

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670133

研究課題名(和文)調節性分泌機構における逐次連続モデルは本当に正しいのか？

研究課題名(英文)Is the sequential model for regulated exocytosis really correct?

研究代表者

泉 哲郎 (IZUMI, Tetsuto)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：00212952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：刺激に応じて生理活性分子を細胞外に放出する調節性分泌経路では、分泌小胞膜と細胞膜の最終的融合の前に、小胞膜と細胞膜のドッキングと、それに続いて膜融合を可能にするプライミングが必要であると信じられてきた。我々は、これらの過程に関与する分子を別々の蛍光で標識し、生きた豚細胞において可視化した。その結果、細胞膜ドッキングは刺激なしに開口放出が起こることを防ぐ膜融合抑制過程であり、これを開口放出可能とするプライミングは、刺激前ではなく、刺激後のCa²⁺上昇に応じて、プライミング因子が顆粒膜に集積し、ドッキング因子を解離させることによって起こることを示唆する所見を得た。

研究成果の概要(英文)：Regulated exocytosis has evolved as the main means of intercellular communication. It is generally assumed that vesicles must first dock at the plasma membrane and then undergo preparatory priming reactions before they become fusion-competent. However, the functional relationship among docking, priming, and fusion has not been sufficiently explored. In the present study, we visualized each individual step in living cells, and showed that docked granules are fusion-reluctant but fuse with the dissociation of a docking factor by recruiting a priming factor, after the stimulus-induced Ca²⁺ increase. These findings suggest that stable docking is neither a prerequisite nor a dead-end for fusion, but instead represents a temporal fusion-reluctant state to inhibit spontaneous fusion, whereas priming is not a step to acquire fusion competence before stimulation, but instead occurs after sensing a stimulus-induced Ca²⁺ increase.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インスリン 分泌顆粒 開口放出 細胞内膜輸送

1. 研究開始当初の背景

調節性分泌経路の最終開口放出過程は、小胞の細胞膜ドッキング→プライミング→Ca²⁺感知→膜融合という逐次連続過程よりなると考えられてきた(図1)。

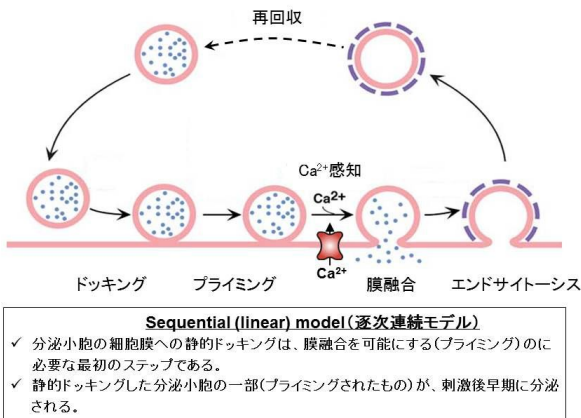


図1

しかし最後の膜融合過程は、他の膜輸送経路同様、SNARE タンパク質の結合によることが確立しているが、その前段階の分子機構は十分に解明されていない。また、ドッキングが電子顕微鏡上の形態学的概念であるのに対し、プライミングは機能的概念であるので、両者の関係を実験により実証することは必ずしも容易ではない。さらに、ドッキングやプライミングの定義が、研究者により異なるという問題があり、必ずしも同一の生物事象に対して用いられておらず、混乱が生じている。このような背景のもと、これまで我々は、分泌顆粒の細胞膜ドッキングに必須である granuphilin という分子の解析を通じて、ドッキングは膜融合に必要ではなく、むしろこれを一時的に抑制する過程であるという説を提唱している。この開口放出前各過程の機能的意義を解明するためには、分泌小胞の細胞膜ドッキング、プライミング、そして最終的な開口放出過程(膜融合)に関わる分子をそれぞれ蛍光標識して、生きた細胞内で、これら素過程の時間的順序を明らかにする必要がある。各過程はきわめて高速の反応であるため、複数の蛍光分子を同時に観測することは困難であったが、最近の顕微鏡技術の進歩によって、全反射顕微鏡による高速多色観察法が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、生きた膵β細胞において、分泌顆粒の細胞膜ドッキングに必須の granuphilin、プライミングに関与する Munc13、そして顆粒の中身で開口放出されるインスリン、をそれぞれ別の蛍光で標識する。そして細胞膜直下の事象を特異的に観察できる全反射顕微鏡下、ドッキング、プライミング、膜融合を直接可視化して、調節性分泌機構における各素過程の機能的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) ドッキング顆粒の可視化とその動態解析
インスリン遺伝子プロモーター下に SV40 large T 抗原という癌遺伝子を発現させたトランスジェニックマウス(Hanahan, Nature, 315, 115-122, 1985)と、我々の作製した granuphilin ノックアウトマウス(Gomi et al., J Cell Biol, 171, 99-109, 2005)を交配させ、仔マウスに生じる膵島腫瘍から granuphilin 欠損膵β細胞株を作製した。この新規細胞株に、内在性 granuphilin と同等レベルの Kusabira-Orange 標識 granuphilin と、膜融合を介する最終的開口放出過程を観察するために Venus で標識したインスリンを導入した。まず、この細胞の静止期において、分泌顆粒の細胞内の動きを調べ、granuphilin 標識の有無によって、顆粒の動きが異なるかを調べる。次に、ドッキングが次の膜融合に必須またはこれを促進する過程か、逆に抑制または開口放出不能にする過程かを調べるために、この細胞に分泌刺激を加えて、全反射顕微鏡下、granuphilin 陽性顆粒と陰性顆粒の開口放出頻度を直接観察する。

(2) プライミングの可視化

これまでの神経シナプスなどでの知見より、プライミングは、Ca²⁺結合活性のある C2 ドメインを複数有する Munc13 という分子が関与すると考えられている。最近、我々は、Munc13 を蛍光標識した生細胞で、本分子が刺激後の Ca²⁺上昇に依存してドッキング顆粒に集積することを見出した(未発表)。そこで、上記 granuphilin 欠損膵β細胞株に、インスリン-Venus、Kusabira-Orange-granuphilin に加えて、Cerulean 標識 Munc13 および Ca²⁺濃度を反映する Fluo4 を導入する。次に刺激前後のドッキング顆粒に局在する granuphilin、Munc13 の蛍光量を全反射顕微鏡で経時的かつ定量的に計測し、Ca²⁺上昇とインスリン開口放出との関係を計測する。また、Munc13 が、ドッキング過程で形成される膜融合抑制性の複合体(granuphilin-syntaxin-Munc18)を解離する活性を有するか、リコンビナント・タンパク質を用いた in vitro の系で検証する。

4. 研究成果

(1) ドッキング顆粒の細胞内動態

静止期における分泌顆粒の細胞内動態を調べると、granuphilin 陽性顆粒は、陰性顆粒に比して著しく動きに乏しく、分子的に細胞膜に繫留されていることが示唆された。逆に言うと、細胞膜直下に存在する顆粒の約15%は分子的に細胞膜に繫留されていないことになる。次に脱分極刺激を加えると、細胞膜直下の陽性顆粒と陰性顆粒はほぼ同数の開口放出数を示すが、もともと刺激前には陽性顆粒の数が多いため(85%)、これを補正すると、顆粒数当たりの放出頻度は、陽性顆粒が陰性顆粒の20%程度であることを見出している。すなわち本知見は、これまでの定説

と異なり、granuphilin で細胞膜にドッキングされた顆粒は、刺激後、開口放出可能であるが、その膜融合能は、分子的にドッキングされていない細胞膜直下の顆粒のそれに比べて、著しく抑制されていることを示唆している。

