

称号及び氏名 博士(理学) 長谷川 紀子

学位授与の日付 2023年3月31日

論文名 The mechanisms for insulin-stimulated glucose uptake and hypertrophy in
white adipocytes
(白色脂肪細胞におけるインスリン応答性糖取込み機構と肥大化機構の解明)

論文審査委員 主査 佐藤 孝哉
副査 児玉 靖司
副査 原 正之

The mechanisms for insulin-stimulated glucose uptake and hypertrophy in white adipocytes

白色脂肪細胞におけるインスリン応答性糖取込み機構と肥大化機構の解明

長谷川 紀子 (細胞生物学)

【緒言】

肥満の本態である白色脂肪細胞の肥大化は、細胞外から取込んだ糖を用いた中性脂肪合成の促進によって起こる。白色脂肪細胞での糖取込み、中性脂肪合成は、インスリンにより調節されているが、これらの制御機構には不明の点が多く、未だ全容は解明されていない。所属研究室では、脂肪細胞培養モデルである 3T3-L1 脂肪細胞やマウス白色脂肪細胞を用いたこれまでの研究から、インスリン刺激により Rac1 が活性化されること、Rac1 が既知の糖取込み制御系であるホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) -タンパク質キナーゼ Akt2 経路の下流で活性制御されることを明らかにしてきた。これらのことから、白色脂肪細胞で Rac1 は、インスリン応答性糖取込み、中性脂肪合成の制御に重要な役割を担い、これらの系の破綻が白色脂肪細胞の肥大化抑制の原因である可能性が高い。そこで本研究では、3T3-L1 脂肪細胞ならびにマウス白色脂肪細胞を用いて、Rac1 を介したインスリン応答性糖取込み機構および肥大化制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 3T3-L1 成熟脂肪細胞でのインスリン応答性糖取込みにおける Rac1 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の同定

【目的】

インスリンが白色脂肪細胞に作用すると、糖輸送担体 GLUT4 が細胞膜へ移行・露出し、糖が取込まれる。この制御系である PI3K-Akt2 経路を介するシグナル伝達機構の全容は不明である。所属研究室ではこれまでに、3T3-L1 脂肪細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系を用いた解析から、白色脂肪細胞での新規糖取込み因子として Rac1 を同定し、Rac1 が PI3K-Akt2 経路を介して活性化され、GLUT4 の細胞膜移行を誘導することを明らかにしてきた。一方、骨格筋細胞でのインスリン応答性糖取込み系においては、Rac1 の GEF として FLJ00068 を同定している。しかし、白色脂肪細胞での糖取込みへの FLJ00068 の関与ならびにその機能は不明である。そこで本研究では、3T3-L1 脂肪細胞を用いて、FLJ00068 が Rac1 の GEF として機能しているかの検討を行った。

【結果・考察】

FLJ00068 の発現を検討したところ、3T3-L1 成熟脂肪細胞でその発現が認められたため、次に、GLUT4 の細胞膜移行への FLJ00068 の関与の検討を行った。その結果、3T3-L1 成熟脂肪細胞にインスリン刺激または恒常的活性型 FLJ00068 を異所性発現させることにより、GLUT4 の細胞膜移行が誘導されたが、これらの応答は、Rac1 ノックダウンにより有意に抑制された (図 1)。また、インスリン刺激依存的な GLUT4 の細胞膜移行への FLJ00068 ノックダウンの影響について検討を行ったところ、インスリン刺激または恒常的活性型 Akt2 の異所性発現依存的な GLUT4 の細胞膜移行は、FLJ00068 ノックダウン細胞で有意に抑制された (図 2)。以上の結果より、3T3-L1 成熟脂肪細胞で、FLJ00068 は、Rac1 を介したインスリン応答性糖取込み機構において Rac1 の GEF として、Akt2 の下流で機能する可能性が示唆された。

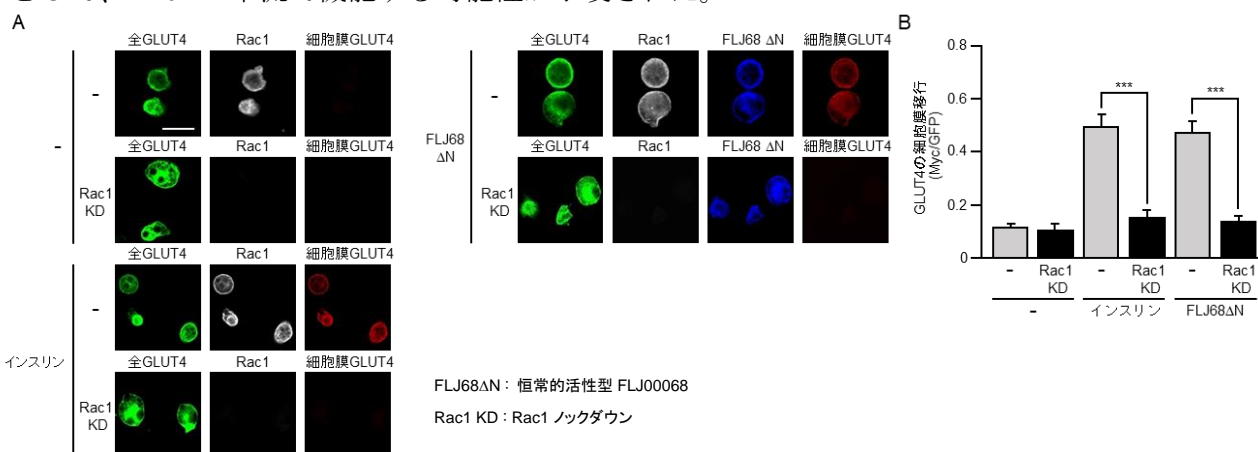


図 1 GLUT4 の細胞膜移行誘導への Rac1 ノックダウンの影響

A) 蛍光免疫染色法による GLUT4 の細胞膜移行の検出 B) 蛍光強度の比 (Myc/GFP) を定量化したグラフ *** $p < 0.001$

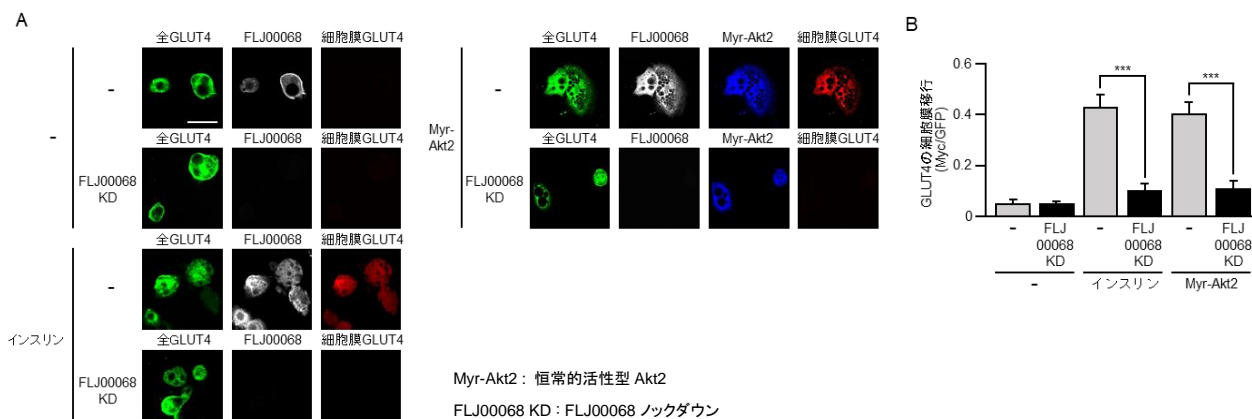


図 2 GLUT4 の細胞膜移行誘導への FLJ00068 ノックダウンの影響

A) 蛍光免疫染色法による GLUT4 の細胞膜移行の検出 B) 蛍光強度の比 (Myc/GFP) を定量化したグラフ *** $p < 0.001$

第 2 章 マウス白色脂肪細胞での Rac1 を介したインスリン応答性糖取込み機構の解析

【目的】

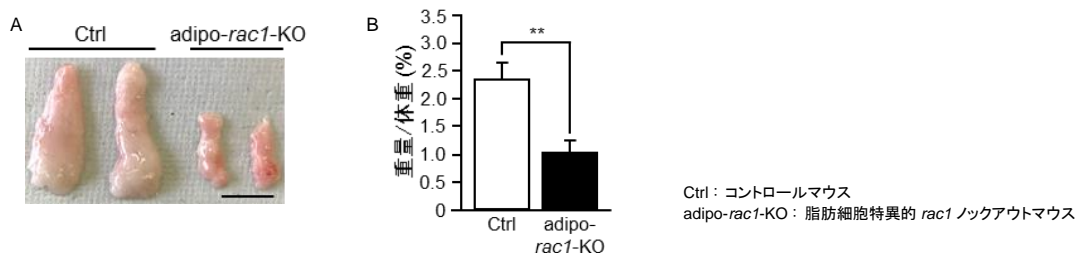
3T3-L1 成熟脂肪細胞を用いた当研究室でのこれまでの研究により、Rac1 が PI3K-Akt2 の下流で、FLJ00068 から活性制御を受け、Ras ファミリー低分子量 GTP アーゼ RalA を介して GLUT4 の細胞膜移行を誘導することで、インスリン応答性糖取込み機構を調節していることが明らかとなった。そこで、第 2 章では、Rac1 の生理学的役割を明らかにするため、adipo-rac1-KO マウスを作成し、マウス白色脂肪細胞を用いて、インスリン応答性糖取込みにおける Rac1 の機能の詳細を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

adipo-rac1-KO マウスの白色脂肪組織の組織学的解析の結果、コントロールマウスと比較して、白色脂肪組織ならびに白色脂肪細胞の小型化が認められた (図 3)。Rac1 を介したインスリン応答性糖取込み機構の破綻による糖取込み能の低下が、その一因である可能性が考えられる。

