



# Insulin-induced GLUT4 movements in C2C12 myoblasts : evidence against a role of conventional kinesin motorproteins

Takazawa, Kazuo

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Date of Publication)

2012-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4329

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004329>

※ 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。



氏 名 高澤 一男  
博士の専攻分野の名称 博士（医学）  
学 位 記 番 号 博い第 1929 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 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Insulin-induced GLUT4 movements in C2C12 myoblasts :evidence against a role of conventional kinesin motorproteins(C2C12 筋芽細胞におけるインスリンにより誘導される GLUT4 の移動 : conventional kinesin motor 蛋白の役割に対する反証)

審 査 委 員

主 査 教 授 片岡 徹  
教 授 中村 俊一  
教 授 清野 進

## 序論

インスリンは、筋肉と脂肪細胞におけるブドウ糖輸送担体GLUT4の細胞膜への移行を促進することによって、ブドウ糖輸送を刺激する。この生理的過程は主にPI3キナーゼ/Aktシグナル経路によって制御されているが、また、それは正常な細胞骨格ネットワークを必要とする。インスリンによるGLUT4の移行に関して、重要な構造的・制御的要素として微小管からなる細胞骨格の関与が、いくつかの研究により示唆されている。まず最初に、GLUT4を含んでいる小胞が、微小管の基礎的な構成要素である、 $\alpha$ -tubulinと結合することがわかった。2番目に、微小管motor蛋白であるdyneinとkinesinを阻害するとインスリン刺激により起こるGLUT4の移行が減弱した。3番目に、微小管を脱重合させる薬剤(nocodazole, colchicine, およびvinblastine)は、核周囲のGLUT4蛋白を分散させ、またインスリン刺激により起こるブドウ糖の取り込みとGLUT4の移行を部分的に阻害した。最後に、dyneinは、GLUT4のendocytosisの制御にRab5と共に機能することが示された。

対照的に、他の研究ではインスリンで誘導されるGLUT4の移行における微小管の役割を支持していないものもある。微小管構造を変化させても、GLUT4の移動に関してインスリン刺激の効果は明らかな物はなかった。さらに、微小管を破壊しても、GLUT4のendocytosisの初期の割合を変化させなかったが、内部へ取り込まれた輸送体を核周囲領域に正しく戻す事を阻害した。その上、nocodazoleはGLUT4と直接相互作用して、つまりインスリンに反応して細胞膜へ移行する能力には影響を及ぼさず、ブドウ糖取り込みを阻害するようであった。これらのデータは、早期endosomesから取り込まれたGLUT4の細胞内局在の主要な決定因子として微小管につき述べているが、他方では、それらはインスリンによるGLUT4の移行における微小管の役割に関する疑問を投げかける。

kinesin motor蛋白は真核細胞において、微小管依存性の輸送を媒介する。conventional kinesinはkinesinスーパーファミリーの中で最初に発見され、それは後に、2つの重鎖と2つの軽鎖から成る4量体蛋白質であると判明した。少なくとも3つのconventional kinesin重鎖(KHC)の遺伝子(KIF5A, KIF5B, KIF5C)と3つのkinesin軽鎖(KLC)の遺伝子(KLC1, KLC2, KLC3)が哺乳類で特定されている。KLC1とKLC2はKIF5A、あるいはKIF5Bに結合し、kinesin motor systemの中核を形成している。

より最近の研究では、KIF5Bが脂肪細胞に多く発現していることや、またKLC1の優性阻害型変異体により、インスリンによるGLUT4の移行が妨げられることが示された。これらの結果は、微小管上でのGLUT4小胞の移動を刺激するために、インスリンがconventional kinesinを必要とする事を示した。しかし、その結果は、培養脂肪細胞でのデータに基づいたものであるため、kinesin motor systemが他の細胞株でもインス

リンによるGLUT4の移行を制御するのかどうかに関して疑問が残る。この問題を明らかにするために、今回我々はC2C12筋芽細胞においてインスリンに反応して起こるGLUT4運動に対する、野生型KLC2および変異型KLC2の過剰発現の効果を調べた。

