

인슐린에 의한 GLUT4 전위과정에서 Rab Protein 및 Gh Protein의 역할에 관한 연구*

이화여자대학교 의과대학 생리학교실
하종식 · 고영현 · 이지희

= Abstract =

Study on the Roles of Rab and Gh Proteins in Insulin-Induced GLUT4 Translocation Process

Jong Sik Hah · Young Hyun Go · Ji Hee Lee

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Insulin stimulation of glucose transport in adipocytes results from the translocation of vesicles containing the GLUT4 glucose transporter from an intracellular pool to the plasma membrane. In mammalian cells a family of GTP-binding proteins has been implicated in the control of cellular traffic. Thus this study was planned to see whether G-proteins such as Rab, a small molecular mass G-protein and $G\alpha_h$, a large molecular mass G-protein are involved in insulin induced GLUT4 translocation process.

Diabetic rats(Sprague-Dawley, 200 - 250g) were prepared by injection of streptozotocin (60mg/kg, IP) and treated with or without insulin(20U/rat) for 4 weeks. The purpose of the study is to elucidate a possible functional relationship between G-protein and the insulin-responsive GLUT4 translocation by immunoblotting method from the subcellular fractions of adipocytes of epididymal tissues.

As results Rab4 protein was coexisted in the membranes of GLUT4 immunoprecipitates of adipocyte total homogenates in normal rats, however $G\alpha_h$ could not be detected. The amount of GLUT4 at plasma membrane(PM) obtained from insulin treated rats were increased by 21.35% compared to that of streptozotocin diabetic rats. The increase of Rab4 at the same plasma membranes was negligible. On the other hand, the amounts of GLUT4 and Rab4 at low density microsome(LDM) were decreased by 7.82% and 9.25%, respectively.

These results show that Rab4 is co-localized with GLUT4 in an insulin-responsive intracellular compartment and Rab4 protein plays role in the action of insulin on the GLUT4 translocation but a large molecular G-protein, $G\alpha_h$ is not involved in the GLUT4 translocation process.

KEY WORDS : GLUT4 · Rab4 · $G\alpha_h$ · Translocation · Insulin · Streptozotocin.

*본 논문은 1997년도 이화여자대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

서 론

포도당은 세포내 필수적인 에너지원이며, 포도당의 이동은 생체의 항상성 유지에 중요한 과정이다. 생체조직 세포에서 포도당의 이동은 인슐린에 의해서 증가되는 것(insulin-sensitive glucose transport system)과 인슐린에 영향을 받지 않는 것(insulin-insensitive glucose transport system)으로 구분된다. 인슐린에 대한 반응성이 무엇에 의해 결정되는지는 확실히 밝혀져 있지 않으나 세포막에 존재하는 포도당 운반체 단백질(glucose transporter, GLUT)의 구조와 인슐린에 의한 신호전달체계의 차이에 의한 것이 아닌가 보고 있다¹⁻⁵⁾.

지금까지 알려진 포도당 운반체 단백질의 종류에는 GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT 7의 6종으로 구분되고, 이중 GLUT4에 의한 포도당이동은 인슐린에 의하여 촉진되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 따라서 많은 연구가들이 GLUT4를 대상으로 포도당이동에 관한 인슐린의 영향을 연구하고 인슐린에 의한 포도당이동 촉진기전에 관해서 보고하고 있다⁷⁻¹⁰⁾. 그 일반적인 기전은 인슐린이 수용체에 결합한 후 생성된 signal에 의해서 GLUT4의 전이(translocation)가 일어나 세포막에 GLUT4의 수가 증가되어 포도당의 이동이 증가된다는 전이학설에 기초를 두고 있다¹¹⁾. 즉, 기초상태에서 GLUT4의 대다수는 세포 내부의 small tubulo-vesicular organelle과 같이 세포의 내부에 위치하고¹²⁾ ¹³⁾, 인슐린을 투여하면, GLUT4를 포함한 vesicle들이 세포표면의 세포막으로 이동하여 포도당이동의 V_{max} 를 증가시킴으로 포도당의 이동이 증가된다는 것이다¹⁴⁻¹⁷⁾. 그러나 인슐린이 GLUT4를 포함한 vesicle을 이동시키는 그 분자적 기전은 잘 알려져 있지 않다. 인슐린이 세포막의 수용체와 결합한 후 포도당운반체를 세포내부로부터 세포막으로 어떤 양상으로 이동시키는가? 또한 이 과정에서 세포내부의 contractile protein들이 관여하는가? 등은 아직 밝혀지지 않은 관심사항이다¹⁸⁾ ¹⁹⁾. 여기에는 아마도 signal cascade에 중요한 역할을 하는 GTP-binding protein이 관여하고 있을 것으로 추정되고 있다.