(2) プライミングの分子機構

Munc13 と granuphilin を別々に蛍光標識した膵β細胞に脱分極刺激を加え、全反射顕微鏡を用いて、細胞膜にドッキングしたインスリン顆粒の開口放出を観測したところ、granuphilin 陽性顆粒の開口放出時に、Munc13 が顆粒膜上に集積し、その蛍光量が增大するとともに、granuphilin 蛍光量が減弱することがわかった。しかし、Munc13 にある 2 つの C2 ドメインいずれかの Ca^{2+} 結合性を失わせた変異体は、顆粒膜集積作用を部分的に保持するが、granuphilin 解離作用を全く失うことがわかった。これらの知見は、Munc13-4 が、刺激後の Ca^{2+} 上昇に応じてドッキング顆粒膜に集積し、granuphilin を解離させて、SNARE 複合体による膜融合を引き起こすことを示唆している。逆に、Munc13-4 の発現を shRNA により減弱させると、細胞膜直下の granuphilin 陽性顆粒が集積し、ドッキング顆粒の開口放出が抑制され、granuphilin を過剰発現した膵β細胞株 (Torii et al., J Biol Chem, 279, 22532-22538, 2004) に酷似した表現型を示した。しかし外來性 granuphilin を発現させていない、granuphilin 欠損膵β細胞に、同じ Munc13 shRNA を導入しても、細胞膜直下の顆粒集積や開口放出の抑制は認められないことから、Munc13 が granuphilin 陽性ドッキング顆粒に特異的に作用し、開口放出抑制を解除していることが示唆された。また、リコンビナント・タンパク質を用いた in vitro の結合実験によって、Munc13 が granuphilin を syntaxin/ Munc18 複合体から解離させる作用があることを示唆する知見を得ている。これらの知見は、プライミングが、従来のモデルのように刺激前に分泌小胞を開口放出可能な状態にするのではなく、分泌刺激による Ca^{2+} 上昇を感知後に、ドッキングによる膜融合抑制状態を解除して開口放出を促進する過程であることを示唆している (図 2)。

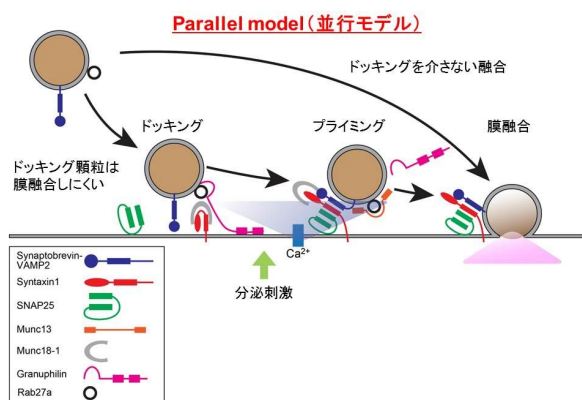


図 2

上記知見 (Mizuno K et al.) は、現在、論文投稿中である。

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 1 件)

Shimada-Sugawara M, Sakai E, Okamoto K, Fukuda M, Izumi T, Yoshida N, and Tsukuba T (2015). Rab27A regulates transport of cell surface receptors modulating multinucleation and lysosome-related organelles in osteoclasts. Sci. Rep., 5, 9620. DOI: 10.1038/srep09620. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

Kohichi Matsunaga, Masato Taoka, Toshiaki Isobe, and Tetsuro Izumi. Functional cross-talk between Rab2a and Rab27a through their dual effector is required for insulin granule maturation and secretion in pancreatic beta cells. International Symposium on Homeostasis through development, life, and diseases, Gunma University, Maebashi, Gunma, Japan, November 7, 2014.

菅原 めぐみ、坂井 詠子、福間 裕、西下 一久、岡元 邦彰、福田 光則、泉 哲郎、吉田 教明、筑波 隆幸。Rab27A は破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御する。第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都府京都市) 2014 年 10 月 17 日。

范 福順、松永 耕一、泉 哲郎。Exophilin8 遺伝子改変マウスを用いたインスリン分泌制御機構の解析。第 61 回北関東医学会総会、群馬大学(群馬県前橋市) 2014 年 9 月 26 日。

M. Yamaoka, T. Ando, M. Okamoto, T. Terabayashi, T. Izumi, I. Niki, T. Ishizaki, and T. Kimura. 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, Vienna, Austria, September 18, 2014.

泉 哲郎、水野 広一。生きた膵β細胞で可視化したインスリン分泌の分子機構。第 13 回生体機能研究会、ホテルパーク(岐阜県岐阜市) 2014 年 7 月 18 日。

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β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、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014 年 5 月 24 日。

水野 広一、泉 哲郎。生きた膵β細胞で可視化することによって明らかとなった、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機能的意義。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、リーガロイヤルホテ

ル（大阪府大阪市） 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

泉 哲郎（IZUMI, Tetsuro）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：00212952

(2)研究協力者

水野 広一（MIZUNO, Kouichi）