

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461342

研究課題名(和文) GDP型Rab27aによるプロトンポンプの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) GDP-bound Rab27a regulates endocytosis by mediating vATPase-dependent regulation of pH

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血糖をコントロールするためには、グルコースに反応してインスリンが適切に分泌される必要がある。そして、この機構の破綻が糖尿病をひき起こす。エンドサイトーシスは、インスリンを適切に分泌する上で重要であるが、その知見は未だ乏しい。わたしはこれまでに、GDP型Rab27aがエンドサイトーシスを制御することを明らかにしてきた。そこで、本研究ではその分子メカニズムの解明を試みた。GDP型Rab27aは、プロトンポンプ複合体の形成とその活性を制御することでエンドサイトーシスを制御した。

研究成果の概要(英文)：Impaired insulin secretion in response to glucose plays an important role in the pathogenesis of diabetes mellitus. Although endocytosis of secretory membranes after insulin release is essential for the tight control of insulin secretion, knowledge about this process in pancreatic beta-cells is still limited. Here, I searched for GDP-bound Rab27a interacting proteins and identified proton pumps. I found that GDP-bound Rab27a promotes the formation of the proton pump complex, which is required for its activity. These results suggest that GDP-bound Rab27a regulates endocytosis via acidification in endocytosed vesicles.

研究分野：分子糖病学

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 Rab27a エンドサイトーシス 膵B細胞 Gタンパク質 メンブレントラフィック エクソサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

インスリンは、それを取り囲む顆粒膜が細胞膜に融合し細胞外に開口放出される(図1)。開口放出とその前段階であるエキソサイトーシスに比べ、その後に位置するエンドサイトーシスの知見は乏しい。申請者は、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きた。

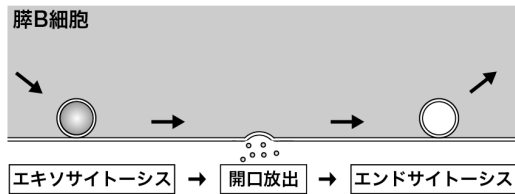


図1 インスリン顆粒の動態

申請者はこれまで、独自のプロテオーム解析により、シグナル伝達に関わる分子を網羅的に探索し、成果をあげてきた(Nat Cell Biol 4 583-591, 2002; J Neurochem 93 1371-1382, 2005)。そこで、この手法を用いて Rab27a 結合タンパク質を探索したところ、GTP 型 Rab27a に結合する分子に加えて、GDP 型 Rab27a に結合する分子を複数同定した(J Cell Sci 121 3092-3098, 2008; Mol Cell Biol 33 4834-4843, 2013)。Rab27a を含む G タンパク質は、GTP 型が活性型で GDP 型が不活性型だとこれまで考えられてきた。そのため、このドグマに反する GDP 型 G タンパク質結合分子の存在は、G タンパク質の概念を一度見直すべき時期が到来したことを示している(Prog Biophys Mol Biol 107 219-223, 2011)。

申請者が同定した GDP 型 Rab27a 結合タンパク質は、IQGAP1 と coronin3 である(図2)。IQGAP1 は GDP 型 Rab27a を介して、coronin3 をエンドサイトーシスが行われるエリアへリクルートした(Biochem Biophys Res Commun 395 318-323, 2010; Mol Cell Biol 33 4834-4843, 2013)。リクルートされた coronin3 は、細胞骨格(アクチン)を再構築することで、インスリンを取り囲む顆粒膜を細胞内へ回収するエンドサイトーシスを制御した(J Cell Sci 121 3092-3098, 2008; Arch Biochem Biophys 496 33-37, 2010)。申請者はさらに、インスリン分泌を惹起するグルコース刺激が、Rab27a を GTP 型から GDP 型に変換することを見いだした(J Cell Sci 121 3092-3098, 2008)。

