

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890031

研究課題名（和文）新規 Exophilin 複合体の同定

研究課題名（英文）Identification of novel Exophilin complexes

研究代表者

石崎 玲 (ISIZAKI REI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90510511

研究成果の概要（和文）：

膵β細胞に発現する Exophilin のうち、インスリン分泌を制御する低分子量 G タンパク質 Rab27a と最も多く結合しているのは Granophilin であった。Granophilin はインスリン分泌を抑制する分子であり、膵β細胞に強く発現している。そこで、Granophilin の新規複合体を同定した。同定された新規複合体は Granophilin による抑制を解除していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The small GTPase Rab27a is expressed in pancreatic β cells and regulates insulin secretion. In this study, I found that Rab27a showed the strongest binding affinity for Granophilin. Granophilin is strongly expressed in pancreatic β cells and suppresses insulin secretion. Then I identified the novel Granophilin complex. This complex inhibits function of Granophilin and increases insulin secretion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：糖尿病

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：インスリン分泌、β細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病の日本人における主な成因として膵β細胞からのインスリン分泌不全が上げられる。このインスリン分泌の過程はインスリン顆粒の膜近傍までの輸送、膜へのドッキング、顆粒膜と細胞膜の融合、と

言った多段階の反応からなり、様々な調節因子によって制御されている。しかし、その詳細な分子機構は不明なままであった。

(2) インスリン分泌調節因子 Granophilin は顆粒膜に局在する低分子量

GTPase Rab27a や細胞膜上の Syntaxin-1a と結合し、インスリン分泌顆粒の細胞膜へのドッキングとそれに続く膜融合を制御している。

(3)Granophilin は Exophilin ファミリーの1つであり、複数の Exophilin が膵β細胞に発現していることが分かった。また、これらはいずれも Rab27a を介してインスリン顆粒に局在している事が分かった。これらのことから Exophilin による新たなタンパク質複合体がインスリン分泌を制御していると考えた。しかし、膵β細胞における Exophilin 複合体の解析は十分に行われてこなかった。

2. 研究の目的

(1)新規 Exophilin 結合タンパク質の同定。

新しい Exophilin 複合体を構成する新規 Exophilin 結合タンパク質を同定する。

(2)新規 Exophilin 複合体の解析。

同定した Exophilin 複合体についてインスリン顆粒の分泌における役割を解析する。

3. 研究の方法

(1)膵β細胞に精製用のタグを付加した Exophilin をアデノウイルスベクターで発現させ、そのタグを用いて Exophilin 複合体を精製した。精製した複合体を電気泳動によって分離し、複合体を形成するタンパク質をマスペクトルグラフィーによって同定した。

(2)新規 Exophilin 複合体の解析。

新規複合体の形成を阻害する Exophilin 変異体を作成した。この変異体を発現するレトロウイルスを作成しインスリン顆粒が可視化された細胞に導入した。現在

これらの細胞を全反射顕微鏡もしくはニポウディスク式共焦点顕微鏡を用いてライブイメージングしている。

4. 研究成果

(1)膵β細胞内においてインスリン分泌は低分子量Gタンパク質 Rab27a によって制御されている。また、膵β細胞内には Exophilin ファミリーと呼ばれる複数の Rab27a エフェクターが発現していることが知られている。しかしながら、そのうちどのタンパク質がどの程度 Rab27a と結合しているのかは知られていなかった。そこでまず、膵β細胞に発現する複数の Exophilin のうちどのエフェクターが Rab27a と強力に結合しているかを調べるために Rab27a による免疫沈降法を用いた結合タンパク質の探索を行った。その結果、膵β細胞内に存在するもっとも強力な Rab27a エフェクターは Granophilin であることが分かった。膵β細胞内に存在する Rab27a エフェクターはそのほとんどが Granophilin であることが分かり、Rab27a によるインスリン分泌調節のほとんどが Granophilin を介して行われていると考えられた。

(2)インスリン分泌の制御は Granophilin-Rab27a 複合体によって行われていると考えられたため、Rab27a エフェクターを探索するのに用いた実験系と同様の手法によって新規 Granophilin 結合タンパク質の探索を行った。その結果、複数の Granophilin 結合タンパク質が得られた。これらはいずれも、これまでに結合タンパク質として知られている Munc18 や Syntaxin-1a と比べて、同等もしくはそれ以上の結合活性を示した。し

かし、結合活性は Granuphilin-Rab27a 間よりは弱く、新規結合タンパク質は Granuphilin の制御因子であると考えられた。また、Granuphilin は 5 個以上のタンパク質からなるタンパク質複合体を形成していることがわかった。そこで、それぞれの結合が他の結合などに与える影響を調べるため、すべての結合タンパク質の Granuphilin 結合部位を決定した。さらに、これらの結合タンパク質と結合できなくした Granuphilin 変異体を作成した。作成した変異体を用いた結合実験から新規に同定された Granuphilin 結合タンパク質は Granuphilin-Rab27a 複合体形成には影響しないことが分かり、直接 Rab27a を制御しているのではないことが分かった。現在、Mun18 や Syntaxin-1a との結合への影響を調べている。

(3) 新規 Granuphilin 結合タンパク質による Granuphilin-Rab27a 複合体を介したインスリン分泌への影響を調べるため、変異 Granuphilin を発現するレトロウイルスを作成し Granuphilin 欠損マウス由来の膵β細胞に発現させてインスリン分泌能と細胞膜へのターゲティング活性を調べた。その結果、ターゲティング活性には Rab27a 以外のタンパク質結合が必要ではなく、脂質結合領域が重要であることが分かった。脂質結合領域と細胞膜に局在する脂質との結合をリコンビナントタンパク質で調べたが、強く結合するものはなかった。現在、Granuphilin の脂質結合領域と結合する脂質の探索を大規模ライブラリーによって行っている。Granuphilin と結合する脂質が同定されればそれは脂質によるインスリン分泌調

節の機構を解明することになり非常に重要なことである。また、野生型 Granuphilin はインスリン分泌を抑制するが、一部の変異型 Granuphilin は野生型に比べてよりインスリン分泌に抑制的に働くことが分かった。このことは Granuphilin には抑制を解除する機構が備わっており、そのタンパク質結合を介して解除されることを示している。膵β細胞からのインスリン分泌は非常に抑制されており、細胞内の全インスリン量のうち 0.1%程度しか分泌しない。また、Granuphilin 変異マウスを用いた実験から細胞膜にターゲティングしているインスリン顆粒の半分以上が Granuphilin に依存しており分泌抑制されていることが分かっている。Granuphilin によるインスリン分泌抑制は特定の条件で解除されると考えられるが、その時間空間的な位置はわかっていない。Granuphilin による分泌抑制の解除機構の解明を目指すため、インスリン分泌の詳細を動的に観察できる全反射顕微鏡を用いて解析している。

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)

① 石崎 玲、Hao Wang、Jun Xu、泉 哲郎
Mechanism for Regulated Exocytosis of Insulin Granules in Pancreatic Beta Cells
日本血液学会国際シンポジウム、2010. 7. 16、
秋田大学、(秋田県)

② Hao Wang、石崎 玲、泉 哲郎
Differential granule-targeting activities between two Rab27a effectors

expressed in pancreatic beta cells

第14回国際内分泌学会議、2010.5.29、国立京都国際会館（京都府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 玲 (ISIZAKI REI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90510511