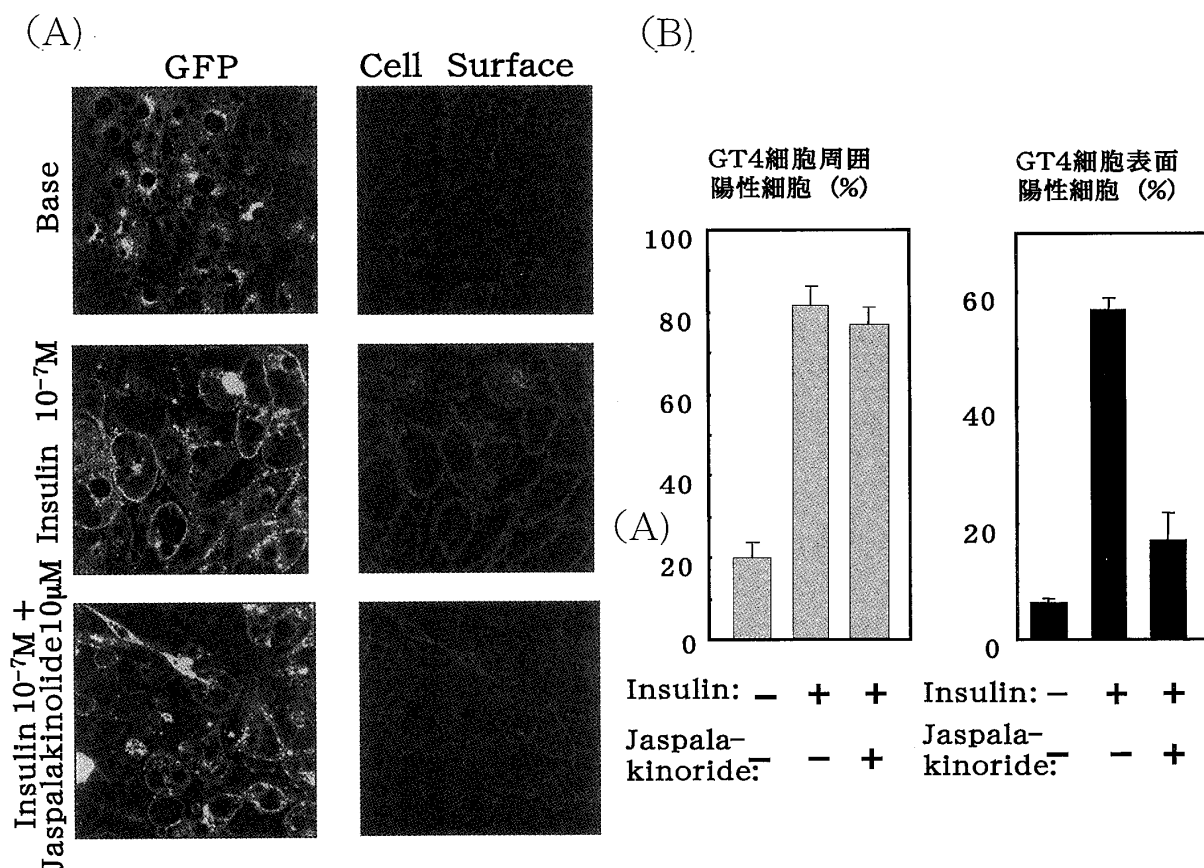


図4 cortical actinの再構築のインスリン依存性 GLUT4局在に対する効果の検討

10 μM の Jaspalakinolide を 2 時間処理した 3T3-L1 脂肪細胞を用い、図 1 と同様の手法にて GLUT4 の細胞内局在を観察し、これを定量化した。3 回の実験結果から平均±標準誤差を示す。

