

PKC iota は SNARE 調節因子 DOC2b のリン酸化を  
介してインスリン誘導性糖取込みを促進する

氏名 野見山 隆太

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用医工学系専攻 病態制御内科学分野

平成 30 年 3 月

## 目次

1. 要旨 . . . . . 3
2. 背景 . . . . . 4 - 5
3. 対象と方法 . . . . . 5 - 8
4. 結果 . . . . . 8 - 15
5. 考察 . . . . . 16 - 17
6. 結語 . . . . . 17 - 18
7. 謝辞 . . . . . 18
8. 参考文献 . . . . . 18 - 20

## 1. 要旨

**背景と序論：**シナプトタグミンの1つである DOC2b (double C2 domain protein b)は、インスリン刺激により細胞膜上へとトランスロケーションし糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜融合過程を促進している。しかし DOC2b がどのような制御を受けているかは不明であった。今回、インスリンシグナルにおける DOC2b の上流因子を同定した。また DOC2b ノックアウトマウスを用いて、全身糖代謝における DOC2b の役割についても検討した。

**方法：**野生型と変異型 DOC2b を用いた免疫沈降実験により DOC2b と特異的に結合する蛋白質を同定した。また、DOC2b ノックアウトマウスを作成して組織学的観察と糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行い、個体レベルで糖代謝に与える影響を評価した。インスリンによる糖取込み促進効果については、単離ヒラメ筋と精巣上体脂肪を用いて評価した。

**結果：**非定型 PKC のアイソフォームである PKC iota が DOC2b と結合し、DOC2b の 34 番目のセリン残基をリン酸化していることを発見した。このリン酸化は DOC2b が細胞膜上へとトランスロケーションするのに必須であった。また、糖負荷試験やインスリン負荷試験の結果から DOC2b ノックアウトマウスはインスリン抵抗性を示すことが分かった。DOC2b ノックアウトマウスでは単離ヒラメ筋と精巣上体脂肪におけるインスリンによる糖取込み促進作用が減弱していた。

**結論：**我々は、PKC iota が DOC2b をリン酸化することで、GLUT4 のトランスロケーションおよび糖取込みを誘導しているというインスリンシグナル伝達における新たな調節機構を発見した。またノックアウトマウスの実験から、DOC2b が生体の糖代謝においても重要であることも判明した。

## 2. 背景

ヒトにおける糖代謝の恒常性の維持は主にインスリン作用に依存している(1-2). インスリンは脂肪細胞や筋細胞において、糖輸送担体である GLUT4 を含む小胞を細胞内分画から細胞膜表面へトランスロケーションさせ、GLUT4 を細胞表面に表出することで糖取り込みを促進させている(3-4). この GLUT4 小胞の再分布 (トランスロケーション) はインスリン作用の鍵となるステップと考えられる. 過去 20 年間、この再分布の過程におけるインスリンシグナル伝達の分子機構を明らかにするために、多くの研究がなされてきた.

インスリンはインスリン受容体チロシンキナーゼを活性化し、それがインスリン受容体基質蛋白質 (IRS) をリン酸化する. チロシンによるリン酸化を受けた IRS は多くの分子と結合する. 中でも P85/P110 型ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) は、インスリン依存性の糖輸送に重要な働きを担う. インスリン受容体チロシンキナーゼによってリン酸化された IRS 蛋白質は、そのホスホチロシン部位へ p85 サブユニットの SH2 ドメインを動員することによって PI3K を活性化する. 活性化された PI3K により生成される 3'-ホスホイノシチドは、インスリン作用による GLUT4 トランスロケーションの必須メディエーターである. 以上の概念は、これまでの多数の研究により確立されている (図 1).

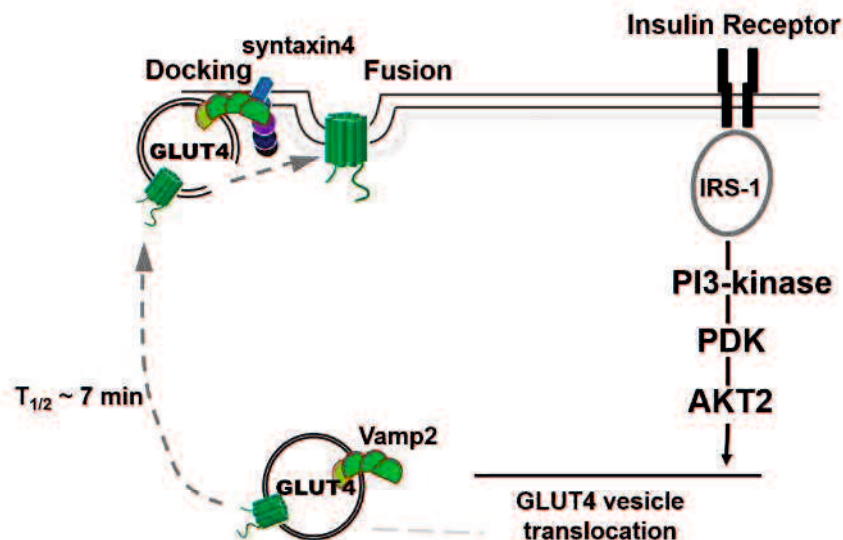


図 1. インスリンシグナルによる糖取り込み促進機構

これまでに、PI3K 産物のさらに下流標的を同定するために多くの研究がなされてきている. 下流標的分子としては、AKT/プロテインキナーゼ B(5-7)、プロテインキナーゼ C (PKC)(8-10)、GRP1(11-12)、ARF 蛋白質(13)などがある. それらの中でも最近の研究からは AKT/PKB と非定型 PKC が PI3 キナーゼの下流にあることを支持するものが多い. 特に AKT/PKB は GLUT4 小胞の調節に深く関わっている. もう一方の非定型 PKC は、カルシウムおよび DAG (ジアシルグリセロール) 非依存性のセリン/スレオニン蛋白質キナーゼが含まれ、細胞増

殖、アポトーシス、細胞骨格調節、糖代謝など、多くの細胞機能に関与していることが示唆されている(14-15). 特に、PKC  $\iota/\lambda$  が糖輸送や糖代謝に働いているとする報告は重要である(16-18). しかし、非定型 PKC の下流標的分子は不明のままであった.

DOC2b はシナプトタグミンファミリーの 1 種であり、C 端に C2 ドメインを有している(19). DOC2b は神経細胞における小胞融合に関わるカルシウムセンサー蛋白質として同定され、全身に発現している(20-21). 以前、我々は培養脂肪細胞において DOC2b が細胞内カルシウム依存性にインスリン刺激に応じて細胞膜上へトランスロケーションし、GLUT4 小胞の膜融合を調節していることを発見した(22). また MIN6 細胞ではインスリン分泌顆粒が膜融合する段階で DOC2b が必要であることも明らかにした(23). これらの結果は、DOC2b が糖代謝に密接に関わっていることを示唆している. しかし、生体の糖代謝において DOC2b が必須か否かは不明であり、また DOC2b を調節するシグナル伝達分子についても明らかにされていなかった. 本研究の目的は、インスリン刺激で DOC2b が細胞膜上へトランスロケーションする分子機構を明らかにすること、および DOC2b ノックアウトマウスを用いて、個体レベルでの糖代謝に DOC2b が果たす役割を検討することである.

### 3. 対象と方法

#### コンストラクトと抗体

野生型 DOC2b は pGEX-6P1 vector (GH Healthcare) にサブクローンした.

Munc interacting domain (MID) とその変異体(S34A) は p3×FLAG-CMV 8.0 vector (Sigma-Aldrich) にサブクローンした. すべての合成 DNA はシーケンスで DNA 配列確認を行った.

ウサギ DOC2b ポリクローナル抗体をシーケンス” CGARDDDEDVDQL ” に対し作製した. その他の抗体は市販品を用いた; anti-GLUT4, anti-GST, anti-PKC $\alpha$ , PKC $\theta$ , PKC $\delta$ , PKC  $\iota$ , PKC $\zeta$  (Cell Signaling), anti-PKC $\beta$ 1, PKC $\beta$ 2, PKC $\epsilon$ , anti-FLAG (Sigma Aldrich), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology); anti-myc (9E10) (Covance), and Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno Research).

#### 細胞培養

HEK-293 細胞と 3T3-L1 細胞は 10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含む DMEM、37 度で培養した.

3T3-L1 細胞はコンフルエントに達して 3-5 日後の細胞に対して、0.5mM のイソブチルメチルキサンチン、0.25mM のデキサメタゾン、4 $\mu$ g のインスリンを含む DMEM 中で 3 日間インキュベーションさせることで脂肪細胞へと分化させ、10%FBS を含む DMEM 中でさらに 5-8 日間培養した.

#### In vitro kinase assay

野生型 MID、S34-MID 変異体の GST 結合蛋白質は製造元の指示に従い精製した(Promega).

蛋白質濃度を調整した後、GST 結合蛋白質をグルタチオンセファロースビーズでプルダウンした(GE Healthcare). 沈降物を活性化 PKC iota(Merck millipore)、 $\gamma$ -[32P]ATP と混合、30°C で 10 分間インキュベートした後、サンプルを 0.75%のリン酸で洗浄した.  
放射活性は ALOKA LSC-5100 (Hitachi-Aloka Medical)を用いて測定した.

### 免疫蛍光顕微鏡

分化した 3T3-L1 脂肪細胞に対してエレクトロポレーションによりトランスフェクトした. 次いで細胞をカバーガラス上で 48 時間回復させた細胞に対して、インスリンあり・なしの条件別に 37°Cで 20 分間インキュベーションした. その後、細胞を PBS 内において 3.7%ホルムアルデヒドを用いて固定し、緩衝液 A 内(0.5 % triton X-100, 1 % FBS in PBS)にて 15 分、最後に 1 次抗体と室温で 2 時間インキュベートした. さらに細胞を洗浄し、適切な 2 次抗体と 30 分間インキュベートしカバーガラスを洗浄した後、スライドガラス上へ載せ LSM 5PASCAL レーザー共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)で観察した.

### Doc2 beta 欠損マウスの作成

DOC2b ノックアウトマウスと野生型マウスは、8 -12 週齢のオスを使用した.  
DOC2b ノックアウトマウスは徳島大学の佐々木卓也教授から供与を受けた.  
DOC2b ノックアウトマウスはエクソン 1 をネオマイシン耐性遺伝子に置換することで作成された. DOC2b ノックアウトマウスは C57BL/6J マウスを背景として系統維持を行った.  
マウス実験は山口大学医学部動物実験委員会の倫理委員会の承認を受けて行った.

### 免疫沈降とウェスタン解析

マウス組織（筋肉、脂肪、単離膵島）は lysis buffer (Thermo Fisher Scientific)で溶解し、細胞はさらに別の lysis buffer(20 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM sodium vanadate, 1 mM benzamidine, 5 mg/mL leupeptin, 5mg/ml aprotinin, 1mM PMSF, 1mM DTT)で溶解した. 蛋白質濃度は BCA protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて調整した. 免疫沈降では lysate を一次抗体で 4°C、8-12 時間インキュベートして、次いで protein-G/A-Sepharose とインキュベートした. Lysates と免疫沈降物は SDS-PAGE により分離し PVDF 膜 (GH Healthcare)に転写した. 転写した PVDF 膜は適切な抗体でインキュベートした.

### 単離骨格筋および脂肪細胞における糖取込み

一晩絶食させたマウスから組織を取り出し、細かく刻み、酸素化した緩衝液 (KRH buffer with 8mM 2-deoxy-glucose, 32 mM mannitol, 2 mM of sodium pyruvate and 0.1 % BSA [bovine serum albumin]) 内でインキュベートした. 組織を 100 nmol/L のインスリンにて 1 分間刺激し 100 x HOT 液 (8 mM 2-[<sup>3</sup>H] deoxy-glucose, 32 mM [<sup>14</sup>C] mannitol) を加えた.

さらに 20 分間インキュベートした後、組織を KRH バッファーで洗浄し 1% TritonX を加え 10 分間ボイルした。放射活性は ALOKA LSC-5100 counter を用いて測定した。2-[<sup>3</sup>H] デオキシ - グルコースの取込み率は細胞外で捕捉された [<sup>14</sup>C] マンニトールを用いて補正した。

### 膵灌流実験

一晩絶食させた 12 - 16 週齢マウスを使用した。主な手順は既報 (24) に従った。簡潔に述べると、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をした後、上腸間膜および腎動脈を結紮し大動脈を横隔膜直下に固定した。腹部大動脈に配置したカテーテルを通し、灌流液を注入し、門脈から採取した。灌流液を 4.6%デキストランおよび 0.25%BSA を補充した KRBH 緩衝液と混合し、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> ガスで混合物をバブリングした。灌流液の流速を 1ml/分に設定し、マウス膵臓を 2.8 または 16.7mmol/L のグルコースを含む KRBH 緩衝液で灌流した。グルコース濃度は 5 分で 2.8 から 16.7mmol/L へと変化させた。灌流実験プロトコールでは、図 7 に示すように初期段階で使用されたものと同じ緩衝液で開始 10 分間の平衡期間を設けた。灌流液中のインスリン濃度は ELISA キット (Morinaga) を用いて測定した。

### マウスの膵ラ氏島単離

マウスの膵ラ氏島単離は 10-12 週齢のマウスに膵管からコラゲナーゼ P (Roche) を注入し標準的な手順で行った。

### 膵ラ氏島の免疫染色

12 週齢のマウスから膵臓を単離し、4%パラホルムアルデヒドにより一晩固定した。パラフィン包埋処理後、3 $\mu$ m のパラフィン切片を作成した。切片をインスリン抗体で免疫染色し、次いで H&E で対比染色して観察した。