そこで、まず、糖代謝測定アッセイを用いて糖取込み量を検討した。その結果、コントロールマウス由来の白色脂肪細胞では、インスリン刺激による糖取込み量の増加が認められたが、adipo-rac1-KO マウス由来の白色脂肪細胞では、増加は認められなかった。

次に、GLUT4 の細胞膜移行への Rac1 の関与を検討したところ、コントロールマウスの白色脂肪細胞では、インスリン刺激、恒常的活性型 PI3K、恒常的活性型 Akt2 および恒常的活性型 FLJ00068 による GLUT4 の細胞膜への移行誘導が認められたが、adipo-rac1-KO マウスの白色脂肪細胞では、完全に抑制された (図 4)。次に、Rac1 の活性化状態を検討したところ、インスリン刺激や上記の恒常的活性型変異体により、Rac1 の活性化誘導が認められ、Rac1 の活性化誘導は、Akt2 阻害剤処理により有意に抑制された。さらに、Rac1 と RalA との関係性について検討を行った。インスリン刺激、恒常的活性型 PI3K、恒常的活性型 Akt2、恒常的活性型 FLJ00068 および恒常的活性型 Rac1 の異所性発現により、GLUT4 の細胞膜移行の誘導が認められたが、ドミナントネガティブ型 RalA の共発現により、GLUT4 の細胞膜移行は完全に抑制された。次に、RalA の活性化状態を検討したところ、コントロールマウスの白色脂肪細胞では、インスリン刺激ならびに上記の恒常的活性型変異体により、RalA の活性化誘導が認められたが、adipo-rac1-KO マウスの白色脂肪細胞では、完全に抑制された (図 5)。また、これらによる RalA の活性化誘導は、Akt2 阻害剤処理により完全に抑制された。以上の結果より、マウス白色脂肪細胞で、Rac1 は PI3K-Akt2 経路の下流で FLJ00068 から活性制御を受け、RalA を介してインスリン応答性糖取込みを制御している可能性が示唆された。



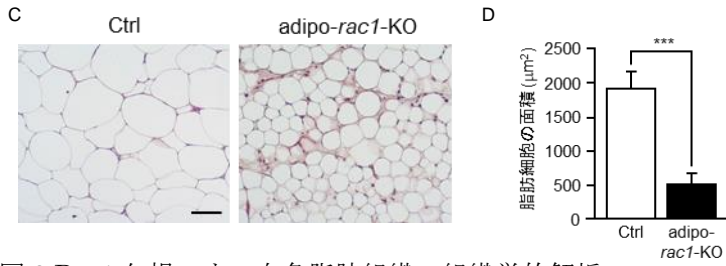


図 3 *Rac1* 欠損マウス白色脂肪組織の組織学的解析

A) 生殖腺周囲の白色脂肪組織 スケールバーは、1 cm B) 体重に対する組織重量の割合 (重量/体重) を定量化したグラフ C) 生殖腺周囲の白色脂肪細胞 スケールバーは、50 μm D) 白色脂肪細胞の面積を定量化したグラフ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

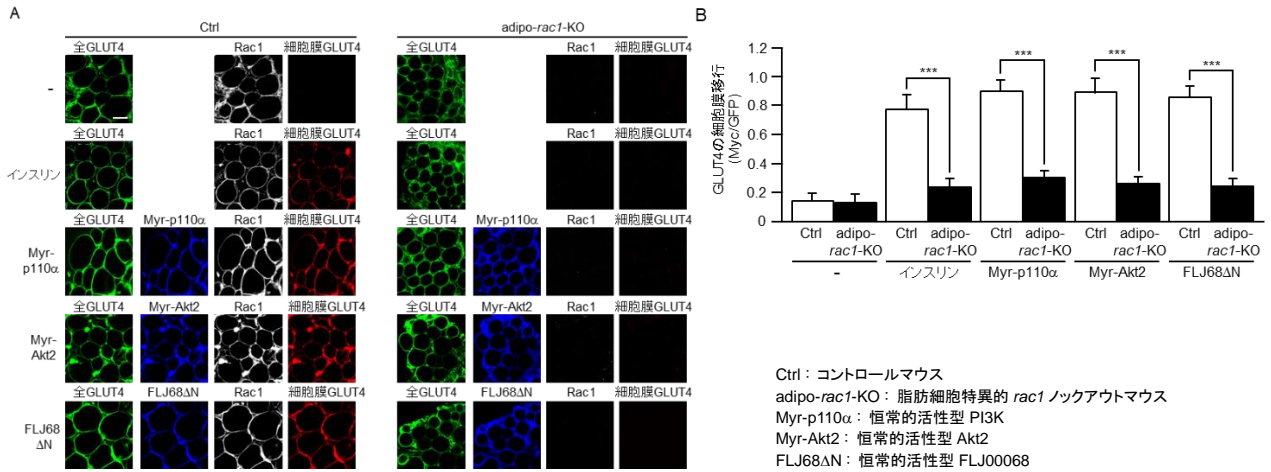


図 4 *Rac1* 欠損マウス白色脂肪細胞を用いた GLUT4 の細胞膜への移行誘導の検討

A) 蛍光免疫染色法による GLUT4 の細胞膜移行の検出 B) 蛍光強度の比 (Myc/GFP) を定量化したグラフ *** $p < 0.001$

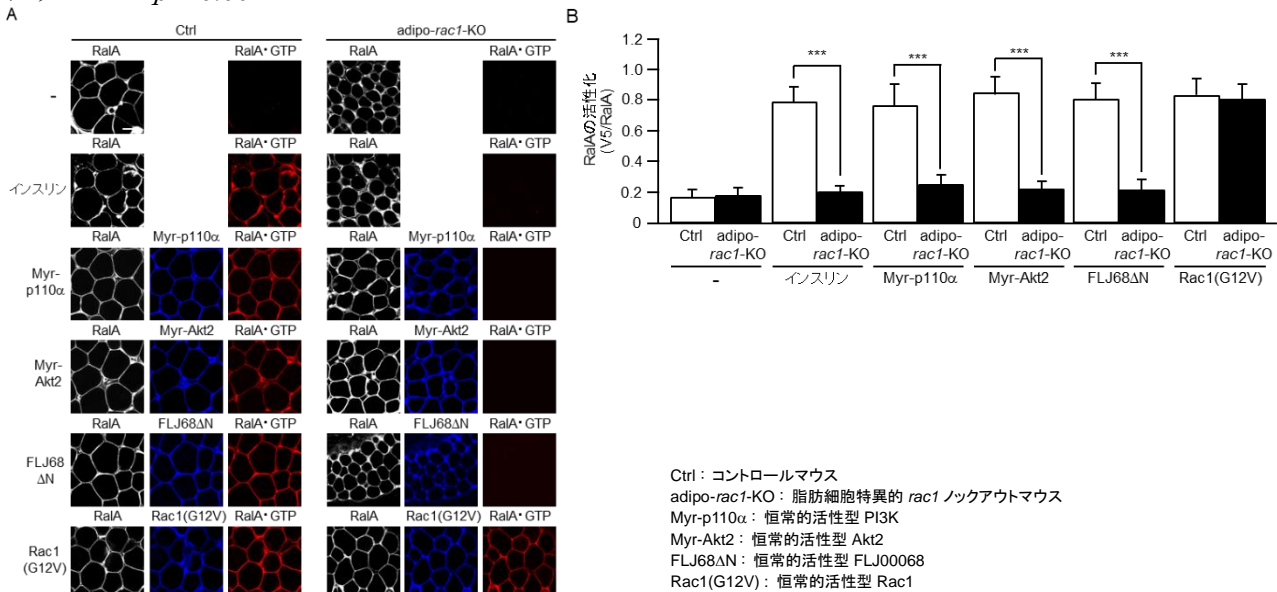


図 5 *Rac1* 欠損マウス白色脂肪細胞を用いた RalA の活性化の検討

A) 蛍光免疫染色法による RalA の活性化の検出 B) 蛍光強度の比 (V5/RalA) を定量化したグラフ *** $p < 0.001$

第 3 章 白色脂肪細胞での *Rac1* による肥大化制御機構の解明

【目的】

adipo-rac1-KO マウスでの白色脂肪細胞の肥大化抑制は、*Rac1* を介したインスリン応答性糖取込み機構の破綻による糖取込み能の低下が一因である可能性が示唆された。また、白色脂肪細胞での中性脂肪合成にも *Rac1* が関与する可能性が考えられるが、*Rac1* の関与は不明である。そこで、本研究では、マウス初代前駆脂肪細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系を用いて、*Rac1* の中性脂肪合成系への関与とその制御機構を明らかにし、白色脂肪細胞の肥大化メカニズムを解明することを目的とした。

【結果・考察】

adipo-rac1-KO マウス由来の初代前駆脂肪細胞では、分化過程でアディポネクチンプロモーターが活性化し、その下流で Cre リコンビナーゼの発現が誘導されて *rac1* の欠損が起こる。まず、分化過程での *rac1* 欠損の時期を検討した。細胞密度が 100%に達した時点を 0 日目とし、7 日目までのコントロールマウスおよび adipo-rac1-KO マウス由来の細胞での *rac1* の発現を検討したところ、4 日目から、adipo-rac1-KO マウス由来の細胞で *rac1* の発現低下が有意に認められた。一方、5 日目からは、コントロールマウス由来の細胞において、脂肪滴の形成が認められるが、adipo-rac1-KO マウス由来の細胞では、細胞と脂肪滴の面積の有意な減少が認められた。

