

## 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：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893025

研究課題名(和文) インスリン分泌顆粒の細胞膜ドッキングの機能的意義

研究課題名(英文) Physiological role of insulin granule docking in regulated exocytosis

研究代表者

水野 広一 (mizuno, kouichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：30321821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：調節性分泌における分泌顆粒の細胞膜ドッキングの意義を明らかにするため、生きた膵細胞でのインスリン顆粒の細胞膜ドッキングと膜融合過程を、全反射蛍光顕微鏡を使って直接観察した。その結果、ドッキング顆粒は分泌応答性に乏しく、分泌応答の際には、ドッキング顆粒へのプライミング因子Munc13-4の集積とグラニューフィリンの解離をともなうことが明らかになった。このことは、ドッキングによりインスリン顆粒の分泌が抑制されていることを示しており、ドッキングしている分泌顆粒が、刺激後、早期かつ選択的に開口放出するという今までの考えとは異なっていた。

研究成果の概要(英文)：We directly observed insulin granule docking and fusion in pancreatic beta cell under total internal reflection fluorescence microscopy to figure out the physiological role of insulin granule docking in regulated exocytosis. This observation revealed that docked granules show lower fusion provability than that of undocked granules and they fuse with the dissociation of docking factor, granophilin by recruiting a priming factor, Munc13-4 after fusion stimuli. These results suggest that docked granules might be trapped in a muted state, which opposites to a current model of regulated exocytosis that docked granules preferably fuse after fusion stimuli.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン分泌 糖尿病 Rab27a 全反射顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

膵細胞は、血中グルコース濃度上昇などの分泌刺激に応じ、インスリン顆粒と細胞膜を膜融合させることで、インスリンを細胞外に放出する。この調節性分泌は、分泌顆粒の細胞膜への輸送とドッキング、プライミングと最終的な膜融合という4つの過程から構成されているというのが定説である。また、これら4つの過程は、いずれも分泌に必須で、逐次経過すると考えられているため、あらかじめ細胞膜にドッキングしている分泌顆粒から刺激後、早期かつ選択的に開口放出するとされている。

副腎髄質クロマフィン細胞では、分泌顆粒の細胞膜とのドッキングに必要な因子として、複数のタンパク質が報告されている。その多くは、SNAREタンパク質やSMタンパク質といった膜融合に直接かかわるタンパク質で、膜融合装置である *trans*-SNARE 複合体自身がドッキング装置であると考えられている。しかし、*trans*-SNARE 複合体を構成する SNARE タンパク質の SNAP-25 や Synaptobrevin 2 の遺伝子をノックアウトしたマウスの副腎髄質クロマフィン細胞は、ドッキング障害を全く示さないことが報告されている。一方、インスリン顆粒膜上に局在するグラニューフィリンの欠失は、膵細胞において細胞膜にドッキングしたインスリン顆粒を完全に消失させるとともに、インスリン分泌は増大させることが示されている。このことは、調節性分泌において、ドッキングは膜融合に必須の前過程ではなく、むしろ膜融合を抑制する過程として働いていることを示唆している。

グラニューフィリンは、インスリン顆粒膜上にある低分子量 GTPase Rab27a と細胞膜にある SNARE タンパク質の Syntaxin と結合する。Syntaxin には、“開いた”状態と“閉じた”状態の2つの立体構造があり、“閉じた”状態の Syntaxin は、SM タンパク質の Munc18 と安定した複合体を形成するため、他の SNARE タンパク質と結合できなくなり、膜融合を抑制すると考えられている。また、グラニューフィリンは、Munc18 と結合するため、グラニューフィリンが、顆粒膜上の Rab27a と細胞膜の Syntaxin/Munc18 複合体の両者と結合することでインスリン顆粒と細胞膜を架橋し、膜融合抑制的に働いている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

インスリン分泌におけるインスリン顆粒の細胞膜ドッキングと膜融合の関係を明らかにするには、生きた膵細胞でドッキングと膜融合の過程を直接観察することが必要である。そこで、膵細胞内でドッキング因子であるグラニューフィリンとインスリンの挙動を同時に全反射蛍光顕微鏡で観察し、取得した画像からグラニューフィリンの有無によるインスリン顆粒の運動性や分泌応答性の違い、開口放出にともなうインスリン顆粒

の運動性とグラニューフィリン量の変化を調べることで、インスリン分泌におけるインスリン顆粒の細胞膜ドッキングの意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) グラニューフィリンノックアウトマウス由来膵細胞の調製

膵細胞のグラニューフィリン量は、著しくインスリン分泌能に影響を与えるため、野生型膵細胞に蛍光標識グラニューフィリンを発現させることでグラニューフィリンの標識をおこなった場合、細胞内グラニューフィリン量の増加により分泌応答が著しく低下し、開口放出の観察が非常に困難になることが予備試験から判明している。また、外因性にグラニューフィリンを発現させることでインスリン顆粒が細胞膜近傍に集積し、その細胞内分布が大きく変化することも報告されている。そこで我々は、マウス膵細胞株 MING 細胞の作成方法に準じ、グラニューフィリンノックアウトマウスとインスリンプロモータ下で SV40T 抗原を発現させたトランスジェニックマウスとの交配により生まれたマウスに発生するインスリンノーマから、グラニューフィリン欠損膵細胞株を樹立した。

(2) 高速多波長観察が可能な全反射顕微鏡システムの構築

開口放出は、数百ミリ秒で完了する非常に早い現象である。従って、開口放出の各過程とグラニューフィリンの動態を同時に観察するには、高速多波長観察が可能な全反射顕微鏡システムが必要である。本研究のために我々は、音響光学可変波長フィルタを用いて2種類の励起用レーザー光を高速で切り替えながらサンプルに照射し、レーザー蛍光マルチバンドフィルターセットで分光されたサンプルからの蛍光を励起光の波長ごとに EM-CCD カメラを用いて検出する全反射顕微鏡システムを構築した。このシステムを用いることで2波長1組の画像取得を100ミリ秒間隔で行うことが可能である。

(3) グラニューフィリン陽性インスリン顆粒の解析

緑色蛍光タンパク質付加プレプロインスリンと赤色蛍光タンパク質付加グラニューフィリンをコードした組換えアデノウイルスを作成し、グラニューフィリン欠損膵細胞株に感染させることでインスリン グラニューフィリン2重標識細胞を調製した。この2重標識細胞を全反射顕微鏡を用いて観察し、細胞膜近傍に存在するインスリン顆粒膜上のグラニューフィリンの有無により、グラニューフィリン陽性、陰性顆粒を区別して、それぞれの運動や分泌応答を記録し、画像解析プログラムを用いて解析した。まず、分泌刺激前の画像から、インスリン顆粒の重心点を追跡し、抽出されたインスリン顆粒の移動軌跡から、

追跡速度、最大到達距離などの運動パラメータを算出した。得られたパラメータをもとに、グラニューフィリン陽性インスリン顆粒が細胞膜にドッキングした顆粒としての性質を持つか検討した。次に、分泌刺激後の画像から、開口放出数を計数し、グラニューフィリンの有無による分泌応答性を比較し、グラニューフィリンが膜融合に対して抑制的に作用するか検討した。また、開口放出直前の画像から、グラニューフィリン陽性インスリン顆粒上のグラニューフィリン量を定量し、グラニューフィリンを含む膜融合抑制的なドッキング装置が開口放出前に分解または解離するかを検討した。併せて、開口放出直前のグラニューフィリン陽性インスリン顆粒の重心点移動距離を計測時間ごとに測定し、分泌応答したインスリン顆粒の近傍にある無応答グラニューフィリン陽性インスリン顆粒からのデータと比較することで、グラニューフィリンを含むドッキング装置の分解または解離にともなう顆粒運動能の上昇について検討した。

#### (4) 細胞膜におけるグラニューフィリン受容体の同定

Syntaxin の変異体を使った解析から、グラニューフィリンは、“閉じた”状態の Syntaxin と選択的に結合することが示唆されている。一方、“閉じた”状態の Syntaxin は、細胞膜において Munc18 と安定した複合体を形成していることが知られている。そこで、GST 融合 Syntaxin および Munc18 の組換えタンパク質を調製し、グルタチオンビーズ上に Syntaxin 単体、Munc18 単体および Syntaxin/Munc18 複合体を固相化後、精製グラニューフィリンと反応させた。各タンパク質に結合したグラニューフィリン量は、反応後のグルタチオンビーズ上に残るタンパク質複合体を SDS-PAGE で分離後、ゲルを Coomassie Brilliant Blue 染色し、グラニューフィリン由来のバンドをデンストメータを使って定量することで見積った。以上より、Syntaxin/Munc18 複合体がグラニューフィリン受容体として機能するか検討した。

#### (5) グラニューフィリンを含むタンパク質複合体とその複合体解離因子の解析

分泌小胞のプライミングに関与すると考えられている Munc13 は、Syntaxin を“閉じた”状態から“開いた”状態に立体構造変化させることが報告されている。グラニューフィリンが“閉じた”状態の Syntaxin と選択的に結合するならば、Munc13 はグラニューフィリンを含むタンパク質複合体を分解する有力な因子と考えられる。そこで、Munc13 ファミリーのうちグラニューフィリンと同様に Rab27 エフェクタータンパク質として知られる Munc13-4 の組換えタンパク質を調製し、試験管内で Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体と反応させ、タンパク質複合体から遊離するグラニューフィリンを定量し、Munc13-4

が Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体からのグラニューフィリン遊離因子である可能性を検討した。

精製タンパク質を使った実験と併せて、Munc13-4 が Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体からのグラニューフィリン遊離因子である可能性を生きた腓 細胞内でも検討するため、上記 2 重標識細胞に青色蛍光標識 Munc13-4 を発現させた 3 重標識細胞、あるいは Munc13-4 ノックダウン細胞を調製し、細胞膜近傍のグラニューフィリン陽性インスリン顆粒の細胞膜密度や分泌応答などを全反射顕微鏡で観察し、得られた画像の解析から Munc13-4 のグラニューフィリン陽性顆粒への影響を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) グラニューフィリン陽性インスリン顆粒の解析

取得した画像の解析から、腓 細胞において細胞膜近傍に存在するインスリン顆粒のほとんどがグラニューフィリン陽性顆粒であった。このグラニューフィリン陽性顆粒は、グラニューフィリン陽性顆粒と比較して著しく運動性に乏しく、細胞膜に非常に近接したドッキング顆粒であることが明らかとなった。しかし、従来の説とは異なり、グラニューフィリン陰性の非ドッキング顆粒と比べて、グラニューフィリン陽性のドッキング顆粒は、分泌応答性に乏しく、開口放出の際にグラニューフィリンの遊離と運動性の亢進を伴うことが明らかとなった。これらの解析結果は、全反射顕微鏡で観察可能なインスリン顆粒には、局在分子の異なった様々な状態の顆粒群が存在していることを示している。また、細胞膜ドッキングは、膜融合に必須の前過程ではなく、むしろ膜融合を抑制する過程として働いており、膜融合の際に細胞膜ドッキングが解除される可能性を示唆している。

##### (2) 細胞膜におけるグラニューフィリン受容体の同定

Syntaxin と Munc18 の組換えタンパク質をビーズ状に固相化後、グラニューフィリンとの結合を検討した。グラニューフィリンは、それぞれ単独よりも Syntaxin/Munc18 複合体と強く結合した。このことは、Syntaxin/Munc18 複合体が細胞膜でグラニューフィリンの受容体として働いていることを示唆している。また、溶液中で調製した Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体をゲル濾過法で分析したところ、複合体のタンパク質数比は、1:1:1 であることが示唆された。これらより、腓 細胞において Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体がドッキング装置としてインスリン顆粒を細胞膜に繋ぎ止めている可能性が示唆された。

##### (3) グラニューフィリンを含むタンパク質複合体とその複合体解離因子の解析

ビーズ上に固相化した Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体を Munc13-4 タンパク質と反応させると、ビーズ上に残存するグラニューフィリン量が減少した。このことから、Munc13 により Syntaxin/Munc18/グラニューフィリン複合体からグラニューフィリンが遊離する可能性が示唆された。

加えて、をきた臍 細胞内での検討から、Munc13-4 は、脱分極刺激後の細胞内カルシウムイオン濃度上昇に伴いドッキング顆粒に集積し、同時にグラニューフィリンがドッキング顆粒から遊離することが明らかとなった。免疫電顕を使った解析からも、脱分極刺激後、Munc13-4 はインスリン顆粒と細胞膜の接合部に集積する可能性が示唆された。加えて、Munc13-4 の C2 ドメインに変異を入れると、グラニューフィリンの遊離は減少した。

一方、RNA 干渉法による Munc13 ノックダウンは、グラニューフィリン過剰発現と同様に臍 細胞においてグラニューフィリン陽性のドッキング顆粒の増加と分泌抑制を引き起こした。これらの結果も、Munc13-4 がグラニューフィリン遊離因子である可能性を示唆している。

## 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)

〔学会発表〕(計 2 件)

Tetsuro Izumi and Kouichi Mizuno. Stimulus-induced Munc13-4 recruitment releases granuphilin to prime fusion-reluctant docked granules. APOCB congress and ASCB workshop, Singapore, February 25<sup>th</sup>, 2014.

水野 広一、泉 哲郎。をきた臍 細胞で可視化することで明らかとなった、インスリン顆粒のドッキングとプライミングの分子基盤と生理的意義。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪、2014 年 5 月 24 日。

〔その他〕

ホームページ等

<http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 広一 (MIZUNO KOUICHI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：3 0 3 2 1 8 2 1