

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08295

研究課題名(和文) 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明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of insulin granules exocytosis via the novel Exophilin-8 complexes.

研究代表者

松永 耕一 (Matsunaga, Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20570162

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)：膵細胞でインスリンが合成され、分泌顆粒に蓄えられる。血糖値上昇を感知すると、分泌顆粒は細胞膜付近のアクチン網へ運ばれ、顆粒膜と細胞膜が融合し、開口放出によって血中に放出される。我々は、Exophilin-8たんぱく質欠損マウスでは、細胞膜周辺部のアクチン網領域に集まっているインスリン顆粒が失われ、インスリン分泌が減少し、血糖値が高くなることを発見した。またExophilin-8と、RIM-BP2、Myosin-7aとの複合体形成が、インスリン顆粒をアクチン網領域内に留めるために必要であることを新たに発見し、この複合体がインスリンを開口放出するためのステップを制御していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Insulin is produced by beta-cells and is stored as secretory granules in beta-cells of the pancreatic islets. Secretion of insulin requires a series of membrane dynamics, namely, producing granules from the Golgi apparatus, sorting to granules and maturation, and trafficking and fusion to the plasma membrane. Secretory granules transfer to the actin cortex near the plasma membrane before they fuse with plasma membrane. In the present study, we showed that Exophilin-8-knockout mice showed significantly higher blood glucose level, and Exophilin-8-null pancreatic beta-cells exhibited decreased insulin secretion in glucose stimulation and lost insulin granule location at the F-actin rich cell periphery. Furthermore, we found that Exophilin-8 formed the complex with RIM-BP2 and Myosin-VIIa, and the complex had important role for the granule localization to F-actin rich cell periphery.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：インスリン Rab27 Exophilin

## 1. 研究開始当初の背景

調節性分泌とは、内分泌細胞や神経細胞等が特定の刺激を感知して生理活性物質等を細胞外に放出することである。その分泌様式は、多様に分化した細胞の機能に応じて厳密に制御され、その機能不全は、例えば膵細胞であるなら糖尿病であるように、様々な疾患の原因となる。この経路では、単量体 GTPase Rab27 が共通して機能しており、そのエフェクター Exophilin ファミリーは 10 種類以上存在する。これら Rab27 エフェクターは、例えば膵細胞では Granuphilin (Exophilin2) である一方、膵細胞では Exophilin4/slp2 であり (Mol Biol Cell.18:688-96 2007)、分泌細胞の種類によって相互作用しているものが異なっているが、その機能差異の詳細はよくわかっていない。さらに複数の Exophilin が顆粒の生合成から開口放出までに機能しており、Rab27 系によって非常に複雑な制御を受けていることが明らかにされつつある。

Exophilin-8 (MyRIP/Slac2-c) は、他の多くとは異なり、細胞膜等の脂質に結合する C2 ドメインを持たず、アクチンやそのモーターたんぱく質ミオシン V/VII と結合することが知られている。これらを介して直接分泌顆粒の輸送を制御する可能性が示唆されているが、はっきりとした分子メカニズムはわかっていなかった。また、Exophilin-8 に関する過去の知見は、ほとんど *in vitro* での知見であり、実際に生体内でどのような機能を有するかは全く不明で、生理的な意義についてはほとんど理解されていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

Exophilin-8 を介した調節性分泌機構を解明するために、ノックアウトマウスを作成した。本研究課題では膵細胞での Exophilin-8 の機能解析に焦点を絞り、インスリン顆粒輸送における Exophilin-8 の役割を *in vivo* において調べることを第一の目的とした。また詳細な分子メカニズムについても解析した。

## 3. 研究の方法

### 1. 膵細胞でのインスリン分泌能の解析

Exophilin-8 ノックアウトマウスを作成し、膵臓から膵島を単離した後、ペリフュージョン解析を行った。さらに間接抗体蛍光法や、電子顕微鏡による形態観察により、分泌顆粒の数や形態、細胞内分布に影響がないかを調べた。

### 2. 新規 Exophilin8 結合たんぱく質の探索

現在、Exophilin8 が結合活性を示す分子として、GTP 結合型 (活性化型) Rab27、アクチン、ミオシン V/VII、PKA や Exocyst 複合体が知られている。しかしこれら相互作用のみでは、どのようなメカニズムでインスリン

顆粒のエキソサイトーシスを制御しているのかを説明するのは難しく、さらにどの分子とも結合しない機能未知の領域もあることから、他にも結合パートナーが存在することを予想し、新規結合たんぱく質の探索を行った。方法はこれまでに研究代表者が行った、MEF-tag による多段階免疫沈降法により行った。

### 3. 複合体解析

Exophilin-8 結合タンパク質を、それぞれの特異抗体を用いたウエスタンブロット法にて結合の確認を行った。

### 4. 細胞内局在解析

Exophilin-8 およびその結合たんぱく質の細胞内局在を、単離膵島とラット膵細胞株である Ins1 細胞にて調べた。方法はそれぞれの特異抗体を用いた間接蛍光抗体法にて行った。

### 5. siRNA/shRNA を用いたノックダウンによる機能解析

INS1 832/13 ラット細胞株に対して、siRNA のトランスフェクション、またはアデノウイルスによる shRNA 発現を用いた RNAi による、遺伝子ノックダウンを行った。その後グルコース刺激によるインスリン分泌アッセイを以下の通りに行った。まずコントロール shRNA (GFP に対するもの)、shRNA (Exophilin-8、またはその結合たんぱく質) それぞれを導入し、遺伝子ノックダウンを行った ins1 細胞を 2 時間 2.8mM グルコース濃度の緩衝液にて培養し、その後 25mM グルコース濃度の緩衝液に置換し、2 時間培養した。その後上清を回収し、alpha-LISA インスリンアッセイキット (パーキンエルマー) を用いてインスリン濃度を測定した。

