

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790876

研究課題名(和文) GDP 型 Rab27a による細胞骨格制御とインスリン顆粒膜のリサイクリング

研究課題名(英文) Secretory membrane endocytosis by the GDP-Rab27a-regulated cytoskeletal modulation

研究代表者

木村 俊秀 (KIMURA TOSHIHIDE)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：60404373

研究成果の概要(和文)：

インスリンは、血糖の維持に重要なホルモンである。インスリン分泌の際、それを囲んでいた膜(顆粒膜)は細胞内で再利用される。顆粒膜のリサイクルはインスリン分泌にとって重要であるが、その機構はほとんどわかっていなかった。本事業では、GDP 型 Rab27a とその結合タンパク質が細胞骨格を制御してこのリサイクルを制御していることを明らかにした。本研究で解析した分子は糖尿病治療薬の新たなターゲットになる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：

Insulin is a hormone central to the maintenance of blood glucose levels. Following insulin release, the secretory membranes are taken up for another round of exocytosis. Although the recycling of the secretory membranes is crucial for insulin secretion, the precise molecular mechanisms have not been elucidated. In the present study, we revealed that GDP-Rab27a and its binding proteins regulate this process via cytoskeletal modulation. These molecules involved in the pathway may be a novel therapeutic target for diabetes mellitus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、アクチン、coronin

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を開発することは、焦眉の課題である。我が国の糖尿病の大半を占める 2 型糖尿病の原因

としては、膵 B 細胞からのインスリン分泌障害の占める割合が大きい。よって、2 型糖尿病の病因を究明し、糖尿病治療薬を創出するには、膵 B 細胞におけるインスリン分泌のメ

カニズムを明らかにすることが必要である。

インスリンは、細胞内 Ca^{2+} の上昇によるインスリン顆粒膜と細胞膜との融合により細胞外に開口放出される。開口放出に比べ、その前後の段階に位置するインスリン顆粒の動態に関する知見は乏しく、世界中の研究室がその解明に力を注いでいる。我々は低分子量 G タンパク質 Rab27a に着目し、インスリン顆粒の動態制御機構の解明を行っている。

Rab27a は、膵島に高レベルで発現し、インスリン顆粒上に局在する (Mol. Cell Biol., 22, 1858-1867, 2002)。Rab27a 遺伝子に変異を持つマウスの解析より、Rab27a はグルコース刺激特異的にインスリン顆粒の動態を制御することが報告された (J. Clin. Invest., 115, 388-396, 2005)。さらに、Rab27a は GTP 型 Rab27a 結合分子 granuphilin を介して SNARE タンパク質と結合し、インスリン顆粒を細胞膜へドッキングすることが報告された (J. Biol. Chem., 21, 22532-22538, 2004)。しかし、Rab27a によるインスリン顆粒の動態制御を 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 遺伝子変異マウスから単離した膵 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おり (J. Cell Biol., 171, 99-109, 2005)、新たなシグナル伝達系の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

申請者は、これまで不活性型と考えられてきた GDP 型 Rab27a に結合する分子としてアクチン関連分子である coronin3 を同定し、膵 B 細胞でインスリン顆粒膜の回収(エンドサイトーシス)を制御することを示した

(Kimura et al. J. Cell Sci., 2008)。しかし、GDP 型 Rab27a と coronin3 の結合がエンドサイトーシスを制御する分子メカニズムは未だ不明である。本研究は、coronin3 と結合した GDP 型 Rab27a が、複数のステップより成るエンドサイトーシスの、どのステージにどのような分子メカニズムで働くのかを明らかにする目的で行った。

3. 研究の方法

(1) 超微形態の観察

MIN6 細胞に coronin 3 siRNA を導入後、グルタルアルデヒドで固定した。洗浄後にオスミウムで染色し、形態を透過型電子顕微鏡により観察した。

(2) 抗体取り込み実験

Coronin3 のドミナントネガティブ変異体 (coronin 3 Δ C) をアデノウイルスを用いて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。

(3) ビオチン化実験

Coronin 3 Δ C をトランスフェクションした MIN6 細胞をビオチンとインキュベートした後、ビオチン化されたタンパク質をアビジンビーズにより回収した。

(4) 免疫染色法

MIN6 細胞に siRNA やプラスミドを導入した後、蛍光標識抗体を用いて免疫染色を行った。蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(5) アクチン結合実験

精製されたアクチン、coronin3、Rab27a を含む溶液を遠心し、東化したアクチンを回収した。回収したアクチンは、SDS-PAGE により解析した。さらに、coronin3 抗体や coronin

3ΔCを導入することで coronin3 とアクチンとの結合を抑制した MIN6 細胞を用いて phogrin 抗体の取り込み実験を行った。

4. 研究成果

(1) Coronin3 が制御するエンドサイトーシスのステージ

Coronin3 をノックダウンした細胞ではインスリンが放出された後に顆粒膜が細胞内に取り込まれず、細胞膜近傍に集積する。そこで、集積した顆粒膜の超微形態を電子顕微鏡で解析した。顆粒膜は、インスリン顆粒に特徴的なハロ・コア構造を持たず、細胞膜から細胞質側に約 15nm 離れた位置に集積が見られた(Kimura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010)。フォグリンはインスリン顆粒膜に局在する膜貫通型タンパク質で、開口放出後にエンドサイトーシスにより細胞内に回収される(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324, 1004-1010, 2004)。申請者は、フォグリンの内腔ドメイン、すなわち開口放出時に細胞外に提示されるドメインを認識する抗体を作製し、これを培養液中に添加することで、エンドサイトーシスによって取り込まれたインスリン顆粒膜を可視化した。Phogrin 抗体は、グルコースと温度依存的に細胞内に取り込まれた。また、coronin3 のドミナントネガティブ変異体を発現した細胞ではエンドサイトーシスが抑制された結果、phogrin 抗体が細胞膜近傍に集積した。さらに、抗体の取り込み後に細胞表面の抗体を強酸で洗浄した結果、細胞膜近傍に集積した phogrin 抗体が酸処理の影響を受けなかったことから、インスリン顆粒膜が細胞内に取り込まれていることがわかった。また、coronin3 のドミナントネガティブ変異体を

発現した細胞の細胞表面タンパク質をビオチン化しアビジンビーズで回収した結果、この細胞では phogrin が細胞膜近傍に集積しているにもかかわらず細胞表面の phogrin の量は減少していた。以上の結果より、coronin3 はエンドサイトーシス経路のうち、顆粒を細胞膜からくびり切った後のステップを制御していることを明らかにした。

(2) Coronin3 によるエンドサイトーシスの制御メカニズム

Coronin3 は、グルコース刺激により細胞質から細胞膜近傍に局在を変えた。また、Rab27a のノックダウンは、その局在変化を抑制した。さらに、グルコースによる coronin3 の細胞内局在変化は、細胞内の Rab27a を GDP 型に変換する酵素 Rab27a-GAP や、GDP 型に Rab27a を固定した変異体の過剰発現により促進された。一方、GDP 型に変換する活性を欠失した Rab27a-GAP 変異体や GTP 型に Rab27a を固定した変異体の過剰発現は、グルコースによる coronin3 の細胞内局在変化を抑制した。以上の結果から申請者は、グルコースにより coronin3 が細胞質から細胞膜に移行すること、その移行には GDP 型 Rab27a が必要であることを明らかにした(Kimura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010)。グルコースは、Rab27a を GTP 型から GDP 型に変換するので、グルコースにより GDP 型に変換された Rab27a が coronin3 を細胞膜近傍にリクルートすることが証明された(Kimura et al. *Beta Cells: Functions, Pathology and Research*, 2011)。

次に、GDP 型 Rab27 が coronin3 の F-アクチン結合能や束化活性を促進することを生化学的に示した。また、coronin3 とアクチン

の結合を coronin3 の変異体や中和抗体で抑制する実験から、coronin3 のアクチン束化活性がインスリン顆粒膜のエンドサイトーシスに必要であることを明らかにした (Kimura et al. Arch. Biochem. Biophys., 2010)。

本研究では、GDP 型 Rab27a 結合タンパク質として申請者が同定した 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分子メカニズムを明らかにした。私たちは現在、次のようなモデルを提唱している。グルコース刺激は、インスリン顆粒のエキソサイトーシスを引き起こすと共に、Rab27a を GDP 型へ変換する。Coronin3 は、GDP 型 Rab27a に結合することで細胞膜直下に集まると共に、アクチンのダイナミクスを制御することにより、取り込まれた顆粒膜をエンドソームなどのオルガネラへ輸送する。

顆粒が放出されるまでと、これに続く顆粒膜の取り込みは、あわせて顆粒膜のリサイクリングと呼ばれている。申請者のこれまでの知見は、このリサイクリングが、Rab27a が GTP 型や GDP 型に変換される Rab サイクルとうまくシンクロナイズしていることを示している (Kimura et al. Endocrine J., 2011)。

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 8 件)

1. Kimura T, Niki I
Rab27a, actin and beta-cell endocytosis.
Endocr. J., 58, 1-6 (2011) 査読有

2. Taniguchi S, Kang L, Kimura T, Niki I
Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic β -cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress.
Brit. J. Pharmacol., 162, 1171-1178 (2011)

査読有

3. Kimura T, Taniguchi S, Toya K, Niki I
Glucose-induced translocation of coronin 3 regulates the retrograde transport of the secretory membrane in the pancreatic β -cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 395, 318-323 (2010) 査読有

4. Kimura T, Taniguchi S, Niki I
Actin assembly controlled by GDP-Rab27a is essential for endocytosis of the insulin secretory membrane.
Arch. Biochem. Biophys., 496, 33-37 (2010) 査読有

5. 仁木一郎、谷口繁生、木村俊秀
インクレチン関連薬の何が期待されているのか
Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther., 41, 55-56 (2010) 査読無

6. Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A., Menager C., Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K
Direct interaction of Slp1 and Rab27 with TrkB receptor regulates its anterograde transport in axons.
Dev. Cell, 16, 675-686 (2009) 査読有

7. Arimura N, Hattori A, Kimura T, Nakamuta S, Funahashi Y, Hirotsune S, Furuta K, Urano T, Toyoshima Y, Kaibuchi K
CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity.
J Neurochem., 111, 380-390 (2009) 査読有

8. 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

[学会発表] (計 12 件)

1. 木村俊秀
GDP 型 Rab27a 結合タンパク質 coronin3 の細胞内局在を制御する機構の解析
第 84 回日本薬理学会 (2011 年 3 月 23 日 誌上開催)

2. 木村俊秀
GDP型Rab27aによるインスリン顆粒膜のエンドサイトーシス制御機構の解析
第33回日本分子生物学会年会(2010年12月8日 神戸)

3. 木村俊秀
インスリン顆粒膜のエンドサイトーシスを制御する分子 coronin3 の細胞内局在決定機構
第63回日本薬理学会西南部会(2010年11月26日 鹿児島)

4. 木村俊秀
低分子量GTP結合タンパク質(Gタンパク質)におけるGDP依存性エフェクターの発見
木村俊秀
第48回日本糖尿病学会九州地方会(2010年10月29日 大分)

5. 木村俊秀
Molecular mechanism of secretory membrane endocytosis by the GDP-dependent Rab27a effector coronin 3.
Asia Islet Biology and Incretin Symposium,
(2010年8月1日 Kyoto, Japan)

6. 木村俊秀
GDP型Rab27aによるインスリン顆粒膜のリサイクリング制御機構。
第10回 Islet Biology 研究会(2010年7月17日 東京)

7. 木村俊秀
アクチン骨格の制御を介したインスリン顆粒膜のリサイクリング。
第53回日本糖尿病学会(2010年5月27日 岡山)

8. 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エンドサイトーシス制御機構の解析。
第83回日本薬理学会(2010年3月18日 大阪)

9. 木村俊秀
Roles of the GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 in actin assembly and endocytosis of the insulin granule membranes.
第32回日本分子生物学会年会(2009年12月10日 横浜)

10. 木村俊秀
GDP型Rab27aによるインスリン顆粒膜のリサ

イクリング制御機構
第2回 Incretin & Islet Initiative (2009年11月28日 東京)

11. 木村俊秀
Roles of the GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 in membrane traffic in the pancreatic beta cell.
45th Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes,
(2009年10月1日 Vienna, Austria)

12. 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52回日本糖尿病学会(2009年5月23日 大阪)

[図書] (計2件)

1. Kimura T, Niki I
Rab GTPases control membrane recycling in pancreatic β -cells.
Beta Cells: Functions, Pathology and Research, Gallagher SE (ed.), Nova Biomedical, NY, 123-130 (2011)

2. 木村俊秀、仁木一郎
インスリン分泌過程研究の変遷
Islet Equality, メディカルレビュー社, 4, 3-5 (2010)

[その他]

「日本糖尿病学会九州支部賞」受賞(2010年10月29日)

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
木村 俊秀 (KIMURA TOSHIHIDE)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号: 60404373