포유동물세포에서는 GTP-결합단백질인 Rab protein이 세포내부의 물질이동을 조절하는 것으로 알려져

왔기 때문에^{20,21)} 본 실험에서는 최근 signal cascade에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 GTP-결합단백질 중 small molecule로서 세포막의 trafficking을 촉진시키는 Rab4와 high molecule로서 세포내부의 inositol phosphate와 Ca^{2+} 를 증가시키는 작용을 하는 $G\alpha_h$ 단백질이 GLUT4의 전이에 어떤 영향을 미치는지를 구명하고자 하였다. 또한 Rab protein은 G-protein의 여러 종류 가운데 작은 분자에 속하며, inactive GDP-bound form으로부터 active GTP-bound form으로 전환되면서 세포막의 trafficking을 촉진시키는 molecular switch로서의 역할을 한다²²⁻²⁷⁾. $G\alpha_h$ 는 high molecular G-protein으로 α_s , α_i (40~45kD)보다 더 큰 74kD의 protein이며, transglutaminase II로 알려져 있어 α -ARs(adrenergic receptor)와 특이적으로 결합하고, phospholipase C(PLC, 69kD)를 활성화시킨다. 이 신호전달경로는 epinephrine과 같은 호르몬이 세포내부의 inositol phosphate와 Ca^{2+} 를 증가시키는 작용을 하는 것과 같은 일반적인 기전과 같다²⁸⁻³⁰⁾.

본 연구에서는 GTP-binding protein중 Rab4와 $G\alpha_h$ 가 지방세포에 존재하는지를 구명하고 인슐린에 의해서 GLUT4 전위의 자극에 어떤 형태로 재분포하게 되는지를 결정하여 GLUT4 전위의 기전을 좀더 자세히 이해하고자 하였다.

실험재료 및 방법

지방세포를 분리하여 plasma membrane(PM), low density microsome(LDM), high density microsome(HDM), nuclei-mitochondria(N/M)로 subfractionation한 후, GLUT4와 Rab 단백질 및 Gh 단백질의 분포를 확인하고 인슐린 투여시 이들 단백질의 분포 변동을 측정하였다.

1. 실험동물

숫컷의 Sprague-Dawley 쥐(200~250g)를 사용했다. 당뇨병을 유발시키기 위하여 60mg/kg의 streptozotocin을 1회 투여하고 3일 후 Accutrend alpha혈당측정기(Boeringer Mannheim Co., Germany)로 혈당을 측정하여 당뇨병이 유발된 것을 확인하였다. Streptozotocin으로 당뇨병이 유발된 쥐를 두군으로

나누어 1군은 당뇨병이 유발된 대조군, 2군은 당뇨병을 유발시킨후 인슐린을 투여한 군으로 나누었다.

2. 항체생산

GLUT4항체를 생산하기 위하여 GLUT4의 C-termini를 구입하여 keyhole limpet hemocyanin(KLH)과 coupled시킨 후 conjugate를 가토에 주입하여 약 6주 후 혈청을 얻고 56°C에서 30분간 가열하여 보체를 비활성화시킨 후 -70°C되는 곳에 보관했다³¹⁾³²⁾. Rab4항체는 Santa Cruz Biotechnology Co.(USA)로부터 구입하였다. G α_h 항체는 중앙대학교 의과대학 백광진 교수로부터 얻어서 사용했다.

3. 지방세포의 분리

숫컷의 Sprague-Dawley 쥐를 경추이골로 희생시키고 epididymal 지방조직을 떼어내어 HEPES-buffered Krebs-Ringer solution(KRH)에 담그고 지방세포를 분리하였다³³⁾. 즉, 조직을 가위로 잘게 썰어 이를 0.5mg/ml의 collagenase(type IV)와 1% bovine serum albumin 및 0.3mM D-glucose가 포함되어 있는 KRH용액으로 37°C에서 30~45분간 천천히 흔들며 주면서 digestion시켰다. 이를 nylon mesh를 통하여 여과하고 유리된 adipocyte를 1% bovine serum albumin 및 0.3mM D-glucose가 포함된 KRH용액으로 2회 씻고, KRH용액으로 2회 더 씻은 후 원심분리하여 지방세포를 수집하였다.

4. 세포내 미세구조물의 분리

지방세포를 STEP buffer(50mM Tris, 1mM EDTA, 250mM sucrose, 1mM PMSF, 100units/ml aprotinin, 1 μ M/L leupeptin, 1 μ M/L pepstatin)³⁴⁾로 재부유시켜서 homogenizer(Tomas Scientific Co. USA)로 2,000rpm에서 10회 상하모드로 세포막을 파괴시키고 원심분리방법으로 세포의 각 미세구조로 분리하였다³⁵⁾.

각 분획은 1,600 \times g의 침전물로부터 percoll/sucrose gradient centrifugation으로 plasma membrane(PM)과 nuclei-mitochondria(N/M)을 분리하고, 상층액을 원심분리하여 40,000 \times g의 침전물을 high density microsome(HDM)으로 하고, 이때의 상층액을 다시 원심분리하여 170,000 \times g의 침전물을 low density microsome(LDM)으로 분리하였다.

5. Immunoprecipitation

10 μ g/ml인슐린을 5분간 처리한 정상쥐의 지방세포를 4°C의 PBS(phosphate buffered saline : NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g/L, pH7.4)로 세척하고 immunoprecipitation buffer(1% Triton X-100, 150mM NaCl, 10mM Tris, pH7.4, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 0.2mM NaVO₄, 0.2mM PMSF, 0.5% NP40)를 첨가해 얼음 위에서 30분간 흔들며 주면서 반응시켰다. Microcentrifuge에서 10,000rpm으로 15분간 원심분리하여 녹지 않은 물질을 제거한 후 total cell lysate를 얻었다.

Lowry 등(1951)의 방법으로 단백질 정량을 하여 약 1mg의 cell lysate에 GLUT4항체, Rab4항체 및 G α_h 항체를 넣어준 후 얼음에서 1시간동안 반응시켰다. 그 다음 10% protein A-separose를 50 μ l넣어 다시 1시간 반응시키고, immunoprecipitation buffer로 3번 세척하였다. Immunoprecipitation buffer를 완전히 제거하고 그 침전물을 Laemmli sample buffer(2% SDS, 10% glycerol, 100mM DTT, 60mM Tris, pH6.8, 0.001% bromophenol blue)로 60°C에서 15분간 녹인 후 원심분리해 상층액을 SDS-PAGE하였다.

6. GLUT4와 Rab 4, G α_h 의 분포 및 이동측정

세포의 각 분획들을 100 μ g씩 10% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동시키고, 이를 nitrocellulose paper로 이동시킨 후³⁶⁾ Ponceau S용액으로 band를 확인하였다. TBS용액으로 탈색시키고 5% milk용액으로 blocking한후 Glut4, Rab4, G α_h 의 항체용액에 4°C에서 4시간동안 incubation시켰다. 다음 2차 항체용액(protein A peroxidase)으로 1시간동안 incubation시킨 후, enhanced chemiluminescence(ECL) detection system으로 가시화하였다. 이를 densitometer로 tracing하여 정량하고 분포 및 이동을 측정하였다.

실험결과

1. GLUT4, Rab4, G α_h 의 분포

Adipocyte에서 GLUT4와 Rab4 및 Gh단백질의 존재유무를 보기 위해서 immunoprecipitation을 실시한 결과, GLUT4는 45kD에서 존재하는 것을 확인할 수 있었고, Rab4는 24kD에서 존재하는 것을 확인할

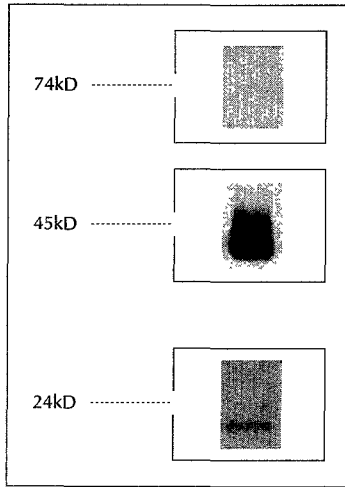


Fig. 1. Immunoblots of GLUT4, Rab4 and G α h proteins at the immunoprecipitates of adipocyte total homogenates. 100 μ g of proteins from homogenates were analyzed by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose paper, and immunoblotted for GLUT4, Rab 4 and G α h proteins.