### RNA 抽出および RT-PCR

マウス組織からの全 RNA 抽出は、TRIzol (Invitrogen) と RNeasy mini kit (Qiagen) または RNA isolation kit (Picopure) を用いて行った。精製した RNA を High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、cDNA に変化させた。

全てのプライマーはマウス遺伝子用に設計し、その配列は以下に列挙する通りである。

DOC2a forward: 5'- CTCTCCTTGGGGCCACTACA -3'

DOC2a reverse: 5'- CCGCAGACATTGAAGAGGGT -3'

DOC2b forward: 5'- CGACGACGACGAAGATGTGGA -3'

DOC2b reverse: 5'- CCAGAGGACGCCCCAAACTT -3'

GAPDH forward: 5'- AGTATGACTCCACTCACGGCAA -3'

GAPDH reverse: 5'- TCTCGCTCCTGGAAGATGGT -3'

### 酸素消費量と活動量分析

酸素消費量は O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> metabolism measuring system (model MK-5000, Muromachikikai, Tokyo, Japan)を用いて測定した。マウスを 26°C で 0.6L/分の空気流量に設定した密閉した 560ml 容積のチャンバー内に 24 時間入れた。空気を 3 分毎に入れ替え、消費された酸素量を ml/分に変化した。酸素消費量はマウス体重に応じて標準化した。活動量は走行輪つきのゲージ(Model MK-700, Muromachikikai)を用いて、24 時間の回転数を計測した。

### 統計解析

結果は平均±標準偏差で示した。有意差検定は t-test を用いて p<0.05 を有意とした。

## 4. 結果

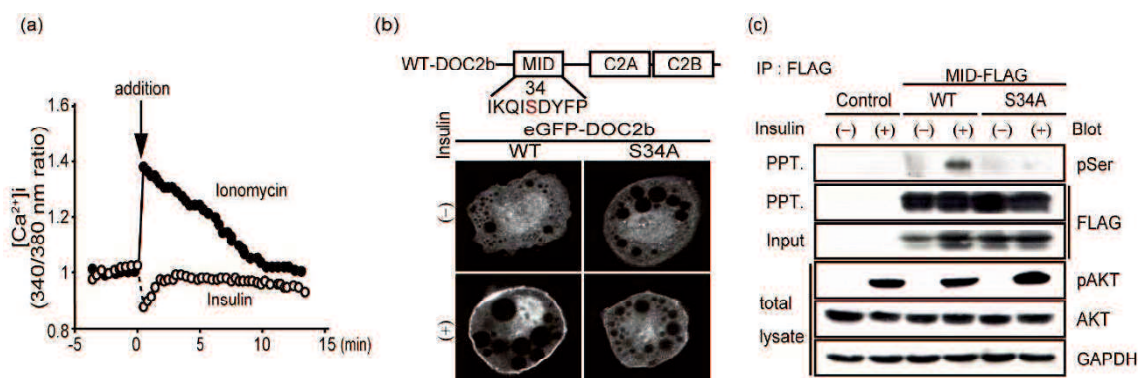
### DOC2b34 番目のセリン残基はインスリン刺激よりリン酸化される

培養脂肪細胞において、DOC2b はインスリン刺激に応じて細胞内分画から細胞膜表面へトランスロケーションする。そして細胞内カルシウム濃度依存性に GLUT4 小胞の膜融合過程を調節している(22)。しかしインスリン刺激により DOC2b が細胞膜上へトランスロケーションする機序については不明のままであった。DOC2b はカルシウムセンサーであるのでインスリン刺激により細胞内カルシウムが上昇する可能性を考えたが以前の報告において脂肪細胞でインスリン刺激は細胞内カルシウム濃度を上昇させなかった (25)。

一方でイオノマイシンは明確に細胞内カルシウム濃度を上昇させた (図 2a)。

我々は以前に、MID 領域を欠失させた DOC2b の変異体がインスリン非存在下において細胞内分画から細胞膜上へと局在が変化することを確認しており、MID 領域がインスリン刺激による DOC2b の活性化に必須の領域なのではないかという仮説をたてた。DOC2b の MID 領域のアミノ酸配列を Phospho Motif Finder (26)を用いてスキャンしたところ、プロテインキナーゼ C によるリン酸化を受けるセリン残基“KQIS34”を同定した。34 番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (S34A) では、DOC2b は細胞膜上へトランスロケーションできなかった (図 2b)。また同じ変異体ではインスリン刺激によるリン酸化も認めなかった (図 2c)。



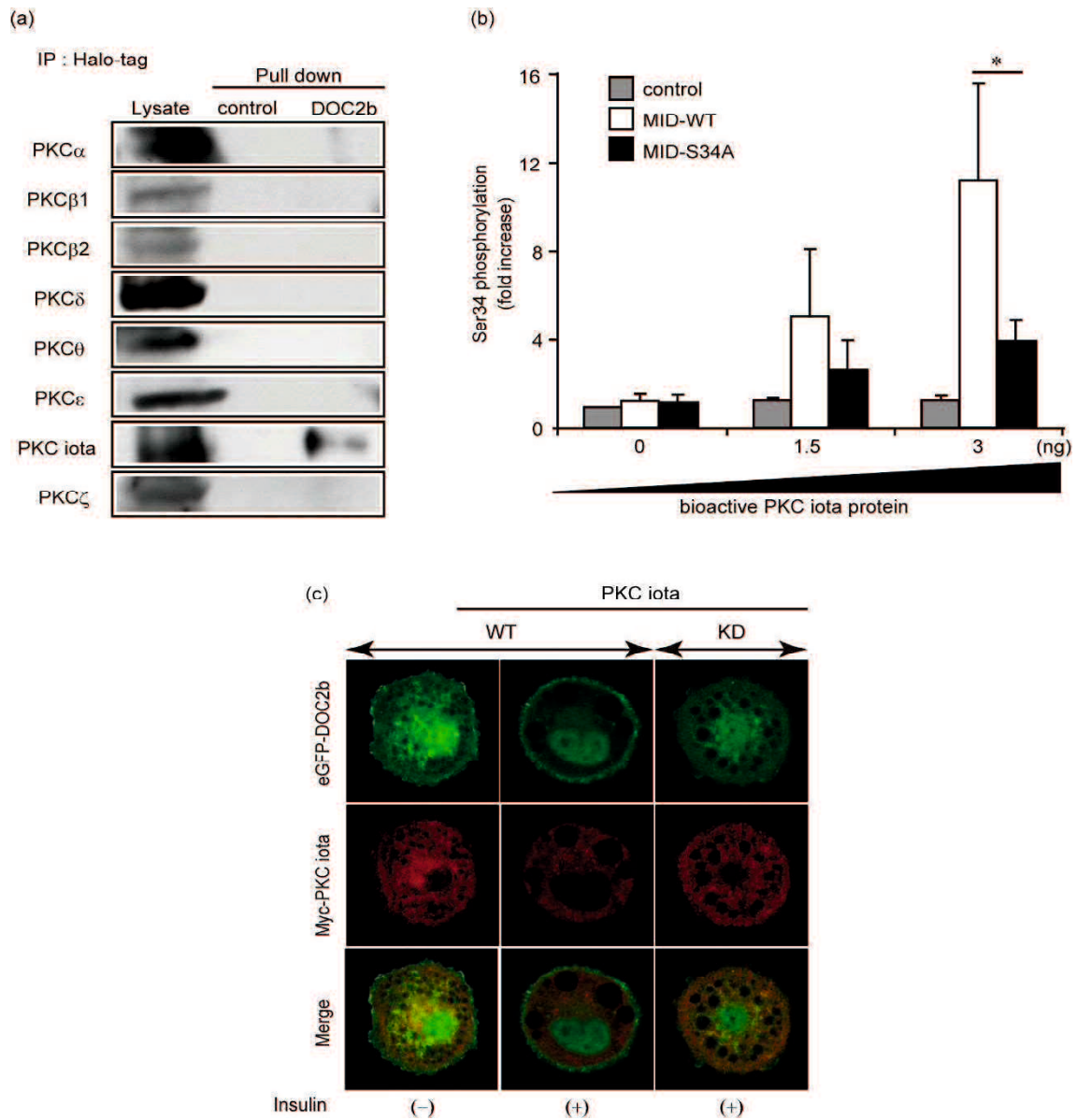


**図 2. DOC2b の 34 番目のセリン残基はインスリン刺激によりリン酸化する**

- (a) 培養脂肪細胞を 100nM のインスリン、1  $\mu$ m のイオノマイシンで刺激した。刺激前から細胞内カルシウム濃度測定を開始し比画像(340/380nm 励起波長)を 3.6 秒間隔で計測した。
- (b) 3T3L-1 細胞に発現させた野生型 DOC2b、変異型 DOC2b (S34A) をインスリン刺激して、共焦点顕微鏡にて DOC2b の局在変化を観察した。
- (c) FLAG-tag をつけた DOC2b (野生型、変異型 (S34A)) をインスリン刺激後に免疫沈降し、リン酸化セリン抗体を用いて、リン酸化の有無を確認した。

### DOC2b は非定型 PKC *iota* によりリン酸化され、細胞膜上へトランスロケーションする

DOC2b の MID 領域をリン酸化する PKC のアイソフォームを同定するために、DOC2b と結合可能な PKC を網羅的に検討した。その結果、非定型 PKC *iota* のみがインスリン刺激下で DOC2b と結合した (図 3a)。非定型 PKC は脂肪細胞や筋細胞において糖取込みを促進するということが報告されているので (10、27、28)、PKC *iota* と DOC2b の相互作用について検討することとした。DOC2b の MID 領域が非定型 PKC *iota* によりリン酸化されるかを確認するため *in vitro* kinase assay を行った。野生型 MID では、濃度依存性に PKC *iota* によってリン酸化の増加を認めた。一方で変異型 MID ではリン酸化が有意に障害された (図 3b)。最後に培養脂肪細胞での DOC2b のトランスロケーションにおける PKC *iota* の役割につき検討した。キナーゼを失活させた PKC *iota* の変異体 (KD) を過剰発現させるとトランスロケーションが障害された (図 3c)。これらの結果は PKC *iota* による DOC2b のリン酸化が DOC2b のトランスロケーションに必須であることを示唆している。



**図 3. PKC iota は DOC2b と相互作用し、DOC2b のトランスロケーションを促進する**

(a) Halo-tag を付加した DOC2b コンストラクトをトランスフェクトし、インスリン刺激後に免疫沈降した。

各 PKC 抗体でブロットした。

(b) GST-MID(Wild Type), GST-MID(S34A)各結合蛋白および GST を精製し、一定量を PKC iota および  $\gamma$ [ $^{32}$ P]ATP とインキュベートした後、放射性活性を測定した。\*P<0.05

(c) eGFP-DOC2b と Myc-PKC iota (野生型またはキナーゼ失活型(KD))を 3T3L-1 脂肪細胞に共発現させた。インスリン刺激による各々の局在を共焦点顕微鏡で観察した。

## DOC2b ノックアウトマウスは耐糖能異常を示す

これまでの結果から DOC2b はインスリンシグナル分子の1つであると考えられる。DOC2b が脂肪細胞や筋細胞において、インスリン刺激性の糖取込みに関与していると考え、DOC2b ノックアウトマウスの解析を行うこととした。DOC2b ノックアウトマウスは、第1エクソンを破壊することで作製し C57BL/6J マウスを背景として系統維持を行った。

摂餌量や体重は野生型とノックアウトの間には有意差は認めなかった (図 4a-b)。

12 週齢マウスを用い、組織学的観察に加え、組織体重測定を行ったところ、精巣上体脂肪とヒラメ筋の重量は DOC2b ノックアウトマウスで減少していた。心臓や肝臓の重量は野生型マウスと同定であった (図 4c-d)。

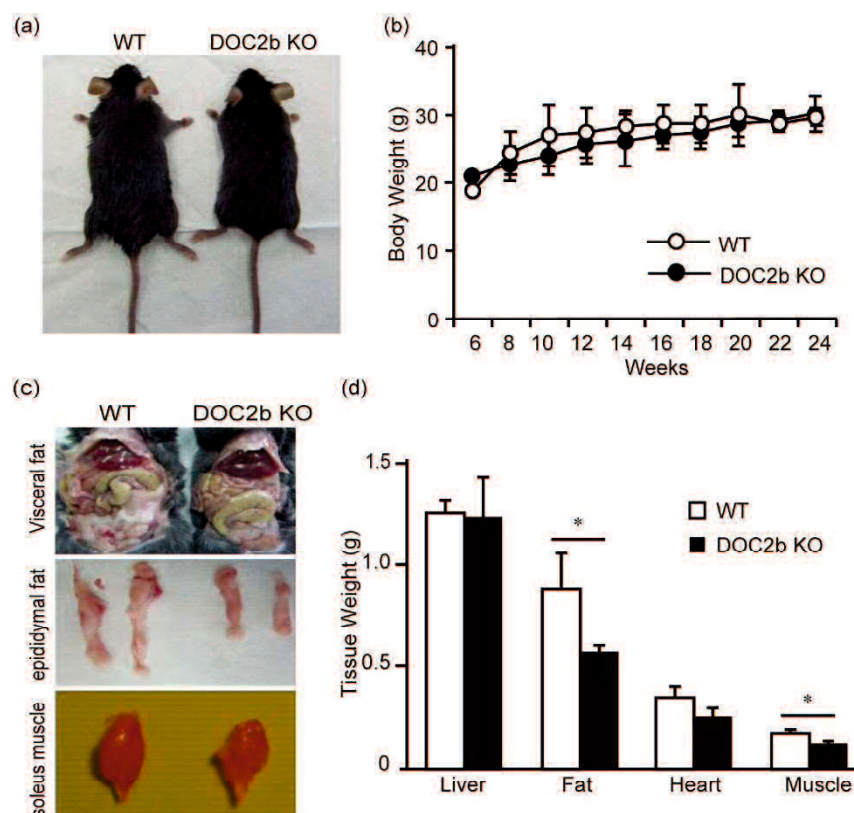


図 4. DOC2b ノックアウトマウスでは筋肉と脂肪細胞の重量が減少する

- (a) 野生型 (WT) とノックアウトマウス (DOC2b KO) の外観.
- (b) WT、DOC2b KO マウスの体重 (n=6).
- (c) 内臓脂肪、精巣上体脂肪、ヒラメ筋の外観.
- (d) 組織重量 (肝臓、心臓、精巣上体脂肪、ヒラメ筋). \*p<0.05.

さらに DOC2b ノックアウトマウスの糖代謝について検討した。

随時血糖値は野生型マウスと同等であった (図 5a)。糖負荷試験においては糖負荷 30 分後から DOC2b ノックアウトマウスで有意な血糖上昇を認めた (図 5b)。同時測定したインスリン濃度も 15、60、90 分後において DOC2b ノックアウトマウスで有意な上昇を示した (図 5c)。インスリン負荷試験で DOC2b ノックアウトマウスはインスリン感受性低下を認めた (図 4d)。さらに肝臓の糖産生を評価するためにピルビン酸負荷試験を行ったところ、野生型との差は認めなかった (図 5e)。これらの結果から DOC2b ノックアウトマウスは、耐糖能障害とインスリン抵抗性を有していることが示されている。

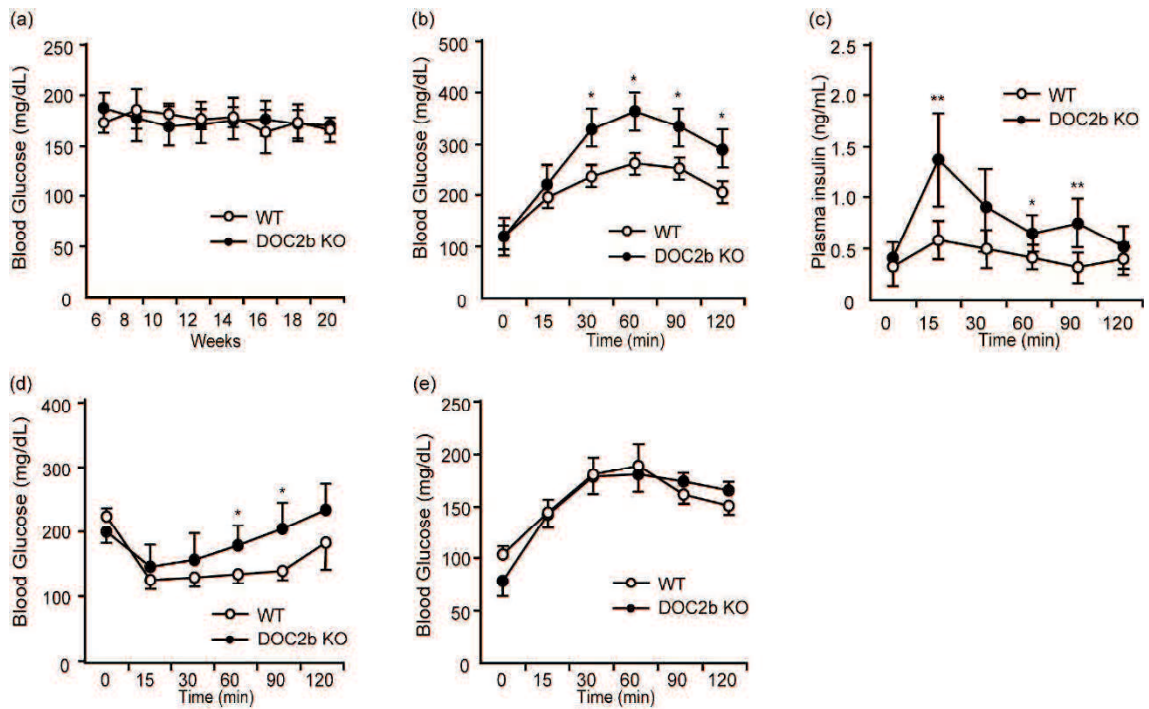


図 5. DOC2b ノックアウトマウスは耐糖能障害を示す

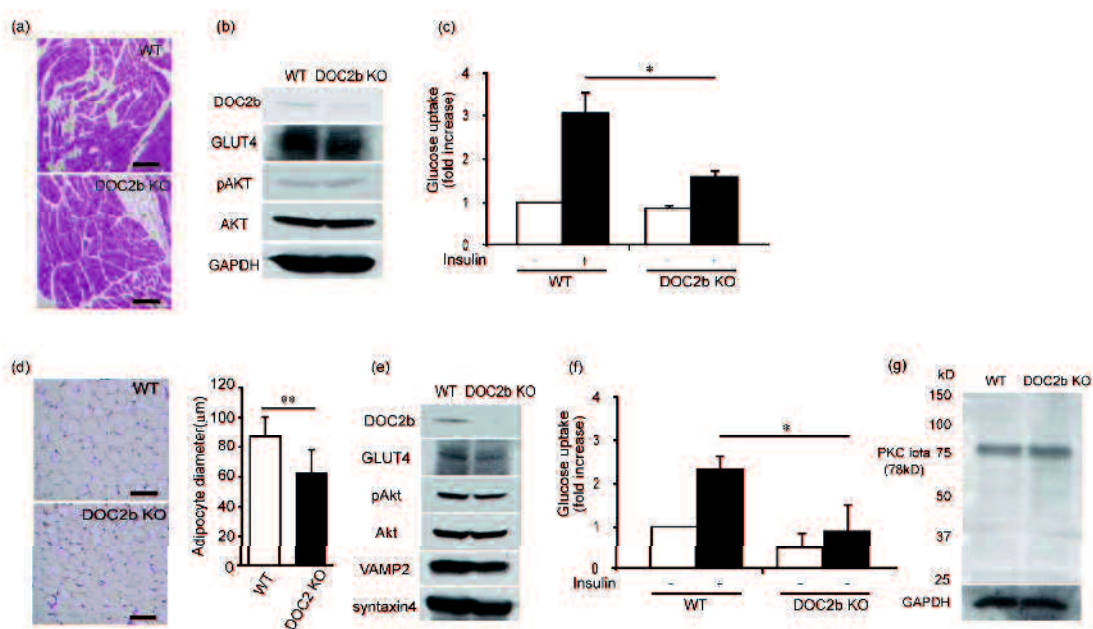
(a) WT、DOC2b KO マウスの随時血糖値。

(b-c)ブドウ糖負荷試験、(d)インスリン負荷試験、(e)ピルビン酸負荷試験

(それぞれ n=6), \*p<0.05, \*\*P<0.01.

## DOC2b ノックアウトマウスはインスリン感受性組織で糖取込みの減弱を示す

DOC2b ノックアウトマウスは耐糖能障害を示していたので次にインスリン感受性組織における糖取込みの評価を行った。ヒラメ筋と精巣上体脂肪をそれぞれ単離して観察すると精巣上体脂肪の萎縮を認めたが筋肉に組織学的な違いは認めなかった (図 6a、6d)。DOC2b ノックアウトマウスにおける GLUT4、AKT、リン酸化 AKT、PKC iota の発現は、野生型マウスと同等であった (図 6b、6e、6g)。しかしインスリン刺激性の糖取込みはヒラメ筋、精巣上体脂肪のいずれにおいても有意に減少していた (図 6c、6f)。以上より、DOC2b ノックアウトマウスはインスリンシグナル分子の発現に影響することなくインスリン感受性組織における糖取込みが減弱しているということがわかった。



**図 6. DOC2b ノックアウトマウスでは筋肉および脂肪における糖取込みが減弱する**

- (a) ヒラメ筋切片の H&E 染色. スケールバーは 200 $\mu$ m.
- (b) ヒラメ筋におけるインスリンシグナル分子の発現.
- (c) ヒラメ筋における 2 - デオキシグルコースの取込み.
- (d) 精巣上体脂肪切片の H&E 染色 (左). 脂肪径測定 (右).
- (e) 精巣上体脂肪におけるインスリンシグナル分子の発現.
- (f) 精巣上体脂肪における 2 - デオキシグルコースの取込み.
- (g) 精巣上体脂肪における PKC iota の発現.

\*P<0.05, \*\*P<0.01.

### DOC2b ノックアウトマウスではグルコース刺激によるインスリン分泌が亢進する

DOC2b ノックアウトマウスは、インスリン感受性組織における糖取り込み障害を認めたが、糖負荷試験においては、むしろインスリン分泌が増加しているようであった。そこで DOC2b ノックアウトマウスの膵島からのインスリン分泌を評価するために、in vivo でグルコース刺激によるインスリン分泌の評価をおこなった。DOC2b ノックアウトマウスでは灌流した膵臓におけるグルコース刺激によるインスリン分泌は7分後から有意に亢進した（図 7a）。さらに、インスリン免疫染色をおこなうと膵β細胞の肥大を認めた（図 7b）。この原因を明らかにするために、膵島における DOC2 のアイソフォームの発現を RT-PCR 法で確認したところ、DOC2b ノックアウトマウスでは、DOC2a の発現が増加していた（図 7c）。

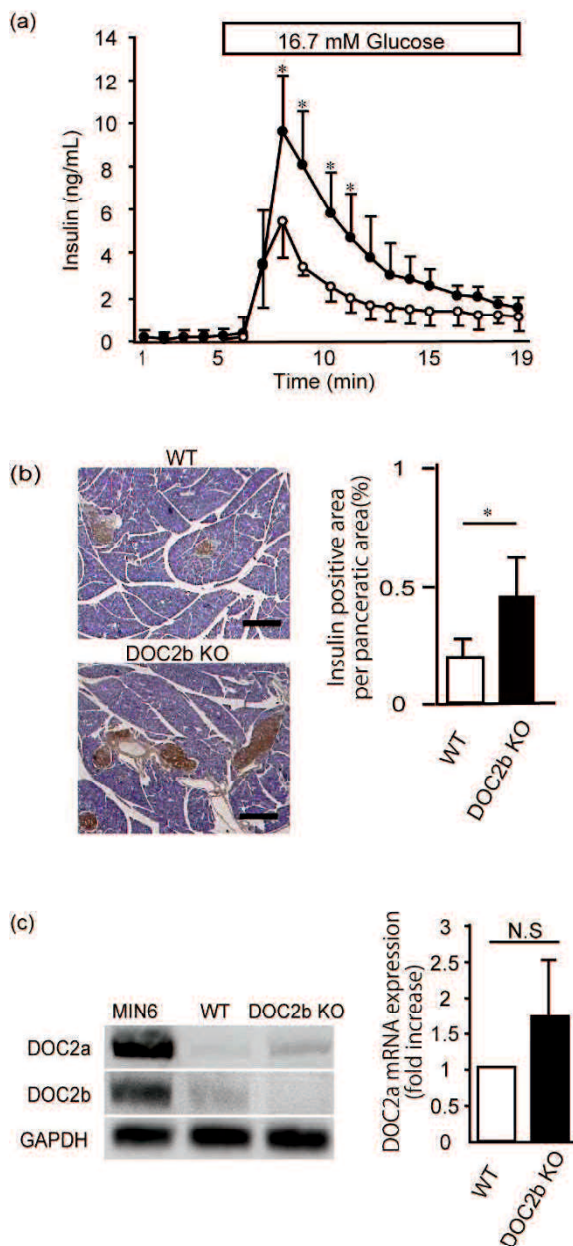


図 7. DOC2b ノックアウトマウスは膵β細胞肥大とインスリン分泌亢進を認める

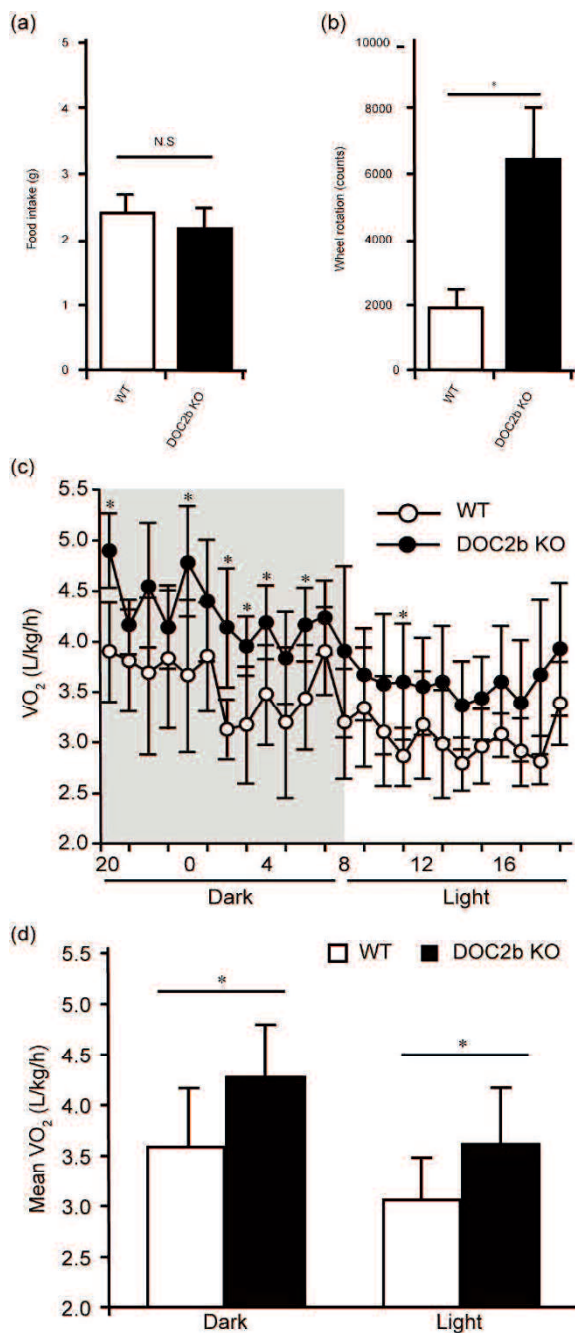
(a) 膵灌流実験. 16.7mM のグルコースに対するインスリン分泌濃度を測定した.

(b) 膵β細胞のインスリン免疫染色 (左) スケールバーは 300μm を示す. インスリン陽性面積の割合を比較した (右)

(c) RT-PCR;膵島における DOC2a の mRNA 発現を WT,DOC2b KO マウスで比較した. \*P<0.05.

**DOC2b ノックアウトマウスではエネルギー消費が亢進していた**

DOC2b ノックアウトマウスは、摂餌量は野生型と同等であったが (図 8a)、活動量は増加していた (図 8b)。さらに酸素消費量も有意に増加していた (図 8C-D)。



**図 8. DOC2b ノックアウトマウスでは活動量と酸素消費量は増加していた**

(a) 摂餌量 (b) 走行輪の 24 時間の回転数により活動量を評価した.

(c) 酸素消費量の計測は 120 分間おこなった. (d) 平均酸素消費量. (n=5)

\*p<0.05.

## 5. 考察

我々は以前に、DOC2bが培養脂肪細胞においてGLUT4小胞の膜融合過程を促進していることを示していた (22). 興味深いことに、DOC2bはインスリン刺激により速やかに細胞膜上へと移動し、細胞内カルシウム濃度依存性に膜融合過程を開始した. しかし、インスリン刺激がDOC2bを調節する正確な機序については不明であった. DOC2bはカルシウムセンサーであるシナプトタグミンファミリー蛋白質の1種なので (20)、我々はまず、細胞内カルシウムがDOC2bを制御しているのではないかと仮説をたてた. しかし図2aに示すように、インスリンは細胞内カルシウム濃度を上昇させなかった. イオノマイシンを作用させるとDOC2bのトランスロケーションは障害された (データは示さない). これらの結果から、細胞内カルシウムはDOC2bのプレコンディショニングに必要なではあるが、活性化には別の機序が必要なのではないかと考えた. 次に我々は、DOC2bはMIDドメインのKQISモチーフがリン酸化を受けることで活性化されているのではないかと考えた. この仮説はDOC2bのS34A変異体を用いた実験結果により裏付けされた (図2b). まとめて、DOC2bのトランスロケーションとインスリンシグナルが関連している可能性があり、さらにDOC2bはインスリンに応答してGLUT4小胞の膜融合過程に関わっているのではないかと考えられる.

本研究における重要な知見は、DOC2bの調節因子としてPKC iotaを同定したことである. このセリン/スレオニンキナーゼは脂肪細胞に発現するPKCの1種であり、in vitroでインスリン刺激によりDOC2b-KQIS34モチーフのセリン残基をリン酸化し、DOC2bと相互作用を示していた. PKC iotaのキナーゼ活性を失活させた変異体を用いた実験で、この相互作用が確認できた (図3c). 我々の知見は非定型PKCが脂肪細胞や筋細胞において糖取込みを増強するという過去の報告 (10, 16) と一致するものである. さらにGLUT4小胞が細胞膜上へとトランスロケーションするために、非定型PKC iotaが必要とする報告もある (29). 我々の過去の研究結果にも基づき、インスリン刺激によりPKC iotaが活性化することで、SNARE調節因子であるDOC2bを制御し、それに続いてシンタキシン4と相互作用することでGLUT4小胞の膜融合過程を促進するという機構を提唱する. DOC2bはインスリン応答性糖輸送を調節するPKC iotaの下流に存在する新規エフェクターと考えられる (図9).

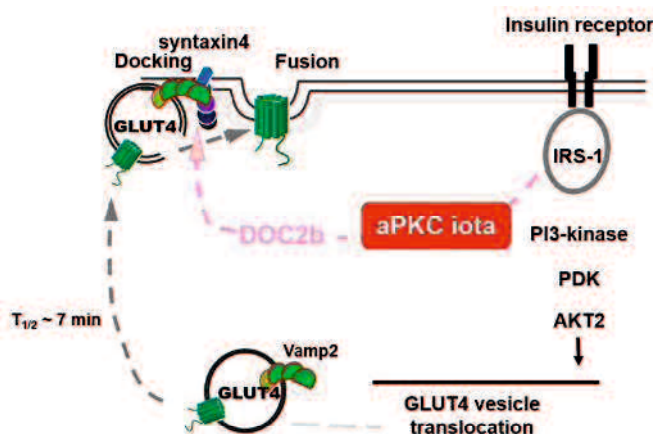


図9. DOC2bはPKC iotaにリン酸化されtranslocationし、GLUT4小胞の膜融合を促進する



2つ目の重要な知見は、生体の糖恒常性維持におけるDOC2bの重要性である。DOC2bはインスリン感受性組織に発現しているとされているので、DOC2b欠失が末梢組織、臓器におけるインスリン抵抗性を生じ、糖代謝の恒常性が損なわれることが予想された。予想通り、DOC2bノックアウトマウスは肝臓を除く骨格筋、脂肪組織といったインスリン感受性組織における糖取込み減弱により、耐糖能障害を示した。さらに筋肉と脂肪組織の重量は減少していた(図4d)。この組織特異性はDOC2bがこれらの組織でSNARE調節因子としてGLUT4小胞の輸送に働いていることで説明できるかもしれない。一方、肝臓ではインスリン作用に小胞輸送が関与する糖取り込み促進は関与しない。この結果は過去の報告と一致する(30)。一方で、我々は糖負荷試験(図5c)、腓灌流実験と腓組織の免疫染色(図7a,b)の結果からDOC2bノックアウトマウスでインスリン分泌が亢進していることを観察した。これらの結果は我々が以前に報告した、MIN6細胞においてDOC2b機能欠損がインスリン第2相分泌を障害するという報告(23)と異なる結果であった。この逆説的な結果について、我々はDOC2bノックアウトマウスにおいて何らかの代償機構が働いたのではないかと考えた。その候補として、膵β細胞と神経細胞にのみ発現するとされているDOC2aに着目した。図7cに示すように、DOC2bノックアウトマウスの膵β細胞においてDOC2a発現はわずかに増加していたが有意差は認めなかった(図7c)。しかし、モデルマウスにおいてDOC2bがインスリン分泌に果たす役割については議論の余地がある。あるグループはDOC2bノックアウトマウスではインスリン分泌が減少した(30)としているが、他グループはDOC2a/DOC2bのダブルノックアウトマウスではインスリン分泌は極めて減弱したが、DOC2bノックアウトマウスではあまり影響を受けなかったとしている(31)。これら異なる結果についてはまだ今後検討が必要だが、インスリン分泌におけるDOC2b欠損の影響は少ないか、またはDOC2aにより代償されている可能性があることが示唆される。さらにDOC2b欠失はインスリン分泌への影響とは別に、末梢組織で明らかなインスリン抵抗性を示し、代償的な膵β細胞の増殖とインスリン分泌全体の増加をもたらしている。

さらに、DOC2bの中樞神経系への影響も興味深いものであった。DOC2bノックアウトマウスでは活動量の増加とエネルギー消費の亢進を認めた。このことは、DOC2bが中樞神経系においてもさらなる役割を果たしている可能性を示唆している。これらの結果は、最近の脳科学に焦点をあてた多くの研究結果と一致する。たとえば、DOC2bはカルシウムセンサー蛋白質として働き、ニューロンにおいて自発的なシナプス小胞融合(32)と非同期エキソサイトーシス(33)を引き起こすということが報告されている。これらの結果は、ヒトにおける糖代謝や肥満において、中樞神経機能が重要であることを示唆している。

## 6. 結語

以上の研究結果から以下の2つの結論に至った。第1にDOC2bは個体の糖代謝において、重要な役割を果たしているということ。第2にPKC iotaがインスリン刺激に応じてDOC2bの

トランスロケーション、GLUT4小胞の膜融合を制御しているということである。

PKC  $\iota$  が DOC2bを制御するこの機構は、糖輸送の増強に関わるインスリンシグナル伝達における新たな経路といえるかもしれない。

## 7. 謝辞

本稿を終えるにあたり丁寧に御指導くださいました谷澤幸生教授に深く感謝致します。また共同研究者として御指導および御協力下さいました、江本政広先生、福田尚文先生、松井久未子先生、近藤学先生、そしてDOC2b ノックアウトマウスを供与くださった徳島大学の佐々木卓也教授、坂根亜由子准教授に厚く御礼申し上げます。また常日頃、研究のサポートをくださった第3内科の研究室の皆様にも深く御礼を申し上げます。

## 8. 参考文献

1. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004; 47: 170-184.
2. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
3. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 267-277.
4. Huang S, Czech MP. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab* 2007; 5: 237-252.
5. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH Kinase signal transduction. *Nature* 1995; 376: 599-602.
6. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378: 785-789.
7. Franke TF, Yang SI, Chan TO, *et al.* The protein kinase encoded by the Akt protooncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995; 81: 727-736.
8. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, *et al.* Activation of protein kinase C ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\zeta$ ) by insulin in 3T3-L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC- $\zeta$  in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272: 2251-2558.
9. Standaert ML, Galloway L, Karnam P, *et al.* Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272: 30075-30082.
10. Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, *et al.* Requirement of atypical protein kinase c lambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes.

- Mol Cell Biol* 1998; 18: 6971-6982.
11. Klarlund JK, Guiherme A, Holik JJ, *et al.* Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 1997; 275: 1927-1930.
  12. Li J, Malaby AW, Famulok M, *et al.* Grp1 plays a Key Role in Linking Insulin Signaling to Glut4 Recycling. *Dev cell* 2012; 22: 1286-1298.
  13. Fuss B, Becker T, Zinke I, *et al.* The cytohesin Steppke is essential for insulin signaling in Drosophila. *Nature* 2006; 444: 945-948.
  14. Musashi M, Ota S, Shiroshita N. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol* 2000; 72: 12-19.
  15. Uberall F, Hellbert K, Kampfer S, *et al.* Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in Res-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 1999; 144: 413-425.
  16. Farese RV, Sajan MP, Yang H, *et al.* Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J Clin Invest* 2007; 117: 2289-2301.
  17. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, *et al.* Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 373-383.
  18. Sajan MP, Jurzak MJ, Samuels VT, *et al.* Impairment of insulin-stimulated glucose transport and ERK activation by adipocyte-specific knockout of PKC- $\lambda$  produce a phenotype characterized by diminished adiposity and enhanced insulin suppression of hepatic gluconeogenesis. *Adipocyte* 2014; 3: 19-29.
  19. Sakaguchi G, Orita S, Maeda M, *et al.* Molecular cloning of an isoform of Doc2 having two C2-like domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 1053-1061.
  20. Kojima T, Fukuda M, Aruga J, *et al.* Calcium-dependent phospholipid binding to the C2A domain of ubiquitous form of double C2 protein (Doc2 beta). *J Biochem* 1996; 120: 671-676.
  21. Groffen AJ, Brain EC, Dudok JJ, *et al.* Ca<sup>2+</sup>-induced recruitment of the secretory vesicle protein DOC2B to the target membrane. *J Biol Chem* 2004; 279: 23740-23747.
  22. Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, *et al.* DOC2B: a novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes. *Diabetes* 2009; 58: 377-384.
  23. Miyazaki M, Emoto M, Fukuda N, *et al.* DOC2b is a SNARE regulator of glucose stimulated delayed insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 384: 461-465.

24. Miki T, Minami K, Shinozaki H, *et al.* Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes* 2005; 54: 1056-1063.
25. Kelly KL, Jude T, Corkey BE. Cytosolic Free Calcium in Adipocytes. Disinct mechanisms of regulation and eccets on insulin action. *J Biol Chem* 1989; 264: 12754-12757.
26. Peri S, Navarro JD, Amanchy R, *et al.* Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems bilology in human. *Genome Res* 2003; 13: 2363-2371.
27. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, *et al.* Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- $\zeta$  and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 1997; 138: 4721-4731.
28. Sajan MP, Rivas J, Li P, *et al.* Repletion of atypical protein kinase C following RNA interference mediated depletion restores insulin stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 2006; 281: 17466-17472
29. Imamura T, Vollenweider P, Egawa K, *et al.* G alpha-q/11 protein plays a key role in insulin-induced glucose transport in 3T3L-1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6765-6774.
30. Ramalingam L, Oh E, Yoder SM, *et al.* Doc2b is a key effector of insulin secretion and skeltal muscle insulin sensitivity. *Diabetes* 2012; 61: 2424-2432.
31. Li J, Cantley J, Burchfield JG, *et al.* DOC2 isoforms play dual roles in insulin secretion and insulin-stimulated glucose uptake. *Diabetologia* 2014; 57: 2173-2182.
32. Groffen AJ, Martense S, Diez Arazola R, *et al.* Doc2 is a High-Affinity Ca<sup>2+</sup> Sensor for Spontaneous Neurotransmitter Release. *Science* 2010; 327: 1614-1618.
33. Yao J, Gaffaney JD, Kwon SE, *et al.* Doc2 is a Ca<sup>2+</sup> sensor for asynchronous neurotransmitter release. *Cell* 2011; 147: 666-677.