



## Adipocytes from Munc 18c-null mice show increased sensitivity in insulin-stimulated GLUT4 externalization

神田, 一

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2005-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3232

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003232>

※ 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。



【 86 】

氏 名・(本 籍) 神田 一 (京都府)  
博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
学 位 記 番 号 博い第1639号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成17年2月28日

【 学位論文題目 】

Adipocytes from Munc 18c-null mice show increased sensitivity in insulin-stimulated GLUT4 externalization  
(Munc 18c 欠損脂肪細胞ではインスリン刺激による GLUT4 の細胞膜表出への感受性の亢進が起こる)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一  
教 授 横山 光宏  
教 授 堀田 博

脂肪細胞において、インスリン依存性のグルコースの取り込みは、インスリン依存性糖輸送担体 (GLUT4) を内在する細胞内小胞が核周囲の細胞内貯蔵プールから細胞膜近傍へ移行後、それに引き続く細胞膜との融合によって完了する。その結果、GLUT4 は細胞膜に表出する。GLUT4 を含む細胞内小胞は、VAMP2、SNAP23、syntaxin4 からなる SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)複合体を形成することを契機に細胞膜との融合を引き起こす。われわれは、この度 syntaxin4 結合蛋白である Munc18c を欠失した遺伝子改変マウスを作成し、検討した。

Munc18c ホモ欠損型変異体は胎生致死もしくは出生後 6 時間以内に死亡する。胎生 13.5 日におけるホモ欠損型変異体は体長が 17% 小さく中枢神経系での発達不全を認めた。GLUT4 トランスポーテーション過程における Munc18c の機能解析を行うため、胎生 13.5 日の胎児より纖維芽細胞を採取し、脂肪細胞へ分化誘導することで初代培養脂肪細胞を得た。初代培養脂肪細胞の各遺伝子型における解析では、SNARE 複合体の構成蛋白である VAMP2 及び SNAP23 は mRNA の発現量も蛋白量も変わらなかった。しかし、syntaxin4 は mRNA 発現量は不变であるが、蛋白量は著明に減少していた。このことは、Munc18c が syntaxin4 の安定性に寄与することを示唆する。さらに、我々は Munc18c の syntaxin4 に対する存在量が相対的に少ないと SNARE 複合体形成をしやすくなるという仮説のもとに、Munc18c が結合していない syntaxin4 を特異的に免疫沈降するモノクロナル抗体 A6C を作成し検討した。Munc18c が完全に欠損したホモ変異型の初代培養脂肪細胞においては、syntaxin4 の全蛋白量は前述のように野生型に比して著明に減少したが、Munc18c の結合しない syntaxin4 の蛋白量は逆に約 2.5 倍ホモ変異型が野生型に比して増加している事象を見出した。

つづいて、初代培養脂肪細胞のインスリンに対する感受性を検討した。初代培養脂肪細胞のウェスタンプロットで、抗チロシンリン酸化抗体 PY20 で免疫沈降した後、同一の抗体でプロットし、インスリンによる IR, IRS のチロシンリン酸化を、また可溶化分画を Akt セリン 473 番目リン酸化抗体でプロットし Akt のリン酸化を比較した。これにより、各遺伝子型において、5 分間の 1nM、及び 100nM のインスリン刺激では差がないことを確認した。Munc18c が GLUT4 のインスリン依存性の移行に果たす役割を検討するため、我々は GLUT4 の第 1 膜貫通部位に 7 つの myc タグを、またカルボキシ末端に GFP タグをもつ外来性 GLUT4 蛋白(GLUT4-myc7-GFP)をレトロウイルスペクターを用いて初代培養脂肪細胞に導入し GFP の蛍光により GLUT4 の細胞内での局在を、また、myc タグに対する細胞表面ラベルを行うことにより細胞膜表面への表出を各々共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。1 または 100nM インスリン刺激で細胞膜周辺への GLUT4-myc-GFP の移動に関

しては、各遺伝子型間で同程度の移行が確認できた。一方、細胞膜表面への GLUT4-myc-GFP の表出を示す細胞表面ラベルによる検討では、野生型では表出には 1nM では不十分で 100nM のインスリン濃度下での刺激を要したのに対して、ホモ変異型では 1nM のインスリン刺激にて十分であることが示された。同様に、トリチウムラベル 2 デオキシグルコースを用いたインスリン依存性の糖取り込み実験においても野生型で 100nM のインスリン濃度を要する糖取り込みが、ホモ変異型では 1nM で起こり、ホモ欠損型では GLUT4 の細胞表面への表出のみならず、実際にブドウ糖取り込みにおいてもインスリン感受性が亢進していることが示された。さらに、アデノウイルスペクターを用いて Munc18c のホモ欠損型細胞に Munc18c を再補充すると syntaxin4 の蛋白量が野生型と同程度になるに伴い、細胞表面ラベルで見る GLUT4-myc-GFP の表出も野生型と同様 1nM のインスリン刺激での細胞表面への表出は 100nM に比べ有意に抑制されており、これらの表現型が Munc18c 欠損によるこの特異性が示された。

さらに、我々は Munc18c が細胞膜への表出の過程で特にワルトマニンで抑制される過程において重要な役割を果たしている可能性を示唆的な知見を得た。ワルトマニン 100nM 存在下で GLUT4 を介したグルコース取り込みは有意に抑制されるが、これは、GLUT4 の細胞膜近傍への移行を阻害するのではなく細胞膜への GLUT4 小胞の融合、表出の過程を抑制している。しかし、Munc18c のホモ欠損型脂肪細胞では 100nM のワルトマニン存在下でも細胞表面への GLUT4 の表出がおこり、この抑制がかからない事実を見出した。

さらに、PI3P はワルトマニンによる抑制とは独立した TC10 シグナルの下流で産生されることが知られており、この PI3P は GLUT4 小胞の細胞膜への移行をひきおこすが、細胞膜との融合は起こさないことが知られている。外来性にポリアミンキャリアを用いて PI3P を初代培養脂肪細胞に導入すると、Munc18c 欠損型においては細胞膜への表出が完了することが確認された。つまり、Munc18c ホモ欠損型脂肪細胞では PI3P のみで GLUT4 の細胞膜への移行から融合及び表出までに十分であることがわかった。

これらのことから、GLUT4 のインスリン依存性の細胞膜への表出過程において、Munc18c はワルトマニン依存性のインスリンシグナルの下流で GLUT4 小胞の細胞膜への融合過程を抑制的に制御していることが示された。我々は、Munc18c がインスリン依存性に syntaxin4 から解離することが、GLUT4 小胞の細胞膜への融合に重要ではないかと推測している。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1642号	氏名	神田一
論文題目	Adipocytes from Munc 18c-null mice show increased sensitivity in insulin-stimulated GLUT4 externalization Munc18c欠損脂肪細胞ではインスリン刺激によるGLUT4の細胞膜表出への感受性の亢進が起こる		
審査委員	主査 中村俊一 副査 佐山光広 副査 塚田博		
審査終了日	平成17年1月25日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 【はじめに】

脂肪細胞に於いてインスリン依存性のグルコースの取り込みは、インスリン依存性糖輸送担体(GLUT4)を担った細胞内小胞が核周囲の細胞内貯蔵プールから細胞膜近傍へ移行後、引き続く細胞膜との融合により行われる。GLUT4を含む細胞内小胞は、VAMP2、SNAP23、syntaxin4からなるSNARE複合体を形成することを契機に細胞膜との融合が起こる。本研究ではsyntaxin4結合蛋白質であるMunc18cを欠損した遺伝子改変マウスを作成し、GLUT4トランスロケーション過程に於ける機能解析をおこなった。

## 【方法】

<初代培養脂肪細胞に於けるGLUT4のインスリン依存性トランスロケーションの観察>

胎生13.5日の胎児より纖維芽細胞を採取し、脂肪細胞へ分化誘導させることで初代培養脂肪細胞を得た。次に、GLUT4の第一細胞外ループにmycタグを、C末端にeGFPを挿入したコンストラクトをレトロウィルスを用いて初代培養脂肪細胞に導入した。GLUT4-7myc-eGFPの細胞内の局在はGFPの蛍光で、また細胞膜との融合は抗myc抗体とphycoerythrinを結合させた2次抗体を用いた細胞表面ラベルを行い、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

<2-deoxy-D-glucoseの細胞への取り込み>

脂肪細胞を2時間血清無添加培地で培養し、1nM或いは100nMインスリンで20分間刺激し、5分間パルスによる2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H]glucoseの細胞への取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 【結果】

初代培養脂肪細胞の各遺伝子型に於ける解析では、SNARE複合体の構成蛋白質であるVAMP2及びSNAP23は、mRNAも蛋白量も野生型或いは欠損型で変化が認められなかった。しかし、Munc18cホモ欠損型変異体由来の脂肪細胞では、syntaxin4のmRNA発現量は不变であるが、蛋白量は著明に減少していた。更に、Munc18c非結合型syntaxin4を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて解析すると、Munc18cホモ

欠損型変異体由来の初代培養脂肪細胞では Munc18c と非結合型の syntaxin4 の蛋白量は逆に野生型に比し約 2.5 倍増加していた。

次に、GLUT4 の細胞表面ラベルによる検討では、野生型では 1 nM では不十分で、100 nM のインスリンで細胞表面への移行が認められたのに對し、ホモ変異体では 1 nM のインスリンでも細胞表面への移行が認められた。また、2-デオキシグルコースの取り込み実験に於いて、野生型では 100 nM のインスリンを要する糖の取り込みが、ホモ欠損型では 1 nM で起こり、ホモ欠損型では GLUT4 の細胞表面への表出のみならず、ブドウ糖取り込みに於いてもインスリン感受性が亢進していることが示された。一方、野生型では 100 nM ワルトマンニン処理により、GLUT4 の細胞膜への融合・表出の過程が抑制されることが知られるが、Munc18c ホモ欠損型変異体由来の初代培養脂肪細胞では、100 nM ワルトマンニン存在下でも GLUT4 の細胞表面への表出が起こることが示され、またポリアミンキャリアを用いて PI3P を導入するだけで細胞膜への表出が完了することが確認された。

#### 【考察】

インスリンは GLUT4 を細胞内貯蔵プールから細胞膜近傍へ移行させる過程と、引き続く細胞膜との融合の異なる過程を調節することが知られる。前者の過程は 1 nM の後者は 100 nM のインスリンが必要である。今回の Munc18c ホモ欠損型変異体を用いた結果から、100 nM インスリンが syntaxin4/Munc18c 複合体から syntaxin4 を遊離させ、GLUT4 結合顆粒と細胞膜との融合が引き起こされることが示唆された。今後これらの機序に基づいた II 型糖尿病の新たな治療法が望まれる。

本研究は、Munc18c ノックアウトマウスに於いて、インスリン刺激による GLUT4 の細胞膜表出への感受性が亢進することを報告したもので、インスリンによる血糖調節機構を理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。