細胞内に取込まれた糖のうち、余剰な糖は中性脂肪合成系へ流用される。この系で機能する中性脂肪合成酵素として、ATP クエン酸リアーゼ (ACLY)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)、脂肪酸合成酵素 (FASN)、ステアロイル-CoA 不飽和化酵素 1 (Scd1) ならびにグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) が知られている。そこで、定量的 RT-PCR 法を用いて、これら酵素の発現を検討したところ、コントロールマウス由来の細胞では、4 日目以降、発現の上昇が認められたが、adipo-rac1-KO マウス由来の細胞では、認められなかった (図 6)。さらに、これら酵素は、転写因子 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ によって発現が調節されることが知られている。そこで、これら転写因子の発現を検討したところ、コントロールマウス由来の細胞において 4 日目以降に見られる発現上昇が、adipo-rac1-KO マウス由来の細胞では、認められなかった。次に、*Rac1* の発現低下が顕著な 5 日目以降において、C/EBP β のタンパク質レベルでの発現ならびに活性化の検討を行った。C/EBP β はタンパク質への翻訳段階で LAP*、LAP、LIP のアイソフォームが産生され、それぞれがリン酸化されると、LAP*、LAP は、PPAR γ 、C/EBP α の転写を促進する一方、LIP は、これらの転写を抑制する。adipo-rac1-KO マウス由来の細胞では、5 日目以降、コントロールマウス由来の細胞と比較して、これらの発現および活性化の抑制が認められた。

以上の結果より、*Rac1* は、インスリン応答性糖取込み機構の制御に加えて、C/EBP β に依存した中性脂肪合成に関与する酵素群の発現を調節することで、肥大化を制御している可能性が示唆された (図 7)。

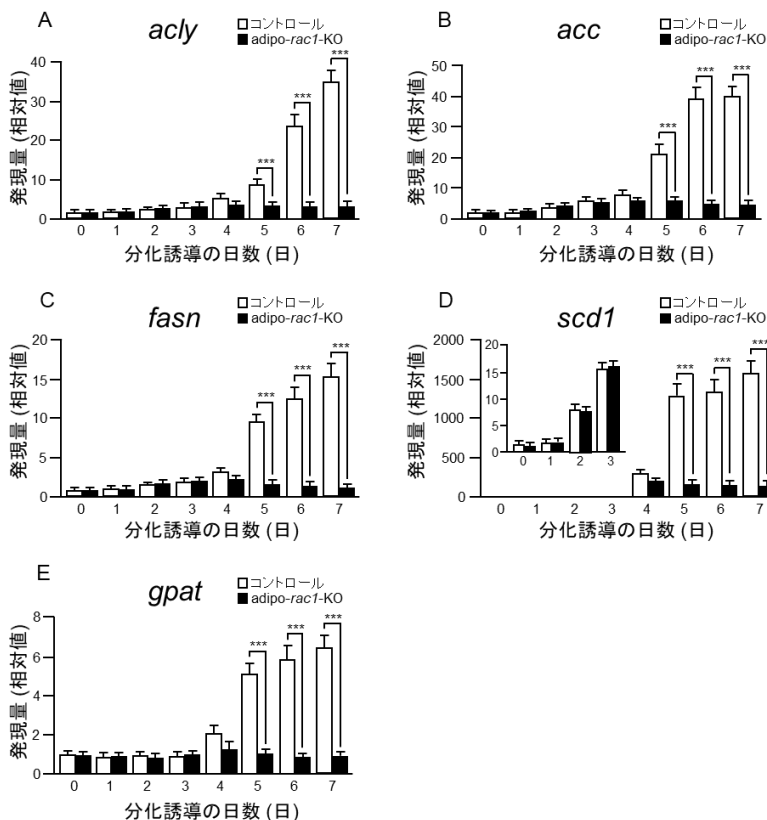


図 6 *Rac1* 欠損マウス白色脂肪細胞を用いた中性脂肪合成酵素の発現解析

A) *acly* の発現 B) *acc* の発現 C) *fasn* の発現
D) *scd1* の発現 E) *gpat* の発現 *** $p < 0.001$

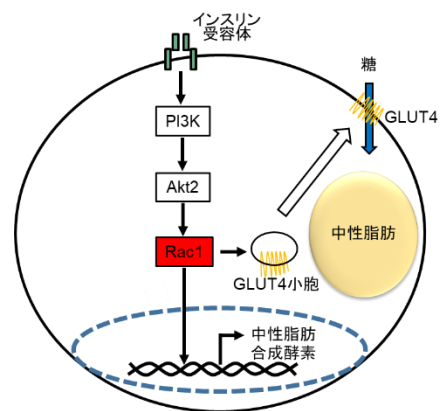


図 7 白色脂肪細胞での *Rac1* の機能 (仮説)

【論文】

● 雑誌

- (1) Regulation of *de novo* lipid synthesis by the small GTPase Rac1 in the adipogenic differentiation of progenitor cells from mouse white adipose tissue. **Hasegawa, K.**, Takenaka, N., Yamamoto, M., Sakoda, Y., Aiba, A., Satoh, T. *Int. J. Mol. Sci.* 24(5), 4608, 2023.
- (2) Atrophy of white adipose tissue accompanied with decreased insulin-stimulated glucose uptake in mice lacking the small GTPase Rac1 specifically in adipocytes. **Hasegawa, K.**, Takenaka, N., Tanida, K., Chan, M. P., Sakata, M., Aiba, A., Satoh, T. *Int. J. Mol. Sci.* 22(19), 10753, 2021.
- (3) The guanine nucleotide exchange factor FLJ00068 activates Rac1 in adipocyte insulin signaling. Takenaka, N., Nakao, M., **Hasegawa, K.**, Chan, M. P., Satoh, T. *FEBS Lett.* 594(24), 4370-4380, 2020.

(別紙) 学位論文審査結果の要旨

当該学位論文は、以下の内容から構成されている。

第1章では、3T3-L1成熟脂肪細胞でのインスリン応答性糖取込みシグナル伝達系において、低分子量GTPアーゼRac1を調節するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の同定に関する研究成果が報告された。インスリンが白色脂肪細胞に作用すると、糖輸送担体GLUT4が細胞膜へ移行、露出し、糖が取込まれる。所属研究室の先行研究において、このシグナル伝達系の制御因子としてRac1が同定され、Rac1がホスホイノシチド3キナーゼタンパク質キナーゼAkt2経路を介して活性化されることが明らかにされてきた。しかし、Rac1に対するGEFは同定されていなかった。本研究での検討の結果、骨格筋細胞の場合と同様に、白色脂肪細胞においても、FLJ00068がRac1に対するGEFとして機能していることが明らかとなった。

第2章では、脂肪細胞特異的*rac1*ノックアウト (*adipo-rac1-KO*) マウスを作出し、このマウスの白色脂肪細胞を用いて、インスリン応答性糖取込みにおけるRac1の機能の詳細を検討した。*adipo-rac1-KO*マウスの白色脂肪組織ならびに白色脂肪細胞は、コントロールマウスと比較して小型化が認められ、Rac1を介したインスリン応答性糖取込み機構の破綻による糖取込み能の低下が、この表現型の一因である可能性が考えられた。マウス個体レベルでの各種のシグナル伝達系の解析により、これまで*in vitro*の実験結果より示唆されていた、Rac1を介する制御系の存在が証明された。

第3章では、マウス初代前駆脂肪細胞を用いた*in vitro*分化誘導系を確立し、白色脂肪細胞の肥大化におけるRac1の機能の詳細を検討した。その結果、Rac1は、インスリン応答性糖取込み機構の制御に加えて、C/EBP β に依存した中性脂肪合成に関与する酵素群の発現を調節することで、肥大化を制御している可能性が示唆された。

以上の研究成果は、学位論文において、詳細な実験結果に基づいて論理的に記述されており、学位論文として相応しい内容であると判断した。なお、第1章の研究は申請者が共著者となっている学術論文において、第2章および第3章の研究は、申請者が筆頭著者となっている2報の学術論文それぞれにおいて、既に発表されている。