

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390253

研究課題名（和文）膵 β 、 α 細胞間で相違する顆粒開口放出マシナリーの解析研究課題名（英文）Molecular machinery of granule exocytosis in pancreatic α and β cells

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

研究成果の概要（和文）：インスリン顆粒の開口放出に關与する Rab27a エフェクター granuphilin とこれを相互作用する分子の機能を *in vitro*, *in vivo* で解析した。また別の Rab27a エフェクター exophilin8 が、インスリン顆粒を細胞皮質部アクチン網に一時的に捕捉し、これを分泌刺激中に細胞膜近傍へ供給することにより開口放出を促進していることを見出した。また、グルコースに対して正反対のホルモン分泌反応を示す膵 α 、 β 細胞において Rab27a 結合分子を網羅的に固定した。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the functional significance of lipid and protein interactions involving the Rab27a effector, granuphilin, in both cultured cells and genetically engineered mice. We have also found that another Rab27a effector, exophilin8, transiently traps insulin granules into the cortical actin network close to the microtubule plus-ends and supplies them for release during the stimulation. Finally, using a proteomics approach, we have systemically identified Rab27a-interacting molecules in both α and β cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：内分泌・代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、生理学、蛋白質、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、低分子量 GTPase Rab27a がペプチドホルモンを含有する分泌顆粒の開口放出過程に特異的に機能していること、中でもグルコース代謝調節に中心的な役割をする膵 α 、 β 細胞において、Rab27a エフェクター分子 exophilin4、granuphilin がそれぞれグルカゴン顆粒膜、インスリン顆粒膜を

細胞膜に接着（ドッキング）させることにより、その開口放出過程を調節していることを示してきた。しかし Rab27a 欠損細胞の表現型は、これらエフェクター分子の機能異常を単純には反映せず、他の相互作用分子も関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) granuphilin など、膵内分泌細胞で機能している既知分子の作用機序をさらに詳細に解析する。

(2) granuphilin の Rab27a 結合領域とのアミノ酸配列相同性から、Rab27a エフェクターとして機能することが推定される exophilin ファミリー分子が、膵内分泌細胞で分泌顆粒の開口放出に関与しているかどうかを調べる。

(3) exophilins 以外の分子が Rab27a と結合してホルモン分泌に関わっている可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) granuphilin が、インスリン顆粒を細胞膜にドッキングさせてその開口放出を制御する際、細胞膜のリン脂質や syntaxin-1a・Munc18-1 複合体を認識することが重要であると考えられている。しかしながらその詳細な機序と生理学的意義は明らかではない。そこでこれら分子との相互作用を失った granuphilin 変異体や、granuphilin や syntaxin-1a を欠損したマウス膵β細胞の解析を行う。

(2) 膵β細胞には、granuphilin 以外に exophilin8 という Rab27a エフェクターが発現していることが知られているが、その機能の詳細は不明である。そこで膵β細胞株 MIN6 において、exophilin8 の過剰発現もしくは shRNAs による発現抑制を行い、インスリン顆粒の細胞内分布や開口放出の変化を調べる。

(3) グルコースに対して正反対のホルモン分泌反応を示す膵α、β細胞における Rab27a 機能の全容を比較解析するために、それぞれの細胞における Rab27a 結合分子を網羅的に解析する。具体的には、Myc タグと Flag タグの間に TEV プロテアーゼ切断サイトをいれ、三者をタンデムにつなげたアフィニティー タグ (MEF タグ) を付加した MEF-Rab27a 発現レトロウイルスを作製し、マウスα、β細胞由来のαTC1.6、MIN6 細胞株に感染させた。これら細胞の抽出液を抗 myc 抗体、抗 Flag 抗体で多段階免疫沈降し、Rab27a 結合タンパク質を精製する。これを電気泳動により分離後、見出されたバンドを切り取り、首都大学大学院理学研究科・磯辺俊明研究室との共同研究により、質量分析装置を用いてタンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) granuphilin の機能

① granuphilin 変異体の機能解析

細胞膜リン脂質、syntaxin-1a・Munc18-1

複合体とそれぞれ特異的に結合活性を失わせる granuphilin 変異体を見出した。これを granuphilin 欠損マウスより樹立した膵β細胞に導入して、その機能を解析した。その結果、分泌顆粒を細胞膜にターゲットする能力、開口放出を抑制する能力とも、granuphilin のリン脂質との結合活性が必須であり、syntaxin-1a・Munc18-1 との結合活性はドッキング後の開口放出過程を特異的に制御する可能性が示唆された。今後、変異体の過剰発現系のみではなく、生理的発現レベルでの解析を行う予定である。

② granuphilin および syntaxin-1a 欠損マウスの解析

granuphilin 欠損マウスは、細胞膜にドッキングしたインスリン顆粒の消失と、インスリン分泌促進を呈する。また他のグループにより、syntaxin-1a 欠損マウスは、ドッキング顆粒消失とともに、第一相のインスリン分泌低下が報告されている。granuphilin と syntaxin-1a は相互に結合する活性を有するが、両者の機能関係を解明する目的で、syntaxin-1a 欠損および granuphilin・syntaxin-1a ダブル欠損マウスの表現型を解析した。その結果、既報と異なり、syntaxin-1a 欠損マウスは、インスリン顆粒のドッキング障害が認められなかった。またダブル欠損マウスは granuphilin 欠損マウスと類似した表現型を示した。これらの知見は、granuphilin が複数の syntaxin アイソフォームと相互作用して、顆粒の細胞膜ドッキングや開口放出を制御していることを示唆している。現在、granuphilin と syntaxin ファミリーの相互作用と機能的意義を解析している。

(2) exophilin8 の機能

蛍光蛋白質を融合した exophilin8 およびその変異体を膵β細胞株に発現し、それ自身とインスリン顆粒の細胞内分布を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、exophilin8 は微小管+端近傍の細胞皮質部アクチン網にインスリン顆粒を一時的に捕捉して、これを分泌刺激中に細胞膜近傍へ供給して開口放出を促進することを見出した。実際、exophilin8 を過剰発現すると刺激依存性のインスリン分泌は促進し、shRNAs により発現を抑制すると分泌は減弱した。本知見は、これまで解明の進んでいない、分泌顆粒の細胞内深部動態と開口放出の関係を明らかにするものである (Mizuno K et al., Mol Biol Cell, in press)。

(3) 多段階免疫沈降法を用いた網羅的 Rab27a 結合タンパク質の探索

Rab27a 結合候補タンパク質として、膵α細胞

胞では16本、β細胞では20本のタンパク質バンドを検出した。両細胞のバンドパターンを比較すると、共通のものもあるが、大きな違いがあり、Rab27aを介するタンパク質相互作用ネットワークが異なることが示唆された。質量分析装置によるタンパク質同定を行うと、α細胞におけるexophilin4、β細胞におけるgranuphilinなど、既知のRab27aエフェクター・タンパク質の他に、新規結合タンパク質が同定された。特にこれまでRab27aとは関係性が報告されていない、小胞体やゴルジ体で機能するタンパク質がいくつか同定され、Rab27aが分泌顆粒の輸送や開口放出だけではなく、その生合成過程にも関与している可能性が考えられた。現在、同定されたタンパク質の1つ1つに対して、詳細な解析を行っている。血糖値に対して正反対のホルモン分泌反応性を示すα、β細胞において、分泌シグナルの受け手である開口放出マシナリーの相違は、十分解明されていない。Rab27aを中心とするタンパク質ネットワークの解析は、それぞれに特異的な分泌制御機構の一端を解明できる可能性がある。

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9件)

- ① Mizuno K, Ramalho JS, and Izumi T (2011). Exophilin8 transiently clusters insulin granules at the actin-rich cell cortex prior to exocytosis. *Mol. Biol. Cell*, in press. 査読有
- ② Izumi T (2011). Heterogeneous modes of insulin granule exocytosis: molecular determinants. *Front. Biosci.*, 16, 360-367. 査読有
- ③ Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, and Yoshimori T (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.*, 190, 511-521. 査読有
- ④ Maeda-Mamiya R, Norii E, Isobe H, Nakanishi W, Okamoto K, Doi K, Sugaya T, Izumi T, Homma T, and Nakamura E (2010). In vivo gene delivery by cationic tetraamino fullerene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5339-5344. 査読有

- ⑤ Guo X, Tu L, Gumper I, Plesken H, Novak EK, Chintala S, Swank RT, Pastores G, Torres P, Izumi T, Sun T-T, Sabatini DD, and Kreibich G (2009). Involvement of Vps33a in the fusion of uroplakin-degrading multivesicular bodies with lysosomes. *Traffic*, 10, 1350-1361. 査読有
- ⑥ Chavas LMG, Ihara K, Kawasaki M, Torii S, Uejima T, Kato R, Izumi T, and Wakatsuki S (2008). Elucidation of Rab27 recruitment by its effector: structure of Rab27a bound to Exophilin4/Slp2-a. *Structure*, 16, 1468-1477. 査読有
- ⑦ Chavas LMG, Ihara K, Kawasaki M, Kato R, Izumi T, and Wakatsuki S (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Rab27a GTPase in complex with exophilin4/Slp2-a effector. *Acta Crystallogr. Sect. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 64, 599-601. 査読有
- ⑧ Kasai K, Fujita T, Gomi H, and Izumi T (2008). Docking is not a prerequisite but a temporal constraint for fusion of secretory granules. *Traffic*, 9, 1191-1203. 査読有
- ⑨ Kasai K, Suga K, Izumi T, and Akagawa K (2008) Syntaxin 8 has two functionally distinct di-leucine-based motifs. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 13, 144-154. 査読有

[学会発表] (計19件)

- ① Ray Ishizaki, Hao Wang, Jun Xu, and Tetsuro Izumi. Mechanism for regulated exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells. JSH (Japanese Society of Hematology) International Symposium 2010 in Akita: Seven Wonders of Erythropoiesis. Akita, Japan, July 17, 2010.
- ② 泉 哲郎、石崎 玲、徐 君、水野 広一。インスリン分泌機構におけるRab27aエフェクターの役割。文部科学省科学研究補助金「新学術領域研究(細胞内ロジスティクス)」第2回班会議、札幌、2010年7月1日。

- ③ 泉 哲郎. Roles of Rab27a and its multiple effectors in insulin exocytosis. (シンポジウム: 膵β細胞研究の最前線(1)「インスリン分泌」)。第53回日本糖尿病学会年次学術集会、岡山、2010年5月28日。
- ④ 水野 広一、泉 哲郎. Exophilin8を介したインシュリン顆粒の形質膜下アクチン網への移行は微小管プラス端近傍でおきている(ワークショップ: メンブレントラフィック(II))。第62回日本細胞生物学会大会、大阪、2010年5月20日、21日。
- ⑤ Hao Wang, Jun Xu, Ray Ishizaki, and Tetsuro Izumi. Differential granule-targeting activities between two Rab27a effectors expressed in pancreatic β cells, 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010), Kyoto, Japan, March 29, 2010.
- ⑥ Tetsuro Izumi. Molecular determinants of insulin granule exocytosis. Workshop: Genesis and function of pancreatic β cells. The official satellite symposium “New insight into pathogenesis and treatment of diabetes” of the 14th international congress of endocrinology (ICE2010), Tokyo, Japan, March 25, 2010.
- ⑦ 泉 哲郎、水野 広一、王 昊、石崎 玲。調節性分泌の分子機序と内分泌代謝性疾患の発症・病態への関与。新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議。名護、2009年11月10日。
- ⑧ 泉 哲郎。分泌顆粒開口放出の分子機序(特別講演)。第8回肺サーファクタント分子病態研究会「肺における細胞内輸送と病態生理」。札幌、2009年6月27日。
- ⑨ Tetsuro Izumi, Jun Xu, Hao Wang, Koichi Mizuno, Hiroshi Gomi, and Ray Ishizaki. Roles of multiple Rab27a effectors expressed in pancreatic beta cells. Gunma University & Akita University International Symposium of Global COE Program: New aspects in immunology and cancer research, Akita, Japan, June 24, 2009.
- ⑩ 石崎 玲、徐 君、泉 哲郎。膵β細胞に発現する2つのRab27エフェクターの機能差異。第52回日本糖尿病学会年次学術総会、大阪、2009年5月23日。
- ⑪ 石崎 玲、徐 君、泉 哲郎。膵β細胞に発現する2つのRab27エフェクターの機能差異。第82回日本内分泌学会学術総会、前橋、2009年4月23日。
- ⑫ 笠井 篤子、泉 哲郎。細胞膜マイクロドメイン-ラフトを介したインスリン分泌過程の解明。第82回日本内分泌学会学術総会、前橋、2009年4月23日。
- ⑬ 泉 哲郎。インスリン顆粒の細胞膜開口放出に関わる因子(β細胞の最前線)。第43回糖尿病学の進歩、松本、2009年2月20日。
- ⑭ 泉 哲郎。分泌顆粒開口放出の仕組み。特定領域研究「メンブレントラフィック」終了・新学術領域研究「ロジスティクス」発足合同シンポジウム: メンブレントラフィックから細胞内ロジスティクスへ。東京、2009年1月29日。
- ⑮ Tetsuro Izumi and Jun Xu. Differential exocytic roles of Rab27a effectors expressed in pancreatic beta cells. The 4th Scientific Meeting of Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group, Kobe, Japan, August 24, 2008.
- ⑯ 泉 哲郎、河西 和雄、藤田 卓二、五味 浩司。インスリン分泌顆粒の開口放出動態におけるRab27a/granuphilinの機能(ワークショップ: Rab蛋白質の高次機能)。第60回日本細胞生物学会大会、横浜、2008年6月30日。
- ⑰ 泉 哲郎。インスリン顆粒の細胞膜ドッキングと開口放出(シンポジウム: インスリン分泌機構はどこまで解明されたのか)。第51回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2008年5月23日、24日。
- ⑱ 藤田 卓二、五味 浩司、泉 哲郎。インスリン分泌顆粒の開口放出における

Rab27a およびそのエフェクター Granuphilin の役割。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2008 年 5 月 23 日、24 日。

- ⑱ Tetsuro Izumi, Kazuo Kasai, Takuji Fujita, and Hiroshi Gomi. Docking is not a prerequisite but a temporal constraint for fusion of secretory granules: roles of Rab27a/granuphilin on insulin exocytosis. 2008 Keystone Symposium: Islet and Beta Cell Biology, Snowbird, Utah, USA, April 8, 2008.

[図書] (計 2 件)

- ① 泉 哲郎 (2008). インスリン開口分泌のメカニズム. 「新時代の糖尿病学 (1) -病因・診断・治療研究の進歩-」 日本臨床 (日本臨床社、東京) 169-173.
- ② 泉 哲郎 (2008). インスリン分泌の分子メカニズム. 「メンブレントラフィックの奔流-分子から細胞、個体へ」 蛋白質 核酸 酵素 (共立出版株式会社、東京) 53, 2136-2140.

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molend/>

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