

인슐린의 포도당 이동 촉진 기전에 관한 연구

— 세포내부 미세구조와 Cytochalasin B 결합단백질의 분포 —

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

하 종 식

(1990년 9월 20일 접수)

= Abstract =

A Study on the Mechanism of Insulin Sensitivity to Glucose Transport System: Distribution of Subcellular Fractions and Cytochalasin B Binding Proteins

Jong Sik Hah

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

What makes glucose transport function sensitive to insulin in one cell type such as adipocyte, and insensitive in another such as liver cells is unresolved question at this time. Recently it is known that insulin stimulates glucose transport in adipocytes largely by redistributing transporter from the storage pool that is included in a low density microsomal fraction to plasma membrane. Therefore, insulin sensitivity may depend upon the relative distribution of glucose transporters between the plasma membrane and in an intracellular storage compartment. In hepatocytes, the subcellular distribution of glucose transporter is less well documented. It is thus possible that the apparent insensitivity of the hepatocyte system could be either due to lack of the constitutively maintained, intracellular storage pool of glucose transporter or lack of insulin-mediated transporter translocation mechanism in this cell.

In this study, I examined if any intracellular glucose transporter pool exists in hepatocytes and this pool is affected by insulin. The results obtained summarized as followings:

1) Distribution of subcellular fractions of hepatocyte showed that there are $24.9 \pm 1.3\%$ of plasma membrane, $36.9 \pm 1.7\%$ of nucleus-mitochondria enriched fraction, $23.5 \pm 1.2\%$ of lysosomal fraction, $9.6 \pm 1.0\%$ of high density microsomal fraction and $4.9 \pm 0.5\%$ of low density microsomal fraction.

2) In adipocyte, there were $29.9 \pm 2.6\%$ of plasma membrane, $19.4 \pm 1.9\%$ of nucleus-mitochondria enriched fraction, $26.7 \pm 1.8\%$ of high density microsomal fraction and $23.9 \pm 2.1\%$ of low density microsomal fraction.

3) Surface labelling of sodium borohydride revealed that plasma membrane contaminated to lysosomal fraction by $26.8 \pm 2.8\%$, high density microsomal fraction by $8.3 \pm 1.3\%$ and low density microsomal fraction by $1.7 \pm 0.4\%$ respectively.

4) Cytochalasin B bound to all of subcellular fractions with a K_d of $1.0 \times 10^{-6}M$.

5) Photolabelling of cytochalasin B to subcellular fractions occurred on 45 K dalton protein band, a putative glucose transporter and D-glucose inhibited the photolabelling.

6) Insulin didn't affect on the distribution of subcellular fractions and translocation of intracellular glucose transporters of hepatocytes.

7) HEGT reconstituted into hepatocytes was largely associated with plasma membrane and very little was found in low density microsomal fraction which equals to the native glucose transporter

*이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

distribution. Insulin didn't affect on the distribution of exogeneous glucose transporter in hepatocytes.

From the above results it is concluded that insulin insensitivity of hepatocyte may due to lack of intracellular storage pool of glucose transporter and thus intracellular storage pool of glucose transporter is an essential feature of the insulin action.

Key Words: Insulin, Glucose transport, Subcellular distribution, Photolabelling, Surface labelling, Vesicle-cell fusion

서 론

포도당이 세포내로 이동되는 것은 세포막에 존재하는 포도당운반체 (glucose transporter)의 facilitated diffusion 과정에 의한 것으로 알려져 있다 (Jung, 1975). 생체조직 세포중에는 근육세포나 지방세포처럼 인슐린에 의해서 포도당의 이동이 증가되는 세포가 있는 반면, 간장세포, 뇌세포 및 적혈구 등과 같이 인슐린에 거의 영향을 받지 않는 세포가 있다 (Jarvis, 1989).

최근에는 유전자 조작기술의 발달로 크로닝 기술이 개발되면서 약 6~7 종의 다른 조직세포의 포도당운반체 단백질에 대한 c-DNA sequence가 밝혀졌으며 (Mueckler et al, 1985; Birnbaum et al, 1986; Fukumoto et al, 1988; Kayano et al, 1988; Thorens et al, 1988; Birnbaum, 1989; Charron et al, 1989; Fukumoto et al, 1989; James et al, 1989; Kaestner et al, 1989), 반 이상의 펩티드가 transmembrane domain 으로서 12개의 membrane-spanning α -helices를 이루고 있고 나머지 non-membrane domains은 비교적 큰 cytosolic domain과 상대적으로 작은 extracellular domain들이며 (Cairns et al, 1987) 이들의 일차구조 (primary structure)가 서로 대단히 비슷한 것으로 알려졌다 (Fukumoto et al, 1989). 이와 같이 포도당운반체가 구조적으로 비슷함에도 불구하고 인슐린에 의한 반응이 다른 것은 무엇 때문인가? 즉 인슐린 없이 조절되는 포도당의 이동 (constitutive regulation)과 인슐린에 의해서 조절되는 포도당의 이동 (insulin-mediated regulation)의 차이는 무엇 때문에 생기게 되는 것인가?

아마도 가장 큰 차이는 세포막 및 세포질 내에 존재하는 포도당운반체의 분포에 있는 것이 아닌가 생각된다. 다소 논란은 있지만 인슐린에 의하여 포도

당의 이동이 촉진되는 지방세포인 경우 기초상태 (basal membrane)에서는 세포질 내부에 저장되어 있던 포도당운반체가 인슐린에 의해서 세포막 (plasma membrane)으로 동원된다는 학설 (Cushman & Wardzala, 1980)이 입증되고 있으므로 (Kahn et al, 1985; Toyoda et al, 1987; Joost et al, 1988; Gould et al, 1989) 세포막과 세포질내 저장고간의 분포양상이 인슐린의 작용 여부와 밀접한 관계가 있을 것으로 추측된다.

따라서 이 학설의 진위를 인슐린에 의해서 포도당의 이동이 영향을 받지 않는 세포를 대상으로 구명하기 위해서, 간장세포 (hepatocyte)를 모델로 하여 세포를 세포막분획, 미토콘드리아 및 핵 분획, 리소좀 (lysosome) 분획, 골지체 (Golgi apparatus) 등이 많은 고밀도미소체 (high density microsome) 분획 및 저밀도미소체 (low density microsome) 분획으로 분리하여 포도당운반체의 분포를 측정하고 인슐린 투여가 그 분포 변동에 미치는 효과를 관찰함으로써 인슐린의 작용기전을 밝히고자 하였다.

실 험 방 법

1. 재 료

Cytochalasin B, Triton X-100, octylglucoside, polyethyleneglycol, collagenase 및 insulin (porcine crystalline)은 Sigma 회사 (St. Louis, Missouri, USA)로 부터 구입하였고, 우혈청알부민 (bovine serum albumin)은 Armour Pharmaceuticals (Chicago, Illinois, USA)로 부터 구입하였다. [3 H]-cytochalasin B 및 NaB 3 H $_4$ 는 New England Nuclear 회사 (Boston, Massachusetts, USA)로 부터 구입하였고 [125 I]-labeled protein A는 Amersham 회사 (Arlington Heights, Illinois, USA)로 부터 구입하였다. Percoll은 Pharmacia Fine Chemicals 회사 (Piscat-

away, New Jersey, USA)로 부터 구입하였으며 그 외 본 실험에 사용된 모든 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

2. 인체 적혈구막의 포도당운반체 (human erythrocyte glucose transporter, HEGT) 분리

인체 적혈구막의 포도당운반체를 순수 분리하기 위하여 하(1986)의 방법을 이용하였다. 간단히 요약하면 수술중 사용하고 남은 비교적 신선한 혈액을 구하여 1/15 Dodge 용액으로 용혈시킨 후 원심분리 방법으로 적혈구 ghost를 만들고 먼저 EDTA를 처리하여 peripheral proteins을 제거시켰다. 그후 octyl-glucoside를 가하여 integral proteins을 용해시키고 이 용액을 DEAE column chromatography하여 포도당운반체로 알려진 band 4.5 단백질을 순수 분리하였다.

3. 간장세포 (hepatocyte)의 분리

약 200 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐 숫컷을 ether로 전마취시키고 nembutal을 8 mg/100 g(체중) 복강내에 주사하여 마취를 유지시키면서 Ciardi 등(1986)의 방법으로 간장세포를 분리하였다. 즉 Ca^{++} 을 없애고 1 mM EGTA가 함유된 Hank씨 완충용액 (Hank's buffer)을 문맥을 통하여 관류시키면서 간이 회색 되면 8.6 mM $CaCl_2$ 와 100 mg/150 ml의 collagenase (Type IV)가 함유된 Hank씨 완충용액을 관류시켜 결합조직을 용해시켰다. 허물 허물해진 간을 조심스럽게 떼어내어 37°C의 collagenase가 함유된 용액에 10분간 더 용해시킨 후 나일론 천으로 여과하고 지체없이 4°C의 Hank씨 용액으로 상층액이 맑아질 때까지 원심분리 방법 (200 x g, 4분)으로 세척하고 cytocrit를 측정 한 후 사용할 때까지 냉장고에 보관하였다.

4. 지방세포 (adipocyte)의 분리

약 200 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐 숫컷을 경추이골로 희생시키고 epididymal 지방조직을 떼어내어 HEPES-buffered Krebs-Ringer solution (KRH)에 담그고 Martz 등(1986)의 방법으로 지방세포를 분리하였다. 즉 조직을 잘게 썰어 0.5 mg/ml의

collagenase (type II)와 2% 우혈청알부민 및 2 mM D-glucose가 함유된 37°C의 용액에 30~45분 동안 천천히 흔들면서 결합조직을 용해시켰다. 이 부유액을 나일론 망을 통하여 여과하고 유리된 지방세포를 1% 우혈청알부민 및 1 mM D-glucose를 함유한 KRH 용액으로 3~4회 씻은 후 30~40% packed cell을 만들어 사용할 때까지 37°C에 보관하였다.

5. 포도당운반체와 간장세포의 융합

순수 분리된 인체적혈구막 포도당운반체 (HEGT)와 50%로 충전된 간장세포를 잘 혼합하고 지방세포와 마찬가지로 Boni 등(1984)의 방법으로 polyethyleneglycol (PEG, MW 8,000)을 이용하여 HEGT vesicles과 간장세포의 융합을 실시하였다. PEG의 농도는 지방세포에서 보다 약간 높은 20%로 하였다. PEG를 가하고 약 5분간 세워 두었다가 Krebs-Ringer phosphate (KRP) 용액으로 희석시킨 후 원심분리 방법으로 3회 세척하고 사용할 때까지 얼음 속에 보관하였다.

6. 포도당운반체와 지방세포의 융합

순수 분리된 인체적혈구막 포도당운반체 (HEGT)를 얼음 속에서 약 2분간 sonication 시킨 후 cytocrit가 50~60% 되도록 충전시킨 지방세포와 잘 혼합하고 Boni 등(1984)의 방법으로 PEG를 이용하여 vesicle-cell 융합을 실시하였다. PEG (MW 8,000)의 농도는 10%로 하였고 PEG를 가한 후 융합이 일어나도록 얼음 속에 2~3분간 가만히 세워 두었다가 KRP 완충용액으로 희석시키면 세포층이 뜨게 되는데 이를 수집하여 KRP 용액으로 3회 세척하고 사용할 때까지 얼음 속에 세워 보관하였다.

7. 포도당운반체의 [3H]-cytochalasin B 광표지 (photolabelling)

포도당운반체의 [3H]-cytochalasin B를 광표지하기 위하여 Deziel과 Rothstein(1984)의 방법대로 0.5 μM 의 [3H]-cytochalasin B와 함께 260~350 nm 파장의 자외선을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 [3H]-cytochalasin B (15.8 Ci/mmol or 22 Ci/mmol Amersham, England) 용액으로 부터 알콜을 휘발시킨 후 20 μM sodium phosphate (PH 7.4) 용액에 재부유

시키고 1 ml의 20 mM sodium phosphate 용액에 0.5 μ M의 [3 H]-cytochalasin B가 되게 만든 후 10 μ M의 cytochalasin E를 첨가하고 여기에 약 2.5 mg의 homogenate를 가하였다. 이 혼합액을 얼음 속에 약 30분간 세워 두었다가 500 watt 수은 등(Hanovia Inc, NJ, USA)의 10~15 cm 아래에서 파장 260~350 nm의 자외선만 통과시키는 유리필터(SS7-54, Corning Glassware, NY, USA)를 통하여 1분간 조사시키고 30초 쉰 다음 다시 1분간 더 조사시켰다. 그 후 10 μ M의 cytochalasin B를 함유하는 20 배의 Krebs-Ringer-Hepes (PH 7.4) 용액으로 희석시키고 170,000 x g의 원심력 하에서 60분간 원심침전시켜 침전물을 얻었다. 전기영동을 하기 위해서는 이 침전물을 증류수에 용해시킨 후 사용하였다.

8. 세포내 각 기관 (intracellular organelles)의 분리

지방세포내 각 기관을 분리하기 위하여 지방세포를 “STEP” 용액 (0.25M sucrose + 10 mM Tris-HCl + 2 mM EGTA + 10 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, PH 7.4)으로 세척하고 teflon pestle homogenizer (Thomas Scientific Co.)로 2,000 rpm에서 10번 상하운동으로 세포막을 파열시킨 후 Belsham 등 (1980)의 방법으로 각 분획을 분리 (subcellular fractionation) 하였다. 분리방법은 다음과 같다. 먼저 homogenate를 2,000 x g로 15초간 원심분리하여 위에 뜨는 파괴되지 않은 세포와 기름덩어리 (fat cake)를 건져 버리고 남은 용액을 16,000 x g로 15분간 원심분리하여 침전물과 상등액으로 나누었다. 침전물은 percoll-sucrose 혼합용액 (1.4 ml of percoll + 6.4 ml of STEP 용액 + 0.2 ml of 2M sucrose + 80 mM Tris-HCl + 8 mM EGTA, pH 7.4)에 재부유시킨 후 10,000 x g로 10분간 원심분리하여 위에 고리모양 (band)으로 형성된 부유액과 침전물을 따로 수집하였다. 부유액은 다시 75,000 x g로 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 위의 10,000 x g 침전물과 75,000 x g 침전물로부터 percoll을 제거한 후 각각 핵-미토콘드리아분획 (N/M fraction)과 세포막분획 (PM fraction)을 얻었다. 한편 16,000 x g 상등액을 40,000 x g로 15분간 원심분리하여 분획 침전물로부터 Golgi체 등이 많은 고밀도미소체분획

(HDM fraction)을 얻었고 상등액은 다시 170,000 x g로 70분간 더 원심분리하여 저밀도미소체 분획 (LDM fraction)인 침전물을 얻었다.

간장세포는 homogenizer로 세포막을 파열시킨 후 Fleischer와 Kervina (1974)의 방법으로 각 분획을 분리하였다. 즉 1,450 x g 침전물로부터 percoll-sucrose 용액을 이용한 원심분리 방법으로 핵-미토콘드리아 분획 (N/M fraction)과 세포막 분획 (PM fraction)을 얻었고, 25,000 x g 침전물로부터 리소솜이 많은 분획 (LYSO fraction)을, 48,000 x g 침전물로부터 고밀도미소체분획 (HDM fraction)을, 그리고 430,000 x g 침전물로부터 저밀도미소체 분획 (LDM fraction)을 얻었다.

9. 세포막의 NaB³H₄ 표지 (surface labelling)

세포막에 표지를 하기 위해서 기본적으로 Emerson과 Kornfeld (1976)의 방법에 준하였다. 즉 세포 부유액을 원심분리하여 세포성분만 가라앉힌 후 약 1.2 ml를 취하고 0.9% NaCl을 10 mM sodium acetate (PH 5.5) 용액에 만든 용액으로 세번 씻었다. 세포성분을 같은 원충용액 5 ml에 재부유시키고 여기에 2 mM의 sodium metaperiodate를 가한 후 얼음 속에 약 30분간 세워 두었다가 이후 이를 매번 40 ml의 KRP용액 (PH 7.4)으로 세번 씻고 침전된 세포성분을 3 ml의 같은 원충용액에 재부유시킨 후 5 mM의 NaB³H₄ 용액을 가하고 얼음 속에서 20분간 반응시켰다. 그 후 KRP용액으로 세번 씻고 마지막으로 0.5 mM CaCl₂와 1 mM NaHCO₃가 함유된 균질화 용액 (homogenizing solution)에 재부유시킨 후 균질화와 원심분리 방법으로 세포 각 기관의 분획으로 분리하였다.

10. 포도당 이동속도 및 cytochalasin B 결합력 측정

지방세포와 간장세포에서 포도당운반체 vesicle의 융합 전·후에 포도당 흡수속도를 측정하기 위하여 3-O-methyl glucose를 이용한 Whitesell과 Gliemann (1979)의 방법을 따랐다. 또 지방세포와 간장세포의 세포내 각기관에 분포된 포도당운반체의 양을 측정하기 위해서는 세포로부터 분리된 각 분획의 cytochalasin B 결합능력을 측정하였다. Cytochala-

sin B 결합측정은 하(1986)의 방법에 준하였다.

11. 단백질의 전기영동분석 및 Gel의 방사능 측정

[³H]-cytochalasin B와 sodium borohydride로 표지된 단백질의 분포를 측정하기 위하여 Laemmli (1970) 방법에 의하여 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시하고 coomassie blue (R-250, Kodak, NY, USA)로 염색시킨 후 각 분획에 결합된 방사능을 측정하였다. SDS polyacrylamide gel을 만들기 위하여 acrylamide의 농도는 10%로 하였고 전기영동시 전류는 gel 당 35~40 mA로 약 2.5~3시간 작동시켰으며 coomassie blue에 밤새 염색시키고 50%의 methanol과 10%의 초산 및 40%의 물로 된 제 1

탈색용액에서 1시간 탈색시키고 그후 7%의 초산과 5%의 methanol로 된 제 2 탈색용액에서 4~6시간 탈색시켰다. 완전히 탈색되면 사진을 촬영해 두고 gel을 1 mm 간격으로 slice를 만들어 vial 한개당 1~2개의 slice를 넣고 0.8~1 ml의 30% 과산화수수를 가한후 75°C에서 2시간 가열하여 완전히 용해시키고 여기에 방사능 측정용 용액을 가하여 liquid scintillation counter (Model 3320, Packard, USA)로 방사능을 측정하였다.

12. 단백질정량

단백질량의 측정은 Lowry 등(1953)의 방법에 의하였으며 표준단백질로 우혈청단백질 (bovine serum albumin)을 사용하였다.

Table 1. Subcellular distribution of rat hepatocyte based on the protein amount determined by Lowry method.

Number of rat	Plasma membrane	Mitochondria & nucleus	Lysosome	High density microsomes	Low density microsomes
1	24.7	22.3	31.9	13.2	7.9
2	17.8	46.2	22.5	9.7	3.8
3	24.9	24.7	25.5	16.8	8.1
4	26.7	43.3	17.2	8.8	4.0
5	28.4	41.8	19.3	8.8	1.7
6	22.3	45.6	21.8	5.6	4.7
7	20.4	39.1	27.6	6.7	6.2
8	34.4	32.7	21.1	7.4	4.4
9	23.1	34.0	21.4	14.0	7.5
10	23.2	34.2	31.0	7.7	3.9
11	25.3	37.3	28.2	6.2	3.0
12	18.1	26.7	28.3	18.3	8.6
13	18.5	27.3	28.7	17.3	8.2
14	23.3	34.4	26.8	11.5	4.0
15	31.5	46.5	14.8	4.2	3.0
16	23.1	34.0	21.3	14.1	7.5
17	28.9	42.7	18.9	5.7	3.8
18	31.5	46.5	14.8	4.2	3.0
19	32.2	47.5	15.9	3.1	1.3
20	18.9	27.9	32.5	14.9	5.8
21	27.7	40.9	25.0	4.5	1.9
Mean ± SE	24.9 ± 1.3	36.9 ± 1.7	23.5 ± 1.2	9.6 ± 1.0	4.9 ± 0.5

* Each value denotes the percentage of total protein yielded by subfractionation according to Fleischer & Kervina (1974).

실 험 결 과

1. 간장세포내 각 미세기관의 분포

간장세포를 분리하고 세포막을 파열시킨 후 원심 분리 방법으로 분류한 세포내 각 기관의 분포량을 보면 표 1과 같다. 즉 세포막 분획, 핵 및 미토콘드리아 분획, 리소좀 분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획이 각각 24.9 ± 1.3 , 36.9 ± 1.7 , 23.5 ± 1.3 , 9.6 ± 1.0 및 $4.9 \pm 0.5\%$ 를 차지하였다. 이 표에서 보는 바와 같이 미소체 분획은 약 15%에 불과하였으며 대부분은 미소체 외의 세포막, 미토콘드리아 및 리소좀 성분이었다.

2. 지방세포내 각 미세기관의 분포

흰쥐 (Sprague-Dawley) 103마리의 부고환 조직으로부터 지방세포를 분리하고 세포막을 파열시킨 후 원심분리 방법으로 분류한 세포내 각 기관의 분포량은 표 2와 같다. 세포막 분획, 핵 및 미토콘드리아

분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획의 분포백분율은 각각 29.9 ± 2.6 , 19.4 ± 1.9 , 26.7 ± 1.8 및 $23.9 \pm 2.1\%$ 로서 미소체분획이 50% 이상 차지하였다.

3. Sodium borohydride의 세포막 표지를 통한 세포막 분포

각 미세기관의 분리중 세포막의 오염도를 측정하기 위하여 방사성 동위원소의 NaB^3H_4 로 세포막을 표지하고 같은 방법으로 세포막을 파열시킨 후 원심 분리 방법으로 세포내 각 기관을 분류한 결과는 표 3과 같다. 이 표에 의하면 간장세포에서는 세포막의 분리도중 세포막이 리소좀, 고밀도미소체 및 저밀도미소체로 각각 26.8 ± 2.0 , 8.3 ± 1.3 및 $1.7 \pm 0.4\%$ 씩 오염되는 것으로 나타났다.

4. 세포내 각 미세기관의 cytochalasin B 결합 성상

세포내의 각 미세기관에 분포하고 있는 포도당은

Table 2. Subcellular distribution of rat adipocyte based on the protein amount determined by Lowry method

Number of experiment	Number of rat used	Plasma membrane	Mitochondria & nucleus	High density microsomes	Low density microsomes
1	6	22.6	29.8	35.7	11.9
2	8	29.7	28.8	25.3	16.2
3	8	31.3	22.1	21.8	24.8
4	8	22.1	17.2	27.9	32.8
5	8	27.5	15.5	27.3	29.7
6	8	38.3	32.3	14.1	15.3
7	9	54.6	15.7	20.1	9.6
8	10	28.1	16.1	22.7	33.1
9	7	33.4	23.2	17.7	25.7
10	7	28.9	21.1	26.0	24.0
11	4	34.8	9.3	31.8	24.1
12	6	16.1	12.9	35.4	35.6
13	9	37.3	10.4	30.8	21.5
14	5	15.2	17.3	37.1	30.4
Total 14	Total 103	Mean \pm SE 29.9 ± 2.6	Mean \pm SE 19.4 ± 1.9	Mean \pm SE 26.7 ± 1.8	Mean \pm SE 23.9 ± 2.1

* Each value denotes the percentage of total protein yielded by subfractionation according to Fleischer & Kervina (1974).

Table 3. Distribution of NaB³H₄ labelling to surface membrane of hepatocyte

Fraction Number	PM, N, M	Lysosome	HDM	LDM
1	72.9%	23.6%	2.8%	0.7%
2	57.7	28.5	11.9	1.9
3	70.2	20.1	8.6	1.1
4	59.9	30.6	7.2	2.3
5	54.1	33.5	9.2	3.2
6	64.4	24.9	9.8	0.9
Mean ± SE	63.2 ± 2.9	26.8 ± 2.0	8.3 ± 1.3	1.7 ± 0.4

* PM, N, M denotes the plasma-nucleus-mitochondria enriched subcellular fraction.

* HDM denotes the high density microsomal subcellular fraction.

* LDM denotes the low density microsomal subcellular fraction.

Table 4. D-glucose sensitive cytochalasin B binding characteristics

	PM	Mitochondria	Lysosome	HDM	LDM
Kd (μM)	0.98 ± 0.23	1.10 ± 0.40	0.93 ± 0.13	0.89 ± 0.20	1.03 ± 0.16
Bound (pmoles/mg)	5.01 ± 1.03	2.48 ± 1.12	7.11 ± 0.41	7.97 ± 0.92	9.85 ± 2.79
Total Capacity (%)	30.7	22.5	26.8	12.3	7.7

* PM denotes the plasma membrane.

* HDM denotes the high density microsomal membrane.

* LDM denotes the low density microsomal membrane.

Each value represents a mean ± standard error (SE).

반체의 성상을 비교하기 위해서 분리된 각 homogenate의 cytochalasin B 결합양상을 비교한 결과는 표 4와 같다. 표에서 보이는 바와 같이 세포막, 미토콘드리아, 리소좀, 고밀도미소체 및 저밀도미소체 분획의 cytochalasin B 결합상수는 약 1.0 μM로서 비슷하였으며 결합력은 고밀도미소체 및 저밀도미소체에서 높은 것으로 나타났고 단백질량을 곱하여 전체 결합능력을 비교하면 세포막, 미토콘드리아 및 리소좀 분획이 전체의 약 80%를 보유하고 있는 반면 고밀도미소체 및 저밀도미소체는 20% 이하였다.

5. 세포내 각 기관의 cytochalasin B 광표지 (photolabelling) 결과

세포내 각 기관의 포도당운반체 분획을 관찰하기 위하여 간장세포를 방사능이 있는 [³H]-cytochala-

sin B 존재하에서 자외선으로 광표지를 한 결과는 그림 1과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 세포막-미토콘드리아-핵이 많은 분획, 리소좀 분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획 모두 cytochalasin B로 표지되었으며 분자량 표준치 (molecular marker)와 비교해 보면 포도당운반체로 간주되는 분자량 45,000 dalton에 해당되는 단백질에 가장 현저히 표지되었다. 그의 포도당운반체의 분해산물로 보여지는 29,000 dalton에 해당되는 단백질에도 표지된 것을 보이고 있다.

6. 포도당(D-glucose)이 세포막의 [³H]-cytochalasin B 광표지에 미치는 영향

세포막의 포도당운반체에 [³H]-cytochalasin B를 광표지 시킬때에 포도당이 미치는 영향을 보면 그림 2과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 500 mM의

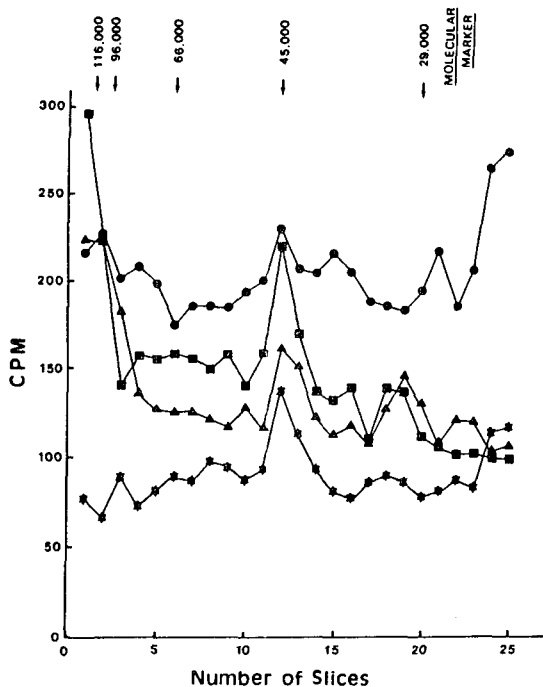


Fig. 1. [³H]-cytochalasin B photolabelling of subcellular fractions of hepatocyte.

[³H]-cytochalasin B (15.8 Ci/mmol or 22 Ci/mmol, Amersham, England) in ethanol was dried under nitrogen and resuspended in 20 mM sodium phosphate buffer (PH 7.4). About 2.5 mg of homogenate in 1 ml of 20 mM sodium phosphate buffer were placed onto a pyrex glass dish (diameter, 20 mm) and incubated in 10 μM cytochalasin E and 0.5 μM [³H]-cytochalasin B in ice for 30 minutes. The reaction mixtures were then irradiated twice for 1 minutes each with 30 seconds rest periods, using a 500 watt mercury lamp (Hanovia Inc, NJ, USA) fitted with a glass filter (SS7-54, Corning Glassware, NY, USA) which transmits ultraviolet light from 260 nm to 350 nm, at a distance 10~15 cm. The reaction mixtures were diluted 20 fold with Krebs-Ringer-HEPES buffer (PH 7.4) containing 10 μM of unlabelled cytochalasin B and centrifuged at 170,000 g for 60 minutes. The pellets were resuspended in distilled water for electrophoresis. Symbols used are for plasma membrane-nucleus-mitochondria enriched fraction (▲), lysosomal fraction (■), high density microsomal fraction (☆) and low density microsomal fraction (●).

D-glucose는 세포막에 존재하는 거의 모든 단백질에서 cytochalasin B의 광표지를 억제시켰다. 포도당

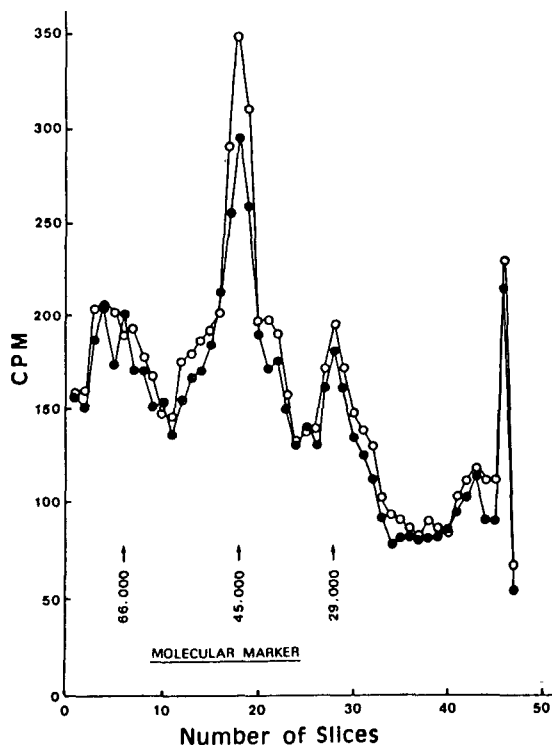


Fig. 2. Effect of D-glucose on [³H]-cytochalasin B photolabelling on plasma membrane.

Plasma membrane isolated from hepatocyte was photolabelled with [³H]-cytochalasin B as shown in figure 1 legend either in the presence (●) or absence (○) of 500 mM D-glucose.

운반체로 보이는 45,000 dalton 크기의 단백질은 약 15% 억제되었고 포도당운반체의 분해산물로 추정되는 29,000 dalton 크기의 단백질에서도 약 10% 억제되었다.

7. 인슐린이 간장세포내 각 기관의 단백질량의 분포에 미치는 영향

인슐린이 세포내 각 기관에 있는 단백질의 이동에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 인슐린의 처리 전후에 세포내 각 기관을 분리하고 단백질량을 측정하여 비교한 결과는 그림 3과 같다. 분리중 세포막의 오염도를 감안하여 세포막-미토콘드리아-핵-리소좀이 많은 분획을 합하여 한 군으로 하고 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획과 비교하면 인슐린을

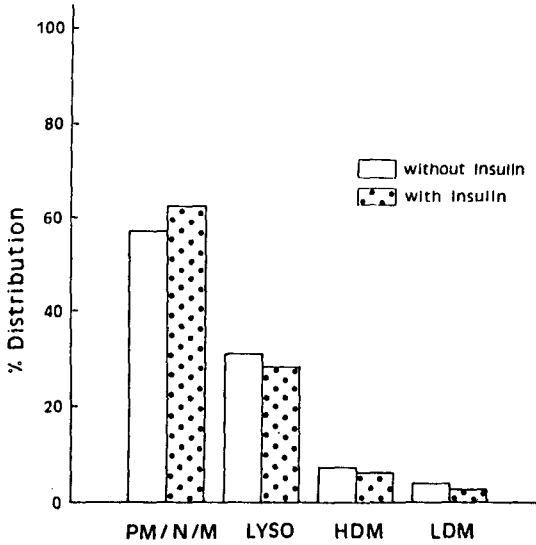


Fig. 3. Effect of insulin on the redistribution of subcellular fractions of hepatocyte based on the protein amount. The amount of protein was measured by Lowry method using bovine serum albumin as protein standard. Subcellular fractionation was done as that of Fleischer & Kervina (1974). One ml of hepatocyte cell in 5 ml of homogenizing solution (0.25 M sucrose + 10 mM HEPES, PH 7.5) was homogenized at 2,000 rpm (3~4 strokes) and subfractionated by centrifugation to get each pellet. Plasma membrane and nucleus-mitochondria enriched fraction was isolated by centrifugation at 1,450×g for 10 minutes, lysosomal fraction was isolated at 25,000×g for 10 min, high density microsomal fraction was isolated at 48,000×g for 30 minutes, and low density microsomal fraction was isolated at 200,000×g for 180 min. The 1,450×g pellet was further purified to separate plasma membrane and mitochondria-nucleus enriched fraction by employing the percoll density gradient centrifugation method of Belsham et al (1980). PM/N/M denotes the plasma membrane/nucleus/mitochondria enriched subcellular fraction. LYSO denotes the lysosome enriched subcellular fraction. HDM denotes the high density microsomal subcellular fraction. LDM denotes the low density microsomal subcellular fraction.

투여하지 않았을때 단백질량의 분포가 각각 88.4, 7.7 및 4.0%이었고 인슐린을 투여한 후 90.8, 6.2 및 3.0%로 거의 변화가 없었다.

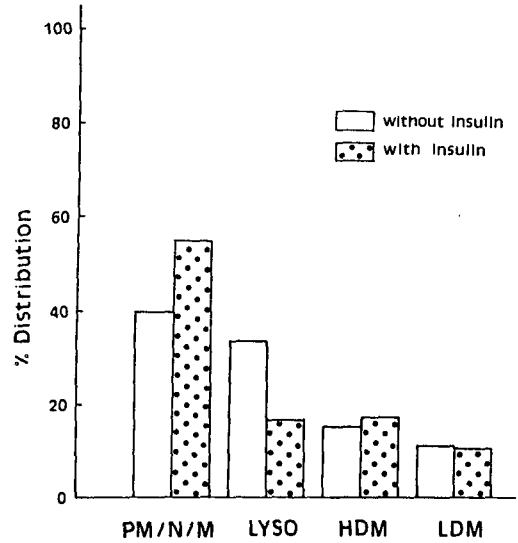


Fig. 4. Effect of insulin on the redistribution of cytochalasin B binding protein of subcellular fractions of hepatocytes.

Equilibrium binding of cytochalasin B to subfractionated homogenates was done by a centrifugation method (Jung & Rampal, 1977). Homogenates were incubated with [³H]-cytochalasin B at specified concentrations for 30 minutes at room temperature and centrifuged for 30 minutes at 4° C at 260,000×g. Pellets and supernatants were recovered free of cross contamination. Radioactivities of both pellets and supernatants were assayed, from which bound ligands were calculated in percent of the total ligands in the assay mixture. Binding data were analyzed by Scatchard (1949) plots. PM/N/M denotes the plasma membrane/nucleus/mitochondria enriched subcellular fraction. LYSO denotes the lysosome enriched subcellular fraction. HDM denotes the high density microsomal subcellular fraction. LDM denotes the low density microsomal subcellular fraction.

8. 인슐린이 간장세포내 각 기관의 cytochalasin B 결합단백질의 분포에 미치는 영향

인슐린이 세포내 각 기관의 포도당운반체 재배치 (redistribution)에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 세포로부터 각 기관으로 분리한 homogenate의 cytochalasin B 결합력을 측정하고 비교한 결과는 그림 4와 같다. 이 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 인슐린 투여전 세포막-미토콘드리아-핵-리소좀 분획, 고

10.6%로 거의 변화가 없었다.

9. 인슐린이 전기영동 분석상에서 간장세포내 각 기관의 단백질 분포에 미치는 영향

인슐린이 세포내 각 기관에 있는 단백질의 이동에 미치는 영향을 육안적으로 측정하기 위해서 인슐린 처치 전후에 세포막 분획과 미토콘드리아-핵 분획을 전기영동 분석한 결과는 그림 5와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 인슐린 처치 전후에 뚜렷한 단백질띠의 변동을 볼 수 없었다.

고 찰

포유동물 세포에서의 포도당 이동은 세포의 종류에 따라 인슐린에 의한 영향이 다르다. 지방세포는 인슐린에 의해서 포도당의 이동이 촉진되는 반면 (Cushman & Wardzala, 1980; Suzuki & Kono, 1980; Simpson et al, 1983; Zorzano et al, 1989) 간장세포에서는 거의 영향이 없는 것으로 알려져 있다 (Craig & Elliot, 1979; Axelrod & Pilch, 1983; Elliott et al, 1984; Ciaraldi et al, 1986; Baly & Horuk, 1988). Cushman과 Wardzala(1980)는 지방세포에서 인슐린이 포도당의 이동을 촉진하는 기전이 세포 내부의 저장고로부터 세포막으로 포도당운반체를 이동시켜 포도당운반체의 수를 증가시키는데 있다는 학설을 제창하였고 많은 연구가들에 의하여 이 학설이 입증되고 있다(Kahn et al, 1985; Toyoda et al, 1987; Joost et al, 1988; Gould et al, 1989). 따라서 세포의 종류에 따른 포도당 이동촉진 기전의 작동 여부는 세포막과 세포질내 저장고 간의 포도당운반체 분포와 밀접한 관계가 있을 것으로 보인다. 본 실험의 목적은 지금까지 포도당의 이동과 인슐린의 작용에 관해서 별로 잘 알려져 있지 않은 간장세포를 택하여 세포내 각 기관의 포도당운반체 분포와 인슐린이 포도당운반체의 재배치에 미치는 영향을 측정하여 인슐린의 작용기전을 밝히고자 하였다. 세포내 포도당운반체의 분포에 관해서는 Ciaraldi 등(1986)이 최초로 보고하였으나 이들의 cytochalasin B 결합시험을 통한 포도당운반체 단백질의 활성도가 아주 낮고, 특히 간장세포에는 리소솜 분

Fig. 5. Gel pictures of plasma membrane and nucleus-mitochondria enriched fraction with or without treatment of insulin.

SDS polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to the method of Laemmli (1970) with some modifications. Samples for gel electrophoresis were solubilized in Laemmli solubilizing solution containing 2% laurylsulfate, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.002% Pyronin Y and 62.5 mM Tris-HCl, PH 6.8. Solubilized samples were incubated at room temperature for 30 minutes and applied on 1.5 mm slab gels were incubated at room temperature for 30 minutes and applied on 1.5 mm slab gels of 10% acrylamide. Electrophoresis was carried out at 35~40 mA/gel for 2.5~3 hours until the tracking dye runs approximately 10 cm from the start of running gels. Gels were stained by coomassie blue (R-250) overnight and destained first by incubating in destaining solution 1 containing 50% ethanol, 10% acetic acid and 40% water for 1~2 hours, then incubated further in destaining solution 2 containing 10% methanol, 7% acetic acid for 4~6 hours. In the figure, lane 1 & 3 show gels of plasma membrane and nucleus-mitochondria fractions isolated from untreated cells as control. Lanes 2 & 4 show gels of plasma membrane and nucleus-mitochondria fractions isolated from insulin treated cells. Molecular weights of molecular markers are 66K, 45K, 36K, 29K, 24K and 20.1K dalton respectively from the top band at left hand side.

밀도미소체 분획 및 저밀도 미소체 분획에 있는 cytochalasin B 결합단백질량의 분포가 각각 73.2, 15.2 및 11.6%이던 것이 인슐린 투여후 72.2, 17.2 및

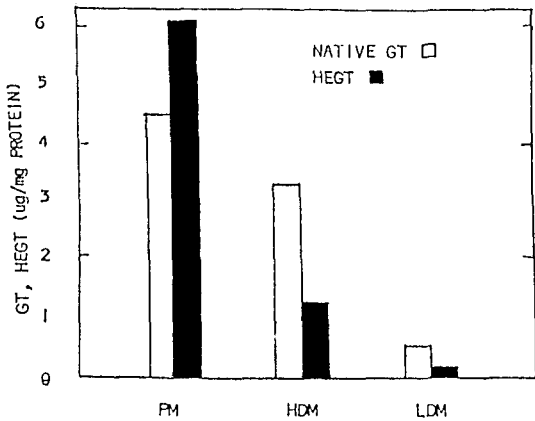


Fig. 6. Subcellular distributions of native glucose transporter and human erythrocyte glucose transporter (HEGT) fused in hepatocyte.

HEGT vesicles were sonicated in ice-cold water using a bath-type sonicator for 2 minutes. When specified, [³H]-cytochalasin B labelled HEGT vesicles were also used. Hepatocyte suspension (cytocrit of approximately 80% in KRH) was mixed with sonicated HEGT vesicles. Usually 50~100 μg HEGT was used for 1 ml of the hepatocyte suspension. The mixtures were then diluted at least 10-fold with KRH buffer and fused hepatocytes were recovered as pellets after centrifugation at 200×g for 4 minutes. Fused hepatocytes were washed 4~5 times with 10-fold KRH buffer to free unfused HEGT vesicles and PEG. Subcellular fractionation was done as shown in figure 3 legend.

획에 많은 양의 포도당운반체 저장고가 있음에도 불구하고 이를 측정하지 않은 점으로 보아 실험성적이 믿기 어렵다.

본 실험에서 간장 세포내 각 기관의 분포를 단백질량을 측정하여 비교한 성적을 보면 세포막 분획보다는 세포내의 리소솜 분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획이 많았으며 (Table 1) 저밀도미소체 분획은 약 5%였다. 그러나 지방세포에서는 포도당의 주 저장고로 알려진 저밀도미소체 분획이 약 24%로서 간장세포에 비하여 약 5배 정도 많았다 (Table 2). Fleischer와 Kervina (1974) 및 Belsham 등 (1980)의 방법에는 이들 각 분획의 오염 (contamination) 정도가 알려져 있지 않으나 이러한 세포내 각 기관의 분포량은 각 분획으로 분리하는 도중에서 서로 섞여 있을 가능성이 있다. Sodium borohy-

dride로 세포막을 표지 (surface labelling) 한 후 같은 방법으로 세포내 각 기관을 분리하면 리소솜 분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획으로 오염된 것을 관찰할 수 있었으며 (Table 3), 이를 감안하면 간세포에는 대부분의 성분이 세포막 분획이고, 미소체 분획은 약 5%에 지나지 않아 지방세포에서 볼 수 있는 세포내 포도당운반체의 저장고로서의 저밀도미소체 분획과 현저한 차이를 보이고 있다. 또한 세포내 각 기관에 분포하고 있는 포도당운반체의 양을 비교하면 세포막, 미토콘드리아, 리소솜, 고밀도미소체 및 저밀도미소체 각 분획에 고루 분포하고 있었으며 세포막 분획에 전체의 약 80% 이상 함유되어 있고 미소체 분획에는 약 20%로서 Jo 등 (1990)이 발표한 지방세포와는 대조적이었다 (Table 4).

간장세포내 각 기관을 cytochalasin B로 광표지 (photolabelling) 한 후 전기영동을 실시하고 gel에 결합된 cytochalasin B 분포를 보면 각 분획 모두 45,000 dalton 크기의 단백질에 가장 많이 결합된 것을 보이므로 (Fig. 1) 각 분획에 포도당운반체가 함유되어 있음을 알 수 있고 29,000 dalton 크기의 단백질은 아마도 포도당운반체의 분해산물 (degradative product)이 아닌가 추측된다 (Deziel & Rothstein, 1984). 세포막의 포도당운반체에 cytochalasin B로 광표지 시킬때에 D-glucose가 광표지를 억제시키는 것으로 보아 포도당운반체에서 두 물질이 상경적으로 결합함을 알 수 있고 이것은 Shanahan 등 (1982)이 보고한 바와 같이 포도당운반체의 성상을 잘 나타내는 것이다 (Fig. 2).

이 연구의 중요한 목적은 간장세포내에 포도당운반체의 저장고가 있으며 인슐린에 의해서 포도당운반체의 전이 (translocation)가 일어나느냐를 연구하는 데 있으므로 간장세포내 각 미세기관의 분포를 측정된 후에 인슐린을 처치하기 전과 처치한 후 단백질량을 측정하여 비교하면 단백질의 분포는 인슐린의 영향이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 또한 간장세포내 각 미세기관에 있는 포도당운반체의 분포가 인슐린에 영향을 받는지를 측정된 결과 거의 영향을 받지 않았고 (Fig. 4) 이 성적은 Ciaraldi 등 (1986)의 보고와 일치하였다. 세포내 포도당운반체가 가장 많이 분포하고 있는 세포막 분획과 미토콘

드리아 및 핵이 많은 분획에서 인슐린 처치 전후에 단백질 분포의 변동을 gel을 통하여 관찰하기 위하여 전기영동 분석한 결과 인슐린에 의한 뚜렷한 변동을 찾아볼 수가 없다(Fig. 5). 이들 실험결과들은 간장세포는 지방세포와 달리 세포내부에 포도당운반체의 저장고가 매우 적을 뿐 아니라 인슐린에 의한 전이전 (translocation mechanism)이 결여되어 있음을 보이는 것이다.

한편 인체 적혈구막으로부터 순수 분리한 포도당운반체 (HEGT)를 PEG를 이용한 vesicle-cell 융합 방법으로 간장세포에 융합시킨 후 포도당운반체의 분포를 측정된 결과 간장세포내의 원래의 포도당운반체 (native glucose transporter)의 분포와 같은 양상으로 저밀도미소체에는 거의 배치되지 않았고 (Fig. 6) 인슐린을 처치하여도 포도당운반체의 분포는 변동이 없었다.

이와 같은 실험결과는 기초상태에서 간장세포에서의 포도당 이동이 지방세포보다 100배 이상 높다는 사실과 매우 유관한 것으로서 인슐린에 의해서 영향을 받는 세포들은 기초상태에서 포도당운반 기능을 낮게 유지함이 필수적이며 세포내부에 저장고를 갖추고 있어야 인슐린 촉진작용이 일어날 수 있음을 보이는 것이다. 비록 인슐린에 반응하는 포도당운반체가 있고 인슐린의 감수성을 유발하는 인자를 모두 갖추고 있다 하더라도 세포내부에 포도당운반체의 저장고가 없으면 인슐린에 의한 포도당운반체의 전이를 통한 동원이 불가능함을 암시한다. 그러나 이외에 간장세포 내에 있는 포도당운반체에 결합이 있어 인슐린에 반응할 수 없는 것인지 또는 세포내부에 인슐린 정보를 전달하는 또 다른 단백질의 결여 때문인지는 더 추구해 보아야 할 과제로 남는다.

결 론

인슐린의 포도당 이동 촉진기전이 세포내부의 포도당운반체 저장고로부터 세포막으로의 포도당운반체 전이 (translocation)에 의한 포도당운반체의 수적 증가에 있다고 알려져 있으므로 세포의 종류에 따른 인슐린의 작용 여부는 세포막과 세포질내 저장고간의 포도당운반체 분포와 밀접한 관계가 있을 것

으로 보인다.

따라서 지금까지 포도당의 이동이 인슐린에 영향을 받지 않는 것으로 알려져 왔지만 포도당운반체의 세포내 분포와 인슐린에 의한 영향에 관해서는 거의 알려져 있지 않은 간장세포를 택하여 세포내 각 미세기관의 분획과 여기에 있는 포도당운반체 분포를 측정하고 인슐린이 운반체의 재배치에 영향을 미치는지를 관찰함으로써 인슐린의 작용기전의 일단을 구명하고자 본 실험을 수행하고 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 간장세포내 각 미세기관의 분포비는 세포막 분획, 핵 및 미토콘드리아 분획, 리소좀 분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획이 각각 24.9 ± 1.3 , 36.9 ± 1.7 , 23.5 ± 1.2 , 9.6 ± 1.0 및 $4.9 \pm 0.5\%$ 로서 저밀도미소체 분획이 약 5%이었다.

2) 지방세포내 각 미세기관의 분포량은 세포막 분획, 핵 및 미토콘드리아 분획, 고밀도미소체 분획 및 저밀도미소체 분획이 각각 29.9 ± 2.6 , 19.4 ± 1.9 , 26.7 ± 1.8 및 $23.9 \pm 2.1\%$ 로서 미소체 분획이 50% 이상이었다.

3) 간장 세포내에 있는 각 미세기관에는 포도당운반체가 고루 분포하고 있었으며 cytochalasin B 해리상수는 약 $1.0 \mu M$ 로서 비슷하였고 cytochalasin B 결합력으로 산출한 포도당운반체의 양은 세포막, 미토콘드리아 및 리소좀 분획에 전체의 80% 이상이 존재하였다.

4) 세포내 각 기관의 cytochalasin B 광표지 결과 포도당운반체의 분자량으로 알려진 45,000 dalton의 단백질에 가장 현저히 표지되었고 D-glucose는 cytochalasin B의 광표지를 억제시켰다.

5) 인슐린은 간장세포내 각 미세기관의 분포에 영향을 주지 않았고 간장세포내 각 미세기관에 존재하는 포도당운반체 단백질의 전이를 일으키지 않았다.

6) 순수한 포도당운반체 vesicles을 간장세포에 융합시킨 후 포도당운반체의 재배치를 측정된 결과 외부에서 가한 포도당운반체도 원래의 포도당운반체와 같은 배분으로 분포하였고 인슐린은 분포의 변동을 일으키지 않았다.

이상의 실험성적으로 보아 인슐린의 포도당 이동 촉진 기전은 세포막과 세포질내에 있는 각 미세기관

의 포도당운반체 분포와 밀접한 관계가 있으며 인슐린에 의해서 포도당의 이동이 촉진되는 지방세포는 세포질내에 비교적 큰 포도당운반체의 저장고를 가지고 있어 기초상태에서는 포도당 이동을 낮게 유지시키나 인슐린 존재시에는 포도당운반체를 세포질내에서 세포막으로 동원하여 세포막에 운반체의 수를 증가시켜 포도당의 이동을 촉진시키는 것으로 볼 수 있다. 그러나 간장세포는 세포질 내부에 포도당운반체의 저장고가 거의 없으므로 인슐린을 투여해도 포도당운반체의 전이가 일어나지 않아 포도당 이동이 증가되지 않는 것으로 생각할 수 있다.

REFERENCES

- Axelrod JD & Pilch PF (1983). Unique cytochalasin B binding characteristics of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry* 22:2222-2227
- Baly DL & Horuk R (1988). The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 947:571-590
- Belsham GJ, Denton RM & Tanner MJA (1980). 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* 192:457-467
- Birnbaum MJ (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57:305-315
- Birnbaum MJ, Haspel HC & Rosen OM (1986). Cloning and characterization of c-DNA encoding the rat brain glucose transporter protein. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 83:5784-5788
- Boni LT, Hah JS, Hui SW, Mukherjee P, Ho JT & Jung CY (1984). Aggregation and fusion of unilamellar vesicles by polyethyleneglycol. *Biochim Biophys Acta* 775:409-418
- Cairns MT, Alvarez J, Panico M, Gibbs AF, Morris HR, Chapman D & Baldwin SA (1987). Investigation of the structure and function of the human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection. *Biochim Biophys Acta* 905:295-310
- Charron MJ, Brosius FC, Alper SL & Lodish HF (1989). A glucose transport protein expressed predominantly in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 86:2535-2539
- Ciaraldi TP, Horuk R & Matthaei S (1986). Biochemical and functional characterization of the liver glucose transport system: Comparison with the adipocyte glucose transport system. *Biochem J* 240:115-123
- Craik JD & Elliott KRF (1979). Kinetics of 3-O-methyl-D-glucose transport in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 182:503-508
- Cushman SW & Wardzala LJ (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell: apparent translocation of intracellular transport system to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255:4758-4762
- Deziel MR & Rothstein A (1984). Proteolytic cleavages of cytochalasin B binding components of band 4.5 proteins of human red blood cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 776:10-20
- Elliott KRF, Bate AJ & Craik JD (1984). Sugar transport across the hepatocyte plasma membrane. *Int J Biochem* 16:1251-1253
- Emerson WA & Kornfeld S (1976). Characterization of the oligosaccharide units of the bovine erythrocyte membrane glycoprotein. *Biochemistry* 15:1697-1703
- Fleischer S & Kervina M (1974). Subcellular fractionation of rat liver. *Methods Enzymol* 31:6-41
- Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI & Seino S (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264:7776-7779
- Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB & Bell GI (1988). Sequence, tissue distribution, and microsomal localization of m-RNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85:5434-5438
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE & Mueckler M (1989). Insulin stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 264:2180-2184
- James DE, Stube M & Mueckler M (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338:83-87

- Jarvis SM (1989). Uniport carriers for metabolites. *Current opinion in cell Biol* 1(4):721-728
- Jo IH, Hah JS, Rampal AL, Chakrabarti R, Craik JD, Cass CE, Zobel CR & Jung CY (1990). Transport function and subcellular distribution of purified human erythrocyte glucose transporter reconstituted into rat adipocytes. *submitted to J Biol Chem MO* -3483
- Joost HG, Weber TM & Cushman SW (1988). Qualitative and quantitative comparison of glucose transport activity and glucose transporter reconstituted into rat adipocytes. *Biochem J* 249:155-161
- Jung CY (1975). Carrier mediated glucose transport across human red cell membranes. In *The Red Blood Cell* (Surgenor, D.M.ed.) Vol. 2, pp. 705-751, Academic Press, New York
- Jung CY & Rampal AL (1977). Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* 252:5456-5463
- Kaestner KH, Christy RJ, McLenithan JC, Braiterman LT, Cornelius P, Pekala PH & Lane MD (1989). Sequence, tissue distribution, and differential expression of m-RNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 86:3150-3154
- Kahn CR, White MF, Grigoresa F, Tokayama S, Haring HU & Crettaz M (1985). The insulin receptor protein Kinase. In *molecular Basis of Insulin Action* (Czech MP ed) pp. 67-93, Plenum Press, New York and London
- Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB & Bell GI (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263: 15245-15248
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1953). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Martz A, Mookerjee BK & Jung CY (1986). Insulin and phorbol esters affect the maximum velocity rather than the half-saturation constant of 3-0-methyl glucose transport in rat adipocytes. *J Biol Chem* 261: 13606-13609
- Mueckler M, Caraso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Lienhard GE & Lodish HP (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941-945
- Scatchard G (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 51:660-666
- Shanahan MF, Olson SA, Weber MJ, Lienhard GE & Gorga JC (1982). Photolabelling of glucose-sensitive cytochalasin B binding proteins in erythrocyte, fibroblast, and adipocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 107:38-43
- Simpson IA, Yver DR, Hissin PJ, Wardzala LJ, Karnieli E, Salans LB & Cushman SW (1983). Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cell: Characterization of subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* 763:393-407
- Suzuki K & Kono T (1980). Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 77:2542-2545
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR & Lodish HF (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. *Cell* 55:281-290
- Toyoda N, Flanagan JE & Kono T (1987). Reassessment of insulin effects on the Vmax and Km values of hexose transport in isolated rat epididymal adipocytes. *J Biol Chem* 262:2737-2745
- Whitesell RR & Glieman J (1979). Kinetic parameters of transport of 3-0-methyl-glucose and glucose in adipocytes. *J Biol Chem* 254:5276-5283
- Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE & Pilch PF (1989). Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicles populations. *J Biol Chem* 264:12358-12363
- 하중식 (1986). 인체적혈구막 Band 4.5 단백질의 기능적인 분자구조. *대한생리학회지* 20:209-217