

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20113005

研究課題名（和文） 調節性分泌の分子機序と内分泌代謝性疾患の発症・病態への関与

研究課題名（英文） Molecular mechanism of regulated exocytosis and its involvement in endocrine and metabolic diseases

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、グラニューフィリンという分子が関わる新たな分子間相互作用を見出し、分泌顆粒の細胞膜ドッキングの分子機構をマウス個体レベルで解明した。またインスリンとグラニューフィリンを別々に蛍光標識した細胞で、分泌顆粒の動態を全反射顕微鏡で高速に画像取得する系を確立した。この系を用いて、分泌顆粒の開口放出に関わる分子の機能を生細胞で解析できる。また、Rab27 エフェクター分子エキソフィリン7とエキソフィリン8が、それぞれ、細胞膜に接着していない非ドッキング顆粒の開口放出、顆粒の細胞深部から皮質部アクチン網への輸送に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We aimed to identify molecular mechanism and functional significance of granule docking to the plasma membrane in regulated exocytosis. For this purpose, we first analyzed the function of the Rab27 effector granophilin and its partner, syntaxin-1a, using gene-knockout mice. We found that only granophilin, but not syntaxin-1a, is essential for the docking process. We also established the microscopic system to simultaneously observe behavior of granules and associated molecules in living cells to explore the relationship between granule docking and fusion. Furthermore, we discovered the roles of other Rab27 effectors in regulated exocytosis: exophilin7 functions in the exocytosis of undocked granules, whereas exophilin8 is involved in the recruitment of granules into the cortical actin network.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	35,100,000	10,530,000	45,630,000
2009年度	25,000,000	7,500,000	32,500,000
2010年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
2011年度	25,000,000	7,500,000	32,500,000
2012年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
総計	134,300,000	40,290,000	174,590,000

研究分野：遺伝生化学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：分泌顆粒、調節性分泌、開口放出、糖尿病、内分泌、Rab タンパク質

1. 研究開始当初の背景

われわれは、膵β細胞に特異的に高発現す

る分子 granophilin を同定し、本分子が低分子量 GTPase Rab27 のエフェクターとして、

インスリン分泌顆粒の細胞膜ドッキングに必須であることを示してきた。しかし、granuphilin がいかにして分泌顆粒を細胞膜に安定的に接着させるのか、また、granuphilin 欠損膵β細胞では細胞膜に接着したドッキング顆粒が消失しているにもかかわらず、インスリン分泌が亢進しているが、分泌顆粒の細胞膜ドッキングと融合はどのような関係があるのか、については十分に解明されていなかった。さらに granuphilin と相同配列を持つ分子が *in silico* で複数見出され、それらの分子が Rab27 エフェクター分子として種々の調節性分泌経路で機能する可能性が示唆されていたが、多くの分子の機能はほとんど不明であった。そこでわれわれは、これらの課題を、分子、細胞、個体レベルで解明することを試みた。また、これら分子の機能を明らかにするためには、生きた細胞内での分泌顆粒の動態を解析する系を打ち上げる必要性を強く感じ、高速での顕微鏡解析法の確立を目標の1つに置いた。

2. 研究の目的

(1) 分泌顆粒の細胞膜ドッキングの分子機構と機能的意義を解明する。

(2) 分泌顆粒の細胞内動態に関する形態学的解析法を確立する。

(3) granuphilin 以外の Rab27 エフェクターの機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 生化学的、分子生物学的手法を用いた、新たな分子間相互作用を同定する。

(2) 全反射顕微鏡、共焦点顕微鏡などを用いて、生細胞における分泌顆粒の細胞内動態を解析する。また、電子顕微鏡を用いて、分泌顆粒の細胞内分布を静的に観察し、動態観察とあわせた形態学的解析を行う。

(3) 遺伝子欠損マウスおよびそれに由来する分泌細胞を用いて、*in vivo* における機能を解析する。具体的には、耐糖能、インスリン分泌能、そのほか各分泌細胞の機能異常を反映する可能性のある表現型を調べる。

