

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14647

研究課題名(和文)皮質アクチンに捕捉された分泌顆粒の開口放出機序

研究課題名(英文)Molecular mechanism of exocytosis from secretory granules that have been trapped into the cortical actin network

研究代表者

王 昊(Wang, Hao)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：70775874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：全反射顕微鏡下、蛍光タンパク質で標識した分泌顆粒を有する膵細胞を観測すると、細胞膜上に局在する顆粒からの開口放出以外に、細胞内部より細胞膜直下に動員され、そのまま迅速に膜融合する顆粒の開口放出が認められる。本研究では、単量体GTPase Rab27のエフェクター・タンパク質 Melanophilinを欠く膵細胞で、このタイプの開口放出が特異的に減少することを明らかにした。Melanophilinは、分泌刺激後の細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇に反応して、皮質アクチン網内のMyosin-5aより解離し、代わりに細胞膜上の活性化型Syntaxin-4と結合して、上記タイプの開口放出を仲介することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安定的な細胞膜ドッキングを介さずに、細胞内部から動員される顆粒からの開口放出は、特にグルコース刺激後に多く認められ、持続的なインスリン分泌に重要な機構と考えられるが、その分子機序はわかっていなかった。本研究は、その分子機序を明らかにし、今後、刺激依存性に開口放出可能な機能的顆粒プール形成を促進するという、糖尿病の新たな治療戦略とその分子標的を創出・提示する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Direct observation of fluorescence-labeled secretory granule exocytosis in living pancreatic cells has revealed that some granules fuse immediately once they are recruited to the plasma membrane. We show that melanophilin, one of the effectors of the monomeric GTPase Rab27 on the granule membrane, is involved in such an accelerated mode of exocytosis. Both melanophilin-mutated leaden mouse and melanophilin-downregulated human pancreatic cells exhibit impaired glucose-stimulated insulin secretion, with a specific reduction in fusion events that bypass stable docking to the plasma membrane. Melanophilin mediates this type of fusion by dissociates granules from myosin-5a and actin in the actin cortex and associates them with a fusion-competent, open form of syntaxin-4 on the plasma membrane in stimulus-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise-dependent manners, which provides the hitherto unknown mechanism to support sustainable exocytosis from granules in the cell interior.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：インスリン分泌 Rabエフェクター 全反射顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分泌細胞を含むすべての細胞は、細胞の形状、統合性を保つために、細胞膜直下に皮質アクチンと呼ばれるマイクロフィラメント網を有している。皮質アクチン網は、トランス・ゴルジネットワークで形成される分泌顆粒が、細胞膜と融合する前に通り抜けなければならない障壁になりうる。実際、薬物処理によりアクチンを脱重合させると、分泌顆粒の開口放出は増大するが、このような細胞骨格を破壊する処理は、膜輸送機構の生理的な過程を覆い隠してしまう可能性が高い。たとえば、皮質アクチンとそこで働く Myosin-5a などのモーター・タンパク質は、細胞膜近傍に分泌顆粒を捕捉・輸送し、開口放出可能なプールを維持するという実験的証拠が報告されている。しかし、分泌顆粒がいかにアクチン網に統合し、次の膜融合に備えるのか、詳しい分子機序はわかっていない。本研究では、この過程に働くと考えられる、単量体 GTPase Rab27 のエフェクター・タンパク質に着目して、その機能を生細胞で解析することによって、皮質アクチンに捕捉された分泌顆粒の開口放出機序を解明する。

### 2. 研究の目的

私たちは、単量体 GTPase Rab27 と、その GTP 結合型に結合して膜輸送を担うエフェクター・タンパク質が、調節性分泌経路で特異的に機能することを世界に先駆けて見出し、その役割を解析してきた。これまで 11 種知られている Rab27 エフェクターのうち、Melanophilin、Exophilin-8 は、分泌顆粒膜上の Rab27 と結合するのみならず、アクチン束上で働くモーター・タンパク質 Myosin-5a や-7a に結合活性を持ち、皮質アクチン網内における分泌顆粒の捕捉・輸送に機能する有力な候補分子と考えられる。最近、私たちは、Exophilin-8 が、RIM-BP2、Myosin-7a との結合を介して、分泌顆粒を皮質アクチン網に集積させることによって、インスリン顆粒の開口放出能を促進させることを報告した (Fan, Matsunaga, Wang et al., Elife 2017)。一方、Melanophilin は、皮膚色素細胞メラノサイトにおいて、メラノソーム膜上の Rab27a と、細胞辺縁部アクチン上で働くモーター・タンパク質 Myosin-5a を架橋することによって、メラノソームを細胞膜直下に捕捉し、周辺の角化細胞ケラチノサイトへの移行を促進させることが、私たちの研究室を含む複数の研究室により明らかにされているが、分泌顆粒開口放出における役割は知られていない。本研究では、インスリン分泌過程における Melanophilin の機能に関する未発表知見 (以下に記述) を基に、これまで十分に解明されていない、皮質アクチン網に捕捉された分泌顆粒、あるいはあらかじめ細胞膜にドッキング (接着) していない分泌顆粒からの開口放出機序を明らかにし、糖尿病などホルモン分泌不全を示す疾患の新たな分子標的を提示する。

### 3. 研究の方法

#### 1) Melanophilin 機能欠失膵 β 細胞におけるインスリン顆粒開口放出の解析

私たちは、Melanophilin が、膵 β 細胞に発現し、その自然変異マウス *leaden* が、個体レベルで耐糖能障害 (グルコース負荷による高血糖) を示し、単離膵島灌流実験で、刺激依存性のインスリン分泌低下を示すことを見出している (未発表)。そこで、インスリンに蛍光タンパク質 Venus を融合させた遺伝子を発現させた *leaden* 膵 β 細胞で、全反射顕微鏡下、単一顆粒レベルで開口放出を観測し、対照野生型膵 β 細胞での知見と比較する。野生型膵 β 細胞では、あらかじめ細胞膜直下に存在していた顆粒からのもの (*resident* と呼称) と、刺激後、瞬時 (100 ミリ秒以内) に細胞内深部から細胞膜直下に動員された顆粒からのもの (*passenger* と呼称) の 2 つのタイプが認められることが、私たちの研究室を含め、複数の研究室から報告されている。*leaden* 膵 β 細胞で顆粒開口放出の変化を認めた場合、ヒト膵細胞において、Melanophilin を siRNA または shRNA を用いてノックダウンし、インスリンを蛍光標識し、全反射顕微鏡観測を行い、同様の変化が認められるかどうかを確認する。

#### 2) Melanophilin と相互作用するタンパク質の同定と、結合不能変異型の機能解析

私たちは、Melanophilin が、これまで知られている Rab27a や Myosin-5a のほかに、細胞膜上の膜融合装置 Syntaxin-4 と結合することを見出している。そこで、Melanophilin を部位特異的に欠失させたりコンピナント・タンパク質を細胞内に発現し、免疫沈降法で Syntaxin-4 との結合ドメインを同定する。次に、その部位に点変異を導入し、Syntaxin-4 結合活性を特異的に失わせた変異体を作製する。野生型およびこの変異型 Melanophilin を各々 *leaden* マウス膵細胞に発現させ、1) で認められたインスリン分泌を回復させるかどうかを調べ、Syntaxin-4 との相互作用が、Melanophilin のインスリン分泌促進作用に必要なかどうかを検証する。これまでに知られている、Rab27a や Myosin-5a との結合活性を失う Melanophilin 変異体についても、同様にレスキュー実験を行い、各相互作用の重要性を解析する。また、これらタンパク質相互作用による Melanophilin 複合体形成が、分泌刺激により変化するかどうかを調べる。たとえば分泌刺激後に上昇する細胞内  $Ca^{2+}$  や cAMP の関与を解析する。

### 4. 研究成果

#### 1) Melanophilin 機能欠失膵 β 細胞におけるインスリン顆粒開口放出の解析

全反射顕微鏡でインスリン顆粒の開口放出を観測したところ、*leaden* 膵 β 細胞では、野生型細胞に比し、*resident* タイプの頻度は変化しないが、*passenger* タイプの頻度が選択的に減少していた。また、横浜市立大学との共同研究で、カナダ Alberta 大学よりヒト膵島を輸入し、内在性 Melanophilin を siRNA/shRNA でノックダウンして、同様にインスリン顆粒の開口放出を全反

