

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860208

研究課題名(和文) インスリン顆粒の物流システムの解明

研究課題名(英文) Role of Rab GTPases in the intracellular logistics of insulin granule

研究代表者

松永 耕一 (MATSUNAGA, Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20570162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：調節性分泌は内分泌細胞などが刺激を感知してインスリンなどの生理活性物質を分泌することであるが、その分子メカニズムは十分に解明されていません。低分子量Gたんぱく質であるRab27は、インスリン分泌において重要な働きをしていることがこれまでにわかっています。私達は、Rab27aが未報告のたんぱく質複合体を形成していることを突き止めました。さらにこの複合体は未成熟顆粒に存在し、インスリン顆粒の成熟と分泌に機能していることを明らかにしました。本研究により、インスリンが合成されてから分泌されるまでのメカニズムの過程の一つを分子レベルで明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Regulated secretion is a main pathway for secretory cells to deliver bioactive molecules to the surface or outside of the cell. Although the molecular machinery for these processes have been characterized, precise molecular mechanisms are poorly understood. Previous studies have shown that the small GTPase Rab27 is required for late steps of this pathway, granule trafficking, docking, and fusion of insulin granule. We found that Rab27a forms a novel protein complex in pancreatic beta-cells. Although Rab27a localized on almost all granules, the complex specifically localized on immature granules. Furthermore, knockdown of Rab27a and that of other component of the complex decreased glucose-induced insulin secretion and conversion of proinsulin to insulin. These data suggest that the novel Rab27a complex is involved in the transition from granule maturation to secretion in the regulated secretory pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：insulin Rab27a 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

インスリンは、膵細胞内において小胞体で合成、その後ゴルジ体で完成され、分泌顆粒に内包される。その後顆粒内で多量体を形成し、成熟したインスリンになり、細胞内に貯留される(**成熟過程**)。そして血中のグルコース濃度に応じて、細胞膜へ輸送、開口放出される(**分泌過程**)。一つの細胞内には約10000個のインスリン顆粒が貯留されているが、高グルコース濃度に反応して開口放出するインスリン顆粒は全体の1-5%程度である(**細胞内貯留**)。そして古く残ったインスリン顆粒の一部はエンドソーム-リソソーム系を介して分解されると言われている(**分解過程**)。このように合成されたインスリン顆粒は**細胞内の物流システム(細胞内ロジスティクス)**によってその**生産(合成と成熟過程)**から**在庫管理(細胞内貯留)**と**流通量(分泌過程)**、**品質管理**、**廃棄(分解過程)**が厳密に制御されているが、その分子メカニズムについては未解明な部分が多い。

インスリン顆粒の**分泌過程**において中心的役割をしているのが、様々な分泌細胞内での調節性分泌経路に機能している **Rab27a small GTPase** であり、その自然変異マウス *ashen* の膵細胞では、グルコース刺激によるインスリン分泌が半減し、グルコース負荷後の血糖値が高値になる。さらにその名の由来の通り、メラニン色素の受け渡しもうまく行かないために体毛の淡色化が起こっている(*J Clin Invest*.115:388-96 2005.)。しかしながら Rab27a たんぱく質が、合成され成熟過程を経て細胞内に貯留されたインスリン顆粒を、刺激に応じてどのように細胞膜まで輸送、開口放出させているのかについてよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

### 2-1 インスリン顆粒の成熟と分泌の分子機構

これまでの研究により、Rab27a を中心とした分泌過程の分子メカニズムを調べるため、Rab27a が共通して機能する様々な分泌細胞内での Rab27a 結合たんぱく質の網羅的探索をおこなった(学術研究助成基金助成金(若手研究B)「Rab27 たんぱく質を中心とした調節性分泌機構の分子基盤の解明」研究代表者 平成 23-24 年度)。これにより特異的に結合するタンパク質を数十種以上同定し、分泌細胞ごとに特異的な結合も多数発見された。

網羅的結合たんぱく質探索により、膵細胞内で別の Rab たんぱく質である Rab2a が Rab27a と結合することを見出した。これまで Rab2a は、シスゴルジ膜に局在し、小胞体-ゴルジ体の輸送経路に機能する Rab GTPase であると言われてきた。しかし最近、Rab2a が欠損すると、神経ペプチド顆粒が正常な成熟過程に入らず、エンドソーム系にミスソートされてしまうことが、線虫を用いた遺伝学的解析によって示された(*J. Cell. Biol.* 186(6) :881-895. (2009), *J. Cell. Biol.* 186(6) :897-914. (2009))。Rab2a がインスリンの成熟過程及び分泌過程に必須であり、Rab27 系と重要な機能的連関がある可能性が高い。さらに Rab2a と特異的に結合するたんぱく質の網羅的解析も行い、それによって Rab27a と Rab2a 双方に結合するデュアルエフェクターたんぱく質を同定した。本研究課題では、新規 Rab27a-Rab2a 複合体のインスリン分泌における役割を明らかにし、インスリン分泌不全を起因とする糖尿病の病態解明につなげることを目的に研究を行った。

### 2-2 インスリン顆粒の品質管理機構

細胞内には約10000個のインスリン顆粒が存在するが、その総数は常に一定に保たれている。インスリン顆粒のターンオーバーは3-5日程度とされ、開口放出しなかった一部の顆粒はエンドソーム-リソソーム系を介して分解されるが、オートファジーの寄与が

ある可能性も報告されている (*Mol Endocrinol.* 21(9):2255-69 (2007))。しかしながら詳細な機序は全く不明である。これまでの研究により、Rab27a 欠損膵細胞において、野生型細胞に比べオートファジーが恒常的に亢進していることを発見した。Rab27a 欠損細胞ではグルコース刺激に应答するインスリン分泌量が半分になるが、インスリン顆粒の総数はあまり変化がない (*J Clin Invest.* 115(2):388-96(2005))。すなわち分泌低下に伴い、顆粒が細胞内に停留することが予想され、顆粒の総数や品質を調節するために、オートファジーが発動されている可能性がある。顆粒に貯留されたインスリンのターンオーバーについては、古くから存在が知られているにもかかわらず (*J. Cell. Biol.* 98 :222-28. (1984))、ほとんど研究されていない。細胞内のインスリンの分解による品質管理システムの分子機構を解明することを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### 複合体解析

Rab27a 結合タンパク質を、それぞれの特異抗体を用いたウエスタンブロット法にて結合の確認を行った。

#### 細胞内局在解析

Rab2a およびデュアルエフェクターの細胞内局在を、ラット膵細胞株である Ins1 細胞にて調べた。方法はそれぞれの特異抗体を用いた間接蛍光抗体法にて行った。

#### shRNA を用いたノックダウンによる機能解析

Rab2a およびデュアルエフェクターのインスリン分泌における機能を調べるため、それぞれのターゲットに対し、アデノウイルスによる shRNA 発現を用いた RNAi による、遺伝子ノックダウンを行った。その後グルコース刺激によるインスリン分泌アッセイを以下

の通りに行った。まずコントロール shRNA(GFP に対するもの)、shRab2a、shデュアルエフェクターそれぞれを導入し、遺伝子ノックダウンを行った ins1 細胞を 2 時間 2.8mM グルコース濃度の緩衝液にて培養し、その後 25mM グルコース濃度の緩衝液に置換し、2 時間培養した。その後上清を回収し、alpha-LISA インスリンアッセイキット(パーキンエルマー)を用いてインスリン濃度を測定した。

#### マウスからの膵島単離

Rab27a 欠損マウスである ashen マウス、及び Rab3a ノックアウトマウス、及びそれぞれの野生型のマウスから膵ランゲルハンス島を、コラゲナーゼを膵管から注入する方法により単離した。単離した膵島を一日 RPMI 1640 培地にて培養した後、トリプシン処理をしカバーガラス上で単相培養した。

#### 免疫染色によるオートファゴソームの検出

単相培養した膵島細胞をパラホルムアルデヒドにて固定し、オートファゴソームマーカーである LC3 に対する抗体、及びインスリン顆粒のマーカーとしてインスリンに対する抗体を用いた間接蛍光抗体法により二重染色し、顕微鏡観察を行った。オートファジー活性は、細胞内の LC3 のドット状構造が示すオートファゴソーム数を計測し、細胞一個当たりの平均値を求めることにより評価した。

### 4. 研究成果

#### 4-1 インスリン顆粒の成熟と分泌の分子機構

MEF-Rab2a を MIN6 細胞にアデノウイルスを用いて導入し、免疫沈降実験とウエスタンブロットを用いた結合解析により、Rab27a と Rab2a は確かに細胞内で結合することを確認した。しかしながら、二つの Rab が直接結

合することは考えにくく、間にその結合を介するたんぱく質の存在がある可能性を考えた。そこで MEF-Rab2a を安定に発現させた MIN6 細胞株も作成し、Rab27a のときと同様に網羅的結合タンパク質同定を試みた。すると Rab27a 結合たんぱく質リストと共通の成分が一つ同定された（以下デュアルエフェクターとする）。このたんぱく質を介して Rab27a、Rab2a が結合しているかどうかを確かめるために、デュアルエフェクターたんぱく質をノックダウンした MIN6 細胞に、MEF-Rab2a を導入し、MEF-tag による免疫沈降を行い、Rab27a が共沈降されてくるかどうかの実験を行った。するとデュアルエフェクターをノックダウンした細胞では Rab27a は共沈降されてこなかった。これにより、二つの Rab はこのデュアルエフェクターを介して一つの複合体を形成していることが明らかになった。

次に間接蛍光抗体法による局在解析を行った。すると Rab2a は主に未成熟顆粒に局在し、インスリン顆粒には一部局在した。一方でデュアルエフェクターは主にインスリン顆粒に局在し、未成熟顆粒には一部局在した。Rab27a はデュアルエフェクターと似た局在を示した。これにより Rab27a-Rab2a 複合体は未成熟顆粒が成熟顆粒になる途中段階のインスリン顆粒に局在することが示唆された。

アデノウイルスを用いた shRNA 発現によるノックダウンを行い、グルコース刺激におけるインスリン分泌への影響を調べたところ、Rab2a、デュアルエフェクターそれぞれのノックダウンで、インスリン分泌が著しく阻害された。これにより Rab27a-Rab2a 複合体がインスリン分泌に重要な機能を有していることが示唆された。

以上のことから、この複合体は、Rab2a が機能する、ゴルジ体からの顆粒生成と正常な成熟過程から、Rab27a が機能する分泌過程、

すなわち細胞膜への輸送と開口放出までの過程へ移行する橋渡しのような役割があることが考えられた。これまでにインスリン分泌の分子メカニズムは長年研究されているが、顆粒形成から成熟、貯蔵、そして分泌までの過程の詳細なメカニズムは、未だ未解明な部分が多い。本研究における複合体の発見は、顆粒成熟から分泌までの分子機構解明への一助になると考えられる。以上の研究成果は論文投稿準備中である。

#### 4-2 インスリン顆粒の品質管理機構

間接蛍光抗体法を用いた顕微鏡観察により、富栄養状態の培地下にもかかわらず、野生型の脾細胞に比べ、*ashen* マウス細胞でオートファゴソーム形成が亢進していることがわかった。これはオートファゴソーム形成初期のマーカーたんぱく質である Atg16L の細胞染色でも同様の結果が得られており、オートファゴソーム形成が促進されていることが確認された。さらにその中の一部がインスリン顆粒と共局在しており、オートファゴソームがインスリン顆粒を選択的に取り囲んでいる可能性が示唆された。これらの知見はインスリン分泌低下に伴い、細胞内に蓄積した顆粒の総数の調節やその品質を維持するために、オートファジーが誘導されている可能性を示唆するものである。さらにオートファジーを阻害する薬剤等を用いたときにインスリン顆粒の総量はどうか、細胞の状態に変化がないか等を調べている。

*ashen* マウス細胞と同様にグルコース刺激によるインスリン分泌が著しく阻害されることが知られている Rab3a ノックアウトマウスの細胞においても同様の観察をしたところ、*ashen* マウス細胞の時と同様に富栄養培地下においても、野生型とくらべてオートファゴソーム形成が亢進していることがわかった。これによりオートファジーの誘

導は欠損した Rab タンパク質の種類に関わらず、インスリン分泌が阻害されていることにより誘導されていることが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松永 耕一 (MATSUNAGA Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20570162

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし