

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18790203
 研究課題名（和文） cAMP による開口分泌制御における cAMP compartment の意義
 研究課題名（英文） The functional significance of cAMP compartment
 in cAMP-regulated exocytosis
 研究代表者
 柴崎 忠雄（SHIBASAKI TADAO）
 神戸大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：00323436

研究成果の概要：

膵β細胞において cAMP シグナルは、インスリン顆粒の細胞内から細胞膜へのリクルートメントと細胞膜への融合を促進することでインスリン分泌を増強することが明らかになった。また cAMP センサー Epac2 は細胞膜近傍のインスリン顆粒プールのサイズを増やすことでインスリン分泌増強の第 1 相を担っていた。さらにこのような Epac2 の機能には、Epac2 の細胞膜への局在が必要であったことから、細胞膜近くに存在する cAMP つまり、cAMP compartment が Epac2 を介したインスリン分泌増強に重要であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：インスリン分泌、糖尿病、インスリン分泌顆粒、膵β細胞、バイオイメージング、
全反射型蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

cAMPは種々の分泌細胞での開口分泌において極めて重要な細胞内シグナルである。例えば、神経細胞では神経伝達物質放出の増強、内分泌細胞（膵β細胞、下垂体など）ではホルモン分泌の制御、外分泌細胞では酵素放出等の惹起が挙げられる。最近、cAMPは細胞全体ではなく細胞内の特定領域（compartment）で機能することによって、そのシグナルの多様性を生み出していると考えられている。このようなcAMP compartmentはProtein kinase A (PKA)を中心としたcAMPシグナルについて解析され、多くは心筋細胞をモデルシステムとしている。PKA以外のcAMP結合タンパク質であるEpacはEpac1とEpac2の2つのサブタイプから成り、PKA非依存性の様々な細胞機能を担っている。EpacのcAMPに対する結合親和性はPKAに比べて100倍以上低く、高濃度のcAMP存在下でのみ活性化されると考えられている。

分泌細胞におけるcAMPによる開口分泌の制御は、(1)分泌細胞の種類、(2)受容体の種類、(3)cAMP結合タンパク質の種類によって異なることが知られている。(1)について、膵β細胞ではcAMPはCa²⁺によるインスリン分泌を増強させるのに対し、外分泌細胞では、cAMPは単独で酵素放出を惹起させる。(2)について、消化管ホルモンGLP-1、GIPとともに膵β細胞の細胞膜上の受容体を介して、細胞内cAMP産生を上昇させインスリン分泌を増強するが、各々の作用機序は異なることが示唆されている。(3)について、cAMPはPKA依存性経路と非依存性（Epac2依存性）経路を通じて、膵β細胞でのインスリン分泌を増強させる。これらのcAMPの作用にはcAMP compartmentが深く関与すると考えられるが、詳細なメカニズムは全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究ではcAMPによって制御される開口分泌におけるcAMP compartmentの意義を明らかにすることを目的に以下を検討する。

- (1)膵β細胞でのcAMP compartmentを構成する分子メカニズムとその制御機構
- (2)EpacシグナルのcAMP compartmentのインスリン分泌における意義

3. 研究の方法

- (1)膵β細胞におけるインスリン顆粒動態の解析
インスリンを蛍光タンパク質Venusで標識したインスリンVenusをアデノウイルスを用いて、初代培養膵β細胞に発現させた。2日後、全反射型蛍光顕微鏡によるインスリン顆粒動態の解析を行った。本解析システムでは、細胞膜から40 nm以内のインスリン顆粒動態の解析が可能であった。
- (2)種々の刺激によるインスリン顆粒動態の解析
高濃度グルコースあるいは高濃度K⁺刺激によるインスリン顆粒動態を(1)のシステムを用いて解析した。またcAMPアナログ8-Bromo-cAMP存在下、高濃度グルコース刺激を行い、同様に解析した。
- (3)Epac2を介したインスリン顆粒動態制御の解析
Epac2欠損マウスの膵β細胞を初代培養し、(1)(2)の方法を用いて、cAMPによるインスリン顆粒動態制御におけるEpac2の役割を検討した。
- (4)Epac2の下流分子、低分子量Gタンパク質Rap1のインスリン顆粒動態への関与
膵β細胞株MIN6細胞を用いて、cAMPによるRap1の活性化をGST-RalGDSを用いたGST-pull downアッセイで検討した。刺激は消化管ホルモンGIPとGLP-1、Epac選択的cAMPアナログ8-pCPT-2-O-Me-cAMPで行った。
- (5)Epac2 FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）プローブの作製
Epac2のN末端側にCFP、C末端側にYFPを結合させたCFP-Epac2-YFPを作製した。このプローブをMIN6細胞に発現させ、Epac2の活性化をリアルタイムで解析した。
- (6)Epac2Bの機能解析
Epac2のN末端側のcAMP結合ドメインAを欠損した新たなSplice variant Epac2Bをクローニングし、MIN6細胞における細胞内局在およびcAMPによるインスリン分泌増強における役割を検討した。
- (7)cAMP compartmentを構成する分子に関する解析
①MIN6細胞の細胞膜を破碎した後、超遠心機で分画した。脂質ラフト分画およびその他の分画を集め、Epac2やPKAなどのcAMPシグナルに関与する分子の抗体によるウエスタンブロット解析を行った。
②低分子量Gタンパク質Rab11の標的分子Rip11がcAMPによるインスリン分泌増強に関与するかをMIN6細胞あるいはEpac2欠損膵β細胞株で検討した。またPKAによるRip11のリン酸化をRip11の変異体を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) インスリン顆粒の膜融合における Epac2 の役割
 インスリン Venus を発現させた初代培養膵β細胞のインスリン顆粒動態を全反射蛍光顕微鏡を用いて解析する方法を確立した。

本法を利用し、種々の刺激によるインスリン顆粒の開口分泌過程を詳細に検討したところ、分泌顆粒動態の特性により、①細胞膜にすでにドッキングしていた顆粒が膜融合する、②刺激によって新たに細胞膜にリクルートされた顆粒が瞬時に膜融合する、③刺激によって新たに細胞膜にリクルートされた顆粒が一時的にドッキングした後、膜融合する3つ様式に分類された(図1)。これらの様式をそれぞれ old face、restless newcomer、resting newcomer と命名した。

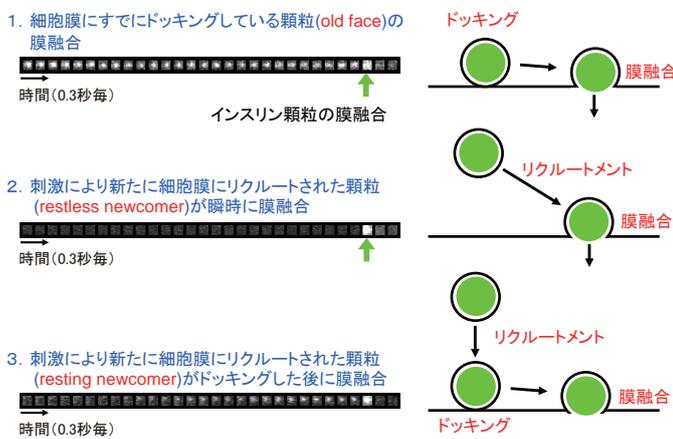


図1. インスリン顆粒の開口分泌様式

高濃度 K^+ 刺激、つまり Ca^{2+} によってのみ惹起される分泌は、瞬時でしかも一過性の分泌であり、old face が主要であった。一方、グルコース刺激では一過性の第1相と持続的な第2相のいずれも大部分は restless newcomer であった。したがって細胞内シグナルにより開口分泌の様式が異なることが初めて明らかになった(図2)。

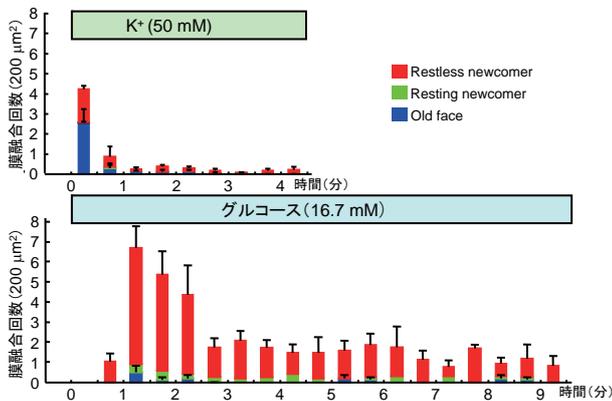


図2. シグナルによる開口分泌様式の違い

インスリン顆粒動態に対する cAMP の効果と cAMP によるインスリン開口分泌制御における Epac2/Rap1 シグナルの役割について全反射型蛍光顕微鏡を用いて検討した。8-Bromo-cAMP 前処置により、グルコースによるインスリン分泌の第1相、第2相ともに膜融合の頻度が増加し、インスリン分泌の増強効果がみられた。また、この増強は、第1相、第2相ともに restless newcomer によるものであった(図3)。

