

인슐린에 의한 포도당운반체의 Translocation 기전에 관한 연구*

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

하 종 식

= Abstract =

Study on the Mechanism of the Translocation of Glucose Transporter by Insulin

Jong-Sik Hah

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Insulin stimulates glucose transport in muscle cell and adipocyte via the rapid redistribution of GLUT4 glucose transporters from intracellular membrane compartments to the cell surface. The mechanism that insulin triggers the translocation of glucose transporters is not known yet whether it is due to the structural differences among glucose transporters or there is a cell specific targeting/translocation apparatus in insulin-sensitive cells.

This study was planned to examine this question by studying insulin effect on the glucose transport rate at adipocyte and hepatocyte fused with GLUT1 vesicle, respectively.

The results showed that treatment of 37nM insulin increased the transport rate of 3-O-methylglucose by 3.8-fold at adipocyte fused with GLUT1 but increased only by 1.4-fold at hepatocyte fused with GLUT1.

Therefore, it is suggested that insulin sensitive cell has a cell-specific targeting/translocation machinery which is triggered by insulin-insulin receptor interaction but insulin sensitivity may not dependent on isoform(structural)-specific manner.

KEY WORDS : Insulin · Glucose transporter · GLUT1 · GLUT4 · Translocation · Cell fusion · Polyethyleneglycol · Fluorescence · Rhodamine.

서 론

포도당은 대부분의 포유동물이 필요로 하는 필수 영양소로서 이들 세포막에 존재하는 포도당운반체 (glucose transporter, GLUT) 단백질에 의하여 촉진적

확산(facilitated diffusion) 과정으로 세포내로 운반된다¹⁾²⁾. 포도당운반체의 종류는 5가지가 있다고 알려졌다³⁾⁴⁾. 이들 5 가지 운반체 단백질 isoforms은 각각 조직내의 분포, 포도당 이동의 역학적 특성 및 조절양상에서 구별된다. 내피세포, 간세포(hepatocyte) 및 뇌실질세포(pa-

*이 논문은 1990년도 한국과학재단연구비(KOSEF 901-0408-011-2)의 지원에 의하여 이루어졌음.

renchymal cell)들과 같은 대부분의 세포에서는 포도당의 대사를 위한 포도당 이동이 주위 혈중농도에 비례하며 급성조절 기전을 필요로 하지 않는다. 이들세포에 있는 포도당운반체 즉 GLUT1, GLUT2 및 GLUT3등은 구조적으로 형질막에 존재하고 있으며 포도당의 이동은 대부분 순환혈중내 포도당 농도에 의해서 결정된다. 한편 근육(muscle)이나 지방(fat) 세포는 포도당의 이동이 인슐린과 같은 조절인자에 대하여 수분내에 반응하여 급성으로 조절되는 포도당 이동계를 가지고 있다.⁵⁾⁶⁾⁷⁾ 근육세포(muscle cell)와 지방세포(adipocyte)에서의 포도당 이동조절은 이들 세포내에 있는 포도당운반체들의 세포내 이동에 의해서 이루어지는데⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ 인슐린의 영향이 없는 기초 상태에서는 포도당운반체의 대부분이 trans-Golgi reticulum과 같은 tubulo-vesicular 구조내에 저장되어 있으나 인슐린에 의해서 자극을 받은 후에는 포도당운반체가 이들 저장소로부터 exocytosis가 일어나 세포막 표면에 그 숫자가 증가되므로 포도당의 이동이 증가된다. 이와같이 포도당을 세포내부로 급속히 이동시킬 수 있는 운반체 단백질의 translocation 기전은 근육세포나 지방세포와의 다른 세포에서는 볼 수 없는 현상이다. 그러나 이러한 translocation 조절이 운반체단백질 자체의 구조적인 차이에 따라 아미노산 서열의 일부에 인슐린의 정보를 인식하는 특수한 부위가 있어 이루어지는 것인지 아니면 인슐린의 영향을 받는 조직에서만 세포내부에 특수한 인자 내지 기구가 있어서 인슐린의 정보에 의하여 translocation이 연쇄적으로 일어난 결과인지는 아직 확실치 않 알려져 있지 않다.

본 연구는 이를 규명하기 위한 실험의 일부로 인슐린에 대한 감수성이 없는 GLUT1을 감수성이 있는 지방세포와 감수성이 없는 간세포에 융합시킨 후 인슐린의 영향을 분석하여 GLUT1 자체에 인슐린의 정보를 인식하는 구조가 있는지를 밝히고자 하였다.