4. 研究成果

(1) 分泌顆粒の細胞膜ドッキングの分子機構と機能的意義

Granuphilin は、顆粒膜上の Rab27 と細胞膜上の syntaxin-1a を架橋することによって、分泌顆粒を細胞膜に接着（ドッキング）させていると考えられている (Izumi et al., Cell Struct. Funct., 2003)。実際、他の研究グループより syntaxin-1a 欠損膵β細胞でもド

ッキング障害が報告されている (Ohara-Imaizumi et al., J. Cell. Biol., 2007)。もし上記仮説が正しいとすると、granuphilin 欠損膵β細胞と syntaxin-1a 欠損膵β細胞は、同様のドッキング障害を示すことが予想される。一方、granuphilin 欠損細胞はインスリン分泌亢進を示すが、syntaxin-1a 欠損細胞は分泌低下を示す。われわれは、分泌顆粒の細胞膜ドッキングと融合における両分子の機能と相互関係を明らかにするために、それぞれの遺伝子欠損マウスに加え、両者を欠損するダブルノックアウトマウスの表現型を、同一遺伝的背景 (C3H/He マウス) 下、同一手法で比較することを試みた。その結果、granuphilin 欠損マウスとダブルノックアウトマウスの膵β細胞では、ドッキング障害を認めたが、syntaxin-1a 欠損マウスβ細胞では、既報と異なり有意のドッキング障害を認めなかった。また、granuphilin は、syntaxin-1a のみならず、細胞膜上に局在する他の syntaxin-2、syntaxin-3 と結合しうることが判明した。以上の結果は、granuphilin が複数の細胞膜上 syntaxins と結合するために、syntaxin-1a 単独欠損ではドッキング障害が認められないことを示唆している。syntaxin-1a 単独欠損によるインスリン分泌低下がごく軽度であることも、他の syntaxins が、顆粒のドッキングや融合に関与していることを示唆している。また野生型を含めた4種のマウス膵β細胞の分泌パターンを調べた結果、既報と異なり syntaxin-1a はドッキング顆粒の開口放出だけではなく、非ドッキング顆粒の開口放出にも関与し、分泌刺激後早期の開口放出にのみ特異的に関与しているわけではないことも明らかとなった。以上の知見は、ドッキングの有無、刺激後の時期により、開口放出マシナリーが異なるという説を明確に否定するものである。以上の知見は、J. Biol. Chem 誌に掲載された (Wang et al., 286, 32244-32250, 2011)。

(2) 分泌顆粒の細胞内動態に関する形態学的解析法の確立

分泌顆粒の細胞膜ドッキングと融合の関係を明らかにするためには、開口放出前の顆粒の細胞内動態を観察する必要がある。これまでわれわれは、インスリン遺伝子に EGFP を融合したタンパク質を膵β細胞に発現し、顆粒の動態を全反射顕微鏡で観察してきた。しかし顆粒動態と特定分子の動きを関連づけるためには、顆粒膜局在分子をインスリンとは別の蛍光で標識し、生細胞でリアルタイムに解析する必要がある。しかしながら顆粒の開口放出現象を解析するためには数十ミリ秒単位の間隔で画像を取得しなければならない。われわれは、このような測定条件を

