

## 自己評価報告書

平成23年4月12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

研究分野：細胞内膜輸送

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. 研究計画の概要

これまで申請者らは、Rab27a およびそのエフェクター granuphilin が、膵β細胞インスリン顆粒の細胞膜ドッキングと融合の制御に重要な役割を担うことを示してきた。しかしその後、全反射顕微鏡を用いた、生きた膵β細胞における顆粒の開口放出現象の観察により、分泌様式は必ずしも一様ではなく、これを裏打ちする複数の分子機序の存在が示唆された。そこで本研究では、調節性分泌経路で働く低分子量 GTPase Rab27a/b とそのエフェクター分子 exophilins を中心とした、分泌小胞開口放出に関する分子基盤を解明する。この目的のために、① Rab27a、granuphilin 等に結合する分子群のプロテオミクス解析による網羅的同定、② 生細胞における、小胞膜局在分子の分泌小胞細胞内動態に及ぼす影響の解明、③ 機能解明が進んでいない Rab27 エフェクター、およびこれらと相互作用する分子に関する遺伝子欠損動物の作製・表現型解析、を行う。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) 新たな Rab27a 結合分子の同定

我々は、Myc タグと Flag タグの間に TEV プロテアーゼ切断サイトをいれ、三者をタンデムにつなげたアフィニティータグ (MEF タグ) をマウス Rab27a cDNA に付加した MEF-Rab27a 発現レトロウイルスを作製し、マウスα、β細胞由来のα TC1.6、MIN6 細胞株に感染させた。これら細胞の抽出液より多段階免疫沈降法で Rab27a 結合分子を精製し、首都大学大学院理学研究科・磯辺俊明研究室との共同研究により、質量分析装置を用いたタンパク質同定を行った。その結果、既知の Rab27a 結合分子の他に、小胞体やゴルジ体で機能する

タンパク質がいくつか同定され、Rab27a が分泌顆粒の輸送や開口放出過程だけではなく、その生合成過程にも関与している可能性が考えられた。現在、同定されたタンパク質の機能解析を行っている。

## (2) 分泌顆粒の細胞内動態解析

全反射顕微鏡を用いた、生細胞における顆粒開口放出の観察により、細胞膜近傍に局在する顆粒からの開口放出に加え、予め細胞膜に接着していない非ドッキング顆粒からの速やかな膜融合を認め、開口放出前の顆粒動態や分泌様式は必ずしも一様ではないことがわかった。これらヘテロな開口放出現象の分子基盤を明らかにするために、顆粒内容物のみならず、顆粒膜局在分子を別波長の蛍光色素で標識して、100 ミリ秒単位の開口放出現象を観察・解析する系を確立した。現在、granuphilin 欠損膵β細胞株に蛍光標識した granuphilin を発現させ、granuphilin 陽性、陰性の顆粒それぞれについて、細胞内動態と開口放出の関係をリアルタイムで解析している。

## (3) Rab27a エフェクターおよびその結合分子に関するノックアウトマウス作製・解析

Rab27a 欠損および granuphilin 欠損膵β細胞の解析より、Rab27a は granuphilin のみならず他の分子を介する作用があることが示唆されている。そこで granuphilin と相互作用することが知られている syntaxin-1a、granuphilin 以外の Rab27a エフェクター exophilins などの遺伝子欠損マウスを導入または作製し、表現型解析を進めている。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

新学術領域研究の前半期間は、新たな研究展開に向けて、新規相互作用分子の同定、顕微鏡解析技術の獲得、遺伝子変異マウスの作製に時間を費やし、基礎となる研究データ、解析技術、リソースの集積は十分にできた。しかしながら論文発表という観点からは、十分な成果に結びつけられなかったことが反省点である。後半2年の研究期間は、これまでの研究蓄積に基づき、研究成果発表をより充実させたい。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) Rab27a と相互作用する新規分子の機能解析

プロテオミクス解析により見出された、新規 Rab27a 結合分子の機能解析を進める。特に顆粒形成に関与すると考えられる分子を中心に研究を進める。

(2) インスリン顆粒と膜局在分子の動態解析

インスリン-EGFPに加え、Kusabira Orange (K0re) を融合した K0re-Rab27a や K0re-exophilins を膵β細胞株MIN6または遺伝子欠損マウス由来の膵β細胞(株)に発現させる。そして顆粒膜局在分子の有無による、インスリン顆粒動態や開口放出に対する効果を生細胞でリアルタイムに解析する。

(3) 遺伝子欠損マウスの解析

新たに作製・導入した、Rab27 エフェクター分子やこれと相互作用する分子に関する遺伝子欠損動物6種の解析を進める。膵β細胞のみならず、他の分泌細胞における機能も調べ、広く調節性分泌経路における Rab27 エフェクター系の役割を解明する。

### 5. 代表的な研究成果

(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9件)

- ① 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, in press. 査読有
- ② Izumi T (2011). Heterogeneous modes of insulin granule exocytosis: molecular determinants. Front. Biosci., 16, 360-367. 査読有
- ③ 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

- ④ 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19件)

- ① 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, Japan, March 25, 2010.

[図書] (計2件)