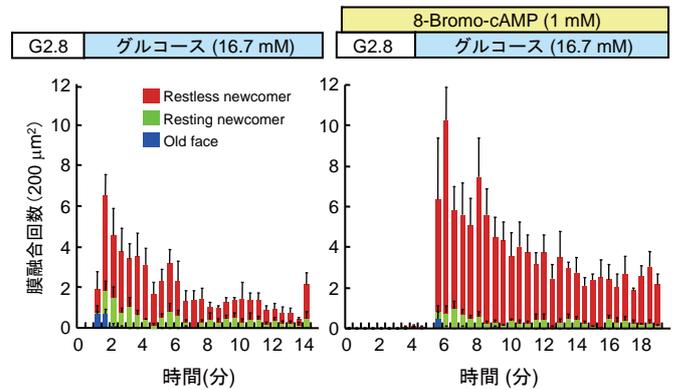


図3. cAMPによるインスリン分泌の増強

Epac2 欠損マウスから単離した初代培養膵β細胞において、8-Bromo-cAMPによる第1相の膜融合頻度の増強がほとんど認められなかった。一方、第2相の増強は野生型のβ細胞と同程度であった(図4)。第1相におけるインスリン顆粒の膜融合の増強は、コンピューターシミュレーションモデルを用いた解析から、細胞膜付近の顆粒プールの増大が関与することが示唆された。

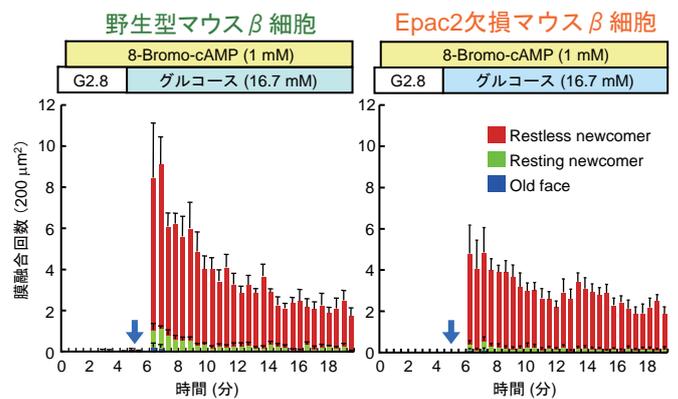


図4. cAMPによるインスリン分泌増強における Epac2 の役割

MIN6 細胞での低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性化を検討したところ、グルコース単独刺激で Rap1 は活性化されなかったが 8-Bromo-cAMP、8-pCPT-2-O-Me-cAMP (Epac 選択的 cAMP アナログ)、GLP-1 および GIP 刺激で活性化された。8-Bromo-cAMP による Rap1 の活性化は PKA 阻害剤 H-89 存在下、抑制されなかった。また、Rap1 は 8-Bromo-cAMP によるインスリン分泌増強を

担っていた。以上の結果から、cAMPにより活性化された Epac2/Rap1 シグナルは PKA 非依存的に細胞膜近傍に存在するインスリン顆粒プールを増大させることで、インスリン分泌の第1相を増強するというインスリン分泌の新たな制御機構が示唆された (図5)。本成果は cAMP compartment モデルの実証にも結びつくものと考えられる。

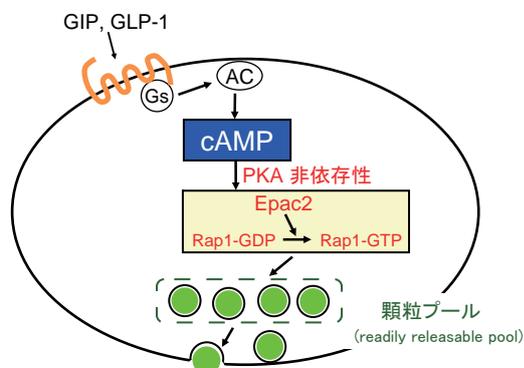


図5. Epac2/Rap1 シグナルによるインスリン分泌制御

(2) Epac2 を用いた FRET センサーの開発とその応用
 膵β細胞における cAMP compartment の存在を明らかにする目的で作製した CFP-Epac2-YFP FRET プローブを MIN6 細胞に発現させ、アデニル酸シクラーゼ活性化剤 forskolin で刺激したところ、細胞内 cAMP レベルの上昇を感知したことから、このプローブは FRET センサーとして機能することが確認された。このプローブを用いて、ある種の薬剤に対する Epac2 の FRET 変化を検討したところ、Epac2 は特異的に活性化された。この結果から、Epac2 が存在する cAMP compartment は cAMP 以外の分子の標的にもなり、薬剤による膵β細胞の機能制御に利用できることが期待された。

(3) Epac2 の細胞内局在とインスリン分泌

Epac2 の Splice variant である Epac2B を同定した。Epac2B は N 末端側から cAMP 結合ドメイン A を欠損するが、他のドメイン (DEP, REM, RA, GEF) は従来の Epac2 (Epac2A と呼ぶ) と同様の構造を有していた。また Epac2B は Epac2A のように細胞膜に局在できず、細胞質に局在していた (図6 A)。さらに MIN6 細胞に Epac2B を発現させて、8-Bromo-cAMP によるインスリン分泌増強を検討したところ、インスリン分泌はグルコース濃度が 16.7 mM ではなく、5.6 mM の時のみ、有意に誘導された (図6 B)。この結果は、食事後、血中グルコース濃度が上昇し始めたときに、Epac2 が関与すること示唆している。また、Epac2A は細胞膜に局在することから、5.6 mM グルコースによって惹起される代謝シグナルは、細胞膜付近の Epac2 が存在する cAMP compartment と相互作用しインスリン分泌を誘導することが予想された。

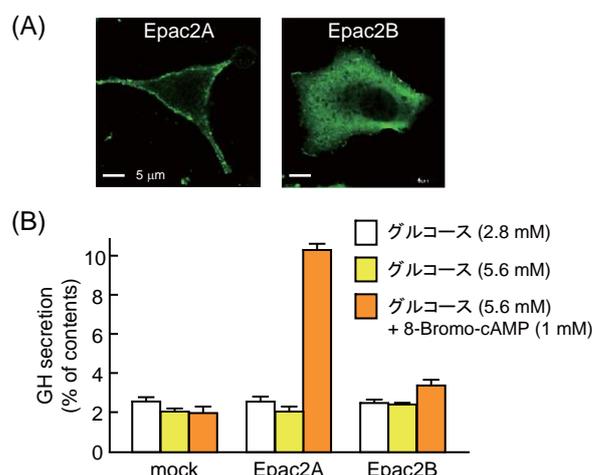


図6. Epac2 の細胞内局在とインスリン分泌制御

(4) cAMP compartment を構成する分子に関する解析
 膵β細胞内の cAMP compartment に関与する分子群を明らかにするために、MIN6 細胞の細胞膜の分画を行ったところ、Epac2 は脂質ラフト分画に特異的に存在するのに対し、PKA はこの分画とともに他の分画にも存在していた。したがって、Epac2 は独自の領域で cAMP compartment を形成するが、PKA は細胞膜直下の様々な領域に存在し、cAMP compartment を形成することが推測された。

cAMP シグナルによるインスリン分泌制御を担う分子として、低分子量Gタンパク質 Rab11 の標的分子、Rip11 を同定した。Rip11 は 8-Bromo-cAMP によるインスリン分泌増強に関与していた。さらに Epac2 欠損膵β細胞株を用いたインスリン分泌実験から、Rip11 は PKA 依存性インスリン分泌増強に関わることが示唆された。実際、Rip11 は PKA によってリン酸化されることが明らかになった。以上の結果から Rip11 は Epac2 が存在する cAMP compartment ではなく、PKA が存在する cAMP compartment によって制御されるインスリン分泌に関与することが予想された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

英語論文

1. Seino S, Takahashi H, Fujimoto W, and Shibasaki T: Regulation of insulin granule exocytosis: diverse roles of cAMP signaling. *Diabetes, Obesity, and Metabolism*, In press. (査読有)
2. Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, and Seino S: Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol* 219:652-658, 2009. (査読有)
3. Sugawara K, Shibasaki T, Mizoguchi A, Saito T, and Seino S: Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of Insulin granule exocytosis. *Genes to Cells* 14:445-465, 2009. (査読有)
4. Saito T, Shibasaki T, and Seino S: Involvement of Exoc31, a protein structurally related to the exocyst subunit Sec6, in insulin secretion. *Biomed Res* 29:85-91, 2008. (査読有)
5. Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, Sunaga Y, Matsumura K, Yamanaka M, Zhang C, Tamamoto A, Satoh T, Miyazaki J, and Seino S: Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19333-19338, 2007. (査読有)

和文総説

1. 柴崎忠雄、清野 進: cAMP シグナルによるエキソサイトシスの調節機構 生体の科学、医学書院 第57巻2号 91-96 2006. (査読無)
2. 柴崎忠雄、清野 進: cAMP コンパートメントとインスリン分泌 分子糖尿病学の進歩 基礎から臨床まで-2006、金原出版 2-7 2006. (査読無)
3. 須永泰弘、柴崎忠雄、高橋晴美、川原康弘、福島光夫、清野 進: インスリン顆粒動態シミュレーターの開発 Simulation of insulin granules dynamics (シミュレーションによるインスリン分泌の可視化)、糖尿病診療マスター、医学書院 第6巻 第4号 453-455 2008. (査読無)
4. 柴崎忠雄、高橋晴美、清野 進: cAMP によるインスリン開口分泌の制御、糖尿病学の進歩 第42集 診断と治療社 6-9 2008. (査読無)

[学会発表] (計11件)

1. 柴崎忠雄、高橋晴美、清野 進: cAMP によるインスリン開口分泌の制御、第50日本糖尿病学会年次集会 (シンポジウム)、2007.5.25、仙台
2. 柴崎忠雄、高橋晴美、清野 進: cAMP によるインスリン開口分泌の制御、第42回糖尿病学の進歩 (レクチャー)、2008.2.15、高松
3. Seino S, Takahashi H, Miki T, and Shibasaki T: Roles of Exocytosis-associated Proteins in Pancreatic Beta-cells, Keystone Symposia: Islet and Beta Cell Biology (シンポジウム), 2008.4.9, Snowbird, USA
4. Yasuda T, Shibasaki T, Miki T, Takahashi H, Miyazaki J, Minami K, and Seino S: Critical role of Rim2 in insulin granule exocytosis. 68th Scientific Sessions, American Diabetes Association (ポスター), 2008.6.7, San Francisco, USA
5. Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, and Seino S: Dynamics of Insulin Granules, The 6th Catholic International Stem Cell Symposium, The 3rd Korea-Japan Islet Club Meeting (シンポジウム), 2008.6.20, Seoul, Korea
6. 安田貴雄、南幸太郎、柴崎忠雄、高橋晴美、宮崎純一、三木隆司、清野 進: Critical role of Rim2 in insulin granule exocytosis、第60回日本細胞生物学会大会 (ポスター)、2008.6.30、横浜
7. Takahashi H, Shibasaki T, and Seino S: Both the first and second phases of glucose-induced insulin secretion involve insulin granules newly recruited to the plasma membrane. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, (口頭), 2008.9.9, Rome, Italy
8. 清野 進、柴崎忠雄、岩崎真宏、南幸太郎: 膵β細胞の代謝調節とインスリン分泌、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (シンポジウム)、2008.12.9、神戸
9. 安田貴雄、柴崎忠雄、三木隆司、高橋晴美、宮崎純一、南幸太郎、清野 進: インスリン顆粒の開口放出機構における Rim2 の重要性、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (ポスター)、2008.12.12、神戸

10. Katoh M, Zhang C-L, Shibasaki T, and Seino S:
Development of a full-length Epac2 FRET
sensor and its application. 44th Annual
Meeting, The American Society for Cell Biology
(ポスター), 2008.12.13, San Francisco, USA

11. 柴崎忠雄 高橋晴美 清野 進: インスリン開口
分泌の制御、第43回糖尿病学の進歩(レクチャー)、
2008.2.20 松本

[図書] (計1件)

1. Seino S, Miki T, and Shibasaki T:
PKA-independent mechanism of cAMP in insulin
secretion. Pancreatic Beta Cell in Health and
Disease. Seino S and Bell GI (eds.). Springer,
133-146, 2008.

6. 研究組織

研究代表者

氏名: 柴崎忠雄

所属研究機関・部局名・職名:

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号: 00323436