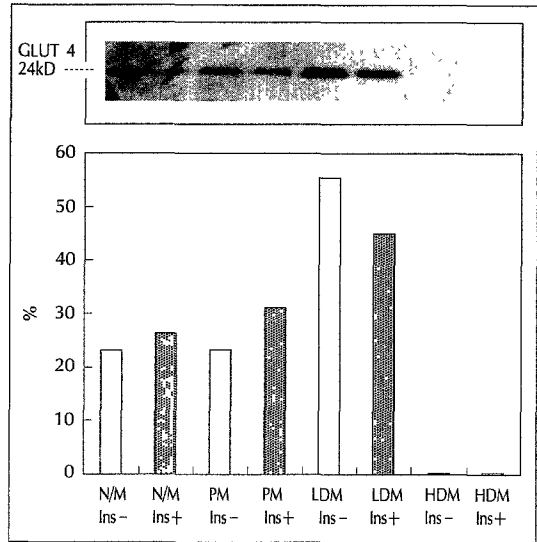


Fig. 3. Effect of insulin on Rab4 distribution in adipocytes. Subcellular fractions obtained from adipocytes of epididymal tissues were analyzed by SDS-PAGE as shown in Fig. 2 and immunoblotted for Rab 4.

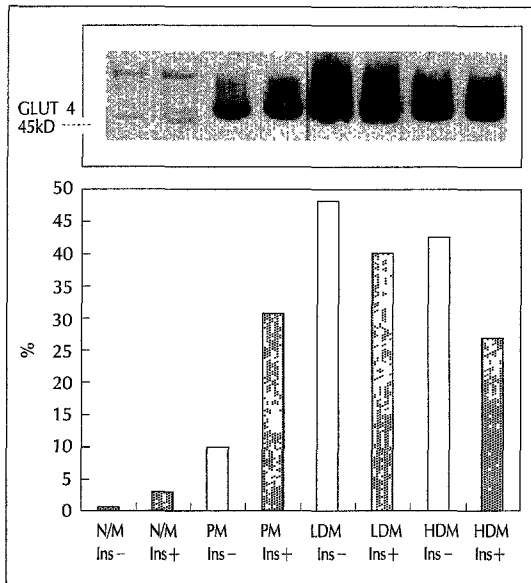


Fig. 2. Effect of insulin on GLUT4 distribution in adipocytes. Rats were induced diabetes mellitus by one shot of streptozotocin(60mg/Kg BW) and treated with(black rod) and without(white rod) insulin(20U/rat) for 4 weeks. After sacrifice subcellular fractions were obtained by differential centrifugation method. Aliquots (100 μ g) of proteins of PM, N/M, HDM and LDM were analyzed by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose paper, and immunoblotted for GLUT4.

수 있었다. 그러나, G α _h는 adipocyte에서 존재하지 않았다(Fig. 1).

2. 인슐린투여시 분포양상의 변동

GLUT4는 당뇨유발군과 당뇨유발후 insulin처리군을 비교할 때, N/M은 2.85%증가를 보였고, PM은 21.35%의 현저한 증가를 보였다. 반면, LDM은 7.82%의 감소를 보였고, HDM은 16.37%의 감소를 보였다(Fig. 2).

Rab4는 당뇨유발군과 당뇨유발후 insulin처리군을 비교할 때, N/M은 1.61%증가를 보이고, PM은 7.6%증가를 보였다. GLUT4에 비해 증가정도가 낮음을 알 수 있다. LDM은 9.25%감소를 보였고, HDM에는 거의 존재하지 않았다(Fig. 3). 즉, GLUT4와 Rab4는 모두 PM에 증가하였고, LDM과 HDM에는 두 단백질 모두 감소하였다. 그러나 GLUT4에 비하여 Rab4는 PM으로의 이동 정도가 대단히 낮았다.

고 찰

인슐린의 주작용은 근육이나 지방조직에서 포도당의 이동을 증가시키는 것이다³⁷⁾³⁸⁾. 이와같은 인슐린의 작용 기전은 포도당을 이동시키는 운반체 단백질(GLUT4)

을 세포내부의 저장소로부터 세포막으로 전이시키는데 있다고 알려졌다¹¹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾. 지방세포에는 포도당운반체 중 GLUT1과 GLUT4가 공존하며, GLUT1은 대부분 세포막에 존재하기 때문에 인슐린의 영향이 거의 없는 반면 GLUT4는 대부분 기초상태에서 세포내부의 trans-Golgi영역에 있는 tubulo-vesicule에 함유되어 있어⁴¹⁾ 인슐린에 의하여 자극을 받으면 대부분 세포막으로 전이가 일어나는 것으로 밝혀졌다. 따라서 GLUT4의 exocytosis가 인슐린의 작용에 중요한 과정으로 생각되고 있다⁴²⁾. 그러나 GLUT4의 전이가 어떤 과정으로 진행되는지에 관해서는 아직 확실히 밝혀지지 않았다.

본 실험결과, 기초상태에서 GLUT4는 세포내부의 low density microsome(LDM)과 high density microsome(HDM)에 존재하다가 인슐린의 자극에 의해 세포막(PM)으로 이동하여 그 결과 세포막의 포도당운반체의 수가 증가됨이 immunoblotting방법으로 확인되었다. 또한 Rab 단백질도 같은 방법으로 그 분포와 이동을 관찰할 수 있었다.

Fig. 2와 Fig. 3에서 보는바와 같이 지방세포의 세포내 미세구조물에서 GLUT4와 Rab4가 공존하고 있음이 확인되었고, 인슐린에 의하여 분포의 변동이 관찰되었다. 그러나 $G\alpha_h$ 는 아주 미약한 분포정도를 보였으며 인슐린에 의하여 거의 영향을 받지 않았다. 이는 Gh 단백질이 GLUT4의 전이기전에 관여하지 않음을 보이는 것이라 할 수 있다. 즉, 인슐린의 포도당이동촉진의 신호전달과정에는 Gh 단백질이 inositol phosphate와 Ca^{2+} 을 동반하여 세포내의 생화학적 작용을 유도하는 기전과는 연관성이 없는 것으로 추측할 수 있다. 반면, 대조군과 실험군의 GLUT4의 이동을 보면 인슐린을 처리한 후에 LDM에서는 7.82%의 감소, HDM에서는 16.37%의 감소가 있었고, PM에서는 21.35%의 현저한 증가가 있었다. 이는 인슐린의 자극에 의해 세포내의 신호전달체계가 작동하여 포도당운반체인 GLUT4가 세포막으로 이동되었음을 보이는 실험결과라고 할 수 있다. 또한, Rab4는 LDM에서는 9.25%감소를 보였고, PM에서는 7.6%의 증가를 보였는데 이는 GLUT4의 이동정도와 비교해 볼 때 LDM에서의 감소율은 비슷하나, PM에서는 그 증가율이 아주 미약한 것이다. 이는 Rab4가 GLUT4와 함께 LDM으로부터 이동하지만, GLUT4가 PM으로 이동하는 것과는 달리 일부는 세포질로 방출되어 버리는 것으로 생각된다. 따라서

Rab4가 포도당운반체인 GLUT4의 전이과정에 관여하는 기전은 인슐린의 자극에 의해 Rab4가 활성화되면 불활성의 GDP-결합형태에서 활성의 GTP-결합형태로 phosphorylation되면서 down stream의 signal cascade를 활성화하여 GLUT4단백질의 세포질내 trafficking을 촉진하는 것이라고 생각된다.

요 약

인슐린이 지방세포나 근육세포에서 포도당의 이동을 촉진시키는 기전은 포도당운반체 단백질(GLUT4)을 세포내부의 저장소로부터 세포막으로 전이를 일으키는 데 있다. 그러나 아직 GLUT4의 전이과정이 확실히 밝혀져 있지 않다. 최근 포유동물에서 GTP-결합단백질들이 세포내부의 물질이동에 관련이 있을 것이라는 보고가 있어 이들 단백질들이 GLUT4의 전이를 일으키는 signal cascade에 관여하는지를 구명하기 위하여 본 실험을 시작하였다.

실험동물로는 Sprague-Dawley쥐를 사용하였고 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨후 인슐린을 처치한 군과 처치하지 않은 군으로 나누어 4주간 사육하였으며 이들을 각각 경추이골로 희생시켜 epididymal 지방조직을 분리하였다. 이 조직으로부터 지방세포를 분리하고 plasma membrane(PM), high density microsome(HDM), low density microsome(LDM) 등의 분획으로 나누어 GLUT4, Rab4 및 $G\alpha_h$ 의 항체와 immunoblotting하여 인슐린에 의한 이들의 분포변동을 측정하였다.

실험결과는 다음과 같다.

- 1) GLUT4와 Rab4는 지방세포막에 공존하고 있으나 $G\alpha_h$ 는 발견되지 않았다.
- 2) GLUT4와 Rab4는 인슐린의 처치에 의하여 PM에 증가하였고 LDM과 HDM에서는 감소하였다.
- 3) GLUT4의 이동에 비하여 Rab4는 PM으로의 이동정도가 대단히 낮았다.

이로부터 Rab4는 인슐린의 자극에 의한 GLUT4의 전이과정에 관련이 있는 것으로 생각되고 그 기전은 인슐린에 의해 Rab4가 활성화되면 인산화과정을 동반하여 down stream의 signal cascade를 활성화하여 세포막의 GLUT4의 전이를 촉진하는 것으로 생각된다. Gh단백질은 GLUT4의 포도당 이동기전에 관여하지

않는 것으로 보아 포도당이동기전은 Ca^{2+} 를 동반하는 세포내의 기전과는 관련이 없는 것으로 추측된다.

References

- 1) Hah JS, Jo IH, 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
- 2) Jo I, Hah JS, Rampel AL, Chakrabarti R, Paterson AR, Craik JD, et al : *Transport function and sub-cellular distribution of purified human erythrocyte glucose transporter reconstituted into rat adipocytes. Biochim Biophys Acta* 1992 ; 1106 : 45-55
- 3) Hah JS, Kim KJ : *Immunocytochemical study on the translocation mechanism of glucose transporters by insulin. Kor J Physiol* 1993 ; 27 : 123-138
- 4) 하중식 : 인슐린이 쥐 지방세포에서 포도당운반체의 translocation에 관련이 있는 몇가지 단백질의 성상에 미치는 영향. *이화의대지* 1993 ; 16 : 305-312
- 5) 하중식 : 인슐린에 의한 포도당운반체의 translocation 기전에 관한연구. *이화의대지* 1994 ; 17 : 289-295
- 6) Mueckler M : *Facilitative glucose transporter. Eur J Biochem* 1994 ; 219 : 713-725
- 7) Fingar DC, Birnbaum MJ : *Characterization of the mitogen-activated protein kinase/90-kilodalton ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes and its role in insulin-stimulated glucose transport. Endocrinology* 1994 ; 134 : 728-735
- 8) Oakes ND, Kennedy CJ, Jenkins AB, Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW : *A new antidiabetic agent BRL 49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoeregulation in the rat. Diabetes* 1994 ; 43 : 1203-1210
- 9) Baldwin SA, Barros LF, Griffiths M : *Trafficking of glucose transporters-signals and mechanisms. Bioscience Reports* 1995 ; 15 : 419-426
- 10) Moyers JS, Bilan PJ, Reynet C, Kahn CR : *Overexpression of Rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cell. J Biol Chem* 1996 ; 271 : 23111-23116
- 11) 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
- 12) Hirshman MF, Goodtear LJ, Wardzala LJ, Horton ED, Horton ES : *Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. J Biol Chem* 1990 ; 265 : 987-991
- 13) Rodnick KJ, Slot JW, Studelska DR, Hanpeter DE, Robinson LJ, Geuze HJ, et al : *Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle. J Biol Chem* 1992 ; 267 : 6278-6285
- 14) Goodyear LJ, King PA, Hirshman MF, Thompson CM, Horton ED, Horton ES : *Contractile activity increase plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. Am J Physiol* 1990 ; 258 : E667-672
- 15) Goodyear LJ, Hirshman MF, Smith RJ, Horton ES : *Glucose transporter number, activity and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. Am J Physiol* 1991 ; 261 : E556-561
- 16) Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, et al : *Exercise induces recruitment of the "insulin responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin - and exercise - recruitable transporter pools in skeletal muscle. J Biol Chem* 1990 ; 265 : 13427-13430
- 17) Goodyear LJ, Hirshman MF, Horton ES : *Exercise induced translocation of skeletal muscle glucose transporters. Am J Physiol* 1991 ; 261 : E795-E799
- 18) Lawrence JC Jr, Hilken JF, James DE : *Phosphorylation of the glucose transporter in rat adipocytes. Identification of the intracellular domain at the carboxyterminus as a target for phosphorylation in intact-cells and in vitro. J Biol Chem* 1990 ; 265 : 2324-2332
- 19) Lawrence JC Jr, Hilken JF, James DE : *Stimulation of glucose transport and glucose transporter phosphorylation by okadaic acid in rat adipocytes. J Biol Chem* 1990 ; 265 : 19768-19776
- 20) Balch WE : *Small GTP-binding proteins in vesicular transport. Trends Biol Sci* 1990 ; 15 : 473-477
- 21) Goud B, McCaffrey M : *Small GTP-binding proteins and their role in transport. Curr Opin Cell Biol* 1991 ; 3 : 626-633
- 22) Simons K, Zerial M : *Rab proteins and the road maps for intracellular transport. Neurology* 1993 ; 11 : 789-799
- 23) Van der Sluijs P, Hull M, Huber LA, Male P, Goud B, Mellman I : *Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. EMBO J* 1992 ; 11 : 4379-4389

- 24) Zerial M, Stenmark H : *Rab GTPases in vesicular transport. Curr Opin Cell Biol* 1993 ; 5 : 613-620
- 25) Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M : *Membrane association of Rab5 mediated by GDP-association inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. Nature* 1994 ; 368 : 157-160
- 26) Burton J, Roberts D, Montaldi M, Novick P, De Camilli P : *A mammalian guaninenucleotide-releasing protein enhances function of yeast secretory protein sec4. Nature* 1993 ; 361 : 464-467
- 27) Moya M, Roberts D, Novick P : *DSS4-1 is a dominant suppressor of sec4-8 that encodes a nucleotide exchange protein that aids sec4p function. Nature* 1993 ; 361 : 460-463
- 28) Im M-J, Riek RP, Graham RM : *A novel guanine nucleotide-binding protein coupled to the $\alpha 1$ -adrenorenergic receptor. J Biol Chem* 1990 ; 265 : 18944-18960
- 29) Baek KJ, Das T, Gray C, Antar S, Murugesau G, Im M-J : *Evidence that the Gh protein is a signal mediator from $\alpha 1$ -adrenoceptor to a phospholipase C. J Biol Chem* 1993 ; 268 : 27390-27397
- 30) Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, et al : *Gh : A GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signalling function. Science* 1994 ; 264 : 1593-1596
- 31) Davies A, Meeran K, Cairns MT, Baldwin SA : *Peptide-specific antibodies as probes of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane. J Biol Chem* 1987 ; 262 : 9347-9352
- 32) Haspel HC, Rosenfeld MG, Rosen OM : *Characterization of antisera to a synthetic carboxyl-terminal peptide of the glucose transporter protein. J Biol Chem* 1988 ; 263 : 398-403
- 33) Martz A, Mookerjee BK, Jung CY : *Insulin and phorbol esters affect the maximum velocity rather than the half-saturation constant of 3-O-methylglucose transport in rat adipocytes. J Biol Chem* 1986 ; 261 : 13606-13609
- 34) Bortoluzzi MN, Cormont M, Gautier N, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y : *GTPase activating protein activity for Rab4 is enriched in the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. Diabetologia* 1996 ; 39 : 899-906
- 35) Belsham GJ, Denton RM, Tanner MS : *Use of a novel rapid preparation of fat-cell plasma membranes employing percoll to investigate the effects of insulin and adrenaline on membrane protein phosphorylation within intact fat-cells. Biochem J* 1980 ; 192 : 457-467
- 36) Towbin H, Staehelin T, Gordon J : *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA* 1979 ; 76 : 4350-4354
- 37) Kahn BB, Flier JS : *Regulation of glucose-transporter gene expression in vitro and in vivo. Diabetes Care* 1990 ; 13 : 548-564
- 38) Czech MP, Clancy BM, Pessino A, Woon CW, Harrison SA : *Complex regulation of simple sugar transport in insulin-responsive cells. Trends Biochem Sci* 1992 ; 17 : 197-201
- 39) Suzuki K, Kono T : *Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. Proc Natl Acad Sci* 1980 ; 77 : 2542-2545
- 40) Simpson IA, Cushman SW : *Hormonal regulation of mammalian glucose transport. Annu Rev Biochem* 1986 ; 55 : 1059-1089
- 41) Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE, James DE : *Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. J Cell Biol* 1991 ; 113 : 123-135
- 42) Robinson LJ, Pang S, Harris DS, Heuser J, James DE : *Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes : Effects of ATP, insulin, and GTP γ S and localization of GLUT4 to clathrin lattices. J Cell Biol* 1992 ; 117 : 1181-1196