## 4. 研究成果

単離膵島を用いてグルコース刺激におけるインスリン分泌活性を調べた結果、Exophilin8 ノックアウトマウスの細胞ではインスリン分泌が第一相、第二相、共に有意に低下した。さらに耐糖能試験では、有意に耐糖能の増悪が見られた。さらに Exophilin-8 ノックアウトマウスでは、細胞内の、細胞膜周辺部のアクチン網領域に集

Exophilin-8 ノックアウトマウスβ細胞では細胞膜近傍に局在するインスリン顆粒が減少している

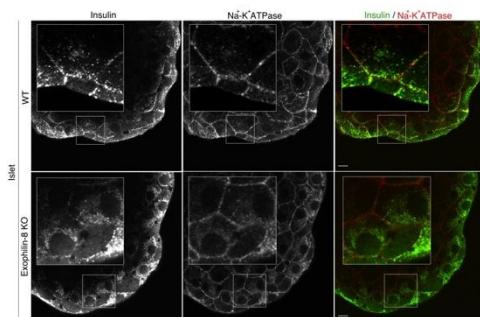


図 1: 単離膵島の細胞染色

上段: 野生型 下段: Exophilin-8 ノックアウト

まっっているはずのインスリン顆粒が失われた(図1)。

MEF-tagによる多段階免疫沈降法により、新規 Exophilin-8 結合たんぱく質である RIM-BP2 が同定された(図2)。次に間接蛍光抗体法による局在解析を行った。すると Exophilin-8 と RIM-BP2、Myosin-VIIa は主にインスリン顆粒に局在した。特にこの三者

新規Exophilin8/MyRIP結合たんぱく質RIM-BP2の同定

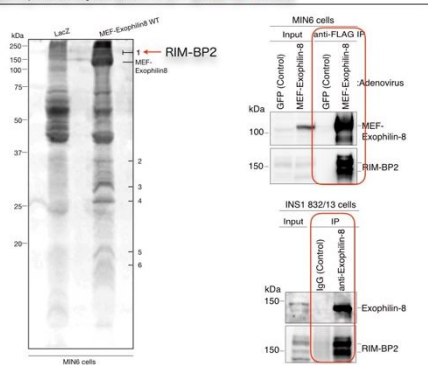


図2: Exophilin-8 結合たんぱく質 RIM-BP2 の同定

左図: MEF-tag 免疫沈降後、電気泳動とたんぱく質染色を行ったもの。バンド1を切り取り、質量分析による解析を行ったところ、RIM-BP2 が同定された。

右図:(上段)マウス細胞株 MIN6 にて、Exophilin-8 と RIM-BP2 との結合を、イムノプロットによって確認した。(下段)ラット細胞株 INS1 832/13 にて、Exophilin-8 と RIM-BP2 との結合を、イムノプロットによって確認した。

Exophilin-8-RIM-BP2-MyosinVIIa複合体は細胞膜近傍のアクチン網領域にインスリン顆粒を局在させ、正常なインスリン分泌に必要である。

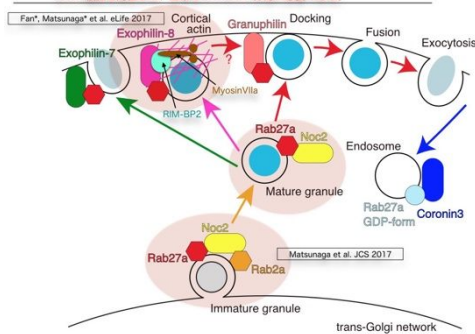


図3: Exophilin-8-RIM-BP2-Myosin-VIIa 複合体の細胞における機能モデル図

複合体は細胞辺縁部分に強く局在し、細胞膜周辺部のアクチン網領域に集まっていると考えられた。このように生化学的解析や細胞生物学的解析から、Exophilin-8 と、RIM-BP2、Myosin-7a との複合体形成が、インスリン顆粒をアクチン網領域内に留めるために必要であることを新たに発見し、この複合体がインスリンを開口放出するためのステップを制御していることを示した(図3)。

この発見により、顆粒の細胞内での位置が、

効率的にインスリン分泌をするために必要であると考えられた。本研究成果は、インスリン分泌機構の一端を明らかにしたもので、今後の糖尿病治療研究における分子標的となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Fushun Fan\*, **Kohichi Matsunaga\***, Hao Wang, Ray Ishizaki, Eri Kobayashi, Hiroshi Kiyonari, Yoshiko Mukumoto, Katsuhide Okunishi, and Tetsuro Izumi

Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-BP2 and myosin-VIIa

*eLife*. 2017;6 DOI: 10.7554/eLife.26174

(\* **Co-first authors**) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. 范福順、**松永耕一**、泉哲郎

Rab27 エフェクター Exophilin8 によるインスリン分泌制御機構 **第59回日本糖尿病学会年次学術集会** (2016年、5月)

2. 范福順、**松永耕一**、泉哲郎

Rab27エフェクター Exophilin8 ノックアウトマウスのインスリン分泌制御における解析 **第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会** (2016年、3月)

3. 范福順、**松永耕一**、泉哲郎 インスリン分泌制御における Exophilin8 たんぱく質の機能解析 **第62回北関東医学会総会** (2015、10月)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 耕一 (MATSUNAGA Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号: 20570162

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし