



## Role of RalA downstream of Rac1 in insulin-dependent glucose uptake in muscle cells

野崎, 真輔

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5678

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005678>

※ 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。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Role of RalA downstream of Rac1 in insulin-dependent glucose uptake in muscle cells

骨格筋細胞へのインスリン依存性糖取り込みにおける Rac1 下流での RalA の役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

分子生物学分野

(指導教員：片岡 徹 教授)

野崎 真輔

## 緒言

脂肪細胞や筋細胞でのインスリン依存性の糖取り込みは、糖輸送担体 GLUT4 の細胞内の貯蔵部位から細胞膜への移行を介して行われる。Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質である RalA は神経伝達物質の分泌やエンドサイトーシスなどの細胞内小胞輸送に関与することが知られている。インスリン刺激下の脂肪細胞においては、RalA は、エクソシストサブユニット Sec5 やモーター蛋白質 Myo1c との結合を介して、インスリン応答性の GLUT4 の細胞膜移行を制御することが報告されている。しかし、筋細胞でのインスリン応答性シグナル伝達における RalA の役割には不明の点が多い。一方、当研究室では、Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質の一種 Rac1 が、培養筋芽細胞やマウス骨筋において、インスリン依存性糖取り込みに重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし、Rac1 が GLUT4 小胞の輸送を制御する機構に関しては未解明の部分が多く残されている。本研究では、骨筋細胞において、RalA が Rac1 の下流で機能し、GLUT4 の細胞膜への移行を調節していることを明らかにした。

## 方法

### 細胞培養

L6 ラット筋芽細胞およびレポーター GLUT4 $myc7$ -GFP (後述) を安定発現する L6 細胞由来の L6-GLUT4 細胞は、10% ウシ胎仔血清、100 IU/ml ベニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、1 mM ピルビン酸ナトリウム含有イーグル基礎培地 (シグマ・アルドリッヂ) で培養した。L6 細胞は、2% ウマ血清存在下で 24 時間培養することにより、筋管に分化誘導した。

### siRNA による RalA のノックダウ

RalA siRNA (duplex-1, 5'-AAG AUG UCG AUC UGC ACU UCC UCC C-3'; duplex-2, 5'-AAA UCU GUU CCC UGA AGU CCG CUG U-3'; duplex-3, 5'-CAU AGU UAA CGU UCC ACU GGU CAG C-3') (Life Technologies) は、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いて L6-GLUT4 細胞に導入し、1 mM ピルビン酸ナトリウム含有イーグル基礎培地で 1 日培養した後、インスリン (100 nM) による刺激を行った。

### アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入

N 末端にミリストイル基を結合し恒常的に活性化されたホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3-K) の触媒サブユニットである Myr $\gamma$ p110 $\alpha$  (神戸大学大学院医学研究科・小川涉先生より御供与いただいた)、恒常的活性型 Rac1(G12V)、恒常的活性型 RalA(G23V)、恒常的活性型 FLJ68 $\triangle$ N は、アデノウイルスベクターを用いて L6 および L6-GLUT4 細胞で発現させた。それぞれのアデノウイルスを感染後、10% ウシ胎児血清、100 IU/ml ベニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、1 mM ピルビン酸ナトリウム含有イーグル基礎培地で 1 日培養した。

### 蛍光免疫染色法

GLUT4 $myc7$ -GFP は、細胞膜上に発現したときに細胞外に露出する領域に Myc タグを

挿入し、細胞内領域である C 末端に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を融合させた GLUT4 変異体であり、GLUT4 の細胞内局在のレポーターとして用いた。このレポーターが細胞膜表面に露出すると、抗 Myc 抗体で検出することができる。

細胞を固定液 (10% バラホルムアルデヒド含有 phosphate-buffer saline (PBS)) に 10 分間浸することで固定し、マウス抗 Myc タグ抗体 (Santa Cruz) を反応させた。PBS で洗浄後、浸透処理した細胞にウサギ抗 p(Ser/Thr)Akt 抗体 (CST ジャパン) を加え、30 分間反応させた。PBS-T (10% Tween20 含有 PBS) で洗浄後、二次抗体として Alexa 546 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa 647 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ライブテクノロジーズ) を用いて免疫染色を行った。画像は共焦点レーザースキャン顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) にて ×40 対物レンズを用いて撮影した。GLUT4<sup>myc7</sup>-GFP レポーターの細胞膜への移行は、Myc と GFP の蛍光強度比により評価した。Myc と GFP の蛍光強度は、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて行った。

#### イムノプロッティング法

サンプルを SDS-PAGE で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。1 次抗体として、抗 HA タグ抗体 (Roche)、抗 Rac1 抗体 (BD バイオサイエンス)、抗チューブリン抗体 (シグマ・アルドリッヂ)、2 次抗体として、HRP 標識抗マウス IgG 抗体、HRP 標識抗ラット IgG 抗体 (GE ヘルスケア) を用いた。検出は ECL PLUS (GE ヘルスケア) を用いた化学発光法により行った。

#### ブルダウンアッセイ

細胞をブルダウンアッセイバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, protease inhibitor cocktail (ナカライトエスク)] に溶解、回収し、1 分間遠心 (18,000 × g) した上清を可溶化液とした。可溶化液は、GST-PAK (G7-150)-Myc (活性型 Rac1 の検出) または GST-3×V5-Sec5(1-99) (活性型 RalA の検出) を固定化したグルタチオンセファロースビーズと 4°C、30 分間インキュベートした。グルタチオンセファロースビーズはブルダウンアッセイバッファーで 2 回洗浄後、回収し、結合している活性型 Rac1 あるいは活性型 RalA は、抗 Rac1 抗体あるいは抗 RalA 抗体 (BD バイオサイエンス) を用いたイムノプロッティング法により検出した。

#### 結果

本研究では、筋細胞において Rac1 が制御する糖取り込みの制御系へ RalA の関与を検討した。まず、L6-GLUT4 筋芽細胞に恒常的活性型 RalA 変異体を発現させると、GLUT4 の細胞膜移行が促進された。一方、特異的 siRNA で RalA をノックダウンした細胞では、活性型 Rac1 依存性 GLUT4 移行が抑制されていることが確認された。これらの結果から、RalA が Rac1 の下流での GLUT4 の細胞膜移行に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、Rac1 自体の変異ではなく、上流の調節因子の活性化による Rac1 の活性化が引起する GLUT4 の細胞膜移行に対する RalA のノックダウンの効果を検討した。PI3-K は多くの

細胞でインスリンシグナル伝達の鍵となる分子とされている。L6 細胞において、インスリン応答性の Rac1 の活性化が、PI3-K 特異的阻害剤であるワートマニン処理により抑制されたことから、インスリン依存性の Rac1 活性化には PI3-K が重要であることが示されている。そこで、恒常的活性型 PI3-K である Myrp110 $\alpha$  依存性の GLUT4 の細胞膜移行への RalA の関与を検討した。また、インスリン依存性の Rac1 の活性化を制御するグアニヌクレオチド交換因子として同定されている FLJ00068 の恒常的活性型である FLJ68 $\Delta$ N 依存性の GLUT4 の細胞膜移行への RalA の関与も検討した。その結果、いずれの恒常的活性型変異体により誘導される GLUT4 の細胞膜移行も RalA のノックダウンにより抑制されることが明らかとなった。

RalA は、GTP 結合型として exocyst 複合体と相互作用するが、この相互作用はシグナル伝達に重要であることが知られている。実際、脂肪細胞ではインスリン刺激により RalA の GTP 型が増加することが報告されている。そこで、L6 筋管においても検討したところ、恒常的活性型 Rac1 の異所性発現により、インスリン刺激した場合と同等の RalA の GTP 結合型の形成が検出された。また、恒常的活性型 Rac1 の発現により形成されるラッフル膜に RalA が局在することも確認された。以上の結果より、インスリン刺激により活性化された Rac1 は、ラッフル膜を形成する一方で、GTP 結合型 RalA の形成を誘導し、GLUT4 の細胞膜移行を引き起こす機構が存在することが示唆された。

#### 考察

本研究により、インスリン依存性の GLUT4 の細胞膜移行において、Rac1 の下流で RalA が必要であることが明らかとなった。しかし、現在のところ、Rac1 の下流で RalA の活性が制御される分子メカニズムは明らかにされていない。脂肪細胞では、RGC1 と RGC2 により構成される RalGAP 複合体が Akt2 の下流に存在し、Akt2 による RGC2 のリン酸化が GAP 活性を阻害し、細胞内に活性型の RalA が蓄積されるというメカニズムが報告されている。筋芽細胞においても、PI3-K の下流で Akt2 が活性化され、さらに本研究で RalA が活性化されることを示したが、RGC2 の関与については不明である。RalA の制御メカニズムは細胞の種類ごとに異なる可能性があり、筋細胞で RalA を特異的に制御するシグナル分子は今後同定する必要がある。

RalA は、脂肪細胞において exocyst 複合体やモーター蛋白質 Myo1c と直接結合し、GLUT4 小胞の輸送を制御することが報告されている。これらの下流の分子との特異的結合には、GTP 結合型の形成が必要であるが、筋芽細胞において恒常的活性型 Rac1 が実際に GTP 結合型 RalA の形成を誘導した。一方、脂肪細胞で報告されているヌクレオチド交換非依存的な RalA-exocyst 複合体の解離を誘導するメカニズムが、筋細胞においても小胞輸送の制御に重要であるかもしれない。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2296 号	氏名	野崎 真輔
論文題目 Title of Dissertation	<p>Role of RalA downstream of Rac1 in insulin-dependent glucose uptake in muscle cells</p> <p>骨格筋細胞へのインスリン依存性糖取り込みにおける Rac1 下流での RalA の役割</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 古瀬 純夫</p> <p>副査 Vice-examiner 内山 喬</p> <p>副査 Vice-examiner 平島 正則</p>		
(要旨は 1,000 字~2,000 字程度)			

インスリン依存性糖代謝を理解することは全身のエネルギー代謝を理解する上で重要である。骨格筋はインスリンの主要な標的臓器のひとつであるが、骨格筋におけるインスリン依存性糖代謝のシグナル伝達経路の解析は脂肪細胞のそれと比べて遅れている。これまでに、骨格筋においては、Rho ファミリー低分子量 GTPase のひとつである Rac1 がインスリン依存性糖取り込みに重要な役割を果たすことが、ラット筋芽細胞株や骨格筋特異的 rac1 ノックアウトマウスを使用した実験から明らかにされてきた。しかし、そのシグナル伝達経路の詳細、特に GLUT4 の細胞膜への移行を司るシグナル伝達に関しては未解明であった。Ras ファミリー低分子量 GTPase である RalA は、インスリン刺激した脂肪細胞における糖の取り込み、特に糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜への移行に関与することが報告されていた。しかし、骨格筋細胞におけるインスリン依存性糖取り込みに RalA が同様の役割を果たしているかは知られていない。そこで、本研究では、骨格筋細胞における Rac1 が制御する GLUT4 の細胞膜への移行に RalA が関与するかについて、GLUT4 レポーター発現させた筋芽細胞株 L6 (L6-GLUT4) および L6 細胞から分化させた筋管 (L6 筋管) を骨格筋細胞のモデルとして解析を行った。L6-GLUT4 細胞に恒常的活性型 RalA 変異体を導入したところ、GLUT4 の細胞膜移行が亢進した。また、恒常的活性型 Rac1 変異体の導入により L6-GLUT4 細胞で観察される GLUT4 の細胞膜移行の亢進が、siRNA を用いた RalA のノックダウンにより抑制されたことから、骨格筋細胞での GLUT4 の細胞膜移行に関わるシグナル伝達系において、Rac1 の下流で RalA が機能している可能性が示唆された。次に、Rac1 依存性の GLUT4 の細胞膜移行における Rac1 の上流分子の関与を検討するために、L6 筋管をインスリン刺激したところ、活性化 Rac1 が増加するとともに細胞膜上に観察されたが、このときホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) の阻害剤であるワートマニンを作用させると活性型 Rac1 の量が減少し、その細胞表面における発現が消失した。したがって、L6 細胞におけるインスリン応答のシグナル伝達系において Rac1 の上流に PI3K が機能していることが確認された。さらに、PI3K の活性化型分子、PI3K 依存的な Rac1 の活性化に関与することが知られているグアニンヌクレオチド交換因子 FLJ00068 の活性化型分子を L6-GLUT4 細胞に発現させることにより GLUT4 の細胞膜移行が誘導されたが、この現象は RalA のノックダウンにより顕著に抑制された。RalA 下流分子である Sec5 のプローブを用いたブルダウンアッセイにおいて、L6 筋管で恒常的活性型 Rac1 を発現させることにより、活性型 RalA が増加した。さらに、インスリン刺激した L6 筋管、恒常的活性型 Rac1 を発現させた L6 筋管において、RalA が細胞膜表面に分布し、活性化型 Rac1 と共に局在していることが観察された。これらの結果から、骨格筋細胞のインスリン依存性糖取り込みのシグナル伝達経路において、Rac1 の下流で RalA が関与することが示された。

本研究は、インスリン依存性糖取り込みにおけるシグナル伝達経路を研究したものであり、従来ほとんど行われなかった骨格筋細胞におけるインスリン依存性糖取り込みにおける Rac1 の下流のシグナル伝達について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。