

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790197

研究課題名（和文） 内分泌素過程を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文） Study on the molecular mechanism of hormone secretion

研究代表者

坪井 貴司（TSUBOI TAKASHI）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：80415231

研究成果の概要（和文）：私達は環境変化に対応するため、ホルモンを分泌することにより体内の恒常性を一定に保っている。この機構の破綻は、アレルギー、糖尿病等の種々の疾患に直結する。本研究では、ホルモン分泌制御を行うタンパク質（ミオシン 2）を同定し、その機能を生化学・生理学・バイオイメーjingなど様々なアプローチで解析することにより、ホルモン分泌の仕組みを分子レベルで理解することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：To adapt environmental changes, endocrine tissues in our body are secreted variety of hormones to maintain body homeostasis. Failure of this mechanism is directly linked to various disease such as diabetes and allergies. In the present study, we identified an myosin 2 as a regulator for hormone secretion by using biochemical, physiological, and bioimaging analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：開口放出、ミオシン2、マイクロRNA、ホルモン、神経内分泌細胞、バイオイメーjing、細胞骨格、分泌顆粒

1. 研究開始当初の背景

ホルモン分泌反応は、次の4つの素過程からなると考えられている。まずホルモン分泌顆粒が、(i)細胞膜へ輸送され、(ii)細胞膜上に係留され（ドッキング過程）、(iii)ATP濃度依存的に開口放出可能な状態（プライミング過程）を経た後、(iv)細胞膜と分泌顆粒が融合し、ホルモンを細胞外へ放出（開口放出過程）する。近年、mRNAに転写されないと考え

られていた多数のDNA配列が non-coding RNA (ncRNA) として転写され、タンパク質発現制御に関与していることが明らかになった。ncRNAの中でも miRNA(microRNA)は、標的 mRNA に結合して遺伝子発現制御に関与する分子として知られている。近年 miR-375 と呼ばれる miRNA が、膵臓ベータ細胞のインスリン顆粒のドッキング過程を抑制し、インスリン分泌を抑制すると報告された。しかしなが

ら、miR-375 以外にホルモン分泌の 4 つの素過程を制御する遺伝子及びそれら遺伝子の発現制御を行う miRNA については、これまで十分に解析、同定されていない。

2. 研究の目的

本研究では、生細胞イメージング法により、ホルモン分泌の 4 つの素過程を制御する miRNA とその標的遺伝子を網羅的スクリーニング可能なシステムを新規開発し、ホルモン分泌素過程を制御する miRNA 及び標的遺伝子を同定し、それらの生理機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホルモン分泌顆粒の分泌メカニズムを全反射蛍光顕微鏡にてリアルタイムで可視化するシステムを構築した。全反射蛍光顕微鏡は、標本のごく一部の浅い部分領域内 (100 ナノメートル範囲) の蛍光色素や蛍光タンパク質を特異的に検出できる。つまり、カバーガラス上に存在する細胞膜領域の蛍光変化を観察することが可能となり、単一のホルモン分泌顆粒の細胞膜方向への輸送、ドッキング、プライミング、開口放出動態の解析に適している。

(2) 本研究ではこの全反射蛍光顕微鏡を用い、蛍光タンパク質標識したホルモン分泌顆粒 (インスリン-緑色蛍光タンパク質 (Ins-GFP) およびニューロペプチド Y-黄色蛍光タンパク質 (NPY-Venus)) を恒常的に発現するホルモン分泌細胞 (インスリンを分泌する MIN6 細胞およびカテコールアミンを分泌する PC12 細胞) のホルモン分泌反応の可視化解析を行った。これらの細胞に、内在性 miRNA を特異的に阻害する Anti-miR miRNA Inhibitor (Ambion) を導入し、miRNA を阻害した際のホルモン分泌動態への影響を可視化解析した。

4. 研究成果

(1) 内在性 miRNA を特異的に阻害する Anti-miR miRNA Inhibitor を MIN6 細胞および PC12 細胞に導入し、ホルモン分泌反応を可視化解析することで、ホルモン分泌素過程に関与する miRNA のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、MIN6 細胞では、2 種類の miRNA (miR-124 及び mi-R375) の関与が、一方 PC12 細胞では、1 種類の miRNA (miR-9) の関与が示唆された。

