

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08547

研究課題名(和文) アクティブゾーン蛋白質ELKSのインスリン極性分泌における役割

研究課題名(英文) Role of the active zone protein, ELKS, in insulin secretion from pancreatic beta cells

研究代表者

今泉 美佳 (Ohara-Imaizumi, Mica)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：40201941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞からのインスリン分泌は毛細血管方向へCa²⁺依存性に極性分泌されることが示唆されているがその分子機構は未だ不明である。本研究では神経終末での極性分泌を担うアクティブゾーン蛋白質ELKSに着目し、膵細胞におけるインスリン極性分泌機構の解明を目的とした。研究の結果、ELKSは毛細血管側の細胞膜領域でL-type 電位依存性Ca²⁺チャネルと複合体を形成しており、グルコース刺激により直ちに引き起こされるCa²⁺流入を促進させ、インスリン分泌第1相における毛細血管方向へのインスリン極性分泌を促進的に調節していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりアクティブゾーンタンパク質ELKSがインスリン分泌第1相において血管方向へのインスリン極性分泌をコントロールしていること、また2型糖尿病ではこの極性分泌機構がELKS発現低下により破綻している可能性を明らかにした。この結果は2型糖尿病のインスリン分泌不全の成因解明に貢献するだけでなく、従来の糖尿病薬とは異なる作用機序を持つELKSを標的とした新たな糖尿病治療薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta cells secrete insulin by Ca²⁺-triggered exocytosis. However, there is no apparent secretory site similar to the neuronal active zones, and the cellular and molecular localization mechanism underlying polarized exocytosis remains elusive. We demonstrated that active zone protein, ELKS and L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels form a potent insulin secretion complex at the vascular side of the beta cell plasma membrane for polarized Ca²⁺ influx and insulin secretion from islets.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン分泌 膵細胞 アクティブゾーンタンパク質 極性分泌

1. 研究開始当初の背景

シナプスからの神経伝達物質放出はプレシナプス膜直下にあるアクティブゾーンと呼ばれる限局した部位で起こることが知られている。アクティブゾーンはシナプス小胞がドッキングして融合する特異的な構造体であり、神経伝達物質の極性分泌の位置とタイミングを制御している。このアクティブゾーンには電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと共に、アクティブゾーン蛋白質と呼ばれる Bassoon, Piccolo, RIM1, Munc13-1, ELKS (CAST) が発現しており、プレシナプスからの神経伝達物質放出を調節していると考えられている。アクティブゾーン蛋白質の中で、特に ELKS は他のアクティブゾーン蛋白質の全てと直接または間接的に結合することから、ELKS はアクティブゾーンタンパク質複合体形成のプラットフォームと考えられている¹⁾。

一方、ホルモン分泌である膵β細胞からのインスリン分泌においては、主に組織化学的解析により膵島内β細胞は静脈系毛細血管を囲むように配置しており、インスリンはβ細胞膜の毛細血管に面した部分から毛細血管方向へ極性分泌されることが報告されている²⁻⁴⁾。しかし、どのようなメカニズムで血管方向へのインスリン極性分泌が行われているのか、また膵β細胞にも神経シナプスのアクティブゾーンのような特別な開口分泌部位 (hot spot) が存在するのかわかるとは長年議論されてきた。

私達はアクティブゾーンタンパク質 ELKS が膵β細胞においても発現しており、ELKS がインスリン顆粒と共にβ細胞の毛細血管側の細胞膜近傍に偏って局在していることを発見し、また膵β細胞からのインスリン分泌を調節していることを報告した⁵⁾。この結果は ELKS がインスリン極性分泌解明の break through となる可能性を強く示唆したものである。しかし、ELKS によるインスリン極性分泌調節機構については未解明である。

2. 研究の目的

膵β細胞からのインスリン分泌は毛細血管方向へ極性分泌されることが示唆されているがその分子機構は未だ不明である。本研究ではアクティブゾーンタンパク質 ELKS に着目し、膵β細胞特異的 ELKS ノックアウトマウスから調製した膵島を主に用いて ELKS のインスリン開口分泌調節機構をイメージング解析し、ELKS による毛細血管方向へのインスリン極性分泌制御の分子基盤を解明する。さらにこれらの成果を2型糖尿病モデル動物を用いて検証し、ELKS 発現低下による極性分泌の破綻と2型糖尿病におけるインスリン分泌低下との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞特異的 ELKS ノックアウト (ELKS^{flox/flox}; Cre mouse: ELKS β KO) マウスを Cre/Lox システムを用いて作成し、ELKS β KO マウスの糖負荷試験を行った。ELKS β KO マウスでの膵灌流実験、また ELKS β KO マウスから調製した膵島やβ細胞を用いてインスリン分泌解析を行った。

(2) コントロールマウス (ELKS^{flox/flox} mouse)、ELKS β KO マウスから調製した膵島やβ細胞を用いて組織化学実験、共焦点蛍光顕微鏡によるイメージング解析、生化学実験、電気生理学実験を行い、ELKS の発現低下および機能不全がどのようなメカニズムでインスリン分泌低下を引き起こすのかを調べた。

(3) 2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いて、2型糖尿病におけるインスリン分泌低下と ELKS との関連を調べた。

4. 研究成果

(1) イムノブロット実験により、コントロールマウスの膵島では2種類の ELKS アイソフォーム (ELKS α, ELKS ε) が発現していたが、ELKS β KO マウスから調製した膵島ではこれら ELKS の発現が顕著に低下していた。また、ELKS β KO 膵島の免疫染色においてβ細胞に発現している ELKS の発現低下を確認した。ELKS β KO マウスに糖負荷試験を行ったところ、耐糖能異常が見られた。

(2) ELKS β KO マウスから調製した単離膵島からのインスリン分泌測定実験ではグルコース刺激及び KCl 刺激応答性のインスリン分泌が低下していた。さらにグルコース刺激下での膵灌流実験により、インスリン分泌第1相が選択的に低下していることがわかった。ELKS-KO β細胞内 Ca^{2+} 測定を行った所、グルコース刺激及び KCl 刺激共に細胞内 Ca^{2+} 上昇応答が大きく低下しており、ELKS が細胞内 Ca^{2+} 上昇を促進することでインスリン分泌を増加させている可能性が示唆さ

れた。

(3) 免疫沈降実験を行った所、ELKS は β 細胞に局在している L-type 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) の構成サブユニットの VDCC $\beta 2$ および VDCC $\beta 3$ と相互作用していることがわかった。さらに Recombinant タンパク同士の結合実験を行った結果、ELKS の N 端のドメインと VDCC $\beta 2/\beta 3$ の GK (グアニル酸キナーゼ) ホモロジドメインと直接結合していることがわかった。GK ホモロジドメインは VDCC のカルシウムイオンの通過を担う α サブユニットと結合しているドメインであるため、ELKS は VDCC $\beta 2/\beta 3$ の GK ホモロジドメインを介して VDCC α サブユニットの活性化をコントロールしている可能性が示唆された。

(4) 電気生理学実験 (β 細胞の whole cell patch 実験) を行い、ELKS-KO β 細胞での Ca^{2+} 電流の解析を行った。電流-電圧 (I-V) 曲線の解析結果から、ELKS-KO β 細胞では L-type VDCC の特異的阻害剤である nifedipine 感受性の電流密度の有意な低下が観察された。一方、L-type VDCC サブユニットの発現量をコントロール腓島と ELKS β KO 腓島で調べた所、発現は同程度であった。従って、ELKS-KO β 細胞における電流密度の低下は L-type VDCC サブユニットの量的な減少によるものではなく、ELKS 欠損による L-type VDCC の機能低下が考えられた。これらの結果から、ELKS は VDCC $\beta 2/\beta 3$ を介して、L-type VDCC の活性化を促進的に調節していることが示唆された。

(5) 腓島の免疫染色による解析を行った結果、ELKS はインスリン顆粒とともに毛細血管側の β 細胞膜近傍に偏って局在していた。腓島内 β 細胞膜直下の *in situ* Ca^{2+} イメージングを Ca^{2+} センサーである G-CaMP8b を β 細胞膜に発現させて行ったところ、コントロール β 細胞ではグルコース刺激での Ca^{2+} 上昇は毛細血管側の β 細胞膜で先行して出現したが、ELKS-KO β 細胞ではその Ca^{2+} 上昇が減少していた。

(6) 以上の結果から、ELKS は毛細血管側の β 細胞膜領域に局在しており、L-type VDCC と複合体を作ること、この領域におけるグルコース刺激により即座に引き起こされる Ca^{2+} 流入を促進させ、分泌第 1 相における毛細血管方向へのインスリン極性分泌をコントロールしていることを明らかにした。

(7) 2 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスの腓島では ELKS の発現量が低下していた。*db/db* マウスの腓島ではグルコース刺激下の毛細血管側の β 細胞膜での Ca^{2+} 上昇が減少しており、これにより *db/db* マウス腓島 β 細胞からのインスリン分泌が低下していることを明らかにした。これらの結果から、2 型糖尿病では ELKS による血管方向へのインスリン分泌促進機構が破綻しており、インスリン分泌障害が引き起こされていることを示唆した。

<引用文献>

1. Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M., Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H., Takai, Y., 2002. Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158, 577-590.
2. Orci, L., Thorens, B., Ravazzola, M., Lodish, H., 1989. Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* 245, 295-297.
3. Bonner-Weir, S., 1988. Morphological Evidence for Pancreatic Polarity of β -Cell Within Islets of Langerhans. *Diabetes* 37, 616-621.
4. Low, J.T., Zavortink, M., Mitchell, J.M., Gan, W.J., Do, O.H., Schwiening, C.J., Gaisano, H.Y., Thorn, P., 2014. Insulin secretion from beta cells in intact mouse islets is targeted towards the vasculature. *Diabetologia* 57, 1655-1663.
5. Ohara-Imaizumi, M., Ohtsuka, T., Matsushima, S., Akimoto, Y., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Kikuta, T., Nagai, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Nagamatsu, S., 2005. ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic beta cells and functions in insulin exocytosis: interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Mol. Biol. Cell* 16, 3289-3300.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohara-Imaizumi Mica, Aoyagi Kyota, Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 27
2. 論文標題 Role of the active zone protein, ELKS, in insulin secretion from pancreatic β -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 S81 ~ S91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2019.06.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohara-Imaizumi, M., Aoyagi, K., Yamauchi, H., Yoshida, M., Mori, M.X., Hida, Y., Tran, H.N., Ohkura, M., Abe, M., Akimoto, Y., Nakamichi, Y., Nishiwaki, C., Kawakami, H., Hara, K., Sakimura, K., Nagamatsu, S., Mori, Y., Nakai, J., Kakei, M., and Ohtsuka, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 ELKS/Voltage-dependent Ca^{2+} channel-Subunit Module Regulates Polarized Ca^{2+} Influx in Pancreatic β -Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1213-1226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.12.106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 今泉美佳	4. 巻 47
2. 論文標題 膵細胞のアクティブゾーンタンパク質ELKSが血管方向へのインスリン極性分泌をコントロールする	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Journal	6. 最初と最後の頁 168-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 今泉美佳	4. 巻 9
2. 論文標題 アクティブゾーンタンパク質ELKSによるインスリン極性分泌調節機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Strategy	6. 最初と最後の頁 156-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Udagawa Haruhide, Hiramoto Masaki, Kawaguchi Miho, Uebanso Takashi, Ohara Imaizumi Mica, Nammo Takao, Nishimura Wataru, Yasuda Kazuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of the taste receptor related G protein, gustducin, in pancreatic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Araki Kunihiko, Araki Amane, Honda Daiyu, Izumoto Takako, Hashizume Atsushi, Hijikata Yasuhiro, Yamada Shinichiro, Iguchi Yohei, Hara Akitoshi, Ikumi Kazuhiro, Kawai Kaori, Ishigaki Shinsuke, Ohara-Imaizumi Mica et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 TDP-43 regulates early-phase insulin secretion via CaV1.2-mediated exocytosis in islets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3578 ~ 3593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI124481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoyagi, K., Itakura, M., Fukutomi, T., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Torii, S., Makiyama, T., Harada, A., Ohara-Imaizumi, M.	4. 巻 159
2. 論文標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic β -cells from male mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3674-3688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-00447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Krishnankutty A, Kimura T, Saito T, Aoyagi K, Asada A, Takahashi SI, Ando K, Ohara-Imaizumi M, Ishiguro K, Hisanaga SI.	4. 巻 7
2. 論文標題 In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 activity in neurons and brains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09239-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ohara-Imaizumi, M., Aoyagi, K. and Ohtsuka, T.
2. 発表標題 Role of active zone protein ELKS in insulin secretion from pancreatic β -cells
3. 学会等名 20th Anniversary Servier-IGIS Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今泉美佳
2. 発表標題 アクティブゾーンタンパク質のインスリン極性分泌における役割
3. 学会等名 第23回臨床内分泌病理学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧山智彦, 青柳共太, 中道洋子, 西脇知世乃, 小泉修一, 今泉美佳
2. 発表標題 妊娠期膵細胞でのP2X7受容体によるインスリン分泌亢進機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳共太, 板倉誠, 西脇知世乃, 中道洋子, 牧山智彦, 今泉美佳
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic beta-cells.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今泉美佳、青柳共太、吉田昌史、飛田耶馬人、大倉正道、山内肇、崎村建司、中井淳一、加計正文、永松信哉、大塚稔久
2. 発表標題 アクティブゾーンタンパク質ELKSのインスリン分泌における役割
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohara-Imaizumi, M
2. 発表標題 Role of active zone protein ELKS in insulin exocytosis from pancreatic beta cells
3. 学会等名 Forefront of Neurotransmitter Release and Calcium Channel Signaling（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青柳共太、板倉誠、福富俊之、西脇知世乃、中道洋子、鳥居征司、牧山智彦、原田彰宏、今泉美佳
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic β -cells
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aoyagi K., Itakura M., Nakamichi Y., Nishiwaki C., Torii S., Nagamatsu S., & Ohara-Imaizumi M.
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic β -cells.
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohara-Imaizumi M. Hida, Y., Yoshida, M., Aoyagi, K., Ohkura, M., Sakimura, K., Nakai, J., Kakei, M., Nagamatsu, S., Ohtsuka, T.
2. 発表標題 Role of active zone protein ELKS in insulin secretion from pancreatic β -cells.
3. 学会等名 第11回Diabetes Leading-edge Conference
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青柳共太、西脇知世乃、中道洋子、福富俊之、鳥居征司、牧山智彦、櫻井裕之、板倉誠、今泉美佳
2. 発表標題 膵細胞におけるVAMP7によるオートファゴソーム形成の制御機構
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会、第40回日本分子生物学会年会合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今泉美佳
2. 発表標題 インスリン分泌におけるアクティブゾーンタンパク質の役割 (基調講演)
3. 学会等名 第26回東京インスリン分泌研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

杏林大学医学部細胞生化学教室 http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/insulin/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	青柳 共太 (Aoyagi Kyota) (50453527)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
連携研究者	大塚 稔久 (Ohtsuka Toshihisa) (40401806)	山梨大学・医学部・教授 (13501)	