射顕微鏡で観測したところ、*passenger* タイプの頻度が特異的に減少していた。これらの知見は、Melanophilin が、刺激前に、細胞膜より離れた部位（全反射顕微鏡で観察できるのは、細胞膜より 200 nm 以内）にいた顆粒からの開口放出に、種を越えて関与していることを示している。

## 2) Melanophilin と相互作用するタンパク質の同定と結合不能変異体の作製

Melanophilin の部位特異的欠失変異体を作製し、ヒト胎児腎細胞株 HEK293A またはマウス膵

細胞株 MIN6 において、免疫沈降法により Syntaxin-4 結合ドメインを解析したところ、アミノ酸 116-125 の領域が、結合に重要であることがわかった。そこでこの部位に点突然変異を入れて結合活性を調べたところ、Y122A/H124A/K130A 三重変異体が、Syntaxin-4 との結合活性をほぼ失うことを見出した。また、これまで知られている Rab27a との結合を失う E14A 変異体、Myosin-5a との結合活性を失う D378A/E380A/E381A/E382A/A467P 五重変異体も作製した。これら変異体が目的とする標的タンパク質との結合能のみ消失し、他の Melanophilin 結合タンパク質との結合能を保持していることを、MIN6 細胞内での免疫沈降法で確認した。野生型 Melanophilin を *leaden* 膵 β 細胞に発現させ、その細胞内局在を免疫染色法で調べたところ、特に細胞角部および細胞膜近傍のインスリン顆粒に共局在し、細胞膜上の Syntaxin-4 とも共局在していた。しかし、Y122A/H124A/K130A 変異体は Syntaxin-4 と共局在せず、皮質アクチンの豊富な細胞角部にのみ存在した。一方、E14A 変異体は顆粒膜に局在する Rab27a と共局在せず、D378A/E380A/E381A/E382A/A467P 変異体は細胞角部に局在する Myosin-5a と共局在せず、細胞膜周辺にのみ存在した。したがって、これら変異体は、各タンパク質相互作用を失うことによって期待されるとおりの細胞内局在の変化を示した。

## 3) Melanophilin 変異体のインスリン分泌における機能解析

野生型膵細胞で認められる発現レベルの野生型または変異型 Melanophilin を *leaden* 膵 β 細胞に外来性に発現し、インスリン分泌低下が回復するかどうかのレスキュー実験を行った。まず、マウスより膵島を単離し、野生型をアデノウイルス・ベクターによって発現させ、グルコース刺激後、培地中に放出されたインスリンを計測したところ、野生型膵島と同等のインスリン分泌能を示した。一方、Y122A/H124A/K130A、E14A、D378A/E380A/E381A/E382A/A467P 変異体は、すべてインスリン分泌能を回復することができなかった。さらに *leaden* 膵島をトリプシン処理し、単層培養した後、Melanophilin を発現させ、全反射顕微鏡でインスリン顆粒の開口放出を観測したところ、野生型は *passenger* タイプの開口放出数を特異的に増加させたが、Y122A/H124A/K130A、D378A/E380A/E381A/E382A/A467P 変異体は増加させることができなかった。

## 4) Melanophilin-Syntaxin-4a 相互作用の解析

*passenger* タイプの開口放出を示す分泌顆粒が細胞膜直下に動員・輸送される機序は、アクチン繊維上で機能する Myosin-5a と Melanophilin の相互作用により説明可能であるが、その後、安定的に細胞膜に接着すること無しに開口放出される機序は説明できない。細胞膜上の Syntaxin 分子は、他の SNARE タンパク質と結合できない閉鎖型と、膜融合を引き起こすことのできる開放型の 2 つの構造を取ることが知られている。Melanophilin がどちらの構造の Syntaxin-4 溶解都合するのか、常時開放型を取る Syntaxin-4 変異体との結合活性を調べたところ、開放型と特異的に結合することが明らかとなった。すなわち、細胞膜に安定的に接着した顆粒からの *resident* タイプの開口放出を仲介する Rab27 エフェクター Granuphilin が、他の SNARE タンパク質と結合できない閉鎖型の Syntaxin-1~3 と結合し、膜融合を一時的に抑制するのに対して、Melanophilin は、膜融合を引き起こすことのできる開放型の Syntaxin-4 と特異的に結合することがわかり、このことが、安定的な細胞膜ドッキングを介さない、迅速な開口放出を仲介する分子基盤ではないかと考えられた。また、この複合体は、グルコースなどの分泌刺激後に形成され、あらかじめ EGTA で細胞外  $Ca^{2+}$  イオンをキレートしておくこと、形成されないことがわかった。また、Melanophilin と Myosin-5a との結合は、逆に分泌刺激後の細胞内  $Ca^{2+}$  イオン上昇により抑制されることがわかった。これらの知見は、皮質アクチン網に捕捉されたインスリン顆粒が、分泌刺激による  $Ca^{2+}$  イオン上昇により、アクチン網から解離し、代わりに細胞膜上の開放型 Syntaxin-4 との結合により、細胞膜上に留まること（ドッキング）無しに、迅速に膜融合するという、*passenger* タイプの開口放出の機序をうまく説明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hameed A, Hafizur RM, Kahn MI, Jawed A, Wang H, Zhao M, Matsunaga K, Izumi T, Siddiqui S, Khan F, Adhikari A, and Sharma KR.	4. 巻 858
2. 論文標題 Coixol amplifies glucose-stimulated insulin secretion via cAMP mediated signaling pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.172514.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okunishi K, Wang H, Suzukawa M, Ishizaki R, Kobayashi E, Kihara M, Abe T, Miyazaki J, Horie M, Saito A, Saito H, Nakae S, and Izumi T.	4. 巻 130
2. 論文標題 Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Clin. Invest.	6. 最初と最後の頁 3919-3935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI127839.	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kohichi Matsunaga, Fushun Fan, Hao Wang, Ray Ishizaki, Eri Kobayashi, Hiroshi Kiyonari, Yoshiko Mukumoto, Katsuhide Okunishi, and Tetsuro Izumi
2. 発表標題 Exophilin-8/MyRIP/Slac2C assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-BP2 and myosin-VIIa.
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Hafizur Rahman, Abdul Hameed, M. Israr Khan, Kiran Maryam, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Achyut Adhikari, Huma Aslam Bhatti
2. 発表標題 Roles of Eupatorin and Hymecromone as Potent Insulin Secretagogues and their Mechanisms.
3. 学会等名 14th Biennial Conference of Pakistan Society for Biochemistry and Molecular Biology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター-exophilin-5のアレルギー性気道炎症における新奇の役割の解明
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター-exophilin-5のアレルギー性気道炎症における新奇の役割の解明
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abdul Hameed, Rahman M Hafizur, M Israr Khan, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Sonia Siddiqui, Faisal Khan, Achyut Adhikari, and Khaga Raj Sharma
2. 発表標題 Coixol amplifies glucose stimulated insulin secretion through cAMP-PKA signaling cascade-independent of K-ATP Channels.
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman M Hafizur, M Israr Khan, Abdul Hameed, Kiran Maryam, Huma Aslam Bhatti, Munneb Ali, Zaheer-UI, Faisal Khan, Ghulam Abbas, Hao Wang, Kohichi Matsunaga, and Tetsuro Izumi
2. 発表標題 Hymecromone potentiates glucose-stimulated insulin secretion through cAMP-PKA signaling pathway.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥西 勝秀、王 昊、泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター-exophilin-5のアレルギー反応における役割
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuro Izumi, Kouichi Mizuno, Katsuhide Okunishi, and Hao Wang
2. 発表標題 Melanophilin accelerates insulin granule fusion without stable docking to the plasma membrane via interaction with myosin-Va and syntaxin-4.
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the EASD (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman M Hafizur, Abdul Hameed, M Israr Khan, Kiran Maryam, Muneeb Ali, Za-heer Ul-Haq, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Achyut Adhi-kari, Huma Aslam Bhatti
2. 発表標題 Exploring the insulin secretory mechanisms of hymecromone and eupatorin in mice islets.
3. 学会等名 The 7th International Symposium-cum-Training Course on Molecular Medicine and Drug Research, Karachi, Pakistan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhide Okunishi, Hao Wang, Maho Suzukawa, Susumu Nakae, and Tetsuro Izumi
2. 発表標題 A novel regulatory role of the Rab27 effector exophilin5 in allergic airway inflammation.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 広一、王 昊、奥西 勝秀、泉 哲郎
2. 発表標題 メラノフィリンは開放型シタキシン-4との結合を介して細胞膜ドッキングを迂回するインスリン開口放出を制御する。
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所遺伝生化学分野  
<http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/>

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