満たす顕微鏡観察系を構築すると共に、XY 面での拡散係数や Z 方向の相対的位置を定量的に計測する系をたちあげた。これまで分泌小胞の細胞膜ドッキングは次の膜融合に必須の前過程であると考えられてきたが、前述のように granophilin 欠損細胞の知見はこの定説に疑問を投げかけている。そこでわれわれは granophilin 欠損膵β細胞株にインスリン-Venus と granophilin-Ku0 (Kusabira Orange 1) を発現し、全反射顕微鏡下、ドッキングと膜融合の関係を生細胞で観察した。その結果、細胞膜直下の顆粒の大部分(約 85%)は、granophilin が局在し、動きも乏しいことが判明した。この知見は、granophilin がドッキングに直接関わっていることを支持する。この細胞に脱分極刺激を加えたところ、細胞膜直下の granophilin 陰性顆粒はほぼすべて開口放出するのに対し、granophilin 陽性顆粒の開口放出率は 20%以下ときわめて低い割合を示した。この事実は、分泌顆粒のドッキングは、定説と異なり、次の膜融合を一時的に抑制する過程であることを示唆する。すなわちドッキングは、分泌刺激の非存在下で、細胞膜近傍の分泌小胞が自発的に融合することを防ぐ役割があることを示唆し、その機能は、刺激存在下にはじめて開口放出が起きるといふ調節性分泌経路の根幹的特性に関わっている可能性がある。しかしながら同時に、ドッキング顆粒は刺激存在下では開口放出可能であることをも意味しており、何らかの分子が刺激後、ドッキングマシナリーによる分泌抑制を解除していると考えられる。現在、この抑制解除の分子機構を探求しており、この過程に関わる有力な分子を同定し、その生細胞における機能を多色蛍光全反射顕微鏡で解析している(以上、Mizuno et al., 未発表知見)。

(3) Granophilin 以外の Rab27 エフェクターの機能

①Exophilin7

これまで granophilin の Rab27 結合領域と相同性のあるアミノ酸配列を有する分子が 10 種同定されており、少なくとも *in vitro* で Rab27 と結合することが知られている。しかしながらこれら分子の大半は、その機能が十分に解明されていない。われわれは、その 1 つ exophilin7 が膵β細胞や下垂体などの内分泌細胞に特異的に発現し、その発現分布が granophilin のそれときわめて類似していることを見出した。実際、exophilin7 は膵β細胞内でインスリン顆粒膜に局在する。しかしながら granophilin と異なり、顆粒を細胞膜近傍に集積させる作用がなく、exophilin7 欠損β細胞においてもインスリン顆粒のドッキング障害が認められなかった。また、exophilin7 欠損膵β細胞において蛍光標識

インスリン顆粒の開口放出を解析した結果、exophilin7 は、刺激前に細胞膜に接着していない非ドッキング顆粒の開口放出を特異的に促進していることがわかった。また変異体を用いた解析より、この作用には、exophilin7 の C2A ドメインが有するリン脂質結合能が重要であることがわかった。以上の知見は、同一β細胞内で 2 種の Rab27a エフェクター granophilin、exophilin7 が、それぞれドッキング顆粒、非ドッキング顆粒の開口放出を制御していることを初めて示したもので、*Mol. Biol. Cell* 誌に掲載された (Wang et al., 24, 319-30, 2013)。

②Exophilin8

Exophilin8 は、granophilin、exophilin7 と異なり、C 端側に 2 つの C2 ドメインを持たない Rab27 エフェクターで、アクチンやアクチン上のモーター蛋白質 myosin Va や VII と結合能を有することが知られている。われわれは、exophilin8 が細胞皮質部のアクチン網にインスリン顆粒を集積させる作用があることを見出した。さらに exophilin8 の過剰発現やノックダウン実験により、本分子が細胞深部より皮質部アクチン網へ分泌顆粒をリクルートする機能があることを示す知見を得た。細胞内深部の顆粒輸送については未解明の部分が多いが、本知見はその一端を明らかにしたものと言え、*Mol. Biol. Cell* 誌に発表された (Mizuno et al., 22, 1716-1726, 2011)。

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 14 件)

- ① Wang H, Ishizaki R, Xu J, Kasai K, Kobayashi E, Gomi H, Izumi T (2013). The Rab27a effector exophilin7 promotes fusion of secretory granules that have not been docked to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, 24, 319-330. 査読有
- ② Yogosawa S, Mizutani S, Ogawa Y, and Izumi T (2013). Activin receptor-like kinase 7 suppresses lipolysis to accumulate fat in obesity through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ and C/EBP α . *Diabetes*, 62, 115-123. 査読有
- ③ Izumi T (2012). Adipose cell and lipid turnovers in obesity and insulin resistance. *Diabetol. Int.* 3, 184-186. 査読有
- ④ Xu X, Coats JK, Yang CF, Wang A, Ahmed

