

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19790636

研究課題名（和文） 細胞骨格制御によるインスリン顆粒の動態調節機構の解析

研究課題名（英文） The dynamics of insulin granules via cytoskeletal modulation

研究代表者

木村 俊秀 (KIMURA TOSHIHIDE)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60404373

研究成果の概要：

Rab27a は、GTP 型と GDP 型の 2 種類の構造をとり、従来は GTP 型にのみ特定の分子が結合し、インスリン分泌を調節すると考えられてきた。本研究では、不活性型と考えられてきた GDP 型 Rab27a にコロニン 3 という分子が結合することをつきとめ、この結合によりインスリン分泌で使用した膜が細胞内に回収されることを見出した。Rab27a はこれら 2 つの型を使い分けることで、インスリン分泌前後のステップを制御する分子であることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：低分子量 G タンパク質、インスリン、膵 B 細胞、エンドサイトーシス、Rab27a、糖尿病、細胞骨格、coronin

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリンの欠乏および作用不全を示す全身性の代謝疾患である。我が国の糖尿病の大半を占める 2 型糖尿病では、膵 B 細胞からのインスリン分泌障害とインスリン標的細胞におけるインスリン抵抗性が様々な割合

で入りまじっている。特に、日本人の糖尿病患者では前者の占める割合が大きいことが臨床的な研究から明らかにされている。増え続ける 2 型糖尿病に対する新しい治療や創薬を開発することは早急の課題であるが、そのためには膵 B 細胞におけるインスリン分泌のメ

カニズム、および糖尿病状態における分泌の障害機序を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、シグナル伝達分子Rab27aの相互作用を検討することで、新たなインスリン分泌調節機構を明らかにすることを目的とした。

インスリンの分泌過程は複数のステップに分かれている。まず、細胞質に存在するインスリン分泌顆粒は何らかのシグナルにより細胞膜近傍へトランスロケーションし、その後ドッキング、プライミングの過程を経て、最終的に細胞内Ca²⁺の上昇により開口放出される。Rabファミリーはエンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの細胞内小胞輸送を制御している低分子量Gタンパク質である。なかでも、Rab27aは膵島に高レベルで発現していることが知られている。Rab27aを含むRabファミリーはエフェクター分子と結合することによりシグナルを伝達し、様々な細胞で多様な生理機能を制御している。例えば、メラノサイトではRab27aがエフェクター分子であるSlp2-a(synaptotagmin-like protein2-a)やSlac-2(Slp homologue lacking C2 domains-2)を介してメラノソームの輸送や細胞膜へのドッキングを制御することが報告されている(Nat. Cell Biol., 6, 1195, 2004)。

一方、インスリン分泌の制御に及ぼすRab27aの知見は十分でない。Rab27aはインスリン顆粒上に局在し、Ca²⁺流入とは無関係にグルコースによるインスリン分泌を制御する(J. Clin. Invest., 115, 388, 2005)。さらに、膵B細胞に特異的なRab27aのエフェクター分子として同定されたGranuphilinが、SyntaxinやMunc18-1と相互に作用してインスリン顆粒を細胞膜へドッキングさせ

ることが報告された(Mol. Biol. Cell, 17, 2101, 2006)。しかしながら、Rab27aを介したインスリン分泌機構をGranuphilinだけで説明することはできない。実際、GranuphilinノックアウトマウスとRab27aの遺伝子変異を持つマウスより単離した膵B細胞を電子顕微鏡により比較した結果、ドッキングしているインスリン顆粒の様相が全く異なることが報告されている(J. Cell Biol., 171, 99, 2005)。本研究では、Rab27a新規結合タンパク質の同定を行うことにより、Rab27aを介した新たなインスリン分泌調節機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) Rab27a結合タンパク質の同定

GSTとの融合タンパク質GST-Rab27aをグルタチオンビーズに固相化しRab27aアフィニティーカラムを作成した。ここに培養膵B細胞であるMIN6細胞の抽出液を添加し、洗浄後、500mM NaClにより結合タンパク質を溶出した。結合タンパク質の同定は質量分析によって行った。

(2) 免疫染色法

8週齢のICRマウスより摘出した膵臓から凍結切片を作製し、各抗体で免疫染色を行った。

(3) 結合実験

GST-Rab27aとCOS-7より精製したFlag-coronin3をインキュベートした後、グルタチオンビーズを加え遠心法により結合タンパク質を回収した。GFP-coronin3とFlag-Rab27a-T23N(GDP型)を発現しているCOS-7細胞の抽出液にGFP抗体を添加し免疫沈降実験を行った。

(4) Pull down assay

3 mM グルコース(G3)でプレインキュベートしたMIN6細胞の培地を20 mM グルコース

(G20) に交換後、細胞抽出液を作製し GST-coronin3 Δ C を用いた pull down assay を行った。

(5) FM4-64 取り込み実験

MIN6 細胞に pAcGFP と coronin 3 siRNA を共発現後、FM4-64 を含む培地でインキュベート、洗浄し、FM4-64 の取り込みを観察した。GFP-coronin 3 Δ C を発現させた MIN6 細胞でも同様の取り込み実験を行った。

(6) Live cell imaging

MIN6 細胞に phogrin-GFP と coronin 3 siRNA、または DsRed-coronin 3 を発現後、phogrin-GFP の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(7) 抗体取り込み実験

アデノウイルスで coronin 3 Δ C をトランスフェクションした MIN6 細胞を抗 phogrin-lumen 抗体とインキュベートした後、免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) Rab27a 結合タンパク質の同定

GDP 型 Rab27a アフィニティーカラムに MIN6 細胞の抽出液を添加し、洗浄後 NaCl により結合タンパク質を溶出した。質量分析の結果、このタンパク質が coronin 3 であることが明らかになった。また、溶出画分を coronin 3 抗体でイムノプロットした結果からも、coronin 3 が GDP 型 Rab27a に結合していることが確認された。インスリン、Rab27a、coronin 3 抗体を用いた免疫染色法により、coronin 3 のマウス膵臓内での局在を調べた結果、インスリン抗体で染まっている膵 B 細胞に coronin 3 が発現しており、その一部は Rab27a と共局在することがわかった。

(2) GDP 型 Rab27a と coronin 3 の結合評価

精製タンパク質を用いた結合実験より、

Coronin 3 は GDP 型 Rab27a と特異的に直接結合した。また、coronin 3 の Rab27a 結合部位を免疫沈降法により調べた結果、GDP 型 Rab27a は coronin 3 の N 末端と中央の WD ドメインに結合した。この領域は β -propeller と呼ばれ、タンパク質同士の結合に参与するドメインである。Coronin 3 のアクチン結合部位は C 末なので、coronin 3 はアクチンとは異なる領域で GDP 型 Rab27a と結合することがわかった。次に、インスリン分泌刺激であるグルコースが Rab27a の GTP 型と GDP 型のサイクルに及ぼす影響を調べるため、coronin 3 Δ C を用いた pull-down assay を行った。この方法では、GDP 型 Rab27 の増減を検出できる。20 mM グルコース刺激により GDP 型 Rab27a の量が増加した。Rab27a の総量には変化がないので、グルコースにより Rab27a が GTP 型から GDP 型へ変換されることがわかった。

(3) Coronin 3 の機能解析

siRNA により coronin 3 をノックダウンし、coronin 3 の機能を調べた。ノックダウンされた MIN6 細胞は共発現した GFP により可視化した。コントロールの細胞では、細胞膜に結合したエンドサイトーシスマーカー FM4-64 がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた。Coronin 3 をノックダウンした細胞では、FM4-64 の取り込みが抑制された。さらに、Coronin 3 のドミナントネガティブ変異体である Δ C を過剰発現させた細胞を用いて同様の実験を行った結果、ノックダウンの結果と同様、FM4-64 の取り込みが抑制された。また、GDP 型 Rab27a を Δ C と共発現することによりその取り込みが回復した。これらの結果から、グルコースにより GDP 型に変換された Rab27a と結合した coronin3 は、

C 末領域を介して分泌顆粒膜の取り込みを制御していると考えられる。

次に、様々なエンドサイトーシス経路の内、インスリン顆粒膜のリサイクリングに着目した。顆粒膜を可視化するために、インスリン顆粒膜に局在する膜貫通型タンパク質で、リサイクリングされることが知られている phogrin の GFP 融合タンパク質を MIN6 細胞に発現させて解析を行った。まず、siRNA による coronin 3 のノックダウンが phogrin-GFP の局在に及ぼす影響を調べた。コントロールの細胞では、phogrin-GFP を含むインスリン顆粒が細胞質に局在した。一方、coronin 3 をノックダウンした細胞では、phogrin-GFP は細胞膜近傍に集積した。次に、coronin 3 のドミナントネガティブ変異体である ΔC を過剰発現させた細胞を用いて同様の実験を行った。Coronin 3 ΔC により coronin3 と GDP 型 Rab27a の結合を妨げると、ノックダウンの結果と同様、phogrin-GFP は細胞膜近傍に集積した。また、GDP 型 Rab27a を ΔC と共発現することによりその局在変化が回復した。次に、phogrin の内腔ドメイン、すなわちエキソサイトーシス時に細胞外に提示される領域を認識する抗体を MIN6 細胞とインキュベートし免疫染色することにより、細胞内に取り込まれた phogrin を標識した。コントロールの細胞では、phogrin 抗体が細胞質に取り込まれた。Coronin 3 ΔC を発現した細胞では、phogrin 抗体は細胞質に取り込まれず、細胞膜近傍に集積した。Coronin 3 ΔC で見られた phogrin-GFP の細胞膜近傍への集積は、phogrin のエンドサイトーシスによる取り込みが抑制された結果であることが示された。

本研究では、GDP 型 Rab27a 結合タンパク質として新しく同定した coronin 3 が、インス

リン顆粒膜の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, 2008)。

従来、GTP 型の低分子量 G タンパク質は、特異的なエフェクターとの結合により機能を発揮するとされてきた。今回の結果は、GTP 型だけを情報伝達の主役としてきた常識を覆す知見である。私たちは、次に示したモデルを提唱している(下図参照)。GTP 型 Rab27a はエフェクターを介してインスリン顆粒を細胞膜近傍にセットしている。グルコース刺激は、細胞内 Ca^{2+} の上昇を介して細胞膜にセットされているインスリン顆粒のエキソサイトーシスを引き起こす一方で、Rab27a を GDP 型へと変換する。GDP 型 Rab27a は coronin 3 と結合し、エンドサイトーシスを制御していると考えている。このシステムは、エキソサイトーシスによって細胞膜に供給された顆粒膜を細胞内に回収することにより、膜のリサイクリングを制御していると考えている。

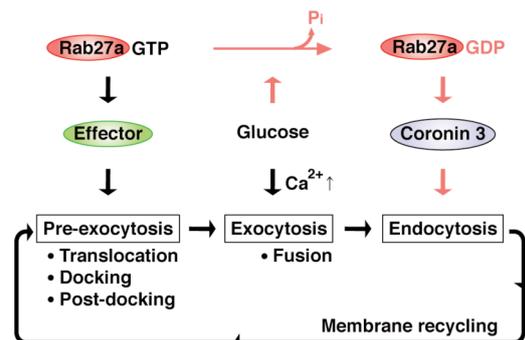


図 Rab27aのGTP/GDP型転換によるインスリン顆粒膜のリサイクリングの制御
グルコース刺激は、細胞内 Ca^{2+} の上昇を介して細胞膜近傍のインスリン顆粒のエキソサイトーシスを引き起こす一方で、Rab27aをGDP型へと変換する。GDP型Rab27aはcoronin 3と結合し、エンドサイトーシスを制御している。(文献2より改変引用)

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. Kaneko Y, Kimura T, Taniguchi S, Souma

M, Kojima Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I
Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose.
FEBS Letters, 583, 377-382 (2009) 査読有

2. Kimura T, Kaneko Y, Yamada S, Ishihara H, Senda T, Iwamatsu A, Niki I
The GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 controls endocytosis of secretory membrane in insulin-secreting cell lines.
J. Cell Sci., 121, 3092-3098 (2008) 査読有

3. Yuzawa Y, Niki I, Kosugi T, Maruyama S, Yoshida F, Takeda M, Tagawa Y, Kaneko Y, Kimura T, Kato N, Yamamoto J, Sato W, Nakagawa T, Matsuo S
Diabetic nephropathy in transgenic mice overexpressing beta cell calmodulin.
J. Am. Soc. Nephrol., 19 1701-1711 (2008) 査読有

4. Tsunekawa S, Yamamoto N, Tsukamoto K, Itoh Y, Kaneko Y, Kimura T, Ariyoshi Y, Miura Y, Oiso Y, Niki I.
Protection of pancreatic beta-cells by exendin-4 may involve the reduction of endoplasmic reticulum stress; in vivo and in vitro studies.
J Endocrinol. 193, 65-74 (2007) 査読有

5. 金子雪子、木村俊秀、仁木一郎
硫化水素とインスリン分泌
内分泌・糖尿病科 25, 245-249 (2007) 査読無

[学会発表] (計 9 件)

1. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a 結合タンパク質 coronin 3 によるアクチン骨格制御とインスリン顆粒膜のリサイクリング
第 82 回日本薬理学会 (2009 年 3 月 18 日 横浜)

2. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a は coronin 3 と結合しインスリン顆粒膜のエンドサイトーシスを制御する
第 31 回日本分子生物学会年会 (2008 年 12 月 9 日 神戸)

3. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a は coronin 3 と結合しインスリン顆粒膜のエンドサイトーシスを制御する
第 51 回日本糖尿病学会 (2008 年 5 月 23 日 東京)

4. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a 結合タンパク質 coronin 3 によるインスリン顆粒膜のリサイクリング機構の解明
第 81 回日本薬理学会 (2008 年 3 月 18 日 横浜)

5. 木村俊秀
Rab27a によるインスリン顆粒膜の動態制御機構の解析
特定領域「G タンパク質シグナル」「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ (2008 年 1 月 26 日 箱根)

6. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a を介したインスリン顆粒膜のリサイクリング機構
第 30 回日本分子生物学会年会 (2007 年 12 月 13 日 横浜)

7. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a を介したインスリン顆粒膜のリサイクリング機構の解明
第 19 回分子糖尿病学シンポジウム (2007 年 12 月 8 日 神戸)

8. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a 結合タンパク質の同定と機能解析
第 60 回日本薬理学会西南部会 (2007 年 11 月 22 日 宮崎)

9. 木村俊秀
低分子量 G タンパク質 Rab27a の膵 B 細胞における新規標的タンパク質の同定
第 50 回日本糖尿病学会 (2007 年 5 月 25 日 仙台)

[その他]

第 81 回日本薬理学会年会「年会優秀発表賞」受賞 (2008 年 3 月 18 日 横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 俊秀 (KIMURA TOSHIHIDE)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60404373

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし