

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09838

研究課題名(和文) GDP型Rab27a変換機構の解明とインスリン分泌後のエンドサイトーシス

研究課題名(英文) Endocytosis after insulin secretion in pancreatic beta-cells

研究代表者

木村 俊秀 (Kimura, Toshihide)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：60404373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは、血糖値の上昇に応じて分泌される血糖降下ホルモンであり、その分泌異常が糖尿病の病因のひとつである。インスリン分泌後の過程に位置付けられるエンドサイトーシスは、適切なインスリン分泌を行う上で必須であるが、その知見は未だ乏しい。わたしはこれまでに、GDP型Rab27aがエンドサイトーシスを制御することを明らかにしてきた。そこで、本研究ではGDP型Rab27aを制御する機構の解明を試み、GaがGDP型Rab27aシグナルの上流に位置することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンを取り囲んでいた膜成分や分泌に関わった分子は、分泌後に細胞内へ回収されなくては、次の分泌に備えられないばかりか(インスリン分泌不全)、細胞膜上への過度な集積が生じて細胞死を引き起こす(インスリン分泌細胞の脱落)。そのため、エキソサイトーシスのみを促進するこれまでの糖尿病治療薬は、長期投与により治療薬の効果が弱まるとともに、インスリン分泌細胞が疲弊する。本研究は、エンドサイトーシスシグナルの全貌を解明することで、エンドサイトーシスをターゲットとした新しい薬物を開発する基盤になり得る。

研究成果の概要(英文)：Impaired insulin secretion in response to glucose plays an important role in the pathogenesis of diabetes mellitus. Although endocytosis of secretory membranes after insulin release is essential for the tight control of insulin secretion, knowledge about this process in pancreatic beta-cells is still limited. Here, I searched for Rab27a-GAP interacting proteins and identified Ga. I found that Ga interacts with Rab27a-GAP, which is required for endocytosis after insulin secretion.

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：糖尿病 インスリン 膵B細胞 シグナル伝達 プロテオーム タンパク質 低分子量Gタンパク質 Rab27a

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病の大半を占める2型糖尿病の原因としては、血糖(血中のグルコース)を下げるホルモンであるインスリンの分泌障害が大きな割合を占める。よって、糖尿病治療薬を創出するためには、グルコース刺激によってインスリンが分泌されるメカニズムを明らかにする必要がある。

インスリンは、それを取り囲む顆粒膜と細胞膜との融合により細胞外に分泌される(図1)。SU薬に代表されるこれまでの糖尿病治療薬は、膜同士の融合を促進するが、開口放出後の過程(エンドサイトーシス)には影響を及ぼさない。そのため、治療薬投与後の細胞では、インスリンを囲んでいた膜成分や分泌に関わった分子が過度に細胞膜上へ集積し、結果的にインスリン分泌細胞の疲弊をひき起こす。申請者は、エンドサイトーシスを促進する薬を開発し併用することで、細胞を疲弊させることなく長期にわたり適切なインスリン分泌を実現できると考えている。

