

平成30年 5月17日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07083

研究課題名(和文) pH制御を介したインスリンの再充填メカニズムの解析

研究課題名(英文) Recycling of insulin by pH

研究代表者

山岡 真美 (Yamaoka, Mami)

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号：10783847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：グルコースは、インスリン顆粒膜と細胞膜との融合を促進することで、膵B細胞からのインスリン分泌を制御している。一方、グルコースは、融合した顆粒膜の回収過程(エンドサイトーシス)にも関わっている。エンドサイトーシスは、インスリン分泌前後で膵B細胞の容積を一定にするためにも、インスリン顆粒を再充填するためにも必須の過程であるが、その分子メカニズムはほとんど知られていない。本研究では、Rab27aがプロトンポンプの複合体形成を促進することを明らかにした。これは、Rab27aが、取り込んだ小胞の酸性化を介してエンドサイトーシスを制御することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Glucose promotes membrane fusion between insulin secretory membranes and plasma membranes, and thereby releases insulin from the vesicles in pancreatic beta-cells. Glucose also promotes endocytosis of the fused secretory membranes. Although endocytosis is essential for cell size maintenance before and after insulin secretion and for refilling of insulin granule pools, little is known about the underlying molecular mechanisms. In the present study, I found that Rab27a regulates the complex formation of proton pumps. These results suggest that Rab27a regulates endocytosis via acidification in endocytosed vesicles.

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：糖尿病、インスリン、エンドサイトーシス、膵B細胞、エキソサイトーシス、膜輸送、シグナル伝達、Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病では、血糖値を下げるホルモンであるインスリンの分泌に異常がみられる。増え続ける2型糖尿病に対する新しい治療を開発することは早急の課題であるが、そのためにはインスリン分泌の量とタイミングを規定するメカニズムを明らかにする必要がある。

ゴルジ体で小胞内に充填されたプロインスリンは、酸性条件で活性化される酵素によってインスリンに変換される(図1)。

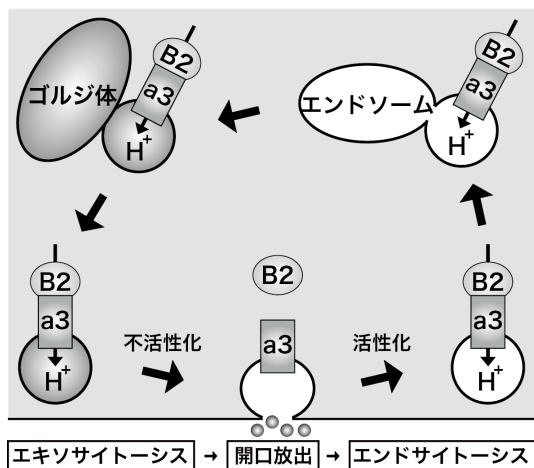


図1 インスリン分泌とプロトンポンプ

この酸性化を担っている分子が、プロトンポンプ vATPase である(図2)。vATPase は複数のサブユニットから構成され、特に B2 と a3 の結合と解離がプロトンポンプ活性を正と負に制御している(J. Biol. Chem. 285, 37476-90, 2010; 図2)。

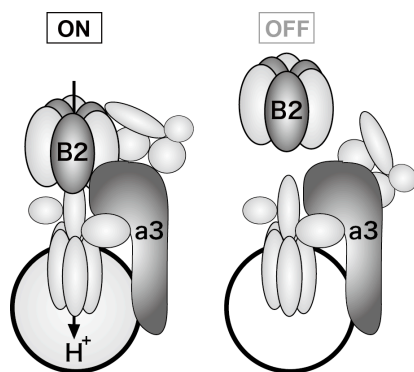


図2 プロトンポンプ vATPase

グルコースは、小胞と細胞膜の融合を促進することで、小胞内のインスリンを放出する(図1)。その際には、a3 が pH の急激な上昇を感知して B2 を解離し、プロトンポンプ活性を抑制する。これは、強い細胞毒性を持つプロトン、細胞外へ放出し続ける危険を回避するためである。その後、vATPase を含む小胞は細胞内に取り込まれ(エンドサイトーシス)、エンドソームと融合する過程を経た後にインスリンを再充填し、次の分泌に備え

る。興味深いことに、この融合には小胞内が酸性化されている必要がある。つまり vATPase は、細胞膜からエンドソームに輸送される過程で再構成され、プロトンポンプ活性を回復していることになる。しかしながら、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究室は、インスリン分泌の司令塔である Rab27a に結合するタンパク質を探索する過程で、GDP 型 Rab27a に結合する分子を複数同定した(J. Cell Sci. 121, 3092-8, 2008; Mol. Cell. Biol. 33, 4834-43, 2013)。Rab27a を含む G タンパク質は、GTP 型が活性型で GDP 型が不活性型だとこれまで考えられてきた。そのため、このドグマに反する GDP 型 G タンパク質結合分子の存在は、G タンパク質の概念を一度見直すべき時期が到来したことを示している(World J. Diabetes 6, 508-16, 2015)。

GTP 型の Rab27a は、インスリン分泌の前段階(エキソサイトーシス)を制御する。申請者らは、インスリンの開口放出を惹起するグルコースが Rab27a を GDP 型に変換し、エンドサイトーシスを制御することを明らかにした(J. Cell Sci. 121, 3092-8, 2008; Mol. Cell. Biol. 33, 4834-43, 2013)。申請者は最近、GDP 型 Rab27a に結合する分子として新たに vATPase の B2 サブユニットを同定した(未発表データ)。また、電子顕微鏡を用いた解析より B2 の発現を抑制した細胞では、取り込まれた小胞がエンドソームなどの酸性オルガネラと融合できないことを明らかにしている。さらに、GDP 型 Rab27a と a3 サブユニットが、B2 のほぼ同じ領域に結合することを明らかにした。B2 と a3 の結合が vATPase のプロトンポンプ活性に必須であることから、GDP 型 Rab27a は膵 B 細胞で pH を制御している可能性が示唆される。

本研究では、GDP 型 Rab27a との結合が vATPase 複合体の形成とプロトンポンプ活性に及ぼす影響を調べる。具体的には、GDP 型 Rab27a と vATPase の結合や各サブユニットの細胞内局在、プロトンポンプ活性を生化学や細胞生物学の手法を用いて解析する。さらに、vATPase が複合体を形成するシグナルの上流過程を解析する。具体的には、Rab27a を GDP 型へ変換する酵素に結合するタンパク質の同定と機能解析を行うことで、グルコースと Rab27a シグナルとの間のミッシングリンクを解明する。

3. 研究の方法

(1) GDP 型 Rab27a による vATPase の活性制御機構

平成 28 年度は、GDP 型 Rab27a が vATPase の複合体形成とプロトンポンプ活性に及ぼす影響を検討した。具体的には、vATPase 複

合体の形成と解離のメカニズムを解明した。プロトンポンプ活性は、pH感受性蛍光色素を用いたライブイメージングにより解析した。

- ① GDP型 Rab27a が B2 と a3 の結合に及ぼす影響を、免疫沈降実験と精製タンパク質を用いた結合実験により解析した。
- ② 構造解析のデータを参考に結合実験を行い、B2 の結合サイトをアミノ酸レベルで同定した。次に、ドミナントネガティブやドミナントアクティブ変異体の作製を行った。
- ③ 内在性の B2 と a3 の細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。具体的には、Rab27a を GDP 型に変換するグルコースや小胞内の pH を上昇させる NH₄Cl を処理した細胞を用いた。さらに、Rab27a や上記変異体を導入することで、結合と局在の関わりを明らかにした。
- ④ GDP 型 Rab27a と B2 の結合が、vATPase のプロトンポンプ活性に及ぼす影響を調べた。具体的には、pH 感受性の蛍光指示薬や蛍光タンパク質を用い、刺激や変異体の導入が小胞内の pH に及ぼす影響を解析した。

(2) グルコースによる Rab27a の変換機構

平成 29 年度は、vATPase を再構成するシグナルの上流を解明するために、Rab27a が GDP 型に変換されるメカニズムを解析した。申請者は既に、グルコースによって Rab27a が GDP 型に変換されること、その変換には Rab27a-GAP が関与することを見いだしているが、グルコースと Rab27a-GAP の間をつなぐシグナルは未だ不明である。そこで、Rab27a-GAP の新規結合タンパク質を同定することで、シグナルの全容解明を試みた。

- ① Rab27a-GAP をリガンドとしたアフィニティカラムに腓 B 細胞の抽出液をアプライし、結合タンパク質をマス解析により同定した。
- ② 精製タンパク質を用いた結合実験より解離定数(Kd)を算出し、結合が直接かつ特異的であることを示した。
- ③ 同定した分子が Rab27a の変換に及ぼす影響を、pull down assay により評価した。この pull down assay は申請者が以前に開発した方法で、細胞内の GDP 型 Rab27a を高感度で検出可能である (*J. Cell Sci.* 129, 637-49, 2016)。
- ④ 細胞をグルコースで刺激し、各タンパク質の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより解析した。
- ⑤ 同定したタンパク質のドメイン構造を指標に複数のフラグメントを作製し、Rab27a-GAP 結合部位を同定した。さらに、結合部位より各種変異体の作製を行った。
- ⑥ siRNA や上記変異体を細胞に導入し、各タンパク質の局在や動態に及ぼす影響を検討した。エンドサイトーシスに及ぼす影響は、フォグリン抗体の取り込み実験やエンドサイトーシスマーカー FM4-64 により解析した。

pH に及ぼす影響は、pH 感受性の蛍光指示薬や蛍光タンパク質を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) GDP 型 Rab27a による vATPase の活性制御機構

平成 28 年度は、GDP 型 Rab27a がプロトンポンプとの複合体形成と活性に及ぼす影響を検討した。免疫沈降実験より、GDP 型 Rab27a がプロトンポンプと細胞内で複合体を形成することを明らかにした。さらに、精製タンパク質を用いた *in vitro* binding assay より、その結合が直接であることを明らかにした。また、Rab27a とプロトンポンプの結合を抑制した細胞では、エンドサイトーシスされた小胞内の酸性化が抑制された。

(2) グルコースによる Rab27a の変換機構

平成 29 年度は、vATPase を再構成するシグナルの上流を解明するために、Rab27a が GDP 型に変換されるメカニズムを解析した。Rab27a-GAP をリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィとマス解析を組み合わせることで、Rab27a-GAP 結合候補タンパク質を複数見出した。精製タンパク質を用いた結合実験より解離定数(Kd)を算出し、結合が直接かつ特異的であることを明らかにした。また、pull down assay の結果より、このタンパク質が Rab27a の変換に関わることを明らかにした。

以上の結果より、インスリン分泌を終えた小胞内で pH をコントロールする分子メカニズムの一端が明らかになった。本研究成果は、次年度以降も行う G タンパク質の活性制御機構の解析を理解する上で極めて重要であると共に、腓 B 細胞のエンドサイトーシスシグナリングという意味からも基礎生物学上重要な知見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

① 山岡真美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
腓 B 細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの解析。

第 40 回 日本分子生物学会年会 (2017 年 12 月 6 日 兵庫県神戸市)

② 山岡真美、荒巻千香子、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀

腓 B 細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの分子メカニズムの解析。

第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会 (2017 年 5 月 19 日 愛知県名古屋市)

③ 姫野冴美、山岡真美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀

膵B細胞におけるGDP型Rab27a新規結合タンパク質の機能解析.

第90回日本薬理学会年会 (2017年3月17日 長崎県長崎市)

④ 荒巻千香子、山岡真美、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀

膵B細胞におけるエンドサイトーシスの解析.

第90回日本薬理学会年会 (2017年3月17日 長崎県長崎市)

⑤ 山岡真美、荒巻千香子、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀

膵B細胞におけるRab27a-GAPを介したグルコース誘導性エンドサイトーシスの制御.

第90回日本薬理学会年会 (2017年3月17日 長崎県長崎市)

⑥ 山岡真美、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀

Gタンパク質によるインスリン分泌後のエンドサイトーシスの制御.

第39回日本分子生物学会年会 (2016年12月2日 神奈川県横浜市)

[図書] (計1件)

① 山岡真美

インスリン分泌後、膵B細胞では何が起きているのか?

Diabetes Strategy, 7, 47-52, 2017

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 真美 (Yamaoka, Mami)

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号: 10783847