いう報告がなされてきた。サイトカラシン D により F-actin を破壊したり、Latrunculin B により actin の重合を阻害すると GLUT4 のトランスロケーションが抑制されると報告されている^(5, 6)。今回の検討では、cortical actin の構造がインスリン刺激下での GLUT4 のトランスロケーションのどのステップで如何に機能しているかを解明するため、Latrunculin B にて cortical actin 構造を破壊したところ、GLUT4 は細胞膜までは移動するが、第 2 段階である細胞表面への露出が抑制された。これらの結果より、GLUT4 のトランスロケーションの完了には cortical actin の構造が不可欠であることが示唆された。さらに Jaspalakinolide 処理においても、Latrunculin B を処理した時と同様に、GLUT4 の細胞膜までの移行には影響を認めなかったが、細胞表面への露出は抑制されたことから、GLUT4 のトランスロケーションの完了、特に GLUT4 小胞と細胞膜との融合段階に cortical actin の再構築が必要であると考えられた。骨格筋系の培養細胞である L6 myotube においても、インスリン刺激によって actin が豊富で細胞膜のラフリングが盛んに起こっている部位に GLUT4 が集積し、細胞膜と

融合をおこすことが報告されているが⁽⁷⁾、この結果も我々と同様に GLUT4 小胞が細胞膜に融合するのに actin 構造が重要であるということを示唆した報告である。

以上、本研究において、GLUT4 小胞が細胞膜まで移行し細胞膜と融合する際に、cortical actin の再構築が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究全般にわたり御指導、御高閲を賜りました春日雅人教授に深謝致します。

文 献

1. Holman, G.D., Sandoval, I.V.: Moving the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 into and out of storage. Trends Cell Biol. 11:173-179, 2001.
2. Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E.: Regulated transport of the glucose transporter

- GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:267-277, 2002.
3. Bogan, J.S., McKee, A.E., Lodish, H.F.: Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. *Mol. Cell Biol.* 21:4785-4806, 2001.
 4. Tamori, Y., Kawanishi, M., Niki, T., Shinoda, H., Araki, S., Okazawa, H., Kasuga, M.: Inhibition of insulin-induced GLUT4 translocation by Munc 18c through interaction with syntaxin4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273:19740-19746, 1998.
 5. Tsakiridis, T., Vranic, M., Klip, A.: Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 269:29934-29942, 1994.
 6. Kanzaki, M., Pessin, J.E.: Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J. Biol. Chem.* 276:42436-42444, 2001.
 7. Tong, P., Khayat, Z.A., Huang, C., Patel, N., Ueyama, A., Klip, A.: Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J. Clin. Invest.* 108:371-381, 2001.

Functions of the cortical actin network in the insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes

Mari Yoshikawa

Division of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases, Department of Clinical
Molecular Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract:

Insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes and skeletal muscle is mediated by translocation of GLUT4-containing vesicles from intracellular storage sites to the cell periphery. This leads to fusion of these vesicles with the plasma membrane, and externalization of GLUT4 to the cell surface. Cortical actin structures, which are located below the plasma membrane in adipocytes, have been implicated in the process of GLUT4 translocation to the plasma membrane. However, the detailed role of cortical actin in insulin-stimulated GLUT4 translocation has not been determined. In this article, we investigated the functional roles of cortical actin in insulin-stimulated translocation of GLUT4 by confocal microscopy in 3T3-L1 adipocytes expressing GLUT4-7myc-eGFP. Insulin (10^{-7} M) was necessary for the externalization of GLUT4 to the cell surface, although insulin (10^{-9} M) was sufficient to stimulate the movement of GLUT4 to cell periphery. Disruption of cortical actin with Latrunculin B inhibited insulin-stimulated externalization of GLUT4 to the cell surface, but not its movement to the cell periphery. Furthermore, inhibition of cortical actin remodeling with Jasplakinolide also prevented insulin-stimulated externalization of GLUT4 to the cell surface, without affecting movement to the cell periphery. These results indicate that the structure and remodeling of the cortical actin network in adipocytes play important roles in the externalization of GLUT4 to the cell surface but not in movement of GLUT4 to the cell periphery.