

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18689008

研究課題名（和文） 開口放出様式を制御する分子機構の可視化解析

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of hormone release revealed by live cell imaging analysis

研究代表者

坪井 貴司（TSUBOI TAKASHI）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：80415231

## 研究成果の概要：

私達の身体は環境変化に対応するため、ホルモンを分泌することにより体内の恒常性を一定に保っている。この機構の破綻は、アレルギー、糖尿病等の種々の疾患に直結する。しかしホルモン分泌の詳細な分子メカニズムについては解明されていない。そこで、超高感度、超高解像度を持つ蛍光顕微鏡を新規開発し、内分泌細胞から起こるホルモン分泌反応を直接可視化計測することに成功した。そして、ホルモン分泌制御機構の詳細な分子メカニズムの一端を解明した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	21,300,000	6,390,000	27,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：可視化、生体分子、生理学、蛋白質、脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

エキソサイトーシスの際には、細胞質に存在する分泌顆粒が細胞膜と融合し、分泌顆粒内容物を細胞外に放出する。エキソサイトーシス反応後の分泌顆粒動態については、3つの仮説が提唱されている。第1の仮説は、分泌顆粒膜が細胞膜と完全に融合し、その後開口放出部位から離れた部位でクラスリンコートされた小胞として回収されるというものである（full Fusion型）。第2の仮説は、分泌顆粒膜が細胞膜と短時間だけ融合し、その後

クラスリンコートされずそのまま分泌顆粒の形を保ちながらエンドソームに戻り、そこで内容物が再充填されるというものである（kiss and run型）。最後の仮説は、分泌顆粒が細胞膜と顆粒の形を保ちながら長時間融合し、その顆粒に対して新たな分泌顆粒が膜融合し2次的な開口放出を繰り返すというものである（sequential型）。しかしながら、どのような分子機構でこの3種類のエキソサイトーシスが制御されているのかは全く解明されていない。

## 2. 研究の目的

内分泌細胞内には、ホルモンを含む分泌顆粒が存在する。細胞外からの刺激に素早く反応し分泌を行うためには、あらかじめ細胞膜と分泌顆粒はドッキングした状態にあると考えられている。分泌により細胞膜にドッキングしている分泌顆粒数が減少すると、細胞内の分泌顆粒が順次細胞膜へと運ばれ補充されると同時に、新たな分泌顆粒が産生されると考えられているが、どのような機構で細胞膜へ運ばれドッキングし、そして新たな分泌顆粒が産生されるのかについては、ほとんど解明されていない。そこで、(1)分泌顆粒の細胞膜への補充機構には何らかの選別機構およびセンサーがあるのか、(2)新たな分泌顆粒の産生機構にはどのようなシグナル伝達があるのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ホルモン分泌顆粒の分泌メカニズムを全反射蛍光顕微鏡にてリアルタイムで可視化するシステムを構築した。全反射蛍光顕微鏡は、標本のごく一部の浅い部分領域内(100 ナノメートル範囲)の蛍光プローブを特異的に検出できる。つまり、カバーガラス上に存在する細胞膜領域の蛍光変化を観察することが可能となり、単一カテコールアミン分泌顆粒のドッキング、プライミング、融合、および細胞膜方向への輸送動態の解析に適している。本研究課題ではこの全反射蛍光顕微鏡を用い、蛍光タンパク質で標識したホルモン分泌顆粒の時空間的動態をリアルタイムで可視化し、ホルモン分泌制御タンパク質群によるホルモン分泌制御機構の解明を試みた。さらに、RNA 干渉法を用いてホルモン分泌制御タンパク質群を特異的に抑制した際のホルモン分泌動態への影響を可視化解析した。

## 4. 研究成果

(1) ฮอร์โมน分泌顆粒の輸送を司る低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーは、ホルモン分泌顆粒の細胞膜方向への輸送、細胞膜へのドッキング、融合の「センサー」として機能すると推測されている。60 種類存在する Rab ファミリーのうち、Rab3A と Rab27A 結合蛋白質であるシナプトタグミン様蛋白質ファミリー (synaptotagmin like protein: Slp) がホルモン分泌顆粒輸送制御分子として同定された。しかし、Slp ファミリーがホルモン分泌をどのように制御しているのかについては、不明である。そこで緑色蛍光蛋白質 (green

fluorescent protein: GFP) 結合 Slp ファミリーをホルモン分泌のモデル細胞である副腎髄質クロマフィン細胞由来 PC12 細胞に過剰発現させ、エキソサイトーシス反応及び、ホルモン分泌顆粒の細胞膜とのドッキングへの影響を全反射蛍光顕微鏡により可視化解析した。その結果、すべての Slp ファミリーがホルモン分泌顆粒膜上に局在し、特に Slp3-a 及び Slp5 がエキソサイトーシス反応を促進した。一方、Slp4-a は、ホルモン分泌顆粒の細胞膜とのドッキング過程を促進するにも関わらず、エキソサイトーシス反応数を抑制した。そこで、この Slp4-a の機能について詳細な解析を行った。その結果、ホルモン分泌顆粒膜上の Rab27A に Slp4-a の Rab 結合領域が結合し、Slp4-a の linker 領域に細胞質内の Munc18-1 が結合し、さらに Munc18-1 が細胞膜上の syntaxin-1a と結合することによって形成されるタンパク質複合体により、ホルモン分泌顆粒を細胞膜上につなぎとめ、エキソサイトーシス反応を抑制することを見出した (図 1)。

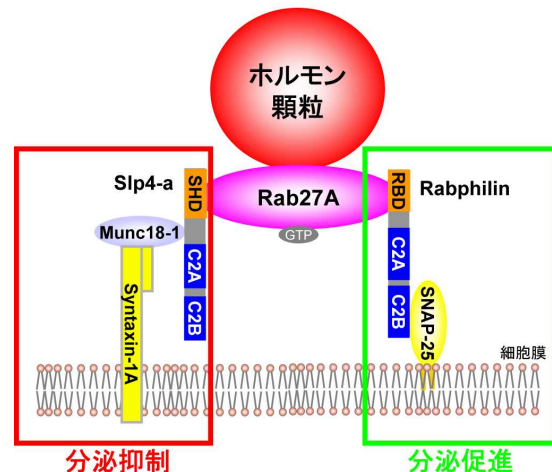


図 1 ホルモン分泌顆粒ドッキング機構

また同様のメカニズムで、Rabphilin は、細胞膜上の SNAP-25 と結合することによって細胞膜上にホルモン分泌顆粒をつなぎとめ、エキソサイトーシス反応を促進することも見出した (図 1)。

(2) Full fusion 型、kiss and -run 型、そして sequential 型エキソサイトーシスを制御する因子の一つとして、カルシウムイオンが 1 つの候補に挙げられている。分泌顆粒膜上には、カルシウムイオンの濃度変化を感受するカルシウムセンサーが必要であると考えられており、現在ではシナプトタグミン (Syt) ファミリーがこの役割を担っていると考えられている。そこでホルモン分泌顆粒の full fusion 型、kiss and -run 型、そして sequential 型エキソサイトーシスを制御する Syt の同定を試みた。

PC12 細胞に野生型シナプトタグミン 7 (SytVII-WT) を過剰発現させるとホルモン分泌が促進される結果が得られた。次に SytVII-WT に GFP を結合させたコンストラクト (SytVII-WT-GFP)、または、カルシウム結合能を欠損させた SytVII 変異体に GFP を結合させたコンストラクト (SytVII-DN-GFP) を恒常的に発現する PC12 細胞株を樹立し、全反射蛍光顕微鏡を用いてホルモン分泌動態を可視化解析した。SytVII-WT-GFP の恒常的発現は、PC12 細胞からのニューロペプチド Y-Venus の分泌を促進したが、SytVII-DN-GFP は、分泌を抑制した。さらに、SytVII-GFP の恒常的発現は、分子サイズの大きい CFP 標識した組織型プラスミノゲン活性化因子の full fusion 型エキソサイトーシス数を増加させたが、SytVII-GFP の発現ではそのような現象は観察されなかった。以上のことから、SytVII は、融合孔の大きさを調節することによりホルモン分泌量を制御していることが明らかになった (図 2)。

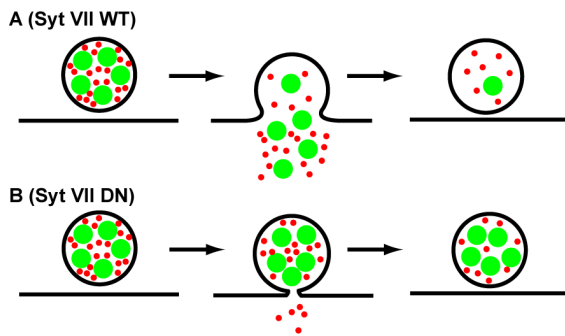


図 2 シナプトタグミンによるホルモン分泌様式の制御機構のモデル図

(3) ホルモン分泌顆粒の細胞膜とのドッキング、プライミング、細胞膜との融合の制御に、Rab3A あるいは Rab27A が関与することが示唆されていた。しかしながら、Rab3A と Rab27A 以外の機能未同定 Rab によってホルモン分泌顆粒のドッキングが制御されている可能性については、これまで全く検討されていなかった。

PC12 細胞を用い、ホルモン分泌顆粒に局在する Rab のスクリーニング解析を行った。GFP 標識した 60 種類の Rab を PC12 細胞に強制発現させた結果、ホルモン分泌顆粒には、Rab3A、27A、33A、37 の 4 種の Rab が局在し、そのうち Rab3A、27A、33A が PC12 細胞に内在性発現していることが明らかとなった。そこで、RNA 干渉法 (siRNA) を用いて内在性の Rab3A、27A、33A を特異的に単独ノックダウンした。その結果、Rab3A 及び Rab27A に対する siRNA は、細胞膜上にドッキングしているホルモン顆粒

数およびエキソサイトーシス反応数を有意に減少させることが全反射蛍光顕微鏡の可視化解析から明らかになった。一方、Rab33A に対する siRNA は、何の影響も与えなかった。すなわち、Rab3A 及び Rab27A は、ホルモン分泌顆粒のドッキング機構を制御していることが明らかになった。そこでホルモン分泌顆粒と細胞膜とのドッキングは、Rab3A と Rab27A によって共同制御されるのか、あるいは、個別制御されるのかを解明するために、内在性 Rab3A と Rab27A の局在を検討した。その結果、Rab3A と Rab27A は同一ホルモン分泌顆粒上に存在した。次に、Rab3A と Rab27A の同時ノックダウンを行った。その結果、Rab3A (または Rab27A) 単独ノックダウンよりも有意に細胞膜上にドッキングしているホルモン分泌顆粒数およびエキソサイトーシス反応数が減少することが明らかになった。以上の結果から、Rab3A と Rab27A が共同してホルモン分泌顆粒を細胞膜上にドッキングさせる機構を解明した。

## 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 16 件)

Ohata S, Kinoshita S, Aoki R, Tanaka H, Wada H, Tsuruoka Kinoshita S, Tsuboi T, Watabe S and Okamoto H. Neuroepithelial cells require fucosylated glycans to guide the migration of vagus motor neuron progenitors in the developing zebrafish hindbrain. *Development*, In press, 2009 査読有

Maekawa F, Tsuboi T and Pellerin L. Regulation of the intracellular distribution, cell surface expression, and protein levels of AMPA receptor GluR2 subunits by the monocarboxylate transporter MCT2 in neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*, In press, 2009 査読有

Tsuboi T. Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Neuroscience*

Research 63, 83-88, 2009. 査読有

Ravier MA, Tsuboi T, Rutter GA. Imaging a target of  $Ca^{2+}$  signalling: Dense core granule exocytosis viewed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods* 46, 233-238, 2008. 査読有

Tsuboi T. Molecular mechanism of docking of dense core vesicle to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Medical Molecular Morphology* 41(2), 68-75, 2008. 査読有

Tsuboi T. Rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Physiological Sciences* 58 (Suppl.), S61, 2008. 査読有

Tsuboi T, Kanno E, Fukuda M. The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 100, 770-779, 2007. 査読有

Tsuboi T, Fukuda M. Role for synaptotagmin VII in fusion pore dynamics revealed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Neuroscience Research* 58 (suppl.1), S136, 2007. 査読有

坪井貴司 (2007). Live cell imagingによる細胞活動の可視化解析. 日本比較内分泌学会ニュース. 124, 45-53.

Tsuboi T, Fukuda M. Synaptotagmin VII modulates the kinetics of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Genes to Cells* 12, 511-519, 2007. 査読有

Tsuboi T, Ravier MA, Parton LE, Rutter GA. Sustained exposure to high glucose concentrations modifies glucose signaling and the mechanics of secretory vesicle fusion in primary rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 55, 1057-1065, 2006. 査

読有

Tsuboi T, Fukuda M. The Slp4  $\alpha$  linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1-syntaxin-1a complex. *Molecular Biology of the Cell* 17, 2101-2112, 2006. 査読有

Tsuboi T, Fukuda M. Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Journal of Cell Science* 119, 2196-2203, 2006. 査読有

Rutter GA, Varadi A, Tsuboi T, Parton LE, Ravier MA. Insulin secretion in health and disease: genomics, proteomics and single vesicle dynamics. *Biochemical Society Transactions* 34, 247-250, 2006. 査読有

Rutter GA, Tsuboi T, Ravier MA.  $Ca^{2+}$  microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* 40, 539-551, 2006. 査読有

Tsuboi T, Fukuda M. Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking of dense core vesicle. *Neuroscience Research* 55 (suppl. 1), S68, 2006. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

坪井貴司. 細胞表面可視化法によるホルモン分泌メカニズムの解明 東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点成果発表会 2008年12月12日 東京大学 (東京)

坪井貴司. 全反射蛍光顕微鏡を用いた開口放出反応の可視化解析 「見る生物学3 イメージングの挑戦」文部科学省特定領域研究「植物メリステム」班会議 2008年11月21日 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良)

坪井貴司. Rabエフェクタータンパク質によるホルモン分泌制御機構の可視化

解析 第 81 回日本内分泌学会学術総会  
2008 年 5 月 17 日 青森

坪井貴司. Rabphilin によるホルモン分泌顆粒ドッキング制御機構の可視化解析 第 85 回日本生理学会大会 2008 年 3 月 26 日 東京

坪井貴司. カテコールアミン産生腫瘍細胞を用いたホルモン分泌制御機構の可視化解析 第 48 回日本組織細胞化学会総会、第 39 回日本臨床分子形態学会総会 2007 年 9 月 28 日 甲府

坪井貴司, 福田光則 シナプトタグミン 7 による調節性分泌制御機構の可視化解析 第 30 回日本神経科学学会大会 2007 年 9 月 11 日 横浜

坪井貴司. Live cell imaging によるホルモン分泌顆粒ドッキング機構の解析. 第 3 回先進治療学セミナー 順天堂大学医学部先進糖尿病治療学・内科代謝内分泌学セミナー 2007 年 6 月 18 日 順天堂大学医学部 (東京)

坪井貴司. Live cell imaging によるホルモン分泌顆粒輸送分子機構の解析. 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター若手研究者セミナー 2007 年 6 月 12 日 東京大学 (東京)

坪井貴司. Recruitment, docking, and fusion of hormone vesicles distinctively revealed by total internal reflection fluorescence microscopy in live neuroendocrine cells. 第 2 回理化学研究所フロンティア研究システム研究成果発表会 2007 年 5 月 18 日 理化学研究所 (和光)

坪井貴司. ホルモン分泌顆粒ドッキング機構の分子メカニズムの解明. 第 87 回日本生理学会大会 2007 年 3 月 20 日 大阪

坪井貴司, 福田光則. ホルモン顆粒輸送分子機構の生細胞イメージング解析. 日本下垂体研究会 第 21 回学術集会 2006 年 8 月 2 日 静岡

坪井貴司, 福田光則. Rab3A と Rab27A に

よるホルモン分泌顆粒ドッキング制御機構の可視化解析. 第 29 回日本神経科学学会大会 2006 年 7 月 21 日 京都

Tsuboi T and Fukuda M. Role of Slp family proteins in regulated exocytosis in neuroendocrine cells. 20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress 2006 年 6 月 20 日 京都

〔その他〕

<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/labs/tsuboi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 貴司 (TSUBOI TAKASHI)  
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
研究者番号: 80415231

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者