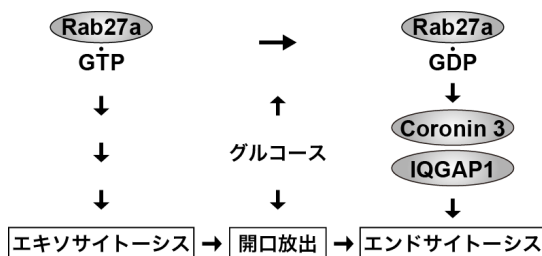


図2 Rab27a による顆粒膜のリサイクリング

申請者は、Rab27a が細胞膜に融合した膜成分を細胞内に回収することで、分泌後も細胞が自身の容積を一定に保つ「膜のホメオスタシス」を制御していると考えている。

2. 研究の目的

申請者は、GDP 型 Rab27a に結合する分子として新たに vATPase を同定した(未発表データ)。vATPase は、分泌小胞やオルガネラの酸性化を制御するプロトンポンプである。さらに申請者は、電子顕微鏡を用いた解析より vATPase の発現を抑制した細胞では、取り込まれた顆粒膜がリソソームに融合できないことを明らかにしている。リソソームは取り込んだ生体高分子の分解と再利用を制御するオルガネラである。本研究では、GDP 型 Rab27a の新たな結合パートナーである vATPase が果たす役割を検討することで、取り込んだ顆粒膜を細胞内でリサイクルするメカニズムを分子レベルで解析した。

3. 研究の方法

本申請研究では、GDP 型 Rab27a とその結合候補タンパク質である vATPase 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、下図に従って解明した。平成 26 年度は、GDP 型 Rab27a と vATPase の結合を評価した。平成 27 年度は、その結合がプロトンポンプ活性に及ぼす影響を調べた。平成 28 年度は、複合体がエンドサイトーシスで果たす役割を検討した。

vATPaseがエンドサイトーシスを制御する分子メカニズム

結合は？

生体内でどのような複合体を形成しているのか？

活性は？

複合体がプロトンポンプ活性に及ぼす影響は？

機能は？

複合体のエンドサイトーシスにおける役割は？

(1) GDP 型 Rab27a と vATPase の結合様式

GDP 型 Rab27a と vATPase 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 vATPase 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) vATPase の活性制御機構

vATPase は、ATP を加水分解することでプロトンを輸送する膜タンパク質で、複数のサブユニットから構成されている。申請者は、GDP 型 Rab27a が vATPase の ATP 結合サブユニットと相互作用することを既に見いだしている(未発表データ)。そこで、GDP 型 Rab27a の結合が、vATPase のプロトンポンプ活性に

及ぼす影響を調べた。

(3) vATPase によるエンドサイトーシスの制御機構

グルコースは、インスリンの開口放出と同時にエンドサイトーシスを引き起こす (Endocr. J. 58 1-6, 2011)。そこで、グルコースが複合体の細胞内動態に及ぼす影響を調べた。また、複合体形成がエンドサイトーシスに及ぼす影響を、バイオイメージングと細胞分画法により解析した。

4. 研究成果

(1) GDP 型 Rab27a と vATPase の結合様式

まず、vATPase の精製タンパク質と抗体を作製した。次に、免疫沈降法と *in vitro* binding assay により、vATPase が GDP 型 Rab27a と細胞内で複合体を形成すると共に、その結合が直接であることを示した。また、精製タンパク質を用いた結合実験により解離定数 (Kd) を算出し、vATPase と GDP 型 Rab27a との結合が特異的であることを示した。次に、vATPase のドメイン構造を指標に様々なフラグメントを作製し、GDP 型 Rab27a 結合部位を同定した。さらに、同定した結合部位をもとにドミナントネガティブ/アクティブ変異体の作製を行った。また、マウス膵切片を免疫染色し、vATPase と Rab27a が膵 B 細胞で共発現していることを明らかにした。

(2) vATPase の活性制御機構

まず、前年度に明らかにした GDP 型 Rab27a 結合ドメインから、結合に必要なアミノ酸を同定した。上記アミノ酸は、vATPase の構造を調節し、プロトンポンプ活性を制御する領域に相当した。そこで、GDP 型 Rab27a が vATPase の構造に及ぼす影響を検討した結果、GDP 型 Rab27a が vATPase のプロトンポンプ活性を調節することを明らかにした。

(3) vATPase によるエンドサイトーシスの制御機構

まず、インスリン小胞内の急激な pH 上昇が、vATPase を不活性型に変換することを見出した。さらに、GDP 型 Rab27a が不活性型の vATPase と結合し、活性型に再変換することを見出した。さらに、その再変換がエンドサイトーシスされた小胞のリサイクリングを調節することを明らかにした。

以上の結果より、GDP 型 Rab27a が vATPase のプロトンポンプ活性を調節することでエンドサイトーシスの後半過程を制御することが明らかになった。本研究成果は、インスリン分泌機構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4件)

Yamaoka M, Ando T, Terabayashi T, Okamoto M, Takei M, Nishioka T, Kaibuchi K, Matsunaga K, Ishizaki R, Izumi T, Niki I, Ishizaki T, Kimura T
PI3K regulates endocytosis after insulin secretion by mediating signaling crosstalk between Arf6 and Rab27a.
J. Cell Sci. 129:637-649 (2016) 査読有
doi: 10.1242/jcs.180141.

Okamoto M, Ishizaki T, Kimura T
Protective effect of hydrogen sulfide on pancreatic beta-cells.
Nitric Oxide 46:32-36 (2015) 査読有
doi: 10.1016/j.niox.2014.11.007.

Yamaoka M, Ishizaki T, Kimura T
Interplay between Rab27a effectors in pancreatic -cells.
World J. Diabetes 6:508-516 (2015) 査読有
<http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v6/i3/508.htm>

Yamaoka M, Ishizaki T, Kimura T
GTP- and GDP-dependent Rab27a effectors in pancreatic beta-cells.
Biol. Pharm. Bull. 38:663-668 (2015) 査読有
doi: 10.1248/bpb.b14-00886.

[学会発表](計19件)

姫野冴美、山岡真美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
膵 B 細胞における GDP 型 Rab27a 新規結合タンパク質の機能解析。
第 90 回 日本薬理学会年会 (2017 年 3 月 17 日 長崎ブリックホール(長崎県長崎市))

山岡真美、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
G タンパク質によるインスリン分泌後のエンドサイトーシスの制御。
第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))

山岡真美、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
グルコースが誘導するエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析。
第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会 (2016 年 5 月 20 日 国立京都国際会館(京都府京都))

市))

木村俊秀

インスリン分泌と膵 B 細胞保護.

第 89 回 日本薬理学会年会 (2016 年 3 月 9 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)) シンポジウム

山岡真美、寺林健、松永耕一、泉哲郎、
仁木一郎、石崎敏理、木村俊秀
膵 B 細胞におけるエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析.

第 38 回 日本分子生物学会年会 (2015 年 12 月 2 日
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市))

山岡真美、安藤朋海、寺林健、松永耕一、
泉哲郎、仁木一郎、石崎敏理、木村俊秀
膵 B 細胞におけるエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析.

第 58 回 日本糖尿病学会年次学術集会 (2015 年 5 月 23 日
海峡メッセ下関 (山口県下関市))

安藤朋海、山岡真美、寺林健、武井真大、
石崎敏理、木村俊秀
グルコースによるメンブレンリサイクリングの分子メカニズム.

第 88 回 日本薬理学会年会 (2015 年 3 月 19 日
名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市))

Yamaoka M, Ando T, Okamoto M, Terabayashi T, Matsunaga K, Ishizaki R, Izumi T, Niki I, Ishizaki T, Kimura T
Identification of Rab27a-GAP- interacting proteins and its functional analysis in pancreatic beta-cells.

50th Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes (2014 年 9 月 18 日
Messezentrum Vienna (オーストリア、ウィーン))

木村俊秀

硫化水素による膵 B 細胞保護.

第 157 回 獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会シンポジウム (2014 年 9 月 10 日
北海道大学 (北海道札幌市))

Kimura T

Protective roles of hydrogen sulfide in pancreatic beta-cells.

3rd International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (2014 年 6 月 5 日
京都大学 (京都府京都市))

山岡真美、岡本光弘、安藤朋海、寺林健、松永耕一、泉哲郎、仁木一郎、石崎敏理、木村俊秀
膵 B 細胞における Rab27a-GAP 新規結合タンパク質の機能解析.

第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会 (2014 年 5 月 24 日
大阪国際会議場 (大阪府大阪市))

[その他]

ホームページ等

<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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石崎 敏理 (ISHIZAKI, Toshimasa)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70293876

寺林 健 (TERABAYASHI, Takeshi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40452429