

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K08891
研究課題名（和文）インスリン分泌細胞におけるエンドサイトーシス制御機構の解析

研究課題名（英文）Endocytosis in pancreatic beta-cells

研究代表者
木村 俊秀（Kimura, Toshihide）

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：60404373
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：インスリンは、血糖値の上昇に応じて分泌される血糖降下ホルモンであり、その分泌異常が糖尿病の病因のひとつである。インスリン分泌後の過程に位置付けられるエンドサイトーシスは、適切なインスリン分泌を行う上で必須であるが、その知見は未だ乏しい。本研究ではARNOに着目し、その新たな結合候補タンパク質との結合特性や役割を解析することでエンドサイトーシスの開始シグナルの解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
SU薬に代表されるこれまでの糖尿病治療薬は、インスリンの開口放出を促進するが、放出後のエンドサイトーシスには影響を及ぼさない。そのため、治療薬投与後の細胞では、インスリン分泌細胞の疲弊をひきおこす。本研究は、エンドサイトーシスをターゲットとした新しい糖尿病治療薬を開発する基盤となる。申請者は、この治療薬を既知の分泌促進薬と併用することで、長期にわたる適切なインスリン分泌が実現できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Insulin is a hypoglycemic hormone that is secreted in response to an increase in blood glucose level, and its secretion abnormality is the pathogenesis of diabetes mellitus. Endocytosis, which is located in the post-insulin secretion process, is essential for proper insulin secretion, but its knowledge is still poor. In this study, I searched for ARNO-interacting proteins and analyzed its binding properties to elucidate the signal of endocytosis.

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 Gタンパク質 Rab27a

1. 研究開始当初の背景

増え続ける糖尿病に対する新しい治療法を開発することは、焦眉の課題である。我が国の糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病では、血糖値(血液中のグルコース濃度)を下げるホルモンであるインスリンの分泌に障害がみられる。よって、2型糖尿病の病因を究明し新たな糖尿病治療薬を創出するためには、インスリンが分泌されるメカニズムを分子レベルで明らかにする必要がある。

インスリンは、それを取り囲む小胞膜が細胞膜と融合することで細胞外に開口放出される(図1)。エンドサイトーシスは開口放出の後に位置し、インスリンを取り囲んでいた膜成分や分泌に関わった分子を細胞内に回収し、次の分泌に備えるためのステップである。また、その障害は、インスリン分泌不全や細胞死を引き起こす。つまり、エンドサイトーシスは、長期間にわたる適切なインスリン分泌を実現する上で、必須の過程である。一方、開口放

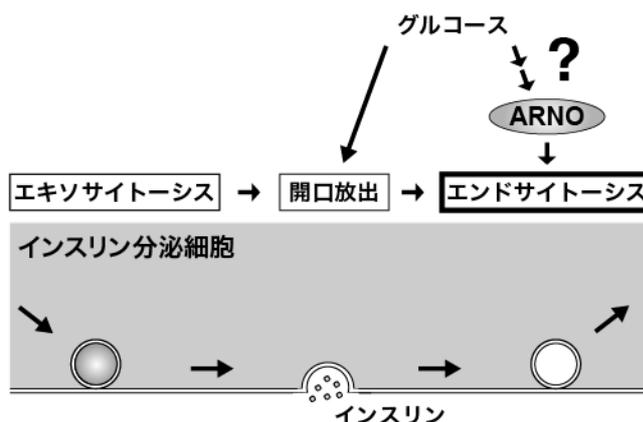


図1 ARNOによるエンドサイトーシスの制御

出に比べて、エンドサイトーシスに関する知見は皆無である。そのため、エンドサイトーシスの分子メカニズムを解明することは、学術的に早急に解決しなければならない「問い」である。

申請者はこれまで、独自のプロテオミクス解析を用いて、神経発生に関わる分子群を網羅的に同定し、成果をあげてきた(*Nature Cell Biol.* 4,583-91, 2002; *J. Neurochem.* 93,1371-82, 2005)。そこで、この手法を用いて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したところ、GTP型 Rab27a に結合する分子に加えて(*Dev. Cell* 16,675-86,2009)、これまで不活性型だと考えられてきた 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)。さらに、これらの分子がエンドサイトーシスを制御すること(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395,318-23,2010; *Arch. Biochem. Biophys.* 496,33-7,2010)、その上流には ARNO を介した EPI64 の活性化が必要であることを明らかにした(*J. Cell Sci.* 129,637-49, 2016)。しかしながら、インスリン分泌を惹起するグルコースとエンドサイトーシスを開始する ARNO の間のシグナルは、未だ不明である。

申請者は、ARNO に結合するタンパク質を解析することで、エンドサイトーシスの上流シグナルを解明できると考え、ARNO 新規結合タンパク質の探索を試みている(*J. Pharmacol. Sci.* 140,300-4,2019)。この過程で同定した結合候補タンパク質のひとつが RTK(Receptor tyrosine kinase)である。

2. 研究の目的

申請者らは、インスリンの放出を惹起するグルコースが、エンドサイトーシスの開始シグナルでもあることを明らかにした(*J. Cell Sci.* 121,3092-8,2008: 図1)。さらに、申請者らは、ARNO がグルコースによって細胞膜直下に集積すること、その集積がエンドサイトーシスに必須であることを見出した(*J. Cell Sci.* 129,637-49,2016)。一方、グルコースと ARNO の間をつなぐシグナル伝達は未だ不明である(図1)。

申請者は最近、ARNO に結合する分子として新たに RTK を同定した。RTK は、インスリン分泌

細胞に局在する膜貫通型タンパク質である。一方、RTKがエンドサイトーシスで果たす機能は不明である。申請者は最近、RTKの発現を抑えたインスリン分泌細胞(図2のRTK-KD)において、ARNOの細胞膜近傍への移行が阻止されることを見出した。申請者は、RTKがARNOを介してエンドサイトーシスを制御していると考えている。本研究では、ARNOの新たな結合パートナーであるRTKが果たす役割を検討することで、グルコースで開始されるエンドサイトーシスのシグナルを分子レベルで解析する。

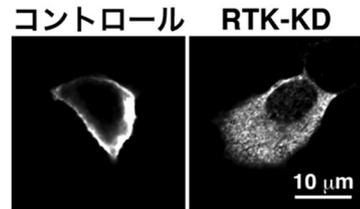
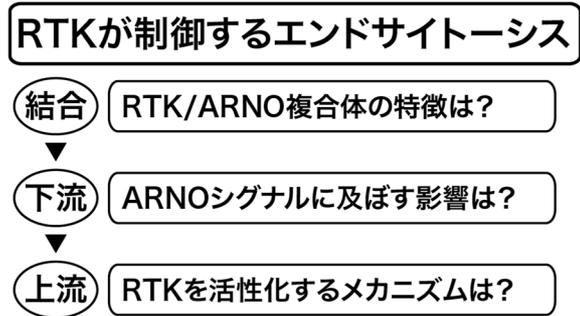


図2 ARNOの細胞内局在

3. 研究の方法

本申請研究では、ARNOとその結合候補タンパク質であるRTKが、グルコースによるエンドサイトーシスを制御するメカニズムを、右図に従って解明した。令和2年度は、ARNOとRTKの結合を評価した。令和3年度は、RTKがARNOを制御するメカニズムを解析した。令和4年度は、グルコースによるRTKの活性化機構を解析した。



(1) RTKとARNOの結合

申請者は、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法を用いて、ARNO結合候補タンパク質としてRTKを同定した。そこで、この結合が特異的な直接結合であり、かつ細胞内で複合体を形成していることを調べた。

(2) RTKによるARNOの制御

申請者は、RTKの発現を抑制した細胞では、ARNOが細胞膜に移行しないことを既に見出している(図2)。そこで、RTKがARNOの膜移行に関するPIP3やPIP3産生酵素であるPI3キナーゼに及ぼす影響を調べた。

(3) グルコースによるRTKの制御

RTKを含めた細胞膜貫通型受容体は、細胞外のリガンドと結合することで活性化し、細胞内にシグナルを伝達する。そこで、グルコースがRTKの活性化や局在に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) RTKとARNOの結合

令和2年度は、ARNOとRTKの結合を生化学的に解析した。まず、RTKの特異的抗体とリコンビナントタンパク質を作製した。次に、免疫沈降実験より、ARNOとRTKが細胞内で複合体を形成することを明らかにした。次に、RTKのフラグメントを作製し、ARNO結合ドメインを同定した。

(2) RTKによるARNOの制御

令和3年度は、RTKがARNOの細胞内動態に及ぼす影響を検討した。ARNOの細胞内動態はリン脂質によって制御され、RTKのノックダウンはリン脂質の生成を抑制した。また、RTKと相互作用するリン脂質変換酵素を同定し、この酵素がARNOの細胞内動態を制御することを見出した。

(3) グルコースによるRTKの制御

令和4年度は、RTKがインスリン分泌刺激であるグルコースによって活性化されること、活性化されたRTKが細胞内でその局在を変化させることを明らかにした。本結果は、RTKがARNOの上流に位置し、エンドサイトーシスの開始シグナルである可能性を示唆している。

本研究では、ARNOに結合するタンパク質をスクリーニングし、同定したタンパク質RTKとARNOの結合が特異的な直接結合であり、かつ細胞内で複合体を形成していることを明らかにした。また、RTKがリン脂質の生成を介してARNOの細胞内動態を制御することを明らかにした。さらに、このシグナルがグルコースによって制御されていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi M, Ohbayashi S, Ooka A, Yamashita H, Motohashi N, Kaneko Y, Kimura T, Saito S, Ishikawa T	4. 巻 600
2. 論文標題 Harmine suppresses collagen production in hepatic stellate cells by inhibiting DYRK1B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 136-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.02.054.	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 Yukiko K Kaneko, Ami Morioka, Misaki Sano, Maho Tashiro, Naoya Watanabe, Nahoko Kasahara, Masato Nojiri, Chihiro Ishiwatari, Kentaro Ichinose, Akira Minami, Takashi Suzuki, Momoka Yamaguchi, Toshihide Kimura, Tomohisa Ishikawa	4. 巻 637
2. 論文標題 Asymmetric dimethylarginine accumulation under hyperglycemia facilitates β -cell apoptosis via inhibiting nitric oxide production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 108-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.11.011.	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 Stella Amarachi Ihim, Yukiko K. Kaneko, Moe Yamamoto, Momoka Yamaguchi, Toshihide Kimura, Tomohisa Ishikawa	4. 巻 46
2. 論文標題 Apigenin Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in INS-1 β -Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 630-635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00913	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小寺聡史朗、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 膵細胞における、エンドサイトーシスの分子メカニズム解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺聡史朗、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 膵 細胞におけるエンドサイトーシス制御機構の解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺聡史朗、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 膵 細胞におけるエンドサイトーシス制御機構の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺聡史朗、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 膵 細胞におけるインスリン分泌制御機構の解析
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 慎悟、木村 俊秀、石川 智久
2. 発表標題 膵 細胞におけるInsulin receptor related receptor (IRR) の機能解析
3. 学会等名 第145回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺聡史朗、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 GDP型Rab27aが制御するエンドサイトーシス機構の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐竹良太、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 臍 細胞におけるG の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小寺聡史朗、木村俊秀、石川智久
2. 発表標題 GDP型Rab27aが制御するエンドサイトーシスメカニズムの解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------