실험방법

1. 인체적혈구막 포도당운반체(Human Erythrocyte Glucose Transporter, HEGT, GLUT1)의 분리

냉동된 EDTA-treated ghost를 4°C에서 녹인후 38,000rpm(Beckman, 50.2 rotor)으로 30분간 원심분리

하여 침전물(pack ghost)을 얻었다. 여기에 1.34% octylglucoside, 2mM DTT와 50mM Tris(pH7.4) 혼합 용액을 가하여 재부유시킨 후 저어주면서 20분간 얼음속에 세워 두었다. 이때 부유액은 거의 투명한 밀짚색깔(straw color)을 띠운다. 이 용액을 38,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 같은 원심력하에서 1시간 더 원심분리하고 상등액을 취하였다. 이 용액을 Kasahara & Hinkle 방법¹¹⁾에 따라 DEAE-52 column chromatography를 통하여 포도당운반체(band 4.5)만을 선택적으로 분리하였다. DEAE-52 column은 사용하기 전 1% octylglucoside, 2mM DTT와 50mM Tris(pH7.4) 혼합액으로 미리 평형시킨 후 냉장고에 보관해 두었다가 사용하였다. Chromatography의 유속은 약 15ml/hour로 하였으며 용출액은 모아서 100mM NaCl과 1mM EDTA를 첨가한 후 투석완충액(1mM EDTA, 100mM NaCl, 50mM Tris, pH7.4)에 투석시키되 1시간 후에 투석완충액을 한번 갈아주고 그 다음 2시간 후에 투석완충액을 한번 더 갈아준 후 3시간 후에 들어내어 약 2배(v/v)의 투석완충액으로 희석시킨 후 38,000rpm으로 1시간 원심분리하여 침전물(GLUT1)을 얻었다.

2. 지방세포의 분리

용성의 Sprague-Dawley 쥐를 경추이골로 희생시킨 후 epididymal 지방조직을 떼어내어 HEPES-buffered Krebs-Ringer solution(KRH)에 담그고 Marz등의 방법¹²⁾으로 지방세포를 분리하였다. 즉, 조직을 가위로 잘게 썰어 이를 0.5mg/ml의 collagenase(Worthington, Type 1)와 2% 우혈청알부민(bovine serum albumin) 및 2mM D-glucose가 있는 37°C의 용액에서 30~45분 동안 천천히 흔들어 주면서 결합조직을 용해시켰다. 이를 나일론 그물을 통하여 여과하고 유리된 지방세포를 1% 우혈청알부민 및 1mM D-glucose를 함유한 KRH 용액으로 3~4회 씻은 후 30~40% packed cell을 만들어 사용할때까지 37°C에 보관하였다.

3. 간세포의 분리

용성의 Sprague-Dawley 쥐를 ether로 전마취시키고 Nembutal을 8mg/100g of weight되게 복부에 주사하여 마취시킨 후 Ciaraldi등의 방법¹³⁾으로 간세포를 분리하였다. 즉, Ca⁺⁺-free EGTA(1mM)가 함유된 Hank's buffer를 문맥을 통하여 관류시키고 간이 회계되면 Ca⁺⁺과 collagenase(100mg/150ml)를 함유한

Hank's buffer를 30분간 관류시키면서 결합조직을 용해시켰다. 그후 간을 떼어내어 collagenase가 있는 37°C의 용액에 담고 10분간 더 용해시킨 후 나일론 그물로 여과하고 즉시 4°C에서 원심분리(200xg, 4분)하여 Hank's buffer로 supernatant가 맑아질 때까지 collagenase를 세척하고 cytocrit를 측정한 후 사용할 때까지 냉장고에 보관하였다.

4. HEGT(GLUT1) Vesicles과 지방세포의 융합

HEGT를 얼음물 속에서 약 2분간 sonication시킨 후 50~60%로 packed시킨 지방세포와 잘 혼합하고 Boni등의 방법¹⁴⁾으로 polyethyleneglycol(PEG)을 이용하여 vesicles과 cell의 융합을 시도하였다.

PEG(MW 8,000)의 농도는 10%로 하고 PEG를 가한 후 2~3분간 세워두어 융합을 일으키고 KRH 용액으로 희석시키면 세포층이 뜨게 되는데 이를 수집하여 KRH 용액으로 3~4회 세척한 후 사용하였다.