(2) miRNA の標的遺伝子をリストアップした

ところ、標的遺伝子候補の 1 つにミオシン 2 を見出した。

(3) ミオシン 2 (MyoII) の活性状態を制御する調節軽鎖 (regulatory light chain; RLC) に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を融合させた MyoII-RLC-EGFP を作製し、ミオシン 2 が PC12 細胞におけるホルモン放出動態へどのような影響を与えるかを生細胞イメージング法により解析した。分子サイズの異なる 3 つのホルモン分泌顆粒内容物 (ニューロペプチド Y (NPY)、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)) を赤色蛍光タンパク質 (mRFP) または、黄色蛍光タンパク質 (Venus) で標識したホルモン分泌顆粒プローブを作成し、それらを PC12 細胞に発現させ、その放出動態を全反射蛍光顕微鏡にて可視化解析した。

NPY-mRFP は、エキソサイトーシス直前に顆

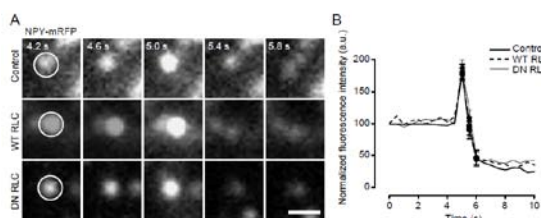


図 1. NPY-mRFP 分泌動態への MyoII の影響

粒直径の 2 倍程度まで蛍光を広げながら、一時的に (300 ミリ秒以内) その蛍光強度を高め、その後完全に消失した (図 1A, B)。

興味深いことに、野生型及び変異型ミオシン 2 調節軽鎖 (MyoII-RLC) を共発現した PC12 細胞において、NPY-mRFP 放出動態は、まったく変化しなかった (図 1)。

一方、tPA-mRFP (図 2A, B) や BDNF-Venus

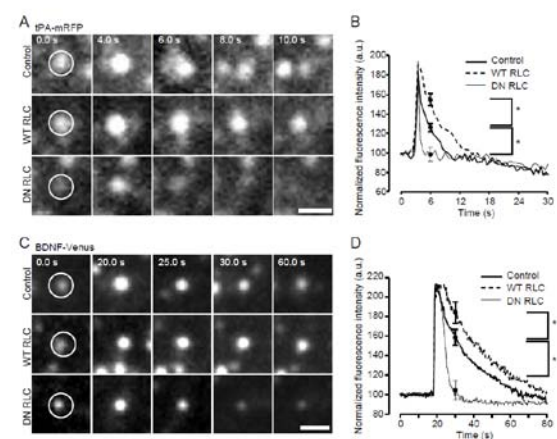


図 2. tPA-mRFP および BDNF-Venus 分泌動態へのミオシン 2 の効果

(図 2C, D) は、数秒間 (10 秒以上) 蛍光強度を高め、その後徐々に蛍光強度が当初のレ

ベルにまで戻るといふ、部分的なホルモン分泌が観察された。また、野生型 MyoII-RLC を発現した PC12 細胞では、tPA-mRFP や BDNF-Venus 放出時の蛍光強度が高まっている時間が長くなり、逆に変異型 MyoII-RLC を発現した場合は、短くなる現象が観察された (図 2)。

(4) 開口放出反応時の野生型 MyoII-RLC または、変異型 MyoII-RLC の細胞内局在及び動態を可視解析した。その結果、刺激前からホルモン分泌顆粒近傍に MyoII-RLC が存在し、開口放出反応後、すばやく MyoII-RLC が開口放出部位から遠ざかる方向へ移動するような反応が観察された (図 3、上)。しかし、変異型 MyoII-RLC を発現した細胞では、そのような反応は観察されなかった (図 3、下)。

(5) 以上の結果から、MyoII-RLC は、ホルモン分泌顆粒の輸送、ドッキング及び、プライミング過程には関与しないと考えられる。MyoII-RLC は、ホルモン分泌顆粒と細胞膜との間の融合孔 (Fusion pore) のサイズを制御し、分泌するホルモン量を制御していることが分かった。

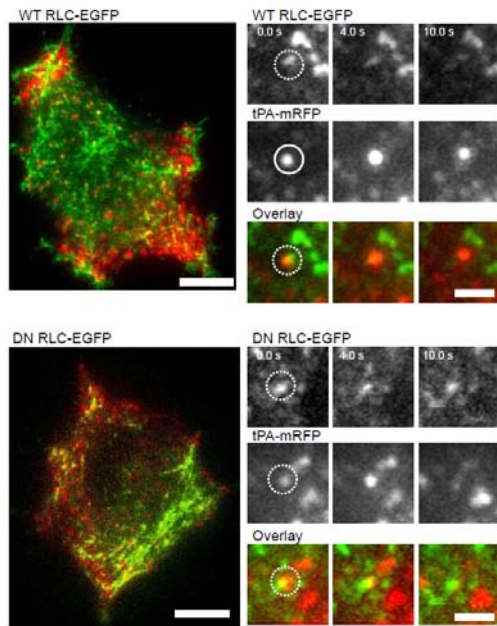


図 3. ホルモン分泌顆粒と MyoII-RLC の細胞内局在及び分泌刺激時の動態

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 15 件)

- ① Ohata S, Aoki R, Kinoshita S, Yamaguchi M, Tsuruoka-Kinoshita S, Tanaka H, Wada H, Watabe S, Tsuboi T, Masai I, Okamoto H. Dual roles of Notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. *Neuron* 69, 215-230, (2011) 査読有
- ② Aoki R, Kitaguchi T, Miyawaki A, Tsuboi T. Myosin II modulates fusion pore opening period via cortical F-actin reorganization *The Journal of Physiological Sciences* 60, 176, (2010) 査読無
- ③ Oya M, Sato M, Suzuki H, Sato M, Tsuboi T. Molecular mechanism of glutamate-induced insulin secretion from pancreatic b-cells revealed by genetically encoded fluorescent indicators *The Journal of Physiological Sciences* 60, 175, (2010) 査読無
- ④ Tsuboi T, Kitaguchi T, Karasawa S, Fukuda M, Miyawaki A Age-dependent preferential secretory vesicle exocytosis in neuroendocrine cells *The Journal of Physiological Sciences* 60, 11, (2010) 査読無
- ⑤ Adachi A, Kano F, Tsuboi T, Fujita M, Maeda Y, Murata M. Golgi-associated GSK3-beta regulates the sorting process of post-Golgi membrane trafficking. *Journal of Cell Sciences*, 123, 3215-3225, (2010) 査読有
- ⑥ Kawashima R, Ikematsu K, Abe Y, Sato M, Tsuruya S, Nakasono I, Fukushima H, Inoue K, Tsuboi T. Effect of glucocorticoid on the biosynthesis of growth hormone-containing secretory granules in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400, 225-229, (2010) 査読有
- ⑦ Takakura H, Sasakura K, Ueno T, Urano Y, Terai T, Hanaoka K, Tsuboi T, Nagano T. Development of Luciferin Analogues Bearing an Amino Group and Their Application as BRET Donors *Chemistry-Asian Journal*, 5, 2053-2061, (2010) 査読有

- ⑧ Aoki R, Kitaguchi T, Oya M, Yanagihara Y, Sato M, Miyawaki A, Tsuboi T. Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *Biochemical Journal* 429, 497-504, (2010) 査読有
- ⑨ Sato M, Mori Y, Matsui T, Aoki R, Oya M, Yanagihara Y, Fukuda M, Tsuboi T. Role of the polybasic sequence in the Doc2alpha C2B domain in dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 114, 171-181, (2010) 査読有
- ⑩ Tsuboi T, Kitaguchi T, Karasawa S, Fukuda M, Miyawaki A. Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Molecular Biology of the Cell* 21, 87-94, (2010) 査読有
- ⑪ Aoki R, Kitaguchi T, Tsuboi T. Myosin II regulates “kiss-and-run” dense-core exocytosis revealed by total internal reflection fluorescence microscopy. *The Journal of Physiological Sciences* 59, 301, (2009) 査読無
- ⑫ Maekawa F, Tsuboi T, Yada T, Pellerin L. Monocarboxylate transporter-2 (MCT2) regulates subcellular localization and surface expression of glutamate receptor-2 (GluR2). *The Journal of Physiological Sciences* 59, 136, (2009) 査読無
- ⑬ Tsuboi T. Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Neuroscience Research* 63, 83-88, (2009) 査読有
- ⑭ Ohata S, Kinoshita S, Aoki R, Tanaka H, Wada H, Tsuruoka-Kinoshita S, Tsuboi T, Watabe S, Okamoto H. Neuroepithelial cells require fucosylated glycans to guide the migration of vagus motor neuron progenitors in the developing zebrafish hindbrain. *Development* 136, 1653-1663, (2009) 査読有
- ⑮ Maekawa F, Tsuboi T, Fukuda M, Pellerin L. Regulation of the intracellular distribution, cell surface expression, and protein levels of AMPA receptor GluR2 subunits by the monocarboxylate transporter MCT2 in neuronal cells. *Journal of Neurochemistry* 109, 1767-1778, (2009) 査読有
- [学会発表] (計15件)
- ① 坪井貴司、北口哲也、唐澤智司、福田光則、宮脇敦史 産生時間依存的な開口放出制御機構の解析 第88回日本生理学会(横浜) 2011年3月28日
- ② Lee SJ, Oh S, Huang C, Watanabe H, Tsuboi T. Model Guided Quantification of Exocytotic Vesicle Dynamics. 50th American Society for Cell Biology (Philadelphia, PA) 2010年12月12日
- ③ 茨木京子、山本清二、坪井貴司、寺川進 海馬神経細胞におけるAMPAが誘導する核内Ca²⁺上昇と核内顆粒出現に対するIP₃ signalingの解析 第33回日本神経科学大会(神戸) 2010年9月3日
- ④ 坪井貴司、北口哲也、唐澤智司、福田光則、宮脇敦史 産生時間依存的な開口放出制御機構の解析 第87回日本生理学会(盛岡) 2010年5月20日
- ⑤ 青木亮、北口哲也、宮脇敦史、坪井貴司 ミオシン2は表層繊維状アクチンの再編成を介して融合孔の開いている時間を制御する 第87回日本生理学会(盛岡) 2010年5月20日
- ⑥ 大屋愛実、佐藤舞、鈴木秀幸、佐藤守俊、坪井貴司 蛍光プローブを用いた膵β細胞におけるグルタミン酸誘導性インスリン分泌の可視化解析 第87回日本生理学会(盛岡) 2010年5月20日
- ⑦ 森亮一、池松和哉、下川功、坪井貴司 マクロファージ由来サイトカイン分泌機構の解析 第32回日本分子生物学会年会(横浜) 2009年12月9日
- ⑧ 佐藤舞、坪井貴司 Actin filament functions as an exocytosis promoting factor in neuroendocrine cells 第32回日本分子生物学会年会(横浜) 2009年12月9日
- ⑨ 柳原優、坪井貴司 Different peptide hormone release dynamics on astrocytes 第32回日本分子生物学会年会(横浜) 2009年12月9日
- ⑩ 大屋愛実、鈴木秀幸、佐藤守俊、坪井貴司 Glucose-induced IP₃ signal in pancreatic MIN6 cells revealed by GFP-based FRET probe 第32回日本分子生物学会年会(横浜) 2009年12月9日
- ⑪ Lee JSJ, Huang CC, Kenyon Z, Watanabe H, Tsuboi T. Automated kinetic characterization of exocytotic events in total internal reflection microscopy 49th American Society for Cell Biology (San Diego, CA, USA) 2009年12月6日

- ⑫ Aoki R, Kitaguchi T, Miyawaki A and Tsuboi T. Myosin II modulates a size of exocytotic fusion pore in neuroendocrine cells 第32回日本神経科学大会 (名古屋) 2009年9月16日
- ⑬ Maekawa F, Tsuboi T, Yada T, Pellerin L. Monocarboxylate transporter-2 (MCT2) regulates subcellular localization and surface expression of glutamate receptor-2 (GluR2). XXXVI International Congress of Physiological Sciences (京都) 2009年7月29日
- ⑭ Aoki R, Kitaguchi T and Tsuboi T. Myosin II regulates “kiss-and-run” dense-core exocytosis revealed by total internal reflection fluorescence microscopy. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (京都) 2009年7月28日
- ⑮ 前川文彦, 坪井貴司, 矢田俊彦, Luc Pellerin. 乳酸輸送体 MCT2 がグルタミン酸 AMPA 受容体サブタイプ GluR2 の細胞膜表面発現に及ぼす影響 第52回日本糖尿病学会 (大阪) 2009年5月21日

[図書] (計2件)

- ① 坪井貴司 図説生物学、東京大学出版 (2010) 52-79
- ② 坪井貴司 ベーシックマスター細胞生物学、オーム社、(2010) 114-129

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 貴司 (TSUBOI TAKASHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：80415231

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし