

인슐린이 쥐 지방세포에서 포도당운반체의 Translocation에 관련이 있는 몇 가지 단백질의 성상에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실
하 종 식

=Abstract=

Effect of Insulin on Some Membrane Proteins Possibly Related to Translocation of Glucose Transporter In Rat Adipocyte

Jong Sik Hah

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

As much as 29.3% of GLUT4, 45.5% of GLUT1, 58.5% of clathrin, and 17.2% of insulin receptor immunoreactivities in rat adipocyte plasma membranes(PM) were found to be insoluble upon 1% Triton extraction at basal state. By insulin treatment the distributions of insoluble fraction were changed by 16.2% of GLUT4, 48.5% of GLUT1, 65.3% of clathrin and 31.0% of insulin receptor, respectively. SDS-PAGE revealed that the Triton-insoluble PM fraction contains a number of protein species including 110, 80, 70, 50 30-33 and 15 KDa polypeptides. When PM was prewashed with alkaline buffer and 0.5M Tris buffer, which removed most of extrinsic membrane proteins including clathrin and AP-2 from PM, virtually all of the GLUT4 and GLUT1 in PM became soluble in 1% Triton. Subcellular fractionation followed by Western blot indicated that AP-2 distribute to 4.8% at PM/NM, 25.7% at HDM, 38.9% at LDM and 30.6% at cytosol, respectively. An insulin treatment which increased GLUT4 content in PM by 1.5 fold increased the AP-2 content in PM nearly 2.3 fold with a concomitant decrease in cytosol AP-2 contents. These findings suggest that subpopulations of GLUT4 and insulin receptor in the plasma membrane of adipocytes are in specific association with extrinsic proteins, possibly clathrin and/or AP-2, and this association may play a key role in the translocation mechanism of GLUT4 in rat epididymal adipocytes.

서 론

지방세포는 인슐린에 의해서 포도당의 이동이

조절되는 세포로서 그 기전은 포도당운반체의 translocation에 의한 것으로 알려져 있다¹⁾²⁾³⁾. 즉 근육 세포와 지방세포는 인슐린에 영향이 없는 기초상

이 논문은 교육부지원 학술진흥재단유전공학연구비(1991-1992) 및 이화여자대학교 교수연구기금(1992-1993)에 의하여 이루어졌음.

태에서는 포도당운반체의 대부분이 trans-Golgi reticulum과 같은 tubulo-vesicular 구조내에 저장되어 있으나 인슐린에 의해서 자극을 받은 후에는 이들 저장소로부터 exocytosis가 일어나 세포막 표면으로 이동하여 포도당의 이동을 증가시키는 것이다⁴⁾⁵⁾. 이와 같이 포도당을 세포내부로 급속히 이동시킬 수 있는 운반체 단백질의 translocation 기전은 근육세포나 지방세포의 대부분의 다른 세포에서는 볼 수 없는 현상이다. 그러나 이러한 포도당운반체의 급속한 exocytosis 현상이 인슐린의 영향을 받는 조직의 세포내부에만 존재하는 특수한 인자에 의해서 일어나는 현상인지 아니면 운반체 단백질 자체의 구조적인 차이에 따라 특수하게 작용하는 세포내부의 어떤 기구에 의해서 일어나는 것인지는 아직도 잘 알려져 있지 않다.

최근에 많은 세포막 수용체들이 세포내부와 세포막 사이를 endocytosis와 exocytosis를 포함한 특수한 경로를 거쳐 반복 순환하는 것으로 알려졌다⁶⁾, 면역기법을 이용한 GLUT4의 recycling 연구에서 coated pit-endosome이 관련되어 있다는 것이 알려졌다⁸⁾

이 연구의 목적은 인슐린에 의한 포도당운반체의 이동에 coated pit가 관련되어 있는지를 밝히기 위하여 인슐린 투여가 coated pit를 형성하는 것으로 알려진 clathrin, assembly protein(AP), 포도당운반체 및 인슐린수용체들의 변동에 미치는 영향을 측정하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

GLUT4의 c-terminal(residues 480-491 또는 477-492) peptides를 Davis등⁹⁾과 Haspel등¹⁰⁾의 방법에 따라 합성하였으며 이들을 Keyhole limpet hemocyanin(KLH)와 coupled 시킨후 conjugate를 가토에 주입하여 약 6주후 혈청을 얻고 56°C에서 30분간 가열하여 complement를 inactivated 시킨후 -70°C에 보관하였다. GLUT1(RaGLUTRANS)과 GLUT4(MaIRGT & RaIRGT) 단일클론 항체를 Eastacres Biologicals(USA)로부터 구입하였다. Clathrin의 light chain 항체 및 인슐린수용체의 항체는 Sigma사(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. Western blot용

시약은 Bio-Rad사(USA)로부터, ECL reagents는 Amersham사(USA)로부터, protein A-peroxidase는 Zymed Laboratories사(USA)로부터 구입하였다.

2. 실험방법

1) 지방세포 및 세포내 미세구조의 분리

웅성의 Sprague-Dawley 쥐를 경추이골로 희생시키고 epididymal 지방조직을 떼어내어 HEPES-buffered Krebs Ringer(KRH) 용액에 담그고 Marz등¹¹⁾의 방법으로 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 digestion 시켰다. 이를 nylon mesh를 통하여 3~4회 씻은 후 30~40% packed cell을 만들어 사용할때 까지 37°C에 보관하였다가 지방세포내의 각 미세기관을 분리하기 위하여 먼저 지방세포를 균질기(Thomas Scientific Co.)로 2,000rpm에서 10번 상하운동으로 세포막을 파괴시키고 Belsham등¹²⁾의 방법으로 각 분획을 분리하였다.

각 분획은 1,600 x g의 pellet으로부터 percoll/sucrose gradient centrifugation으로 plasma membrane(PM)과 nuclei-mitochondria(NM)를 분리하고, 40,000 x g pellet을 high density microsome(HDM)으로, 170,000 x g pellet을 low density microsome(LDM)으로 분리하였다.

2) Western blot 방법

Laemmli¹³⁾ 방법으로 전기영동을 실시하고 20% methanol, 192mM glycine, 25mM Tris(pH 8.3)의 완충액에서 4시간 동안 100volt로 단백질을 nitrocellulose paper로 transfer하고 Ponceau S 용액으로 염색하여 이동을 확인하였다. TBS 용액(150mM NaCl/10mM Tris pH 7.4)으로 세척한 후 GLUT-1, GLUT-4, 인슐린 수용체 및 AP-2 등의 1차 항체와 1시간 동안 incubation하고 2차로 protein A conjugated peroxidase(1 : 2000)와 1시간 동안 더 incubation 하였다. TBS 용액으로 5분간씩 2회 세척하고 ECL Western blotting detection reagents에 1분간 반응시킨후 X-ray film(KODAK, X-O-mat)에 5~20초 노출시켜 현상하였다. X-ray 감광 film을 densito-

meter(Gilford-Response series, Ciba Corning Diagnosis Corp.)로 scanning하여 자동적으로 면적을 구하고 각 단백질의 양은 면적의 크기로 비교하였다.

