

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390050

研究課題名(和文) 分泌機能の安定維持システムの解明

研究課題名(英文) Stabilizing endocrine cell function by phogrin.

## 研究代表者

鳥居 征司 (TORII, SEIJI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：40312904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドホルモンを含有する分泌顆粒に局在するフォグリン蛋白質は、神経内分泌細胞の基本的機能であるホルモン分泌能の安定維持を担うことが示唆されている。本研究では、ホルモン動態のイメージング技術を駆使した細胞レベルの研究と、フォグリン遺伝子欠損マウスを解析する個体レベルの研究を行った。その結果、フォグリンは分泌過程そのものには機能せず、膵β細胞においては、インスリン受容体との直接結合を通してオートクライン増殖作用を制御していることが確認された。また試験管レベルの解析からフォグリンの新たな機能を見出し、IRS2安定化機構の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Phogrin, a member of receptor protein tyrosine phosphatases, primarily localizes on secretory granules (SGs) in a variety of neuroendocrine cells including pancreatic  $\beta$ -cells, and has some supportive roles in SGs formation and cell growth. We analyze its function with use of newly developed imaging method and of gene-targeting mice. Our data show an evidence suggesting that at the plasma membrane phogrin participates in molecular interactions with insulin receptors to regulate IRS2 protein stability and in turn glucose-promoted pancreatic  $\beta$ -cell growth. We further showed that phogrin supports PTP1B activity to achieve an overall regulation of glucose-stimulated insulin signaling.

研究分野：神経内分泌細胞学

キーワード：ペプチドホルモン 分泌顆粒 インスリン オートクライン チロシンホスファターゼ

### 1. 研究開始当初の背景

いわゆる成人疾患においては多くの神経内分泌器官でホルモン産生能の低下が起こり、これにはホルモン生合成の低下のみならず細胞内輸送や分泌機構の関与が示唆されている。フォグリンは線虫からヒトまで進化的に保存されるチロシン・ホスファターゼ様の膜蛋白質で、哺乳動物においては、相同分子である IA-2 と共に 1 型糖尿病の自己抗原として知られている。これまでの研究で、フォグリンおよび IA-2 は神経内分泌細胞に限局して発現し、主としてペプチドホルモンを含む分泌顆粒に局在すること、分泌刺激により細胞膜に移行したのちにリサイクリングすることなどが明らかにされている。またこれら蛋白質の機能解析においては、1 型糖尿病への直接的な寄与は認められず、生理的役割として、膵ベータ細胞の増殖促進機能とホルモンの細胞内安定維持機能が示唆されている。しかしその詳細は不明で、この分子機能を明らかにすることで、加齢に伴うホルモン産生能の低下や多くの疾患の分子レベルの理解が進むと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では組織特異的遺伝子欠損マウスから作製した種々の内分泌細胞を使用し、ホルモンの細胞内動態をイメージングしてフォグリンの生理機能を明らかにする。またフォグリンの機能解析を通じて、ホルモン選別輸送機構や分泌メカニズム、インスリンのオートクライン増殖機構といった未知の生理システムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ホルモンの細胞内動態をイメージングする新たな解析技術の開発

まずマウス・インスリンまたはヒト・成長ホルモンにマルチタグを連結したコンストラクトを作成し、内分泌細胞にそれぞれを発現させたステイブル細胞株を得る。赤色蛍光のタグ結合プローブと緑色蛍光プローブを順次ラベリングし、新旧ホルモンを分別する。分泌刺激などによるチェイスを行い、ホルモンの動態を蛍光顕微鏡下で観察する。蛍光プローブをビオチン化プローブに置き換えて、抗ビオチン抗体による生化学的なアッセイも行う。

#### (2) フォグリン欠損細胞株によるホルモン動態の解析

フォグリン遺伝子欠損マウスの単離膵島から細胞を初代培養し、SV40T 抗原を発現した安定細胞株(ベータ細胞)を得る。またTALEN 法による遺伝子欠損を行うための特異的プラスミドを構築し、これを使って MIN6 (膵ベータ細胞)や AtT-20 細胞(下垂体細胞)における安定欠損株を作製する。並行して、従来より使用してきた shRNA 発現アデノウイルスによるノックダウンも行う。これらの細胞とコントロール細胞で(1)のホルモン

動態の解析を行う。

#### (3) フォグリン遺伝子欠損マウスの膵島における表現系の解析

フォグリン欠損マウスの膵島を用いて、チミジン取り込み実験やインスリン分泌試験、遺伝子および蛋白質発現解析(プロテオーム)などを行い、フォグリンの生理機能を検定する。得られた結果を基に、細胞レベルおよび試験管レベルの解析を行って、蛋白質機能とそれに付随した生理的役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

膵細胞で新旧合成インスリンを可視化し、インスリン分泌を解析した結果、細胞内深部に位置する新規インスリンが優先してグルコース応答分泌を起こしていることを明らかにした。内分泌細胞の開口放出は、神経のシナプス小胞の解析にならって理解されることが一般的であったが、申請者らの結果から、少なくとも膵細胞では、生理的なグルコース刺激で開口放出される分泌顆粒は細胞膜直下にある必要がなく、内部からの移動(輸送)を伴うものが多いことが判明した(図1)。

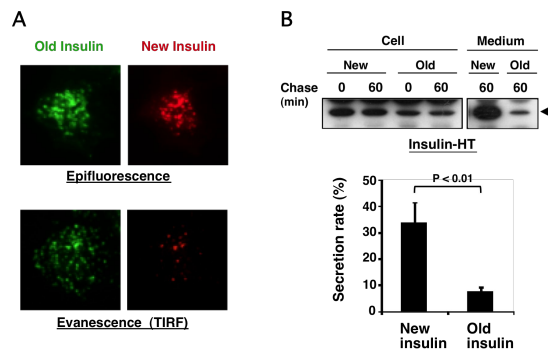


図1 マルチタグ・ラベリング法によるインスリン分泌の解析 (A)膵細胞株 MIN6 にインスリン-HT を発現させ、2 種類の蛍光プローブで順次ラベリングした。全反射顕微鏡(TIRF)で解析すると、新しく合成されたインスリン-HT (赤) は細胞膜付近ではなく細胞内部に存在することが示された。(B)ブロッティングプローブとビオチン化プローブを組み合わせ新旧インスリン-HT の細胞内レベルと培地レベル(分泌)を抗ビオチン抗体で定量した。新規合成インスリン-HT が優位に分泌されていることが分かった。

フォグリンを欠損する安定細胞株で解析を行ったところ、いずれもホルモン含量の低下が認められたが、分泌応答や顆粒の動態などに有意な差は認められなかった。フォグリンのノックダウンは、選別輸送受容体の1つであるカルボキシペプチダーゼEの輸送を変化させリソソームへとミスソーティングさせるが、インスリンの輸送変化はなかった。同様に、可視化した新旧合成インスリンの動

態もフォグリン発現増減による変化は認められなかった。セクレトグラニン III など他の選別輸送受容体が代替機能を果たす可能性があるため、今後はダブル・ノックアウトなどの解析を検討する。

一方、フォグリン欠損細胞は細胞増殖能が低い傾向にあり、とくに膵細胞では、グルコース濃度に依存した細胞増殖が著しく低下していた。遺伝子欠損マウスの膵島について蛋白質発現レベルの解析を行ったところ、インスリン受容体基質の1つ IRS2 の顕著な減少が認められた(図2)。IRS2 は、膵細胞の増殖や機能維持に必須な分子として知られており、フォグリンによる IRS2 蛋白質の安定化機序の解明は重要である。

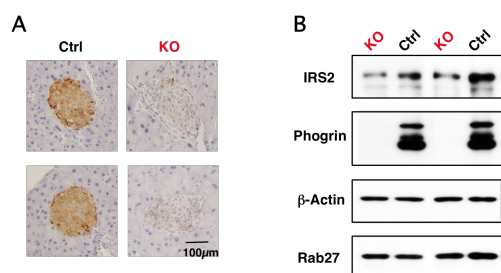


図2 フォグリン・ノックアウトマウスの解析 (A)コントロールマウス(Ctrl)と、フォグリン遺伝子欠損マウス(KO)の雌雄それぞれについて膵臓を固定し、抗フォグリン抗体で免疫染色を行った。(B) Ctrl と KO から膵島を単離し、等量の蛋白質抽出液を SDS-PAGE にアプライしてイムノブロットを行った。フォグリン欠損マウスの膵島では IRS2 蛋白質が減少している。

フォグリン欠損細胞で詳しい解析を行ったところ、オートクライン作用で進むインスリンシグナルのフィードバック経路で IRS2 蛋白質の分解がおきていた。精製フォグリン蛋白質を使った実験では、リン酸化インスリン受容体に直接結合するが脱リン酸化活性は示さず、しかし自身が酸化されることにより PTP1B の脱リン酸化活性を高めた。フォグリンの発現が低いインスリノーマや発現しない肝細胞株にフォグリンを過剰発現したところ、PTP1B 活性を補助することで高濃度インスリンの持続刺激が引き起こすネガティブ・フィードバック経路を阻止することが分かった。これらの結果から、フォグリンは膵細胞において、分泌インスリンの高濃度刺激が IRS2 の分解を誘導することを防御し、適正なオートクライン増殖シグナルを与えるべく機能していることが明らかとなった。

#### 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 6 件)

1. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Itakura

M, Torii S, Akimoto Y, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Kishimoto T, Kawakami H, Harada A, Takahashi M, Nagamatsu S. VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 65:1648-1659, 2016 査読有 DOI: 10.2337/db15-1207

2. Torii S, Shintoku R, Kubota C, Yaegashi M, Torii R, Sasaki M, Suzuki T, Mori M, Yoshimoto Y, Takeuchi T, Yamada K An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. *Biochemical Journal* 473: 769-777, 2016 査読有 DOI: 10.1042/BJ20150658

3. Gomi H, Morikawa S, Shinmura N, Moki H, Yasui T, Tsukise A, Torii S, Watanabe T, Maeda Y, Hosaka M. Expression of secretogranin III in chicken endocrine cells: Its relevance to the secretory granule properties of peptide prohormone processing and bioactive amine contents. *J Histochem Cytochem* 63:350-366, 2015 査読有 DOI: 10.1369/0022155415575032

4. Sun M, Watanabe T, Bocimoto H, Sakai Y, Torii S, Takeuchi T, Hosaka M. Multiple sorting systems for secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones. *Traffic* 14:205-218, 2013 査読有 DOI: 10.1111/tra.12029

5. Gomi H, Kubota-Murata C, Yasui T, Tsukise A, Torii S. Immunohistochemical analysis of IA-2 family of protein tyrosine phosphatases in rat gastrointestinal endocrine cells. *J Histochem Cytochem* 61:156-168, 2013 査読有 DOI: 10.1369/0022155412466872

6. Hou N, Mogami H, Kubota-Murata C, Sun M, Takeuchi T, Torii S. Preferential release of newly synthesized insulin assessed by a multi-label reporter system using pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6. *PLoS One* 7:e47921, 2012 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0047921

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 神徳 亮介, 他 4 名 Reactive oxygen species-generating activity in lysosomes contributes to an iron-dependent form of cell death. 第 58 回日本神経化学学会大会 2015 年 9 月 11 日 大宮ソニックシティ (埼玉)

2. 前田 佳紀, 他 6 名 セクレトグラニン III が膵島インスリン生合成と分泌で果たす

役割について 第 88 回日本生化学会大会  
2015年12月1日 神戸ポートアイランド(兵庫)

3. 青柳 共太、他 10 名 VAMP7 はオートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構を介して膵 細胞からの第 2 相インスリン分泌を制御する 第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日 タワーホール船堀 (東京)

4. 青柳 共太、他 10 名 VAMP7 による第 2 相インスリン分泌の制御機構 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015 年 5 月 21 日 グランプラス セント・ヴァレンタイン(下関、山口)

5. 前田 佳紀、他 5 名 神経内分泌細胞の分泌顆粒に局在するセクレトグラニン III の生体で果たす役割 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 京都国際会館(京都)

6. 寺田 幹、他 4 名 イリジウム錯体を発光プローブとする低酸素病態のイメージング:改良体の組織浸潤性と組織集積および細胞内分布について 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日 京都国際会館(京都)

7. 鳥居 征司、他 5 名 鉄依存性細胞死フェロトーシスにリソソーム機能が関与する 第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会 2014 年 7 月 18 日 東京医科歯科大学(東京)

8. 鳥居 征司、他 2 名 インスリン分泌における顆粒膜蛋白質フォグリンとインスリン受容体の結合は、膵 細胞のオートクライン増殖シグナルに必要である 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 22 日 リーガロイヤルホテル(大阪)

9. 鳥居 征司、他 2 名 Immunohistochemical analysis of IA2 family of protein-tyrosine phosphatases in rat gastrointestinal endocrine cells. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 横浜国際会議場(神奈川)

10. Hiroshi Horikawa, 他 8 名 MKP-1 is induced rapidly after ischemic stress in neuron at peri-infarct area and show neuroprotection against oxidative stress *in vitro*. 26<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function 2013 年 5 月 23 日 上海(中国)

11. Seiji Torii, 他 3 名 Exocytosis-coupled interaction of insulin receptor and secretory granule-resident PTP phogrin allows for autocrine insulin signaling in pancreatic beta-cells. 第 10 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス 2013 年 2 月 8 日 がん研究振興財

団 国際研究交流会館(東京)

12. 穂坂 正博、他 5 名 内分泌細胞の分泌顆粒形成におけるグラニタンパク質の役割 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡国際会議場(福岡)

13. Hiroshi Horikawa, 他 9 名 Revealing mechanisms of mitogen activated protein kinase phosphatase (MKP-1) up-regulation under ischemic stress. Neuroscience 2012 Society for Neuroscience's 42<sup>nd</sup> annual meeting 2012 年 10 月 13 日 New Orleans (米国)

14. 鳥居 征司、他 2 名 マルチタグ・ラベリング法によるインスリン分泌機構の解析 日本内分泌学会 第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー 2012 年 7 月 13 日 伊香保福一コンベンションホール(群馬)

15. Seiji Torii, 他 2 名 Preferential release of newly generated insulin assessed by a multi-labeling reporter system. 第 64 回日本細胞生物学会大会 2012 年 5 月 29 日 神戸国際会議場(兵庫)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
<http://secret-biol.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
鳥居 征司 (TORII, Seiji)  
群馬大学・生体調節研究所・准教授  
研究者番号: 40312904

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
五味 浩司 (GOMI, Hiroshi)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 90293240

行木 信一 (NAMEKI, Nobukazu)  
群馬大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 80302959

最上 秀夫 (MOGAMI, Hideo)  
浜松大学・健康科学部・教授  
研究者番号: 90311604