

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15211

研究課題名(和文)細胞は、分泌小胞の開口放出をいかに感知して、それを補充しているのか？

研究課題名(英文)How do cells prepare exocytosis of secretory granules?

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTPase Rabは、哺乳類で60種以上あり、そのGTP型に結合するエフェクター・タンパク質を介して、細胞内膜輸送の各経路を特異的に制御している。このうちRab27は、刺激に応じて、ホルモンなど生理活性物質を含む分泌小胞を細胞外に開口放出させる経路で機能する。本研究では、これまで11種知られているRab27エフェクターのうち、Noc2、Exophilin-8というエフェクター分子が、Rab27以外に別の経路で機能するRab2、Rab3とそれぞれ結合して、多段階より成る開口放出過程がスムーズに移行できるように調整している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The small GTPase family proteins, Rab, and its effector proteins that bind the GTP form of Rab, are known to regulate intracellular membrane trafficking. Among more than 60 members of mammalian Rab proteins, Rab27 specifically controls regulated secretory pathways. The present study reveals that Rab27 effectors not only controls its own step but also coordinates neighboring steps by binding other Rab proteins. For example, Noc2 binds Rab2 as well as Rab27 to regulate granule maturation and exocytosis, whereas Exophilin-8 that interacts with both Rab27 and Rab3 regulates granule capture within actin networks at the cell periphery and its fusion with the plasma membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞医科学 インスリン 膜輸送と輸送タンパク質 生体膜 内分泌学 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、細胞内オルガネラ膜輸送に関わる低分子量 GTPase Rab ファミリーのうち、Rab27 が調節性分泌経路の分泌小胞膜に特異的に局在し、その開口放出過程を制御していることを示してきた (Yi et al., *Mol. Cell. Biol.* 22, 1858-1867, 2002; Gomi et al., *Mol. Biol. Cell* 18, 4377-4386, 2007 など)。GTP と結合した活性型 Rab は、エフェクターと呼ばれるタンパク質と結合して、Rab が局在する小胞膜の輸送を担う。申請者らは、Rab27 に 11 種のエフェクターがあり、それらが、分泌小胞の皮質アクチン網への捕捉、細胞膜への繫留などに関わっていることを報告してきた (Gomi et al., *J. Cell Biol.* 171, 99-109, 2005; Mizuno et al., *Mol. Biol. Cell* 22, 1716-1726, 2011; Wang et al., *Mol. Biol. Cell* 24, 319-330, 2013 など) しか、各エフェクター分子が、多段階よりなる開口放出過程のそれぞれをどのように関連させて機能しているかは、解明されていない。

2. 研究の目的

調節性分泌経路は、あらかじめ生理活性物質を細胞内の分泌小胞に貯蔵して、外界刺激に応じてこれを迅速に細胞外に放出する。この使命を継続的に達成するには、分泌細胞は、分泌小胞が開口放出したことを感知し、新たな分泌小胞を開口放出可能な状態に準備させなければならない。分泌小胞と積み荷物質の生合成は数時間以上かかるため、刺激応答能を短期間に回復させる別の仕組みが存在するはずであるが、その機構はほとんど解明されていない。本研究では、申請者らの予備知見を基に、多段階より成る分泌小胞の開口放出過程を関連させる機構を解明し、糖尿病などホルモン分泌障害を示す疾患の病態理解や治療法開発に新たな展開を加える。

1) Rab2/Rab27 デュアル・エフェクター Noc2 の機能解析

申請者らは、インスリン分泌の分子機構を調べるために、質量分析法によって膵β細胞株 MIN6 における Rab27a 結合タンパク質の網羅的探索を行い、その中の 1 つに Rab2a を同定した。従来、Rab2a は、シスゴルジ膜に局在し、小胞体 - ゴルジ体間の輸送経路で機能するとされてきた。しかし最近、線虫を用いた遺伝学的解析により、Rab2 を欠損すると、顆粒が正常に成熟せず、分泌されるべき神経ペプチドがエンドソーム系に誤って輸送されることが報告され (Edwards et al., *J. Cell Biol.* 2009; Sumakovic et al., *J. Cell Biol.* 2009) Rab2 がゴルジ体以降の分泌過程で機能することが示された。Rab27a と Rab2a は直接結合しないことから、さらに解析を進めたところ、両者に結合するタンパク質 Noc2 を同定した。近年、他の細胞内輸送経路においても、複数の Rab タンパク質と結合して、それぞれの Rab が機能する経路を効率的に橋渡しする分子が注目されている。しかし多くの場合、一方の Rab のエフェクターが他方の Rab の

GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) として働き、GTP 型 Rab と他方の GDP 型 Rab を連結して、それぞれの Rab が関与する過程を逐次的に進行させる。一方、Noc2 は、GTP 型の Rab27 と結合している場合のみ、GTP 型の Rab2 と結合するという、これまでの例とは異なる特性を示す。また、これまで知られている Rab27 エフェクターの多くは、分泌顆粒膜を細胞膜にリクルートするなど、分泌の後期過程に作用するが、Rab2a/Noc2/Rab27a 三者複合体は、顆粒の成熟など初期過程で機能することが示唆される。本研究では、Noc2、Rab2a、Rab27a 間各相互作用の機能的意義を解明する。

2) Rab3/Rab27 と結合しうる Exophilin-8 /RIM-BP2 /Myosin-7a 複合体の機能解析

Rab27 エフェクター Exophilin-8 は、アクチン網上で働くモーター・タンパク質 Myosin-Va や Myosin-VIIa と結合し、網膜色素細胞のメラノソーム輸送に関与することが示唆されているが、個体レベルでの解析は皆無で、その機能解明が遅れている。申請者らは、本分子が、膵β細胞株 MIN6 において、インスリン顆粒を皮質アクチン網へ捕捉・集積させる作用があることを報告した (Mizuno et al., *Mol. Biol. Cell* 2011) しか、アクチン網への捕捉は、分泌顆粒の細胞膜への移行を一時的に抑制すると考えられ、そこから細胞膜での開口放出がいかにして起こるか、その機序はわかっていない。Exophilin-8 は、Rab27、アクチン、Myosin-VIIa に結合するが、申請者らのマス解析により、RIM-BP2 という分子にも結合することが判明した。RIM-BP2 は、元々、神経シナプス小胞やインスリン顆粒の開口放出を制御する Rab3 エフェクター RIM の結合タンパク質として同定された分子であることから、Exophilin-8 複合体は、Rab27 のみならず、RIM-BP2、RIM を介して Rab3 とも結合しうることになる。本研究では、これらの未発表知見を基に、分泌顆粒を細胞辺縁部アクチン網から細胞膜へ受け渡す過程の分子基盤を、個体レベル、分子レベル両面から明らかにする。

3. 研究の方法

1) Rab2/Rab27 デュアル・エフェクター Noc2 の機能解析

膵β細胞では、生成後間もない新しい成熟顆粒が選択的に開口放出されることが知られているが、その機序として、未成熟顆粒膜上の Rab2a が Noc2/Rab27a 複合体をリクルートすることによって、新しい顆粒を開口放出過程へ優先的に橋渡しする可能性が考えられる。まず、Noc2 の種々の変異体を作製し、それぞれの Rab が結合する領域を同定し、Rab27 結合活性は保持するが Rab2 結合活性を欠損する変異体、両 Rab への結合活性を失った変異体を作製する (Rab2 は、Rab27 と結合した Noc2 にのみ結合できるため、Rab2 結合活性は保持し、Rab27 結合活性のみ失う変

異体は作製できない)。これら Noc2 変異体を安定的に発現させた INS-1 膵β細胞株において、内在性野生型 Noc2 を shRNA により特異的にノックダウンし、Noc2 変異体のみ発現する細胞を構築する(外来性に発現した Noc2 変異体は shRNA 抵抗性の塩基配列にデザインする)。この細胞株において、Noc2 変異体の細胞内分布、インスリン含量、分泌への影響を調べる。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド存在下、³⁵S メチオニンによるパルスチェイス・ラベル実験を行い、顆粒内タンパク質プロインスリンがプロセッシングされる過程への影響を解析する。

2) Rab3/Rab27 と結合しうる Exophilin-8/RIM-BP2/Myosin-7a 複合体の機能解析

まず、Exophilin-8 欠損マウスを作製し、その耐糖能、単離膵島からのインスリン分泌能、また、電子顕微鏡下、膵β細胞内インスリン顆粒の分布を調べる。次に、Exophilin-8 と RIM-BP2 の結合に関与する分子内領域を調べ、RIM-BP2 と結合できない Exophilin-8 変異体を見出し、この変異体を Exophilin8 欠損膵β細胞に発現させ、野生型同様にインスリン顆粒の細胞辺縁部への集積や開口放出の促進を引き起こすかを調べる。また、Exophilin-8 と結合する他のタンパク質 Rab27、アクチン、Myosin-VIIa や、RIM-BP2 に結合する RIM、Munc13-1 (プライミング因子)、Ca_v1.3 チャネル(分泌のトリガーとなる Ca²⁺ を流入させる)など、複合体構成因子 1 つ 1 つをノックダウンして、インスリン顆粒の集積や開口放出に対する影響を調べ、複合体形成のキーとなる第一義的分子を特定する。

4. 研究成果

1) Rab2/Rab27 デュアル・エフェクターNoc2の機能解析

Rab2a-Noc2-Rab27a 三者複合体は、核周囲の未成熟顆粒に特異的に局在するのに対して、Noc2-Rab27a 二者複合体は、細胞辺縁部の成熟顆粒に局在することを示した。次に、*in vitro* の系で、Noc2 は、Rab27a と結合した後にはじめて Rab2a と結合できること、Rab2a の結合に必要な Noc2 領域は Rab27a 結合領域とは異なることを見出した。Rab2a に結合できない Noc2 変異体を作製したところ、この変異体は、野生型 Noc2 と異なり、グルコース依存性のインスリン分泌を促進できなかった。Rab2a をノックダウンすると、Noc2 の発現が消去されるとともに、細胞質に散在していたインスリン顆粒が核周囲のゴルジ体近傍に集積し、細胞内インスリン含量、インスリン分泌がともに低下し、前駆体プロインスリンからインスリンへのプロセッシングも低下した。一方、Rab27a をノックダウンすると、インスリン分泌は低下するが、開口放出不能の分泌顆粒が細胞内に蓄積し、インスリン含量は逆に増大した。また、Noc2 をノックダウンすると、インスリン分泌は低下するが、両 Rab の機能低下を反映するかのよう

に、インスリン含量は変化せず、代わりに前駆体プロインスリン含量が増えた。これらの結果は、デュアル・エフェクターNoc2 が、Rab2a が機能する分泌顆粒生成過程と、Rab27a が機能する分泌顆粒開口放出過程の橋渡しをしていることを示唆する(以上、Matsunaga et al., J. Cell Sci., 2017 に報告)

2) Rab3/Rab27 と結合しうる Exophilin-8/RIM-BP2/Myosin-7a 複合体の機能解析

Exophilin-8 欠損マウスを作製し、その膵細胞を調べたところ、細胞膜周辺部のアクチン網領域に集まっているはずのインスリン顆粒が失われ、その結果、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 は、これまで示唆されていた Myosin-Va や-VIIa との直接結合ではなく、RIM-BP2 という分子を介する Myosin-VIIa との間接的な結合によって、分泌顆粒を皮質アクチン網に集積させることを見出した。RIM-BP2 との結合活性を失わせた Exophilin-8 変異体は、インスリン顆粒をアクチン網領域内に留めることができず、同時にその開口放出を促進させる作用を失うことから、本複合体の形成は、インスリンの効率的な分泌に必要であることを明らかにした(以上、Fan et al., Elife 2017 に報告)

これらの知見は、これまで解明が十分でなかった、細胞内深部における分泌顆粒膜の輸送機構を明らかにしたもので、見出された Rab27 エフェクター複合体は、今後の糖尿病などホルモン分泌不全を示す疾患治療の分子標的となる可能性がある。

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 2件)

Matsunaga K, Taoka M, Isobe T, and Izumi T (2017). Rab2a and Rab27a cooperatively regulate the transition from granule maturation to exocytosis through the dual effector Noc2. 査読有, J. Cell Sci., 130, 541-550.

DOI: 10.1242/jcs.195479

Fan F, Matsunaga K, Wang H, Ishizaki R, Kobayashi E, Kiyonari H, Mukumoto Y, Okunishi K, and Izumi T (2017). Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-BP2 and myosin-VIIa. 査読有, Elife, 6, e26174.

DOI: 10.7554/eLife.26174

[学会発表](計 8件)

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、京都、2016 年 5 月 19-21

日。

Tetsuro Izumi. Novel functions of Rab27 effector proteins in insulin granule exocytosis. The seventh International Symposium on Bioanalysis, Biomedical Engineering, and Nanotechnology (ISBBN2016), Funan University, Changsha, China, May 26-30, 2016.

水野 広一、泉 哲郎。インスリン顆粒を細胞膜に繋ぎ止めるドッキング装置の超解像顕微鏡を用いたナノ構造解析。第 68 回日本細胞生物学会大会、京都、2016 年 6 月 15 日-17 日。

Tetsuro Izumi. Novel roles of Rab27 effectors in regulated exocytosis of secretory granules. The 2nd IMCR Symposium on Endocrinology and Metabolism: International Frontiers in Homeostatic Regulation Research. Maebashi, Nov 10-11, 2016.

Tetsuro Izumi. Novel functions of Rab27 effector proteins in insulin granule exocytosis. Japan Diabetes Innovation Summit, Kyoto University, Kyoto, Japan, 29-30 November, 2016.

泉 哲郎。Rab27 エフェクターによるインスリン分泌顆粒開口放出制御機構。群馬大学・秋田大学連携 第 5 回生体情報研究シンポジウム、秋田、2017 年 2 月 17 日。

王 昊、水野 広一、奥西 勝秀、泉 哲郎。Rab27 エフェクター蛋白質メラノフィリンのインスリン分泌における役割。第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、京都、2017 年 5 月 18-20 日。

Tetsuro Izumi, Fushun Fan, and Kohichi Matsunaga. The Rab27 effector, exophilin-8, assembles insulin granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-binding protein and myosin-VIIa. EASD 2017, Lisbon, Portugal, Sep 14, 2017.

〔図書〕(計 1 件)

泉 哲郎 (2017). 調節性分泌経路における分泌顆粒の細胞膜ドッキングとプライミングの分子基盤と機能的意義. 生化学 89, 797-807.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()