- OM, Alvarado M, Izumi T, and Shah NM (2012). Modular genetic control of sexually dimorphic behaviors. *Cell*, 148, 596-607. 査読有
- ⑤ Wang H, Ishizaki R, Kobayashi E, Fujiwara T, Akagawa K, and Izumi T (2011). Loss of granuphilin and loss of syntaxin-1a cause differential effects on insulin granule docking and fusion. *J. Biol. Chem.* 286, 32244-32250. 査読有
- ⑥ Mizuno K, Ramalho JS, and Izumi T (2011). Exophilin8 transiently clusters insulin granules at the actin-rich cell cortex prior to exocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 22, 1716-1726. 査読有
- ⑦ Izumi T (2011). Heterogeneous modes of insulin granule exocytosis: molecular determinants. *Front. Biosci.*, 16, 360-367. 査読有
- ⑧ Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, and Yoshimori T (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.*, 190, 511-521. 査読有
- ⑨ Maeda-Mamiya R, Norii E, Isobe H, Nakanishi W, Okamoto K, Doi K, Sugaya T, Izumi T, Homma T, and Nakamura E (2010). In vivo gene delivery by cationic tetraamino fullerene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5339-5344. 査読有
- ⑩ Guo X, Tu L, Gumper I, Plesken H, Novak EK, Chintala S, Swank RT, Pastores G, Torres P, Izumi T, Sun T-T, Sabatini DD, and Kreibich G (2009). Involvement of Vps33a in the fusion of uroplakin-degrading multivesicular bodies with lysosomes. *Traffic*, 10, 1350-1361. 査読有
- ⑪ Chavas LMG, Ihara K, Kawasaki M, Torii S, Uejima T, Kato R, Izumi T, and Wakatsuki S (2008). Elucidation of Rab27 recruitment by its effector: structure of Rab27a bound to Exophilin4/Slp2-a. *Structure*, 16, 1468-1477. 査読有
- ⑫ Chavas LMG, Ihara K, Kawasaki M, Kato R, Izumi T, and Wakatsuki S (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Rab27a GTPase in complex with exophilin4/Slp2-a effector. *Acta Crystallogr. Sect. F. Biol. Cryst. Commun.*, 64, 599-601. 査読有
- ⑬ Kasai K, Suga K, Izumi T, and Akagawa K (2008). Syntaxin 8 has two functionally distinct di-leucine-based motifs. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 13, 144-154. 査読有
- ⑭ Kasai K, Fujita T, Gomi H, and Izumi T (2008). Docking is not a prerequisite but a temporal constraint for fusion of secretory granules. *Traffic*, 9, 1191-1203. 査読有
- [学会発表] (計 4 3 件)
- ① Hao Wang, Ray Ishizaki, Jun Xu, Kazuo Kasai, Hiroshi Gomi, and Tetsuro Izumi. The Rab27a effector exophilin7 promotes fusion of insulin granules without stable docking to the plasma membrane. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. (2012. 11. 27)
- ② 石崎 玲、王 昊、泉 哲郎. 膵β細胞に発現する Rab27a エフェクター Exophilin7 遺伝子欠損マウスの解析. 平成 24 年度日本生化学会関東支部例会. 群馬大学. 前橋. (2012. 6. 23)
- ③ Ray Ishizaki, Hao Wang, Jun Xu, and Tetsuro Izumi. Exophilin7 promotes fusion of undocked granule in pancreatic β cells. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. Kobe International Conference Center, Kobe, Japan. (2012. 5. 28-29)
- ④ 王 昊. 石崎 玲. 徐 君. 泉 哲郎. 膵β細胞に発現する Rab27 エフェクター Exophilin7 遺伝子欠損マウスの解析. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. パシフィコ横浜. 横浜. (2012. 5. 19)
- ⑤ 泉 哲郎. Roles of multiple Rab27a effectors in insulin granule exocytosis. (シンポジウム: 2 型糖尿病 インスリン分泌). 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. パシフィコ横浜. 横浜. (2012. 5. 17)
- ⑥ 王 昊. 石崎 玲. 泉 哲郎. 藤原智徳. 赤川 公朗. Granuphilin と Syntaxin-1a 二重欠損マウスを用いたインスリン分泌機構の解析. 第 26 回日本

- 糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. 愛知県産業労働センター. 名古屋. (2012. 2. 17)
- ⑦ Hao Wang, Ray Ishizaki, Tomonori Fujiwara, Kumio Akagawa, and Tetsuro Izumi. Loss of granuphilin and of syntaxin-1a cause differential effects on insulin granule docking and fusion. 第34回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜. 横浜. (2011. 12. 15)
- ⑧ 石崎 玲, 王 昊, 藤原 智徳, 赤川 公朗, 泉 哲郎. Granuphilin と Syntaxin-1a 二重欠損マウスを用いたインスリン分泌機構の解析. 第84回日本生化学会大会. 国立京都国際会館. 京都. (2011. 9. 22)
- ⑨ Ray Ishizaki, Hao Wang, Jun Xu, and Tetsuro Izumi. Mechanism for regulated exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells. JSH (Japanese Society of Hematology) International Symposium 2010 in Akita: Seven Wonders of Erythropoiesis. Akita University, Akita, Japan. (2010. 7. 16-17)
- ⑩ 泉 哲郎. Roles of Rab27a and its multiple effectors in insulin exocytosis. (シンポジウム: 膵β細胞研究の最前線(1)「インスリン分泌」). 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 岡山コンベンションセンター. 岡山. (2010. 5. 27-29)
- ⑪ 水野 広一, 泉 哲郎. Exophilin8 を介したインシュリン顆粒の形質膜下アクチン網への移行は微小管プラス端近傍でおきている (ワークショップ: メンブレントラフィック(II)). 第62回日本細胞生物学会大会. 大阪国際会議場. 大阪. (2010. 5. 19-21)
- ⑫ Hao Wang, Jun Xu, Ray Ishizaki, and Tetsuro Izumi. Differential granule-targeting activities between two Rab27a effectors expressed in pancreatic β cells, 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010). Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. (2010. 3. 26-30)
- ⑬ Tetsuro Izumi. Molecular determinants of insulin granule exocytosis. Workshop: Genesis and function of pancreatic β cells. The official satellite symposium “New insight into pathogenesis and treatment of diabetes” of the 14th international congress of endocrinology (ICE2010). Tokyo Conference Center Shinagawa,

Tokyo, Japan. (2010. 3. 25)

- ⑭ 石崎 玲, 徐 君, 泉 哲郎. 膵β細胞に発現する2つのRab27エフェクターの機能差異. 第52回日本糖尿病学会年次学術総会. ホテル NCB, 大阪国際会議場. 大阪. (2009. 5. 21-24)
- ⑮ 石崎 玲, 徐 君, 泉 哲郎. 膵β細胞に発現する2つのRab27エフェクターの機能差異. 第82回日本内分泌学会学術総会. 群馬県民会館, 前橋商工会議所. 前橋. (2009. 4. 23-25)
- ⑯ 笠井 篤子, 泉 哲郎. 細胞膜マイクロドメイン-ラフトを介したインスリン分泌過程の解明. 第82回日本内分泌学会学術総会. 群馬県民会館, 前橋商工会議所. 前橋. (2009. 4. 23-25)
- ⑰ 泉 哲郎. インスリン顆粒の細胞膜開口放出に関わる因子(β細胞の最前線). 第43回糖尿病学の進歩. 長野県松本文化会館, まつもと市民芸術館. 松本. (2009. 2. 20-21)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[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) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし