

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791039

研究課題名(和文) GDP型Rab27aエフェクター間のクロストークによる顆粒膜動態制御の解明

研究課題名(英文) A novel GDP-bound-Rab27a-interacting protein which regulates endocytosis of insulin secretory membranes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内輸送は、制御分子が必要な領域に集積する必要がある。Rab27aの活性型(GTP型)は、インスリン分泌を制御する。私は以前に、不活性型と考えられてきたGDP型が、インスリン分泌後の過程を制御することを明らかにした。本研究では、GDP型Rab27aに結合する第2の分子としてIQGAP1を見いだした。さらに、インスリン分泌刺激で活性化されたCdc42が、Rab27aやcoronin3などインスリン分泌後の過程を制御するタンパク質群を細胞膜直下のIQGAP1のもとへリクルートし、分泌後に不要となった膜成分を細胞内に回収することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Intracellular trafficking is a fundamental cellular process that is required for communication between organelles. Recruitment of specific molecules to specific membrane sites is essential for this trafficking. Rab27a, a member of the Rab GTPase family, has been considered to act as a molecular switch for exocytosis in insulin secretion, cycling between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. I previously showed that GDP-bound Rab27a is not an inactive form but is in fact an active form that regulates endocytosis through the GDP-dependent effector coronin3. In the present study, I identified IQGAP1, an effector of GTP-bound Cdc42, as another GDP-dependent effector of Rab27a. My results indicate that activation of Cdc42 in response to the insulin secretagogue glucose recruits endocytic machinery, including GDP-bound Rab27a and coronin3, to IQGAP1 at the cell periphery and regulates endocytosis at this membrane site.

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：IQGAP1 Rab27a エンドサイトーシス 膵B細胞 インスリン 糖尿病 Gタンパク質 メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

これまでのインスリン分泌研究は、インスリン顆粒膜が細胞膜に融合し顆粒内のインスリンを細胞外に放出する過程が終点であると見なされてきた。しかし、刺激により細胞膜に融合したインスリン顆粒膜を細胞内に回収することは、膵B細胞の体積を分泌後も一定に保ち、開口放出関連タンパク質を再利用するためにも必要である。私は、この回収のメカニズムがインスリン分泌の量とタイミングを決めるのに必須であり、その破綻が2型糖尿病の新たな原因となりうると考え、インスリン顆粒膜のリサイクリング機構の解析を行ってきた。

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低分子量 G タンパク質である。Rab27a には GTP 型と GDP 型が存在し、GTP 型には granophilin が結合し、SNARE タンパク質を介してインスリン顆粒を細胞膜へドッキングする。一方、GDP 型はこれまで機能を持たないと考えられてきた。

私は、新たな Rab27a 結合タンパク質を探索する過程で GDP 型にしか結合せず、かつ機能的に働いている coronin3 を同定した。(Kimura et al. JCS, 2008)。さらに、私は coronin3 の細胞骨格(アクチン)を束ねる作用がインスリン顆粒膜の取り込み(エンドサイトーシス)の実行に必要であること(Kimura et al. ABB, 2010)、グルコース刺激により Rab27a が GDP 型へ変換された結果、coronin3 が細胞質から細胞膜周辺にリクルートされること(Kimura et al. BBRC, 2010)を明らかにした。

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。私たち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 サイクルとうまく同期していることを示している。

2. 研究の目的

私は coronin3 に引き続き、GDP 型 Rab27a に結合するもうひとつの分子として IQGAP1 を新たに同定した。IQGAP1 は、cAMP や Ca^{2+} など多彩なシグナル伝達を統合するタンパク質で、その機能は多岐にわたる。さらに私は、IQGAP1 の発現を抑えた細胞では GDP 型 Rab27a に結合しエンドサイトーシスを制御するタンパク質 coronin3 の細胞膜近傍への移行が阻止されることを見出した。私は、GDP 型 Rab27a のエフェクター間のクロストークがインスリン顆粒膜の取り込みを制御していると考えている。そこで本研究では、GDP 型 Rab27a の新たなエフェクターである IQGAP1 が coronin3 や Rab27a の局在に及ぼす影響を解析することにより、エンドサイトーシスを制御するタンパク質が必要な場所にリクルートされる分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GDP 型 Rab27a と IQGAP1 の結合様式

GDP 型 Rab27a と IQGAP1 の結合様式を生化学的手法で調べた。具体的には、精製タンパク質を用いた結合実験により、GDP 型 Rab27a と IQGAP1 の結合の特異性、結合サイト、解離定数(Kd)、複合体の性質を調べた。

(2) IQGAP1 の活性制御機構

IQGAP1 は、Rab27a とは異なるファミリーに属する低分子量 G タンパク質 Rac1 および Cdc42 の GTP 型と結合する。さらに、IQGAP1 は Ca^{2+} によって活性化されるプロテインキナーゼ C によりリン酸化され、タンパク質のコンフォメーションを変化させる。そこで、Rac1/Cdc42 やリン酸化された IQGAP1 が、GDP 型 Rab27a と IQGAP1 の結合に及ぼす影響を調べた。

(3) IQGAP1 によるエンドサイトーシスの制御機構

RNAi 法により IQGAP1 や Rab27a をノックダウンし、各タンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、RNAi の影響を受けないように RNA 配列を修飾した遺伝子を導入して、ノックダウンされた細胞にこれらのタンパク質を発現させ、siRNA による効果がレスキューされることを確認した。

4. 研究成果

(1) GDP 型 Rab27a と IQGAP1 の結合様式

精製タンパク質を用いた結合実験より、GDP 型 Rab27a と IQGAP1 の結合は直接かつ特異的であった。解離定数(Kd)は 0.2 μ M で、この値は GDP 型 Rab27a と coronin3 の Kd とほぼ同じ値であった。また、IQGAP1 の Rab27a 結合部位を免疫沈降法により調べた結果、GDP 型 Rab27a は IQGAP1 の GRD ドメインに結合した。この領域は GTPase related domain と呼ばれ、IQGAP1 がその制御タンパク質のひとつである GTP 型 Cdc42 と結合する領域でもある。さらに、GDP 型 Rab27a/IQGAP1 複合体の形成は、インスリン分泌惹起物質であるグルコースによって促進された。

(2) IQGAP1 の活性制御機構

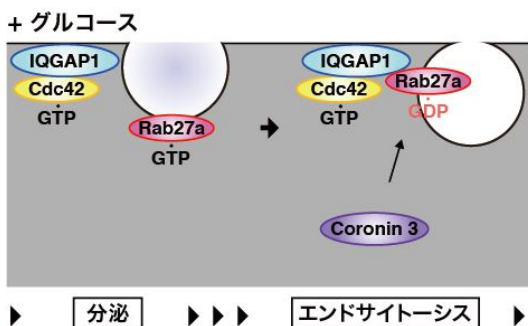
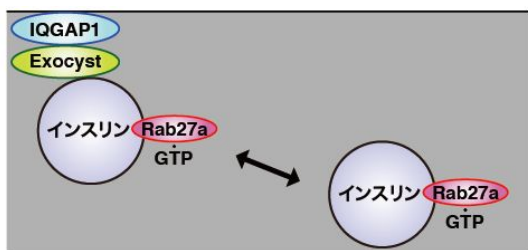
前述の Cdc42 は、グルコースにより GDP 型から GTP 型に変換されることが既に知られている。そこで、IQGAP1 と GDP 型 Rab27a の結合に Cdc42 が及ぼす影響を検討した結果、IQGAP1 は GTP 型 Cdc42 と結合した時のみ、GDP 型 Rab27a と複合体を形成することが明らかになった。IQGAP1 のもうひとつの制御タンパク質 Rac1 でも同様の結果が得られたが、グルコース刺激後に各タンパク質が GTP 型に変換されるタイムコースより、IQGAP1/GDP 型 Rab27a の複合体形成を制御するタンパク質

は Cdc42 であることが明らかになった。

(3) IQGAP1 によるエンドサイトーシスの制御機構

グルコース刺激により、細胞質の Rab27a や coronin3 は細胞膜近傍に集積した。この集積は、IQGAP1 のノックダウンにより抑制された。一方、IQGAP1 は、グルコースの有無に関わらず細胞膜直下に局在し、Rab27a や coronin3 のノックダウンはその局在に影響を及ぼさなかった。インスリン顆粒膜のエンドサイトーシスは、IQGAP1 のノックダウンにより抑制された。同様の抑制は、IQGAP1 と GDP 型 Rab27a の結合を阻害するドミナントネガティブ変異体や GDP 型 Cdc42 を過剰発現した細胞でも観察された。

本研究では、GDP 型 Rab27a 結合タンパク質として私が同定した IQGAP1 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。私は現在、下図のようなモデルを提唱している。IQGAP1 は、エキソサイトーシスを制御する時には Exocyst と結合し、エンドサイトーシスを制御する時には私が同定した GDP 型 Rab27a や coronin3 と結合する。エキソサイトーシスからエンドサイトーシスへの転換は、Cdc42 がグルコース刺激によって GTP 型へ変換されることで調節されている。つまり、IQGAP1 は必要な時に必要なタンパク質をひとつところに集めるための足場、言わば細胞膜直下でプラットフォームの役割を果たしていることが示唆された。今回の結果は、インスリンが分泌される際、エキソサイトーシスとエンドサイトーシスは別々の現象ではなく、連続した一連のステップであることを示している。



IQGAP1 は GDP 型 Rab27a や coronin3 などエンドサイトーシスに関わるタンパク質群を細胞膜近傍にリクルートすることで、エンドサイトーシスがおこるエリアを規定していることが明らかになった (Kimura et al.

Mol. Cell. Biol. 33, 4834-43, 2013)。本研究成果は、インスリンを取り囲むインスリン顆粒膜のリサイクリングを理解する上で極めて重要であると共に、GDP 型 G タンパク質によるシグナリングという意味からも基礎生物学上重要な知見である。従って、本研究は当初の計画以上に進展したと考えている。

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)

Kimura T, Yamaoka M, Taniguchi S, Okamoto M, Takei M, Ando T, Iwamatsu A, Watanabe T, Kaibuchi K, Ishizaki T, Niki I
Activated Cdc42-bound-IQGAP1 determines the cellular endocytic site
Mol. Cell. Biol. 33, 4834-43 (2013) 査読有
DOI: 10.1128/MCB.00895-13

Okamoto M, Yamaoka M, Takei M, Ando T, Taniguchi S, Ishii I, Tohya K, Ishizaki T, Niki I, Kimura T
Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 442, 227-233 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.023

Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Kojima H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yuzawa Y, Niki I
Distribution of hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and the roles of the H₂S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy.
Clin Exp Nephrol. 17, 32-40 (2013) 査読有
DOI: 10.1007/s10157-012-0670-y

Taniguchi S, Kimura T, Umeki T, Kimura Y, Kimura H, Ishii I, Itoh N, Naito Y, Yamamoto H, Niki I
Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine gamma-lyase in the pancreatic beta-cell
Molecular and Cellular Endocrinology, 350, 31-38 (2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.mce.2011.11.016

Kimura T, Niki I
Rab27a in pancreatic beta-cells, a busy

protein in membrane trafficking
Progress in Biophysics and Molecular
Biology, 107, 219-223 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.06.016

Kimura T, Niki I
Rab27a, actin and beta-cell endocytosis
Endocr. J., 58, 1-6 (2011) 査読有
DOI: 10.1507/endocrj.K10E-391

Taniguchi S, Kang L, Kimura T, Niki I
Hydrogen sulphide protects mouse
pancreatic beta-cells from cell death
induced by oxidative stress, but not by
endoplasmic reticulum stress
Brit. J. Pharmacol., 162, 1171-1178 (2011)
査読有
DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01119.x

Kimura T, Niki I
Rab GTPases control membrane recycling in
the pancreatic beta cell
Beta Cells: Functions, Pathology and
Research, Gallagher SE (ed.), Nova
Biomedical, NY, 123-130 (2011) 査読有
[https://www.novapublishers.com/catalog/
product_info.php?cPath=23_131_162&produ
cts_id=12468](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?cPath=23_131_162&products_id=12468)

〔学会発表〕(計 27 件)

IQGAP1 によるエンドサイトーシスの制御
機構の解析.
木村俊秀
第 86 回 日本薬理学会年会 (2013 年 3 月 23
日 福岡)

The regulatory mechanism of
intracellular localization of the
GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 in
pancreatic beta-cells.
Toshihide Kimura
48th Annual meeting of European
Association for the Study of Diabetes
(2012 年 10 月 1 日 ベルリン, ドイツ)

インスリン分泌時における膵 B 細胞の恒
常性維持システムの解析
木村俊秀
第 22 回 日本病態生理学会 (2012 年 8 月 4 日
大分)

GDP 型 Rab27a 新規結合タンパク質 IQGAP1
によるエンドサイトーシスの制御
木村俊秀
第 55 回 日本糖尿病学会 (2012 年 5 月 17 日
横浜)

Rab27a と coronin3 の細胞内局在を規定す
る新規 GDP 依存性 Rab27a エフェクターの同
定

木村俊秀
第 85 回日本薬理学会 (2012 年 3 月 16 日 京
都)

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
木村俊秀
第 34 回 日本分子生物学会年会 (2011 年 12
月 15 日 横浜)

インスリン顆粒膜のエンドサイトーシス
を調節する GDP 型 Rab27a エフェクターによ
る分子クラスターの形成
木村俊秀
第 54 回 日本糖尿病学会 (2011 年 5 月 19 日
北海道)

〔図書〕(計 4 件)

木村俊秀, 山岡真美
GDP 型 G タンパク質シグナリング
生化学, 日本生化学会, 85, 12, 1079-1083
(2013)

木村俊秀, 岡本光弘
硫化水素による膵 B 細胞保護
DOJIN NEWS, 同仁化学研究所, 148, 1-4 (2013)

岡本光弘, 山岡真美, 木村俊秀
硫化水素と膵 B 細胞機能
日本臨床, 日本臨床社, 71, 175-180 (2013)

山岡真美, 岡本光弘, 仁木一郎, 木村俊
秀
Rab27a-GAP 新規結合タンパク質の同定とそ
の機能解析
日本病態生理学会雑誌 21,3,28-30 (2012)

〔その他〕

ホームページ等
[http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacolog
y/index.html](http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/index.html)

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