

平成21年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770159

研究課題名（和文） 分泌顆粒の動態と開口放出の分子機序

研究課題名（英文） Molecular mechanism for secretory granule dynamics and exocytosis

研究代表者

鳥居 征司（TORII SEIJI）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：40312904

研究成果の概要：フォグリンは分泌顆粒に局在する膜蛋白質で、動態観察に有用なマーカーである。本研究では、低糖環境で誘導されるインスリン分解機構について、フォグリン融合蛋白質による新しい顆粒分解検出法を開発した。また同時に、新しい細胞死誘導経路を明らかにした。さらには、遺伝子ノックダウン解析によりフォグリンの膵β細胞における生理機能を見出した。興味深いことに、フォグリンは内分泌ホルモンのオートクライン作用を特異的に制御する初めての蛋白質である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、分泌、インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持に関わる高次機能を持った細胞は、その機能を効果的に発揮するために、独自の構造体や分子システムを保有している。神経内分泌細胞では、生理活性物質を貯蔵し分泌する特異的オルガネラとして、分泌顆粒が発達し細胞内に充満している。ホルモンを有する分泌顆粒は古くから形態観察の対象であり、電子顕微鏡を中心とした解析が精力的に行なわれてきた。集積した知見によれば、分泌顆粒ははじめトランス・ゴルジ・ネットワークからの出芽により形成され、他の経路へ運ばれる内容物の選択的脱落の

のち、ホルモンの濃縮とともに成熟顆粒となる。細胞膜直下に移動した成熟顆粒は、カルシウム流入などの分泌シグナルを受けて膜融合へと誘導され、開口放出を行なう。一方で生理的に分泌刺激のない状態が続くと、一部の顆粒がリソソームと融合してホルモンが分解される。

近年、分泌顆粒の開口放出機構の解析が急速に進展してきているが、分泌顆粒の動態全体を捉えた研究は少なく、リサイクリング経路や分解経路などの仕組みはほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

内分泌細胞においてペプチドホルモンは分泌顆粒に貯留・蓄積され、細胞外からの刺激に応答して分泌される。この分泌顆粒の開口放出機構には、特異的な制御蛋白質が機能することが考えられ、これまでに代表者は、分泌顆粒に局在する新規蛋白質の機能解析を行うことで、開口放出機構の一端を明らかにしてきた。しかし開口放出以外の分泌顆粒の動態は、分子レベルの解析が遅れている。本研究では、分泌顆粒に局在する特異的な蛋白質フォグリンの分子生物学的・細胞生物学的解析を通じて、開口放出機構に留まらず、分泌後のリサイクリング機構や分解機構の解析を進め、その分子機序を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

これまでにフォグリンを EGFP などによって標識してリサイクリング経路の解析を行ってきた。さらに詳しく、局在/時間経過/輸送関連蛋白質の関与などを調べるために、顆粒内ドメインを特異的に認識する新規抗体を作製する。細胞表面に現れたフォグリン蛋白質を特異抗体を用いてトラップし、細胞内への取込み実験を行う。

分泌顆粒の分解を捉えるために、新たなアッセイ系を構築する。まず膵β細胞株をモデルとして使用することを検討し、次に従来の免疫電顕法による検定に代替する、蛍光標識法を用いた（分解）ファゴソームの検定法を開発する。

フォグリンは分泌顆粒の動態を捉える良いマーカーとして広く認識されているものの、その生理機能は不明である。この蛋白質の機能として従来はホルモン分泌への関与が予測されているが、矛盾が否めない。そこで本来のフォグリンの生理機能を明らかにするために、膵β細胞の培養細胞を用いて RNA 干渉によるノックダウン解析を行う。

## 4. 研究成果

フォグリンの顆粒内ドメインに対する抗体を作製した。内分泌細胞の細胞表面に現れたフォグリン蛋白質を特異抗体を用いてトラップし、細胞内への取込み実験を行ったところ、抗体がフォグリンの発現依存的に取り込まれ、分泌顆粒にリサイクリングすることを確認した。このリサイクリング経路を時間経過を追って観察し、関連するオルガネラを探索したところ、一般的なエンドソームとは異なる独自のオルガネラを介することが分かった。また、リサイクリングを制御する蛋白質として、AP2アダプター複合体やダイナミンを同定した。

マウス膵β細胞株 MIN6 を用いて、<sup>3</sup>H-Leucine 標識によるパルスチェイス実験と電子顕微鏡による形態観察を行ったところ、低糖培養後 12 時間以降に顕著なインスリン分解を検出した。またフォグリン蛍光標識蛋白質を用いて、分泌顆粒とリソソーム酵素の挙動を同時に観察する方法を確立し、インスリン分解を捉える簡易実験系を立ち上げることに成功した。

膵β細胞を低糖培養すると、36 時間で 78% の細胞がアポトーシスを起こした。従来に見解に反して、低糖培養により活性酸素種が蓄積することを見出した。誘導された活性酸素種の蓄積（酸化ストレス）が、MAPキナーゼ・フォスファターゼ MKP-1 の酸化を引き起こし、結果として JNK の持続的な活性化をもたらし、細胞死を誘導することが明らかとなった（図 1）。

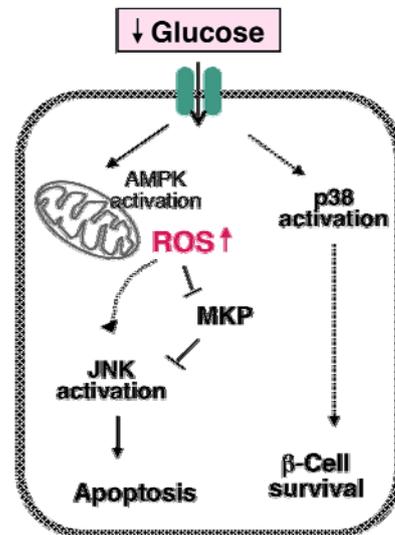


図1 低糖培養下の膵β細胞のシグナル伝達

フォグリンに特異的な shRNA を発現するアデノウイルスを作製し、遺伝子ノックダウンの解析を行ったところ、予想外に、ホルモン分泌に関与せず細胞増殖を制御する役割があることが判明した。膵β細胞のノックダウンにおいて種々の蛋白質の発現プロファイルを解析すると、興味深いことに、インスリンシグナル伝達に関与する蛋白質群に著しい変化が観察された。フォグリンによるインスリンシグナル関連蛋白質の安定化は、インスリン分泌とその後のオートクライン作用に依存していた。In vitro 結合アッセイやフォグリン特異抗体による免疫沈降法によって、結合蛋白質としてインスリン受容体を同定した。グルコース刺激によるインスリン分泌は、フォグリンを細胞膜へと移行させてインスリン受容体との結合を誘導し、これが関

連蛋白質の分解を防御し、結果として細胞増殖を促すことが判明した (図2)。

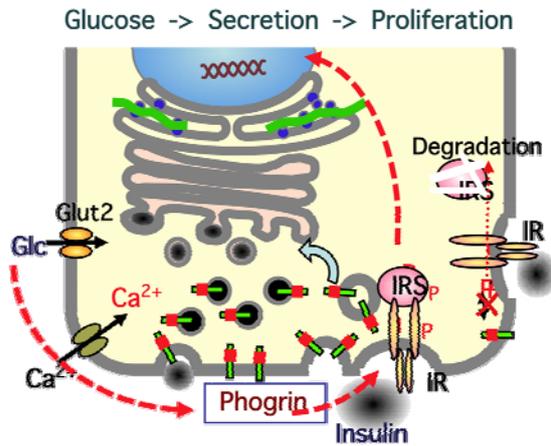


図2 フォグリンによるインスリン・オートクライン機構の制御

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)

[雑誌論文] (計5件)

1. Torii S, Saito N, Kawano A, Hou N, Ueki K, Kulkarni RN, Takeuchi T  
Gene silencing of phogrin unveils its essential role in glucose-responsive pancreatic beta-cell growth. *Diabetes* (Online, Dec 8, 2008) 査読有
2. Chavas LM, Ihara K, Kawasaki M, Torii S, Uejima T, Kato R, Izumi T, Wakatsuki S  
Elucidation of Rab27 Recruitment by Its Effectors: Structure of Rab27a Bound to Exophilin4/Slp2-a *Structure* 16, 1468-1477 (2008) 査読有
3. Hou N, Torii S, Saito N, Hosaka M, Takeuchi T.  
Reactive Oxygen Species-mediated Pancreatic {beta}-cell Death is Regulated by Interactions between Stress-Activated Protein Kinases,

p38 and JNK, and MAP Kinase Phosphatases.

*Endocrinology* 149, 1654-1665 (2008) 査読有

4. Chavas LM, Torii S, Kamikubo H, Kawasaki M, Ihara K, Kato R, Kataoka M, Izumi T, Wakatsuki S.  
Structure of the small GTPase Rab27b shows an unexpected swapped dimer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 63(Pt 7), 769-779. (2007) 査読有
5. Yu M, Kasai K, Nagashima K, Torii S, Yokota-Hashimoto H, Okamoto K, Takeuchi T, Gomi H, Izumi  
Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca<sup>2+</sup>-inhibitory phospholipid-binding activity of the C2A domain *Mol Biol Cell* 18, 688-696 (2007) 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Seiji Torii  
A secretory granule-resident protein-tyrosine phosphatase phogrin regulates autocrine insulin signaling in pancreatic b-cells.  
第8回国際プロテインホスファターゼカンファレンス 2008.11.14 前橋
2. 鳥居征司、斎藤直也、竹内利行  
分泌顆粒膜タンパク質 Phogrin はグルコース応答性の膵β細胞増殖を制御する  
第60回日本細胞生物学会 2008.7.1 横浜
3. 鳥居征司、斎藤直也、竹内利行  
分泌顆粒膜タンパク質フォグリンは膵β細胞の増殖を制御する  
第51回日本糖尿病学会 2008.5.23 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 征司 (TORII SEIJI)  
群馬大学・生体調節研究所・助教  
研究者番号：40312904

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：