3) 세포형질막(PM)의 용해

세포형질막의 단백질을 막내단백질(intrinsic protein)과 막외단백질(extrinsic protein)로 분리하기 위하여 Triton X-100(Tx-100)로 용해시켰다. PM(2 mg/ml)을 10mM Tris(pH 7.0), 5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 50mM sodium fluoride를 함유하는 PM 완충액(4°C)에 부유시킨 후 Tx-100의 10배 농축액을 가하여 최종 Tx-100의 농도가 각각 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0%가 되도록 하였다. 얼음속에서 30분간 세워두었다가 Eppendorf microcentrifuge로 12,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액(용해성 PM)과 침전물(불용성 PM)로 분리하였다. 경우에 따라서는 PM과 Tx-100 불용성 PM을 20mM Taps, 1mM DTT, 10 μ M leupeptin, 1 mM orthophenanthroline 및 0.5M Tris-HCl 완충액에 incubation시켜 clathrin과 AP-2를 포함한 막외 단백질을 제거하였고 용해성 PM과 불용성 PM을 각각 10% polyacrylamide를 사용한 SDS-PAGE로 분리하였다.

4) 인슐린의 처치

쥐 지방세포에서 인슐린에 의한 포도당운반체의 translocation을 관찰하기 위하여 분리된 세포를 30 nM의 인슐린(porcine)을 함유하는 KRH 완충액에 30분간 incubation시키고 즉시 인슐린이 없는 KRH로 3번 씻은 후 원심분리 방법으로 PM, NM, HDM 및 LDM 분획으로 분리시킨 후 -70°C에 냉동보관하였다.

5) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry등¹⁴⁾의 방법으로 측정하였다. Tx-100가 비색계에서 optical density를 교란하기 때문에 Tx-100를 완전히 제거한 후에 단백질을 측정하였고 Tx-100가 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0%가 함유된 표준곡선을 그려 대조군과 비교하였다.

실험결과

1. 인슐린이 지방세포막의 GLUT1 및 Clathrin에 미치는 영향

인슐린 처리후 PM을 분리하고 Western blot을 실시한 결과 GLUT1과 clathrin의 분포에는 거의 변동이 없었다(Fig. 1, IA & D ; IIA & D). 이들을 각각 Tx-100로 처리한 후 용해성 PM과 불용성 PM으로 분리하여 GLUT1 항체로 Western blot을 실시하고 densitometer로 면적을 측정분석한 결과 인슐린을 처리하지 않은 PM에서는 용해성 PM에 54.5% 불용성 PM에 45.5% 분포하였고, 인슐린을 처리한 PM에서는 용해성 PM에 51.5% 불용성 PM에 48.5% 분포하였다. 한편 같은 시료에서 clathrin(light chain) 항체로 Western blot을 실시한 결과 인슐린을 처리하지 않은 PM에서는 용해성 PM에 41.2% 불용성 PM에 58.5% 존재하였고, 인슐린을 처리한 PM에서는 용해성 PM에 34.7% 불용성 PM에 65.3% 존재하였다.

2. 인슐린이 지방세포막의 GLUT4 및 인슐린수용체에 미치는 영향

인슐린을 처리하지 않은 PM과 인슐린을 처리한 PM을 GLUT4와 인슐린 수용체의 항체로 Western blot을 실시하고 densitometer로 면적을 측정분석한 결과 인슐린을 처리하지 않은 PM에 비하여 인슐린을 처리한 PM에 GLUT4의 양이 약 35% 증가하였고 인슐린 수용체는 54.7%로 감소하였다(Fig. 2, IA & D ; IIA & D). 이들을 각각 Tx-100로 처리한 후 용해성 PM과 불용성 PM으로 분리하여 GLUT4 항체로 Western blot을 실시하고 분포를 측정된 결과 인슐린을 처리하지 않은 PM에서는 용해성 PM에 70.7% 불용성 PM에 29.3% 분포하였고, 인슐린을 처리한 PM에서는 용해성 PM에 83.8% 불용성 PM에 16.2% 분포하였다. 한편 같은 시료에서 인슐린 수용체의 항체로 Western blot을 실시한 결과 인슐린을 처리하지 않은 PM에서는 용해성 PM에 82.8% 불용성 PM에 17.2% 분포하였고, 인

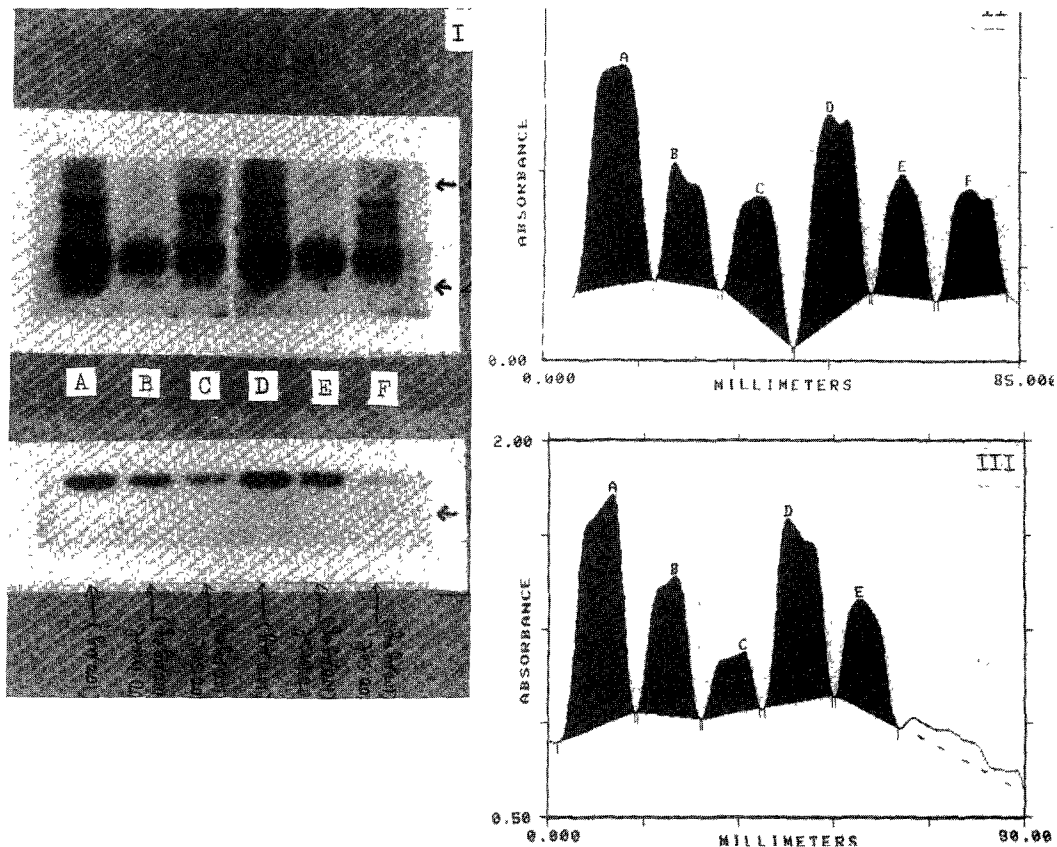


Fig. 1. Western blot analysis of GLUT1 and clathrin in plasma membrane of adipocytes.

I. Upper panel illustrates the immunoblots of GLUT1. Lower panel illustrates the immunoblots of clathrin light chain. A-C : Without insulin treatment. D-F : With insulin treatment. Lanes A, D : Intact plasma membrane. Lanes B, E : 1% Tx-100 insoluble fractions. Lanes C, F : 1% Tx-100 soluble fractions.

II. Densitometric tracings of GLUT1 immunoblots of the upper panel.

III. Densitometric tracings of clathrin immunoblots of the lower panel.

슐린을 처리한 PM에서는 용해성 PM에 69.0% 불용성 PM에 31.0% 분포하였다.

3. 인슐린이 지방세포막의 AP-2에 미치는 영향
인슐린을 처리하지 않은 지방세포와 인슐린을 처리한 지방세포를 각각 subfractionation하고 각 분획을 일정량씩 SDS-PAGE를 한후 AP-2 항체로 Western blot을 실시하여 AP-2 단백질의 분포를 측정하였다(Fig. 3). 인슐린을 처리하지 않은 세포에서 AP-2의 분포는 PM/NM, HDM, LDM 및 cytosol에 각각 4.8, 25.7, 38.9 및 30.6%였고, 인슐린을 처리한 군에서는 각각 11.2, 27.4, 53.3 및 8.0%로

인슐린 투여후 PM에 2.3배 증가하였고, cytosol에서는 75% 감소하였다(Table 1).

4. Tx-100 용해성 PM과 불용성 PM의 SDS-PAGE 비교

Tx-100 용해성 PM과 불용성 PM을 전기영동으로 분리한 결과 단백질의 분포에 차이가 있었다(Fig. 4). Tx-100 불용성 PM은 110, 80, 70, 50, 30-33 및 15KDa polypeptides를 포함하는 일련의 단백질 분포를 나타내었으나 알칼리 pH와 Tris-buffer로 씻으면 이들의 대부분은 소실되었는데 특히 80과 15KDa polypeptides가 막의 단백질 추출과정에 가장

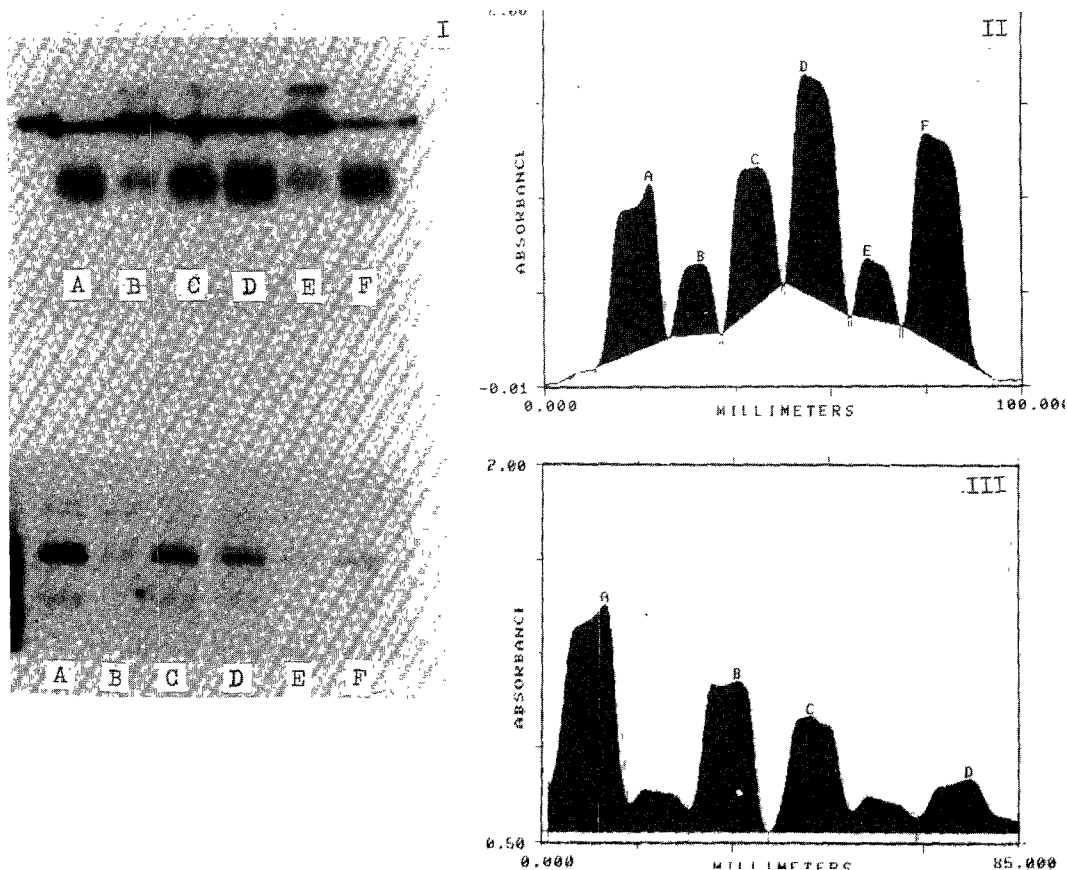


Fig. 2. Western blot analysis of GLUT4 and insulin receptor in plasma membrane of adipocytes.

I. Upper panel illustrates the immunoblots of GLUT4. Lower panel illustrates the immunoblots of insulin receptor. A-C : Without insulin treatment. D-F : With insulin treatment. Lanes A, D : Intact plasma membrane. Lanes B, E : 1% Tx-100 insoluble fractions. Lanes C, F : 1% Tx-100 soluble fractions.

II. Densitometric tracings of GLUT4 immunoblots of the upper panel.

III. Densitometric tracings of insulin receptor immunoblots of the lower panel.

예민하였다.

고 찰

지방세포에서 인슐린이 포도당의 이동을 촉진하는 주 기전은 GLUT4를 세포내의 저장소로부터 세포 표면으로 재배치를 유발하는 기전에 있다¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. 이러한 사실은 인슐린이 없을 때는 세포 표면으로부터 GLUT4가 줄어드는 것으로도 입증된다. Haney등¹⁷⁾에 의하면 GLUT4의 translocation은 인슐린에 영향을 받지 않는 세포와 정상적으로 GLUT4를 표현하지 않는 세포에서도 일어나며 반면에 GLUT1도 같은 조건하에서 세포표면으로 이동이

일어나고 있다. GLUT4는 3T3-L1 지방세포¹⁷⁾¹⁸⁾, 쥐 지방세포⁵⁾¹⁹⁾ 및 쥐 심근세포⁵⁾등 인슐린 반응 세포 등에서 vesicle 형태로 세포내부에 존재하고 있고, GLUT4가 함유된 vesicle은 brown adipocytes와 심근세포 뿐아니라 3T3-L1 fibroblasts와 지방세포에서 trans-Golgi reticulum과 같은 tubulovesicular 구조에 운집되어 있는 것으로 추측된다. 그러나 GLUT4 vesicle의 형태학적 및 생화학적 특성은 인슐린 반응세포와 인슐린 비반응세포 간에 차이가 발견되지 않았다. 따라서 인슐린의 감수성을 나타내는 인자가 무엇인지를 밝히기 위해서 최근에는 인슐린이 포도당 운반체의 translocation을 유도하는 신호전달경로 및 포도당운반체의

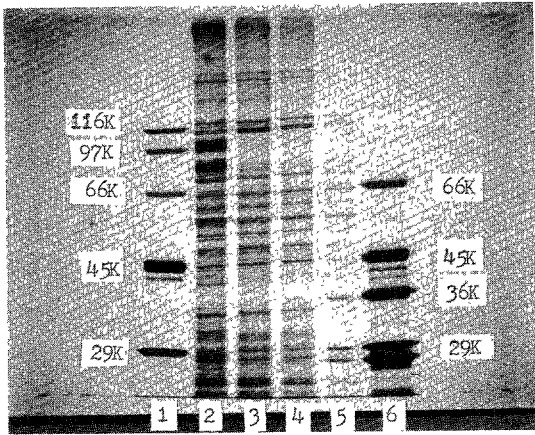


Fig. 3. Sliver stained gel electrophoretic profile of the adipocyte plasma membranes treated with 1% Tx-100, high pH buffer and 0.5 M Tris. Lane 1 contains a high molecular marker from Sigma Chemical Co. Lane 2 contains intact plasma membrane. Lane 3 contains 1% Tx-100 insoluble proteins. Lane 4 contains 1% Tx-100 insoluble proteins prewashed with a high pH buffer. Lane 5 contains 1% Tx-100 insoluble proteins prewashed with a high pH buffer and 0.5 M Tris. Lane 6 contains a low molecular marker from Sigma Chemical Co.

pathways에 관련된 특수기구의 존재유무에 관심이 집중되어 있다.

이 연구는 포도당운반체의 세포내 이동과정에 있어서 GLUT4 translocation이 아마도 세포내부에 있는 특수단백질에 의한 endocytosis- retroendocytosis 과정과 관련이 있을 것으로 짐작되어 이에 관련된 유력한 후보인 clathrin, assembly proteins²⁰⁾ 및 인슐린 수용체 등과 GLUT1, GLUT4와의 관련성을 추구하고져 하였다.

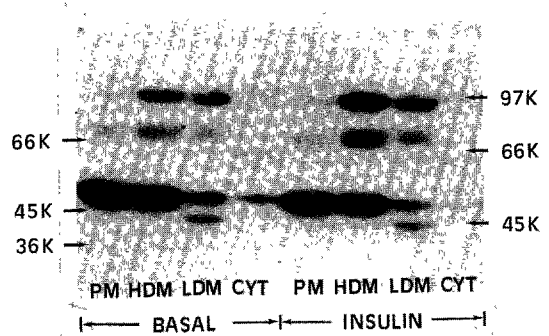


Fig. 4. Distribution of AP-2 in subcellular fractions prepared from basal and insulin treated(10nM, 30 min at 37°C) rat adipocytes.

Basal : Without insulin treatment
Insulin : With insulin treatment

먼저 인슐린 투여시 GLUT1과 clathrin의 분포에 변동이 있는지를 밝히기 위하여 PM을 GLUT1과 clathrin 항체로 Western blot하여 분석한 결과 GLUT1과 clathrin은 인슐린에 의하여 변동이 일어나지 않았다(Fig. 1). 또한 쥐 지방세포에서 GLUT4와 인슐린수용체의 recycling 간에 어떤 연관이 있는지를 밝히기 위하여 PM을 GLUT4 항체와 인슐린 수용체 항체로 Western blot 한 결과 인슐린에 의해서 GLUT4는 증가한 반면 인슐린 수용체는 감소하였다(Fig. 2). 이 실험결과는 인슐린이 인슐린 수용체에 작용하여 signal을 형성하고 세포내부에 있는 GLUT4를 exocytosis시키는 동안 인슐린수용체는 endocytosis되고 있음을 보이는 것으로서 endocytosis와 exocytosis는 공통수레(common vehicle)를 매개로 일어났을 가능성이 높다.

Table 1. Distribution of AP-2 protein in subcellular fraction of adipocyte

	Subfractions	Protein yields(mg)	AP-2 Relative Intensity	Total distribution(%)
Without insulin treatment	PM/NM	5.04+1.15	5.04	4.8
	HDM	1.36+0.15	27.20	25.7
	LDM	2.74+0.51	41.10	38.9
	Cytosol	16.15+5.15	32.30	30.6
With insulin treatment	PM/NM	4.19+1.51	12.57	11.2
	HDM	1.02+0.30	30.60	27.4
	LDM	2.97+0.51	59.40	53.3
	Cytosol	17.85+4.25	8.93	8.0

한편 PM을 1% Tx-100로 처리하여 용해된 단백질과 용해되지 않은 단백질로 구분하여 이들의 분포를 관찰한 결과 GLUT4는 인슐린 투여후 용해된 단백질에 대부분 분포하였고(Fig. 1), 인슐린 수용체는 인슐린을 투여하기 전에는 용해된 형태에 대부분 분포하고 있었으나 인슐린 투여후 대부분 소실되었다(Fig. 2-III). 이 실험결과는 인슐린의 투여로 GLUT4가 막내단백질(integral protein)의 위치로 이동되었음을 보이는 것으로서 포도당운반체의 기능적인 형태는 막내단백질인 것을 짐작할 수 있으며, 인슐린수용체는 막내단백질에서 막외단백질(extrinsic protein)의 형태로 이행되거나 소실됨을 보임으로서 세포막으로부터 endocytosis 되었음을 알 수 있다. 이것은 인슐린이 수용체에 결합하여 신호를 발생하고 인슐린수용체가 세포내부로 endocytosis되는 동안 세포내부에서는 인슐린의 신호에 반응하여 세포내부의 어떤 기구를 동원하여 GLUT4가 exocytosis 되는 과정을 암시하는 것으로 아마도 clathrin과 AP와 같은 수레(vehicle)가 개재되었을 가능성이 높다. 따라서 인슐린이 clathrin과 AP-2의 분포변동에 미치는 영향을 측정하였다. Fig. 1은 인슐린이 GLUT1과 clathrin의 분포변동에 미치는 영향을 보이고 Fig. 3은 AP-2의 변동을 보이는 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 AP-2는 인슐린의 처리에 의하여 PM에 2.3배 증가함을 보임으로서 GLUT4의 translocation과 유관함을 암시하였다. 그러나 clathrin은 인슐린 처리후 양적으로는 현저한 변화를 보이지 않았고 대부분 1% Tx-100에 불용성으로 존재하여 막외단백질로 존재함을 알 수 있었다. 이상의 실험결과로 미루어 보아 인슐린 투여시 GLUT4가 세포내부로 부터 세포막으로 이동되는 exocytosis는 인슐린수용체가 세포막으로부터 세포내부로 이동되는 endocytosis 과정과 유기적으로 병행하며 GLUT4는 clathrin coated vesicles의 형태로 이동될 것으로 생각되나 clathrin과 AP-2와의 유기적인 관계는 좀더 추구하여야 할 과제로 남는다.

References

1) Cushman SW & Wardazala 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

- 2) 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
- 3) Wardazala LJ & Jeanrenaud B : *Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. J Biol Chem* 1981 : 253 : 4758-4762
- 4) 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
- 5) Solt 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* 1991a : 113 : 123-135
- 6) 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* 1991b : 88 : 6893-6897
- 7) Jhun BH, Rampal AL, Liu H, Lachal M & Jung CY : *Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes : Evidence of constitutive GLUT4 recycling. J Biol Chem* 1992 : 267 : 17710-17715
- 8) Piper RC, Hess LJ & James DE : *Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells. Am J Physiol* 1991 : 260 : C570-C580
- 9) 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
- 10) 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 : 393-403
- 11) Marz 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
- 12) Belsham GJ, Denton RM & Tanner MJA : *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
 - 13) Laemmli UK : *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* 1970 : 227 : 680-685
 - 14) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall : *Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
 - 15) Calderhead DM, Kitagawa K, Tanner LI, Holman GD & Lienhard GE : *Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem* 1990 : 265 : 13801-13808
 - 16) Holman GD, Kozka IJ, Clark AE, Flower CJ, Saltis J, Habberfield AD, Simpson IA & Cushman SW : *Cell surface labelling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. J Biol Chem* 1990 : 265 : 18172-18179
 - 17) Haney PM, Slot JW, Piper RC, James DE & Mueckler M : *Intracellular targeting of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) is isoform specific and independent of cell type. J Cell Biol* 1991 : 114 : 689-699
 - 18) Gould GW & Bell GI : *Facilitative glucose transporters : An expanding family. Trends Biochem Sci* 1990 : 15 : 18-23
 - 19) James DE & Pilch PF : *Fractionation of endocytic vesicles and glucose transporter containing vesicles in rat adipocytes. Biochem J* 1988 : 256 : 725-732
 - 20) Mahaffey DT, Peeler JS, Brodsky FM & Anderson RGW : *Clathrin coated pits contain an integral membrane protein that binds the AP-2 subunit with high affinity. J Biol Chem* 1990 : 265 : 16514-16520