【課程－２】

審査の結果の要旨

氏名　　細 谷　弓 子

脂肪組織における糖取込みは インスリンの主要作用の一つであり、全身の糖代謝にも大きな影響を与えている。本研究はこの糖取込みを担う グルコーストランスポーター4（GLUT4）の細胞内挙動のメカニズムと 細胞骨格の役割を明らかにするため、レーザー共焦点顕微鏡を用いた高解像度ライブセルイメージングを基盤とした手法を用いて GLUT4 の細胞内動態の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

１．　eGFP-GLUT4-cmyc を導入した 3T3L1 脂肪細胞を用い、レーザー共焦点顕微鏡にて インスリン刺激による GFP-GLUT4 小胞の細胞膜への translocation を記録し、これを核周辺と細胞膜における GFP 輝度比を計測することで定量化した。また、蛍光標識グルコースを用いた糖取込みの評価系を併用することにより、脂肪細胞の糖取込みが GLUT4 小胞の translocation に伴って促進されることが確認された。

２．　レーザー共焦点顕微鏡を用いた時間的・空間的高解像度のライブセルイメージングと FRET（ Fluorescence Resonance Energy Transfer ; 蛍光共鳴エネルギー移動）法を組み合わせた解析法を開発し、GLUT4 小胞の translocation 過程を細分化して インスリン作用点の解析を行った。特に細胞膜近辺での GLUT4 小胞の動きに着目して検討したところ、インスリン投与により GLUT4 小胞の細胞膜直下での停留時間が有意に延長し、また細胞膜との接着率も有意に上昇することが明らかになった。即ち、この 2 段階が GLUT4 小胞の translocation におけるインスリン作用点である可能性が示された。

３．　成熟脂肪細胞を用いた固定染色標本にて GLUT4 小胞と細胞骨格の形態及び相互関係を観察したところ、インスリン刺激により表層アクチンが細網状に増殖し、さらに GLUT4 小胞を捕捉している像が得られた。 アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D で細胞を予め処理すると、このインスリン刺激に伴う表層アクチンの形態変化（リモデリング）や GLUT4 の捕捉現象は認められなくなった。

４．　同様にサイトカラシン D で前処理した脂肪細胞では、インスリン刺激による GLUT4 小胞の translocation が消失した。さらに同じ細胞を用いて、GLUT4 小胞の細胞内挙動のどの段階が影響を受けるかを検討したところ、インスリン刺激による GLUT4 小胞の細胞膜直下での停留時間の延長や細胞膜との

接着率の上昇は消失していた。この結果から、インスリン刺激に伴う表層アクチンのリモデリングが 細胞膜直下での GLUT4 小胞の停留を促進し、translocation に関与している可能性が示された。

５． 表層アクチンと協働して GLUT4 小胞の translocation に関わりうる分子を検索したところ、アクチン結合蛋白の一つである Dynamin2 が成熟脂肪細胞において顕著に発現が増加すること、また成熟脂肪細胞の細胞膜直下にて表層アクチンと共局在することが確認された。 この結果より Dynamin2 が GLUT4 小胞の挙動にも関与している可能性があると考え、siRNA を用いてこの Dynamin2 発現を抑制した脂肪細胞を用いて GLUT4 小胞の挙動解析を行ったところ インスリン刺激による GLUT4 小胞の translocation は消失し、細胞膜への停留時間の延長や接着率の上昇も顕著に抑制された。従って Dynamin２が GLUT4 小胞の細胞膜付近での挙動に関与し、translocation において重要な役割を担っている可能性が示された。

６． インスリン投与後の経過時間による GLUT4 小胞の細胞内挙動の変化を各段階で解析したところ、インスリン刺激による細胞膜との接着率の上昇は投与 30 分後でも残存しており、他段階よりも長時間インスリンの効果が持続していると考えられた。即ち、インスリン刺激に伴う表層アクチンのリモデリングは GLUT4 小胞の translocation を長時間にわたり促進し、インスリン作用の持続に寄与している可能性が示唆された。

以上、本論文は 3T3L1 成熟脂肪細胞において、GLUT4 小胞の細胞内動態におけるインスリンの作用点 及び 表層アクチンのリモデリングの役割を明らかにした。 脂肪細胞における糖取込みは 全身の糖代謝に関与する重要なインスリン作用であるが、本研究はその本態である GLUT4 小胞の細胞内動態の制御機構の解明に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。