## 結果および議論

kinesin関連蛋白質であるKIF3 subfamilyはC2C12筋芽細胞に存在していることが示されているが、この細胞におけるconventional kinesin motor蛋白の発現に関する報告はほとんどない。Immunoblot解析と免疫沈降により、C2C12筋芽細胞にKHCとKLC2蛋白が多く発現しており、またKHCとKLC2が互いに生体内で結合する事が示された(図1)。従って、conventional kinesin motor蛋白はC2C12筋芽細胞において機能を持っていると思われる。しかし、この研究で使用しているKHCに対するモノクローナル抗体(mAb)は全ての重鎖(KIF5A, KIF5B, KIF5C)と反応するため、この細胞株において、conventional kinesinをどのisoformが構成しているのかは不明である。

近年、conventional kinesinは、KLC2のSer575のリン酸化を介して14-3-3に結合する事が示された。14-3-3は標的細胞の様々な機能(細胞内再分布、構造変化、安定性、および酵素活性等)を制御するので、14-3-3へのKLC2のリン酸化依存性の結合はkinesinを介する小胞輸送の過程を制御しているという事が考えられる。

我々は、小胞輸送に影響を与える典型的な刺激が、KLC2の14-3-3への結合を変化させるのかどうかを調べた。GST共沈実験により、Ser575がAlaに置き換えられ、リン酸化が欠損した変異体(KLC2-S575A)ではなく、野生型KLC2(KLC2-WT)が、CHO-IR細胞(図2A)あるいは、C2C12筋芽細胞(図2B)において14-3-3と結合する事を明らかにしたが、この事は既報に合致するものであった。CHO-IR細胞をインスリンあるいはAICAR(これらはそれぞれAktとAMP活性化プロテインキナーゼを活性化しブドウ糖輸送を促進する)で刺激しても、結合にはあまり影響しなかった(図2A)。また、小胞移動におけるkinesinを介したexocytosisの引き金となり、またインスリンで誘導されたAktのリン酸化とGLUT4の移行を修飾すると報告されているにもかかわらず、A23187による刺激でも著明な効果は認められなかった(図2B)。

ラットおよび人間の脂肪細胞において、forskolinと $\beta$ アドレナリン作用薬であるisoproterenolは、ブドウ糖輸送を阻害するようである。さらに、カテコラミンはcAMPを介した機序で、ラット脂肪細胞におけるインスリン刺激によるブドウ糖輸送をしていると提唱されている。我々は、forskolinあるいはisoproterenolでC2C12筋芽細胞を刺激すると、14-3-3に結合するKLC2-WT(KLC2-S575Aではなく)の量が増加することを見出した(図2B)。これらの結果は、cAMP-PKA経路がSer575におけるKLC2のリン

ン酸化と、その結果おこる14-3-3への結合、そしてその結果KHC-KLCヘテロ4量体の運動機能を変更させる可能性を含んでいる。脂肪細胞でのインスリン刺激によるGLUT4運動におけるconventional kinesinの主要な役割を考えると、このリン酸化依存性の過程は、インスリンによるGLUT4移行に対するcAMPの抑制効果を修飾しているのかもしれない。

もしこの筋書きが当てはまるとすると、14-3-3とのリン酸化を介する結合が起こらないKLC2-S575Aを過剰発現させると、インスリンによるGLUT4の移行が高まり、逆にKLC2のCOOH末端部欠失変異体(KLC2-ΔTPR)では、GLUT4の移行が抑えられると考えられた。この可能性を検証するために、我々は、野生型KLC2とKLC2-S575AあるいはKLC2-ΔTPRをコードするアデノウイルスベクターを作成し、C2C12筋芽細胞で過剰発現される事を確認した(図3)。次に我々は、レトロウイルスベクターを用いてC2C12筋芽細胞に発現させたGLUT4-myc7-GFPの細胞内局在のインスリンによる変化に対して、これらの組換え型KLC2蛋白が影響を及ぼすのかどうかを、免疫染色により分析した。このGLUT4 constructは、最初の細胞外ループに7個のMycエピトープタグが、またGFPが細胞内COOH末端に融合されており、細胞内のGFPの測定によりインスリンによるGLUT4細胞膜への運動を検出し、またMycタグに対する抗体での測定により細胞表面へのGLUT4の露出を検出することができる。

β-galactosidaseを発現する細胞において、GFPは基底状態では、主に核周囲に観測された(図4A)。インスリン刺激により、細胞表面でMycが陽性の細胞の比率と同様に、細胞辺縁にGFPを示す細胞の比率が有意に増加した(図4A)。これらの結果は、C2C12筋芽細胞において、インスリンが細胞膜へのGLUT4の移行と、表面への露出を起こす事を示している。しかし、定量的に分析すると、野生型KLC2あるいは2種類の変異型KLC2を強発現しても、インスリンによるこれらの効果はあまり変化しなかった(図4B)。それ故、conventional kinesin motor蛋白が微小管上でのインスリンによるGLUT4移動を制御している3T3-L1脂肪細胞とは対照的に、C2C12筋芽細胞ではインスリンによるGLUT4の移動にこれらのmotor蛋白を利用するようには見えない。この事は、ラットの骨格筋で微小管を破壊しても、インスリンによるブドウ糖輸送は抑制されないという最近の報告に合致しているかもしれない。

今回の結果は、培養筋芽細胞におけるインスリンによるGLUT4の移行に対するconventional kinesinの寄与について反対の議論となるかもしれないが、kinesinスーパーファミリーの他の分子が関与している可能性を除くことができない。実際、KIF3AとKIF3Bを含むヘテロ4量体motor蛋白であるKIF3は、インスリンによるGLUT4の移行を媒介するためにRab4と相互作用する事が示されている。従って、筋細胞でインスリ

ンによるGLUT4の移行におけるkinesinと微小管からなる細胞骨格の生理的な役割を解明するには更なる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1930号	氏名	高澤 一男
論文題目	Insulin-induced GLUT4 Movements in C2C12 Myoblasts: Evidence Against a Role of Conventional Kinesin Motor Proteins (C2C12 筋芽細胞におけるインスリンにより誘導され る GLUT4 の移動 : conventional kinesin motor 蛋白の 役割に対する反証)		
審査委員	主 査	片岡 徹	
	副 査	清野 進	
	副 査	中村 俊一	
審査終了日	平成20年 2月 27日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

インスリンは、正常な細胞骨格ネットワークを必要とする複雑なメカニズムを介して、細胞内貯蔵コンパートメントから形質膜までグルコース輸送担体 GLUT4 の膜移行を誘導する。培養脂肪細胞において、conventional kinesin motor 蛋白質は微小管上の GLUT4 の運動を制御していると提唱されている。しかし、kinesin motor system が骨格筋細胞で同様の役割を担っているのかどうかは明らかにはなっていない。本研究では、conventional kinesin の重鎖および軽鎖を共に発現している C2C12 筋芽細胞を用いて、この問題について検討を行った。

また、近年、conventional kinesin は kinesin light chain 2 (KLC2) の Ser575 残基のリン酸化を介して、標的細胞の様々な機能を制御する 14-3-3 蛋白質に結合する事が示されたが、本研究では、その結合量がプロテインキナーゼ A (PKA) によるリン酸化依存性に増加する事を見出した。この事から、kinesin を介する小胞輸送において、KLC2 のリン酸化依存性の 14-3-3 への結合が小胞輸送の調節因子として働き、PKA によるリン酸化により調節を受けるといった可能性が考えられたので、KLC2 と 14-3-3 の結合の GLUT4 膜移行に対する影響も検討した。

本研究では、C2C12 培養筋芽細胞における GLUT4 の膜移行系を用いて、conventional kinesin motor 蛋白質、および、その 14-3-3 蛋白質との結合の役割について検討を行った。C2C12 筋芽細胞では、野生型 KLC2 またはそのリン酸化が欠損した S575A 変異体をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現しても、インスリン刺激による Myc-GLUT4-GFP の形質膜への移行と、その結果起こる表面への露出にはあまり影響が見られなかった。同様に、KLC2 の優性阻害型変異体 (COOH 末端側の欠失型変異体) を過剰発現しても、この細胞株では GLUT4 の移行に有意な影響を及ぼさなかった。

これらの結果から、conventional kinesin は培養筋芽細胞におけるインスリン依存性の GLUT4 の膜移行には必須でないと考えられた。しかし、kinesin super family の他の分子が関与している可能性は除外できなかった。実際、KIF3A と KIF3B を含むヘテロ 4 量体 motor 蛋白である KIF3 が、インスリンによる GLUT4

の移行を媒介するために低分子量G蛋白質 Rab4 と相互作用する事が示されている。従って、骨格筋細胞でインスリンによる GLUT4 の移行における kinesin と微小管からなる細胞骨格の生理的な役割を解明するには更なる研究が必要であると考えられた。

本研究は、培養筋芽細胞におけるインスリン依存性の GLUT4 膜移行について、その conventional kinesin motor 蛋白質による制御機構を研究したものであるが、従来報告されていた脂肪細胞における役割が骨格筋細胞では異なることを示唆する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。