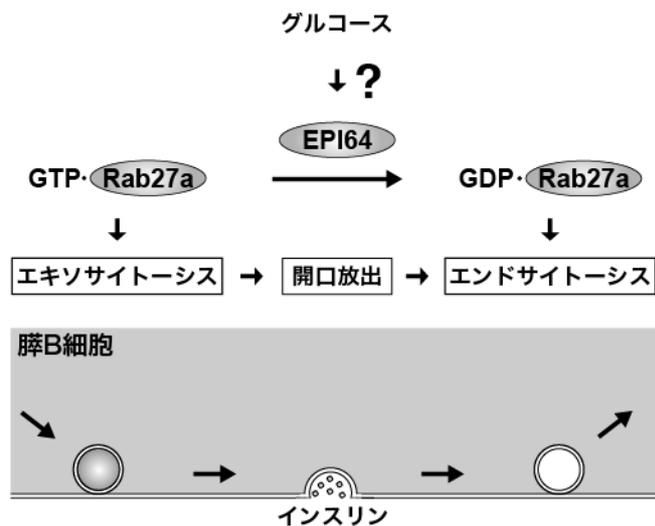


図1 Rab27aによる分泌前後の制御

申請者はこれまで、独自のプロテオーム解析により、シグナル伝達に関わる分子を網羅的に探索し、成果をあげてきた(Nature Cell Biol. 4,583-91,2002; J.Neurochem. 93,1371-82,2005)。そこで、この手法を用いてインスリン分泌の司令塔である Rab27a に結合するタンパク質を探索したところ、GTP型 Rab27a に結合する分子に加えて(Dev. Cell 16,675-86,2009)、これまで機能を有さないと考えられてきた GDP型 Rab27a に結合する分子を複数同定した(JCS 121,3092-8,2008; MCB 33,4834-43,2013)。さらに、これらの分子が、エンドサイトーシスを制御すること(BBRC 395,318-23,2010; ABB 496,33-7,2010)、その上流には EPI64 の活性化が必要であることを明らかにした(JCS 129,637-49,2016 : 図1)。しかしながら、インスリン分泌を惹起するグルコースとエンドサイトーシスを開始する EPI64 の間をつなぐシグナル伝達経路は未だ不明である。

2. 研究の目的

申請者は、EPI64 に結合する分子として新たに 3 量体 G タンパク質の α サブユニット($G\alpha$)を同定した(未発表データ)。 $G\alpha$ は、細胞膜直下において G タンパク質共役受容体(GPCR)や $G\beta\gamma$ と不活性な複合体を形成している(図2)。リガンドと結合した GPCR により GTP 型に変換された $G\alpha$ は複合体から解離し、細胞内にシグナルを伝達する。

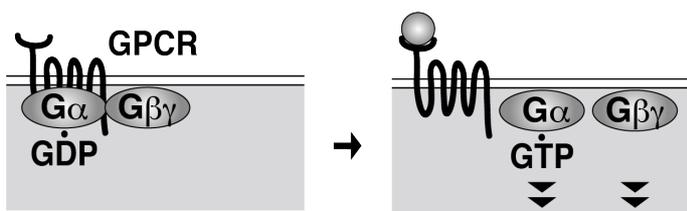


図2 $G\alpha$ の活性化

本研究では、EPI64 の新たな結合パートナーである $G\alpha$ が果たす役割を検討することで、グルコースで開始されるエンドサイトーシスのシグナルを分子レベルで解析する。

3. 研究の方法

本申請研究では、EPI64 とその結合タンパク質である $G\alpha$ が、グルコースによるエンドサイトーシスを制御する分子メカニズムを、右図に従って解明する。平成 29 年度は、EPI64 と $G\alpha$ の結合を評価する。平成 30 年度は、 $G\alpha$ が EPI64 を活性化するメカニズムを解析する。平成 31 年度は、 $G\alpha$ の上流に位置するレセプターの探索と機能解析を行う。

$G\alpha$ が制御するエンドサイトーシス

結合は？

どのような複合体を形成しているのか？

下流は？

EPI64の活性に及ぼす影響は？

上流は？

$G\alpha$ の活性を制御するレセプターは？

(1) EPI64 と $G\alpha$ の結合様式

EPI64 と $G\alpha$ の結合様式を生化学的手法で調べる。具体的には、精製タンパク質を用いた結合実験により、EPI64 と $G\alpha$ の結合の特異性、結合サイト、

解離定数(Kd)、複合体の性質を調べる。

(2) Ga による EPI64 の活性制御機構

申請者は、グルコースが細胞膜上のリン脂質 PIP3 の産生を介して EPI64 を活性化することを報告した (JCS 129, 637-49, 2016)。申請者は最近、Ga の発現抑制 (Ga-KD) が、グルコースによる PIP3 の産生を抑制することを見出した (未発表データ)。そこで、Ga が PIP3 産生酵素である PI3 キナーゼの細胞内動態や活性化に及ぼす影響を調べる。

(3) Ga と共役するレセプターの探索

グルコースによるエンドサイトーシスに Ga が関与する上記結果は、グルコースをリガンドとして認識するレセプターの存在を示唆している (図 2)。そこで、新規 Ga 結合分子の探索とその機能解析により、グルコースレセプターの同定を試みる。

4. 研究成果

(1) EPI64 と Ga の結合様式

まず、Ga の特異的抗体とリコンビナントタンパク質を作製した。次に、免疫沈降実験と精製タンパク質を用いた結合実験より、Ga と EPI64 が細胞内で複合体を形成すること、その結合が直接で特異的であることを明らかにした。次に、EPI64 のフラグメントを作製し、Ga 結合ドメインを同定した。さらに、同定した結合部位をもとにドミナントネガティブ/アクティブ変異体の作製を行った。また、マウス臍切片を免疫染色し、EPI64 と Ga が臍 B 細胞で共発現していることを明らかにした。

(2) Ga による EPI64 の活性制御機構

まず、Ga には、2 つのシグナル経路が備わっている。GTP 型に変換された Ga と、Ga の変換によって解離し活性を示す $G\beta\gamma$ である。そこで、どちらの分子が PIP3 産生を制御しているのかを調べた。具体的には、非刺激状態の MIN6 細胞に GTP 型や GDP 型 Ga を発現し、Ga シグナルの PIP3 産生への寄与を検討した。また、 $G\beta\gamma$ の寄与は、阻害剤 Gallein を用いて検討した。次に、グルコースによるエンドサイトーシスに関与する PI3 キナーゼの同定を試みた。さらに、MIN6 細胞をグルコースで刺激し、同定した PI3 キナーゼの細胞内動態を解析した。また、Ga のノックダウンや過剰発現、 $G\beta\gamma$ 阻害剤が PI3 キナーゼの細胞内動態に及ぼす影響を検討した。

(3) Ga と共役するレセプターの探索

まず、Ga の GST 融合タンパク質を大量培養し、精製した。次に、GST-Ga をリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィを行った。具体的には、培養臍 B 細胞である MIN6 の抽出液を GST-Ga カラムにアプライし、洗浄後に結合タンパク質を塩で溶出した。次に、溶出画分を SDS-PAGE で分離した後に銀染色を行い、Ga に特異的に結合するタンパク質の候補を複数選別した。最後に、ゲルからタンパク質を抽出し、LC-MS/MS により Ga 結合タンパク質を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Terabayashi T, Hanada K, Motani K, Kosako H, Yamaoka M, Kimura T, Ishizaki T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Baicalein disturbs the morphological plasticity and motility of breast adenocarcinoma cells depending on the tumor microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 466-479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Y, Mizuno Y, Suganuma K, Shiroto K, Ikeda T, Yamashita K, Kimura T, Yamauchi K, Aizawa T	4. 巻 65
2. 論文標題 Pharmacokinetics of insulin disappearance after massive overdosing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1147-1153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0118.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura T, Yamaoka M, Terabayashi T, Kaibuchi K, Ishikawa T, Ishizaki T	4. 巻 42
2. 論文標題 GDP-bound Rab27a dissociates from the endocytic machinery in a phosphorylation-dependent manner after insulin secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1532-1537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00242.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka M, Terabayashi T, Nishioka T, Kaibuchi K, Ishikawa T, Ishizaki T, Kimura T	4. 巻 140
2. 論文標題 IRR is involved in glucose-induced endocytosis after insulin secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Sci.	6. 最初と最後の頁 300-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2019.07.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村俊秀、山岡真美、石崎敏理、石川智久
2. 発表標題 インスリン分泌後のエンドサイトーシス制御機構の解析
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村俊秀、姫野冴美、山岡真美、寺林健、石崎敏理
2. 発表標題 GDP型Rab27a新規結合タンパク質の同定とエンドサイトーシスの制御
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村俊秀、姫野冴美、山岡真美、寺林健、石崎敏理
2. 発表標題 インスリン分泌後のエンドサイトーシス
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山岡真美、荒巻千香子、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
2. 発表標題 膵B細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第60回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村俊秀
2. 発表標題 Endocytosis after insulin secretion
3. 学会等名 第60回 日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岡真美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
2. 発表標題 膵B細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの解析
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山岡真美	4. 発行年 2017年
2. 出版社 株式会社 先端医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 Diabetes Strategy	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----