

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590308
 研究課題名（和文）膵β細胞でのインスリン分泌制御における Epac2/Rap1 シグナルの役割
 研究課題名（英文）Role of Epac2/Rap1 signal in the regulation of insulin secretion in pancreatic-β-cells

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（和文）：

膵β細胞における cAMP/Epac2/Rap1 の下流シグナルを担う分子を探索したところ、複数の候補が同定された。また膵β細胞での cAMP によるアクチン細胞骨格の制御に着目したところ、低分子量 G タンパク質 Cdc42 が cAMP/Epac2 によって活性化され、Cdc42 のノックダウンで cAMP によるインスリン分泌増強が低下することが明らかになった。したがって Epac2 は複数の下流分子を活性化することでインスリン分泌増強を制御することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have searched for downstream signals of cAMP/Epac2/Rap1 in pancreatic β-cells and identified several candidate molecules. We have also found that Rho family GTPase Cdc42, which is involved in actin dynamics, is activated by cAMP/Epac2 stimulation in pancreatic β-cells and its knockdown decreases cAMP-potentiated insulin secretion. These results suggest that Epac2 mediates the potentiation of insulin secretion by cAMP through the activation of several downstream signals.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞でのグルコースによるインスリン分泌は ATP、Ca²⁺、cAMP、リン脂質などの様々

な細胞内シグナルによって制御されている。生理的に重要な腸管内分泌ホルモンであるインクレチンは膵β細胞上の特異的受容体

を活性化することで cAMP を産生させ、インスリン分泌を増強する。代表的なインクレチンとして Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) が知られており、食後のインスリン分泌量の 20-60% に関与するとされている。インクレチン/cAMP はインスリン分泌増強の他に、膵β細胞の増殖促進、アポトーシス抑制、膵β細胞再生等の膵β細胞量を維持する効果を有していることが報告されている。このような効果から、膵β細胞での cAMP 産生を持続させることが、インスリン分泌制御や膵β細胞の維持に重要であると考えられ、近年、インクレチン作用を標的とした抗糖尿病薬が開発されているが、インクレチン/cAMP による膵β細胞機能の制御の分子機構は未だ解明されていない。

膵β細胞における GLP-1 や GIP によるインスリン分泌を増強には、PKA 依存性経路と PKA 非依存性経路が存在する。PKA 非依存性経路は、cAMP 結合タンパク質 Epac2 によって担われている (Ozaki, Nat Cell Biol, 2000; Kashima, JBC, 2001)。全反射型蛍光顕微鏡を用いたインスリン顆粒動態の解析とインスリン顆粒動態のシミュレーションで得られた結果から、Epac2 は低分子量 G タンパク質 Rap1 を活性化し、PKA 非依存的に細胞膜近傍に存在するインスリン分泌顆粒プールを増大させることで、インスリン分泌の第 1 相を増強することを示した (Shibasaki, PNAS, 2007)。しかし、Epac2/Rap1 がどのような下流シグナルを活性化することでインスリン顆粒動態を制御するのか、インクレチンによる膵島機能制御に Epac2 は生理的にはどのように関わっているのか、インクレチンによる糖尿病改善効果において Epac2 がどのように関わっているかはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

Epac2 シグナルの膵β細胞での機能の分子機構を明らかにするために、

(1) Epac2/Rap1 の下流シグナルの同定とインスリン分泌増強への関与の解明

Epac2 によって活性化された Rap1 がどの分子と相互作用するかを明らかにし、さらに cAMP によるインスリン分泌増強への関与を解明する。

(2) Epac2/Rap1 によるアクチン細胞骨格の制御とインスリン分泌増強機構の解明

グルコースによるインスリン分泌にアクチン細胞骨格の重合、脱重合が関わることを示されていることから、cAMP がどのようにアクチン細胞骨格を活性化し、インスリン分泌増強を制御することかを明らかにする。

(3) 個体レベルでの Epac2 を介したインクレチン作用の解明

Epac2 欠損マウスを行い、Epac2 を介した血糖調節機構を解明する。

3. 研究の方法

- His-FLAG ペプチドで標識した Rap1 を発現するアデノウィルスベクターを作製した。
- 抗 FLAG 抗体および Co²⁺ カラムを用いて His-FLAG-Rap1 と結合するタンパク質を精製し、LC/MS による解析を行った。
- Rap1 の標的分子に対する shRNA を作製し、cAMP によるインスリン分泌増強に対する効果を検討した。
- インスリン分泌細胞株 MIN6 およびマウス膵島における、既知の Rap1 結合分子の発現を RT-PCR で解析した。
- cAMP で活性化される低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの分子を探索した。
- Epac2 欠損マウスから単離した膵島を用

いて、インスリン分泌を検討した。

4. 研究成果

(1) Epac2/Rap1 の下流シグナルの同定とインスリン分泌増強への関与の解明

膵β細胞においてインクレチン/cAMP シグナルによって活性化された Epac2 が、どのようなメカニズムでインスリン分泌増強を制御するかを明らかにする目的で、Epac2 の下流シグナルを担う Rap1 の標的分子の同定を試みた。His-FLAG ペプチドで標識した Rap1 をアデノウィルスを用いて発現させた MIN6 細胞を cAMP アナログ 8-bromo-cAMP で活性化した後、細胞を回収した。これらの細胞を溶解した後、抗 FLAG 抗体および Co⁺カラムを用いて His-FLAG-Rap1 と結合するタンパク質を精製し、LC/MS による解析を試みたところ、約 100 kDa に未同定のバンドを検出した。また、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの Rac に対する GEF である Tiam1 を同定した。Epac2/Rap1 を介するインスリン分泌における Tiam1 の関与を検討するために、Tiam1 に対する shRNA を作製した。Tiam1 の発現を抑制した条件下、Epac 特異的 cAMP アナログで MIN6 を刺激したが、インスリン分泌増強はコントロール shRNA を導入した細胞とほとんど変わらなかった。さらに Tiam1 特異的阻害剤を用いて同様の実験を行ったが、インスリン分泌増強の低下は認められなかった。したがって Tiam1 は Epac2/Rap1 によるインスリン分泌増強に関与しないと考えられた。

引き続き、Rap1 の effector を探索するため、膵β細胞および膵島での既知の Rap1 結合分子の発現を RT-PCR で確認した (図 1)。

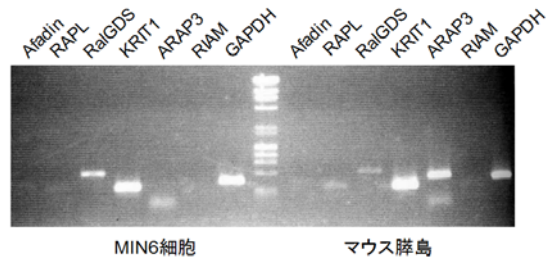


図 1 Rap1 結合分子の発現 (RT-PCR)

MIN6 細胞とマウス膵島で共通に発現している RAPL、RalGDS、KRIT1 について、GST-Rap1(G12V)との結合を *in vitro* で検討したところ、RalGDS が検出された。したがって Epac2/Rap1 の下流シグナルを担う分子として RalGDS が候補と考えられた。今後、RalGDS がインクレチン/cAMP 刺激依存性に Rap1 に結合するかを検討し、またインクレチンによるインスリン分泌増強に関与するかを明らかにする。

(2) Epac2/Rap1 によるアクチン細胞骨格の制御とインスリン分泌増強機構の解明

膵β細胞において cAMP/Epac2 シグナルが細胞骨格を制御することでインスリン分泌を増強するかを検討した。はじめに、8-bromo-cAMP および Epac 選択的 cAMP アナログ 8-pCPT-2'-Me-O-cAMP によって活性化される分子として、細胞骨格制御に関与する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの Cdc42 を同定した (図 2)。

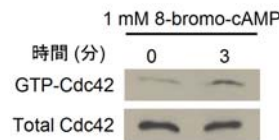


図 2 cAMP による Cdc42 活性化 (MIN6 細胞)

Cdc42 に対する shRNA を MIN6 細胞に導入し、cAMP 刺激によるインスリン分泌増強を検討したところ、有意に低下していた。さらに、

この分子の下流分子の探索を行ったところ、cAMP 依存性に結合する分子を同定した。この分子はアクチンの重合に関与することから、dominant negative 変異体を作製し、膵島、膵β細胞株に導入し、インスリン分泌増強に関与するかを検討したところ、有意に抑制された。したがって cAMP/Epac2 シグナルによるアクチンの重合は、インスリン分泌に重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) 個体レベルでの Epac2 を介したインクレチン作用の解明

Epac2 の膵β細胞におけるインスリン分泌における役割を個体レベルで解析するため、膵β細胞で特異的に Epac2 を欠損させたマウスを作出した。このマウスを用いて個体レベルの実験ができるように現在、繁殖をさせているが、事前に Epac2 欠損マウスから膵島を単離して、インクレチンで刺激し、インスリン分泌増強を検討したところ、野生型マウスに比し有意に抑制されていた。またインクレチン以外のインスリン分泌促進薬と組み合わせても、インスリン分泌増強は有意に抑制されていた。したがって Epac2 はインクレチンによるインスリン分泌増強に重要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

英文

- 1) Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121:2118-2125, 2011.
- 2) De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Ramracheya R, Amisten S, Habib AM, Moritoh Y, Zhang E, Reimann F, Rosengren AH, Shibasaki T, Gribble F,

Renström E, Seino S, Eliasson L, Rorsman P. GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis. *Cell Metab.* 11:543-553, 2010.

- 3) Seino S, Shibasaki T, Minami K. Pancreatic β-cell signaling: toward better understanding of diabetes and its treatment. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:563-577, 2010.
- 4) Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Numata T, Mori Y, Miyazaki J, Miki T, Seino S. Rim2α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab*, 12:117-129, 2010.
- 5) Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J, Seino S. Establishment of new clonal pancreatic β-cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cyclic adenosine monophosphate signaling. *J Diabetes Invest* 1:137-142, 2010.
- 6) Seino S, Zhang CL, Shibasaki T. Sulfonylurea Action Re-revisited. *J Diabetes Invest* 1:37-39, 2009.
- 7) Seino S, Takahashi H, Fujimoto W, and Shibasaki T. Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. *Diabetes Obes Metab* 11:180-188, 2009.
- 8) Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, Minami K, Sunaga Y, Takahashi H, Yokoi N, Iwasaki M, Miki T, and Seino S. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* 325:607-610, 2009.
- 9) Sugawara K, Shibasaki T, Mizoguchi A, Saito T, Seino S. Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of insulin

granule exocytosis. *Genes Cells* 14:445-456, 2009.

- 10) Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, 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.

和文

- 11) 柴崎忠雄、清野 進：インスリン分泌機構解明の最前線「インスリン分泌における cAMP センサー-Epac2A の役割」、*内科学会雑誌* 100:1418-1424、2011
- 12) 柴崎忠雄、清野 進：特集 インクレチン関連薬 –糖尿病治療のパラダイムシフト– インクレチンの分泌調節機構、*日本臨床* 69:803-807、2011
- 13) 柴崎忠雄、清野 進：最近の話題 スルホニル尿素薬の新たな標的分子、*日本薬理学会雑誌* 138:1、2011
- 14) 柴崎忠雄、張長亮、清野 進：インスリン分泌における cAMP センサーの役割、代謝制御の鍵を握る膵β細胞 –インスリン分泌の新機構と実現化する細胞再生– *実験医学* 28:1342-1346、2010
- 15) 柴崎忠雄、清野 進：スルホニル尿素薬とインクレチン、*最新医学* 1:113-119、2011
- 16) 柴崎忠雄、高橋晴美、清野 進、インスリン開口分泌のダイナミクス、*糖尿病学の進歩 第43集* 29-33、2009
- 17) 柴崎忠雄、張長亮、清野 進、糖尿病治療薬のあらたな標的としての cAMP センサー-Epac2、*医学のあゆみ* 231:749-754、2009

[学会発表] (計 16 件)

招待講演

- 1) Shibasaki T, Yasuda T, Takahashi H, Seino

S: Molecular mechanisms of insulin granule exocytosis、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 (札幌)、2011.5.19

- 2) Shibasaki T, Takahashi H, Yasuda T, Zhang C-L, Seino S: Molecular mechanisms of insulin granule exocytosis. 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜)、2011.3.22
- 3) Shibasaki T, Zhang C-L, Takahashi T, Takahashi H, Seino S: Epac2-mediated signaling to insulin secretion, 10th Annual Rachmiel Levine Diabetes and Obesity Symposium (Las Vegas, USA) 2010.3.16
- 4) Shibasaki T, Zhang CL, Takahashi T, Takahashi H, Seino S: シンポジウム「膵β細胞研究の最前線 (1) 『インスリン分泌』」: Epac2 is a direct target of both cAMP and sulfonylurea in insulin secretion、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (岡山)、2010.5.28

一般演題

- 5) Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Tatebe M, Oiso Y, Seino S: Role of actin dynamics regulated by Cdc42/N-WASP signaling in insulin secretion. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions (San Diego, USA), 2011.6.26
- 6) Aini W, Iwasaki M, Ogura M, Shibasaki T, Minami K, Seino S: Induction of incretin responsiveness from incretin-unresponsive clonal beta-cells by formation of pseudoislets. The 3rd Asian Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Beijing, China), 2011.7.23
- 7) Takahashi H, Shibasaki T, Takahashi T, Seino S: Interaction of cAMP and sulfonylurea through Epac2 in insulin

- secretion. XII Servier-IGIS Symposium (Saint-Jean-Cap-Ferrat, France), 2011.4.2
- 8) 高橋晴美、柴崎忠雄、高橋利匡、清野進：インクレチンとSU薬によるインスリン分泌におけるEpac2/Rap1シグナルの役割、第54回日本糖尿病学会年次学術集会（札幌）、2011.5.21
- 9) 上西栄太、柴崎忠雄、高橋晴美、濱口ひとみ、大磯ユタカ、清野進：Cdc42/N-WASPによるアクチンダイナミクスの制御とそのインスリン分泌における役割、第54回日本糖尿病学会年次学術集会（札幌）、2011.5.21
- 10) Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J-I, Seino S: Induction of cAMP responsiveness from cAMP unresponsive β -cells by formation of pseudoislets. 70th Scientific Sessions, American Diabetes Association (Orland, FL, USA), 2010.6.26
- 11) Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Miyazaki J-I, Miki T, Seino S: Rim2 α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis in pancreatic β -cells. Asia Islet Biology & Incretin Symposium (Kyoto, Japan), 2010.7.31
- 12) Shibasaki T, Takahashi H, Seino S: Regulation of insulin granule exocytosis by glucose. 14th International Congress of Endocrinology (Kyoto, Japan), 2010.3.27
- 13) Shibasaki T, Uenishi E, Takahashi H, Hamaguchi H, Seino S: Role of actin dynamics in insulin secretion through Cdc42/N-WASP signaling 第34回日本分子生物学会年会（横浜）、2011.12.15
- 14) 上西栄太、柴崎忠雄、濱口ひとみ、大磯ユタカ、清野進：cAMPを介したインスリン分泌におけるCdc42の役割、第53回日本糖尿病学会年次学術集会（岡山）、2010.5.27
- 15) 柴崎忠雄、松村公男、建部将夫、岸本亜野、宮澤康太郎、藤本和歌子、三木隆司、岩永敏彦、清野進：インクレチンホルモン GLP-1 分泌における Noc2 の役割 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会（神戸）、2010.12.7
- 16) Shibasaki T, Sugawara K, Seino S: Participation of Rab11 and its effector Rip11 in the regulation of insulin secretion. 第32回日本分子生物学会年会（横浜）2009.12.12

〔図書〕（計2件）

- 1) 柴崎忠雄、安田貴雄、清野進：インスリン開口分泌におけるRim2 α の役割、糖尿病学 2011 17-25、2011
- 2) 柴崎忠雄、張長亮、清野進：cAMPとスルホニル尿素薬の標的としてのEpac2、糖尿病学 2010 38-41、2010

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6. 研究組織

(1) 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