융합이 일어났는지 확인하기 위하여 rhodamine으로 표지된 인지질을 함유한 HEGT vesicle이 세포표면에 부착된 것을 형광현미경으로 관찰하였다.

5. HEGT Vesicles과 간세포의 융합

HEGT를 50%로 packed시킨 간세포와 잘 혼합하고 지방세포와 마찬가지로 Boni등의 방법¹⁴⁾으로 PEG (MW 8,000)을 이용하여 HEGT vesicles과 간세포의 융합을 시도하였다. PEG 농도는 지방세포에서보다 약간 높은 20%로 하였다. PEG를 가한 후 약 5분간 실온에 세워 두었다가 KRH 용액으로 희석시킨 후 원심분리 방법으로 3~4회 세척하고 사용할때까지 냉장고에 보관하였다.

HEGT vesicle이 hepatocyte에 융합이 되었는지를 지방세포에서의 같이 형광 현미경으로 관찰하였다.

6. 융합세포의 형광현미경적 관찰

HEGT vesicle에 형광물질 octadecyl rhodamine B (Molecular probe, Eugene, OR, USA)를 부착시키기 위하여 Hoekstra등의 방법¹⁵⁾을 적용하였다. 이 형광 물질을 공급시 chloroform : methanol(1 : 1) 혼합 용액에 녹아있는 것을 질소기체로 건조시키고 소량의 ethanol에 다시 용해시킨 후 약 10~15 μ l를 HEGT vesicle 용액(2.5mg/ml KRH)에 주입하였다. 최종 rho-

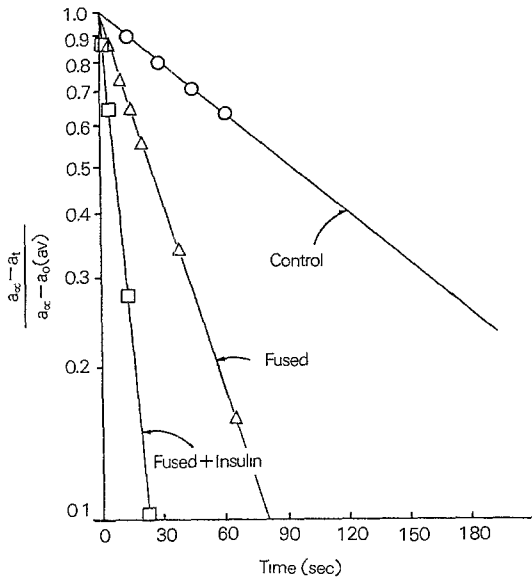


Fig. 1. The effect of insulin on the equilibrium exchange influx of 3-O-methylglucose. Control represents a normal flux rate, Fused represents a flux rate of adipocyte fused with HEGT(GLUT1) and Fused+Insulin represents a flux rate of adipocyte fused with HEGT in the presence of 37nM insulin.

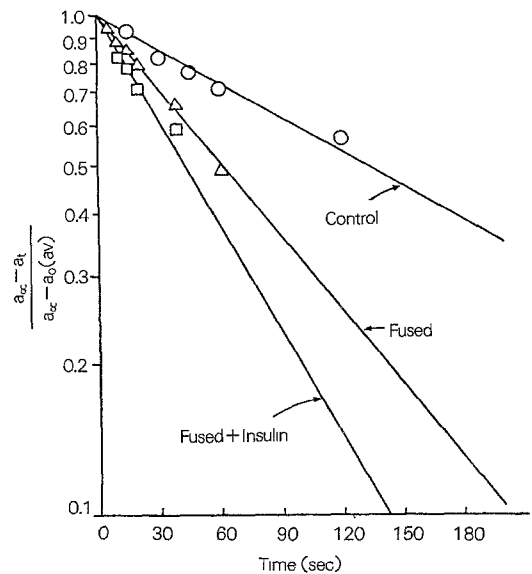


Fig. 2. The effect of insulin on the equilibrium exchange influx of 3-O-methylglucose. Control represents a normal flux rate, Fused represents a flux rate of hepatocyte fused with HEGT(GLUT1) and Fused+Insulin represents a flux rate of hepatocyte fused with HEGT in the presence of 37nM insulin.

damine B와 ethanol의 양은 각각 10~15 μ l과 1~1.5 %였다.

7. 3-O-Methyl Glucose 이동 측정

지방세포와 간세포 공히 세포융합전과 세포융합후 포도당 흡수속도를 측정하기 위하여 Whitesell & Gliemann의 방법¹⁶⁾으로 3-0-methyl glucose의 이동을 측정하였다.

결 과

1. 인슐린이 HEGT Vesicles과 융합된 지방세포의 포도당 이동에 미치는 영향

HEGT vesicles을 실험방법에서 기술한 바와 같이 지방세포에 융합시킨후 포도당 이동능력을 측정하기 위하여 3-0-methylglucose의 이동을 측정하였다. 아무런 처치를 하지 않은 지방세포에서 $t_{1/2}$ 는 약 95초였고 HEGT vesicles을 융합한 후에는 $t_{1/2}$ 가 약 23.5초로 이동속도가 약 3.5배 증가하였으며 인슐린을

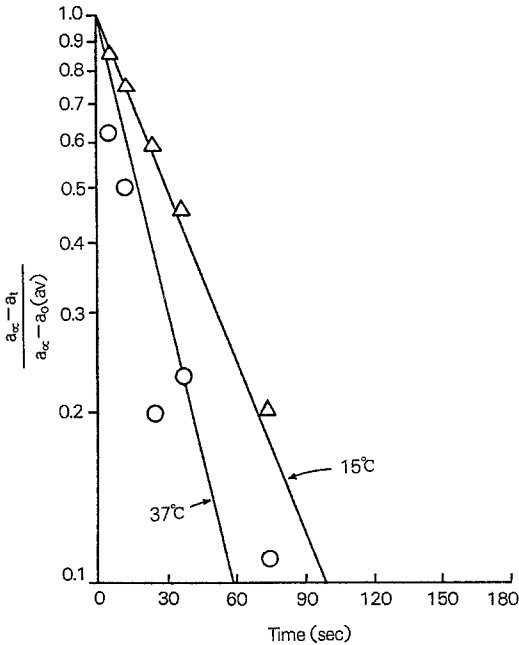


Fig. 3. Temperature effect on the equilibrium exchange influx of 3-O-methylglucose at hepatocytes fused with HEGT vesicles. The fused hepatocytes were incubated for various time intervals at 15°C and 37°C in the presence of 5mM 3-O-methylglucose. Glucose uptake rate was measured by the equilibrium exchange method.

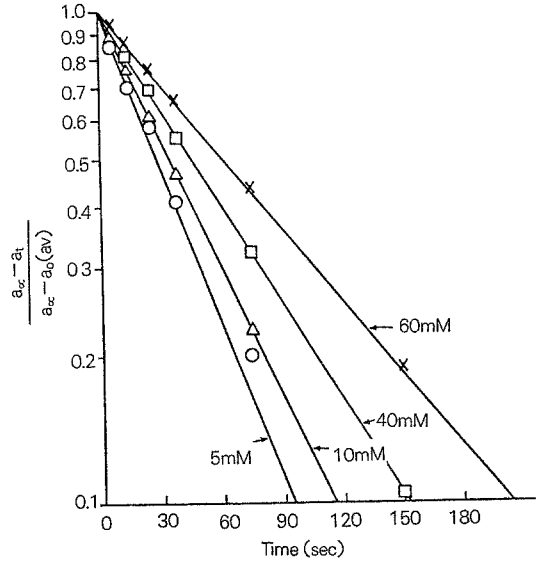


Fig. 4. The effect of substrate concentrations on the equilibrium exchange influx of 3-O-methylglucose at hepatocytes fused with HEGT vesicles. The fused hepatocytes were incubated for various time intervals at 37°C in the presence of 5mM, 10mM, 40mM and 60mM 3-O-methylglucose. Glucose uptake rate was measured by the equilibrium exchange method.

투여한 후에는 $t_{1/2}$ 가 약 8초로서 이동속도가 약 12배 증가하였다(Fig. 1).

2. 인슐린이 HEGT Vesicles과 융합된 간세포의 포도당 이동에 미치는 영향

HEGT vesicles의 융합이 간세포의 포도당 이동에 미치는 영향을 보기 위하여 지방세포와 마찬가지로 HEGT vesicles을 간세포에 융합시킨 후에 포도당의 이동을 측정한 결과 이동속도가 약 2배 증가하였고 HEGT를 간세포에 융합시킨 후 인슐린이 포도당 이동에 미치는 영향을 측정한 결과 거의 영향이 없었다(Fig. 2).

3. 온도 및 기질의 농도가 융합세포의 포도당 이동에 미치는 영향

융합세포에서 포도당의 이동측정 방법이 역학적인 분석에 합당하지를 검정하기 위하여 온도와 기질의 농도가 간세포에서의 포도당이동에 미치는 영향을 측정하였다. 실험결과 15°C에서 측정한 이동속도에 비하여 37°C에서 약 1.5배 증가하였고(Fig. 3), 기질의 농도가 증가할수록 이동속도가 감소하는 전형적인 능동적 이동현상을 보였다(Fig. 4).

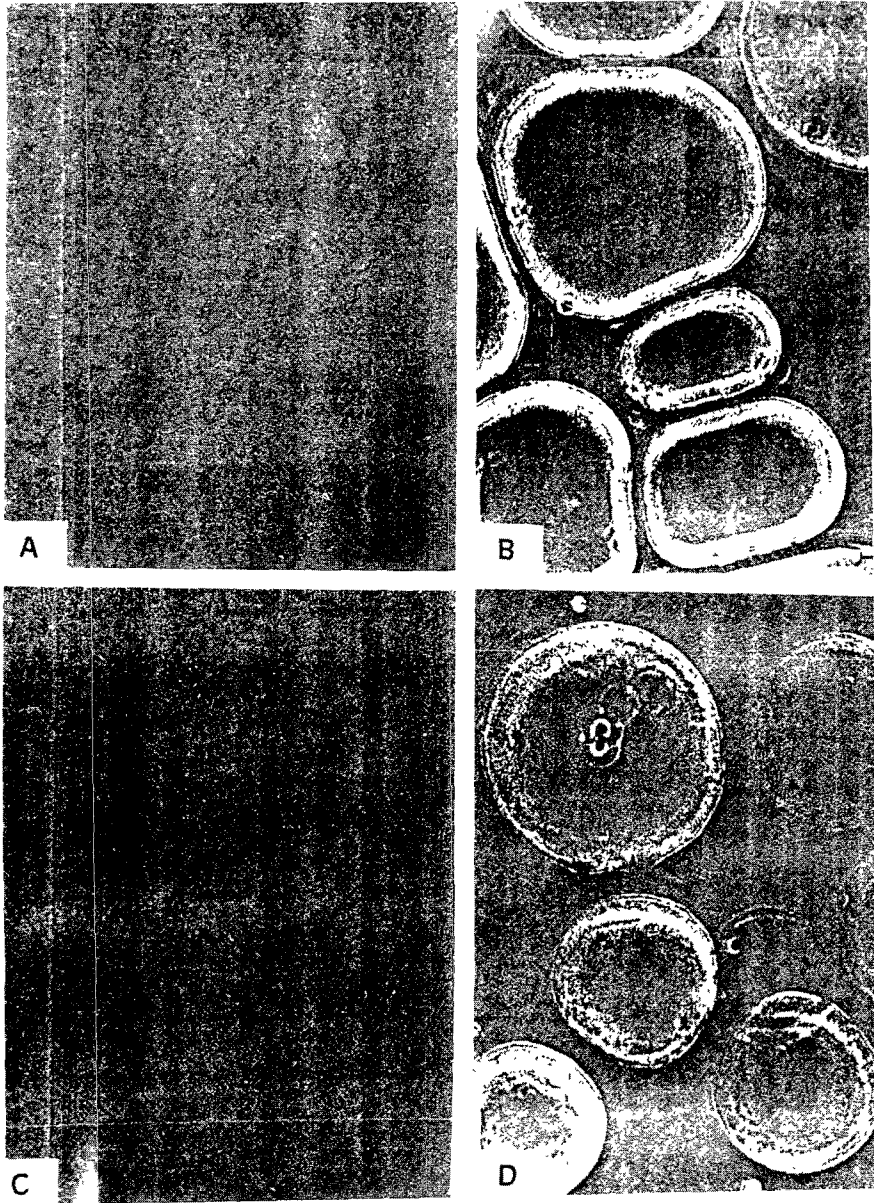


Fig. 5. Fluorescence microscopy of nonfused adipocytes(A), fused adipocytes(B), nonfused hepatocytes(C) and fused hepatocytes(D). Rat adipocytes and hepatocytes were mixed with rhodamine-incorporated HEGT and incubated without(A, C) and with(B, D) 10% PEG 8,000. Bar represents 10 μ m.

4. HEGT Vesicles과 융합된 세포의 현미경적 소견

HEGT vesicles과 지방세포 및 간세포의 융합이 이루어졌는지를 형태학적으로 관찰하기 위하여 HEGT vesicles의 인지질에 rhodamine을 표지하고 HEGT vesicles과 세포를 융합시킨 후 형광현미경으로 관찰한 결과 형광이 세포의 표면에 비교적 균등히 분포함을

보임으로서 융합이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 5).

고찰

전 실험¹⁷⁾¹⁸⁾에서 인슐린을 처리하지 않은 지방세포와 인슐린 37nM을 30분간 처리한 지방세포로부터 각각 세포질내의 각 미세구조의 분획으로 분리한 후

plasma membrane(PM)과 low density microsome(LDM)에서 GLUT1의 항체인 64C7과 GLUT4의 항체인 1F8으로 immunoblot한 결과 인슐린은 PM에 GLUT4를 증가시키고 LDM에 감소시켰으나 GLUT1에는 영향을 미치지 않았다¹⁷⁾. 간세포를 인슐린으로 처리한 군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 세포내 미세구조의 분획으로 분리한 후 GLUT1과 GLUT2 항체로 immunoblot한 결과 대부분의 GLUT2는 PM에 있는 것으로 밝혀졌으며, 인슐린의 투여는 GLUT2의 분포변동에 영향을 미치지 않았다¹⁸⁾. 또한 인슐린의 수용체가 있음에도 불구하고 포도당의 이동이 인슐린의 영향을 받지 않는 것으로 알려진 HepG₂ 세포를 세포내 미세구조로 분리한 후 GLUT1과 GLUT2항체로 immunoblot한 결과 인슐린은 GLUT1과 GLUT2 분포변동에 영향을 미치지 않았다¹⁸⁾.

이상의 실험결과는 인슐린이 포도당운반체를 translocation시키기 위해서는 인슐린이 수용체에 결합하여 발생하는 정보를 인식할 수 있는 부위가 포도당운반체 자체에 있든지 인슐린의 정보를 받아 포도당운반체를 이동시킬 수 있는 기구가 세포내부에 있어야 함을 암시한다. 따라서 본연구에서는 인슐린의 감수성을 결정하는 인자가 포도당운반체 자체에 있는 것인지를 밝히기 위하여 인슐린의 감수성이 없는 GLUT1을 분리하여 지방세포에 융합시키고 인슐린의 영향을 관찰하였다. 인체적혈구막으로 부터 DEAE-52크로마토그래피 방법으로 분리한 GLUT1(HEGT)은 90% 이상의 순수성을 보였으며 vesicles의 형태로 존재하였다. GLUT1 vesicles을 지방세포와 간세포에 PEG를 이용하여 융합시키고 인슐린이 있을때와 없을때 포도당의 흡수속도를 측정한 결과 지방세포에서는 융합시키지 않은 대조군의 흡수속도에 비하여 융합 후 흡수속도가 더욱 증가되었고, 간세포에서는 거의 영향이 없었다.

즉 인슐린에 영향을 받지 않는 GLUT1 vesicles을 지방세포에 융합시킨 후 융합된 세포에서 인슐린에 의하여 포도당 이동이 증가된 것은 지방세포 내부에 있는 어떤 기구에 의하여 융합된 GLUT1 단백질이 세포내로부터 외부로 translocation되었음을 보이는 것으로서 이 결과는 인슐린 감수성을 결정하는 인자가 GLUT 자체의 특성보다는 세포내부에 존재하는 기구일 가능성을 시사한다고 할 수 있다. 그러나 이러한 단백질의 이동이 세포내부에서 어떤 과정을 거치는

지는 아직 알 수 없다. 포도당운반체 단백질이 이동하기 위해서는 세포내부로부터 세포막으로의 exocytosis, 세포막으로 부터 내부로의 endocytosis 기전이 공존할 것으로 보이며 여기에는 아마도 clathrin이나 assembly protein(AP)등과 같은 수송도구가 관여할 것으로 보인다.

결 론

인슐린에 의한 포도당운반체의 translocation 기전을 이해하기 위해서 인슐린에 포도당이동이 영향을 받지 않는 GLUT1 vesicles을 인체적혈구막으로 부터 분리하고 이를 포도당 이동이 인슐린에 영향을 받는 지방세포와 인슐린에 영향을 받지 않는 간세포에 각각 융합을 시킨 후 인슐린을 투여하기 전후에 융합된 세포에서 포도당 이동을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) GLUT1 vesicles과 지방세포 및 간세포는 PEG 8,000에 의하여 융합이 가능함을 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

2) GLUT1 vesicles를 지방세포에 융합시킨 후 포도당 이동속도가 약 3.5배 증가하였고 융합된 지방세포에서 인슐린에 의하여 이동속도가 약 3.8배 증가하였다.

3) GLUT1 vesicles을 간세포에 융합시킨 후 포도당 이동속도가 약 2배 증가하였고 융합된 간세포에서는 인슐린에 의하여 이동속도가 약 1.4배 증가하였다.

결론적으로 인슐린에 영향을 받지 않는 GLUT1 vesicles을 지방세포에 융합시킨 후 융합된 세포에서 인슐린에 의하여 포도당 이동이 3.8배 이상 증가되었으나 간세포에서는 인슐린의 영향이 거의 없으므로 보아 인슐린의 감수성을 결정하는 인자는 포도당운반체 자체보다는 세포내부에 존재하는 어떤 기구일 가능성이 있음을 시사한다.

References

- 1) Wheeler TJ & Hinkle PC : *The glucose transporter of mammalian cells. Ann Rev Physiol* 1985 : 47 : 503-517
- 2) Baly DL & Horuk R : *The biology and biochemistry of the glucose transporter. Biochim Biophys Acta* 1988 : 947 : 571-590
- 3) Gould GW & Bell GI : *Facilitative glucose transpor-*

- ters : An expanding family. *Trends Biochem Sci* 1990 : 15 : 18-23
- 4) Mueckler M : Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes* 1990 : 39 : 6-11
 - 5) Cushman SW & Wardzala LJ : Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1980 : 255 : 4758-4762
 - 6) Suzuki I & Kono T : Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 : 77 : 2542-2545
 - 7) Wardzala LJ & Jeanrenaud B : Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. *J Biol Chem* 1981 : 253 : 4758-4762
 - 8) Blok J, Gibbs EM, Lienhard GE, Slot JW & Geuze HJ : Insulin-induced translocation of glucose transporters from post-Golgi compartments to the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biol* 1988 : 106 : 69-76
 - 9) Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE & James DE : Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter (GLUT4) in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 1991 : 113 : 123-135
 - 10) Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE & Lienhard GE : Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 : 113 : 123-135
 - 11) Kasahara M & Hinkle PC : Reconstitution and purification of the D-glucose from human erythrocytes. *J Biol Chem* 1977 : 252 : 7384-7390
 - 12) Martz A, Mookerjee BK & Jung CY : Insulin and phorbol esters affect the maximum velocity rather than the half-saturation constant of 3-O-methyl glucose transport in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1986 : 261 : 13606-13609
 - 13) Ciaraldi TP, Horuk R & Matthaei S : Biochemical and functional characterization of the liver glucose-transport system : Comparison with the adipocyte glucose-transport system. *Biochem J* 1986 : 240 : 115-123
 - 14) Boni LT, Hah JS, Hui SW, Mukherjee P, Ho JT & Jung CY : Aggregation and fusion of unilamellar vesicles by polyethyleneglycol. *Biochim Biophys Acta* 1984 : 775 : 409-418
 - 15) Hoekstra D, de Boer T, Klappe K & Wilschut J : Fluorescence method for measuring the kinetics of the fusion between biological membranes. *Biochemistry* 1984 : 23 : 5675-5681
 - 16) Whitesell RR & Gliemann J : Kinetic parameters of transport of 3-O-methylglucose and glucose in adipocyte. *J Biol Chem* 1979 : 254 : 5276-5283
 - 17) Jo I, Hah JS, Rampal AL, Chakrabarti R, Paterson ARP, Craik JD, Cass CE, Zobel CR & Jung CY : Transport function and subcellular distribution of purified human erythrocyte glucose transporter reconstituted into rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1992 : 1106 : 45-55
 - 18) Hah JS, Jo I, Chakrabarti R & Jung CY : Demonstration of an insulin-insensitive storage pool of glucose transporters in rat hepatocytes and HepG2 cells. *J Cell Physiol* 1992 : 152 : 56-63