

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570189

研究課題名（和文） 2相性インスリン開口放出機構のイメージング解析

研究課題名（英文） Mechanisms of biphasic insulin granule exocytosis by imaging technique

研究代表者

今泉 美佳 (MICA OHARA-IMAIZUMI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：40201941

研究成果の概要（和文）：グルコース刺激による膵β細胞からのインスリン分泌は2相性を示す。2型糖尿病では第1相が著しく低下していることから、2相性インスリン分泌機構の解明は2型糖尿病の予防、治療法の開発のためにも非常に重要な課題であるが、不明な点が多く残されている。本研究では全反射蛍光（TIRF）顕微鏡システムに共焦点レーザー蛍光（Confocal）顕微鏡システムを合体させた新規システム（TIRF-Confocal-Hybrid microscopy）を主に用いて2相性インスリン分泌におけるインスリン顆粒動態の可視化解析を行い、以下の研究成果を得た。

(1) インスリンはPI3K活性を介して細胞膜表面のTrpV2量を増加させることにより、Ca<sup>2+</sup>応答潜時を短縮し、第1相インスリン開口放出を促進的に制御する。

(2) Gα<sub>o</sub>は形質膜へのインスリン顆粒のドッキング、および放出可能な状態となるプライミング過程を制御することにより、第1相インスリン開口放出を抑制的に調節している。

(3) 2型糖尿病感受性遺伝子*CDKAL1*の遺伝子産物CDKAL1はCDK5以外の経路を介して、ATP生成、K<sub>ATP</sub>チャネルの応答性、細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇を促進することにより、第1相インスリン開口放出を促進的に制御する。

(4) 第2相インスリン開口放出を担うnewcomerインスリン顆粒はアクチンネットワーク層内に貯蔵されており、顆粒とアクチンとの相互作用にMyosin Vaが関与することでnewcomer顆粒の細胞内輸送が制御されている。

研究成果の概要（英文）：Insulin is stored in pancreatic β cell granules, and released biphasically by the exocytotic mechanism induced by nutrient glucose. In order to reveal the molecular mechanism of biphasic insulin granule exocytosis, we utilized a newly innovated imaging technique, TIRF-Confocal-Hybrid imaging system. Our results showed that there are two pools of insulin secretory granules docked at the plasma membrane and existed in the cytosol located ~500 nm from the cell surface. TIRF-Confocal-Hybrid imaging revealed that glucose stimulation evoked the translocation of insulin granules from inner pool to the plasma membrane, and fusion of granules with cell membrane was occurred after reaching the cell surface. Furthermore, the experiments using recombinant adenovirus encoding actin-EGFP treated β cells showed the close association of insulin granule intracellular movement with actin-network. Thus, TIRF-Confocal-Hybrid imaging is a valuable technique to reveal the mechanism of intracellular vesicle trafficking.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：インスリン分泌、開口放出、糖尿病、全反射顕微鏡、細胞内トラフィック

### 1. 研究開始当初の背景

インスリンはβ細胞内の分泌顆粒（インスリン顆粒）に貯蔵されており、グルコースに応答して開口放出によって細胞外へ分泌される。このインスリン分泌は2相性に起こることが知られているが、2相性分泌の分子機構は未だ解明されていない。2型糖尿病では第1相分泌の著しい低下を特徴とするインスリン分泌不全を呈しているため、2相性インスリン開口放出の分子機構解明は2型糖尿病を予防し、新たな治療法を開発するためにも早急に解決すべき課題である。私達はインスリン開口放出機構解明には可視化解析法が強力な研究手段と考え、GFP標識インスリン顆粒システムとTIRF顕微鏡を組み合わせたインスリン分泌顆粒動態の形質膜TIRF可視化解析法を確立した(J. Biol. Chem. 2002; Biochem. J., 2004)。この解析法により、まず初代培養膵β細胞において第1相のインスリン開口放出は主に予め形質膜にドッキングしている顆粒(previously docked granules)からのフュージョンであり、第2相は細胞質から形質膜へ新たに移動した顆粒(newcomers)からのフュージョンであること、またインスリン分泌第1相は形質膜SNARE蛋白質であるsyntaxin1A依存性であり、第2相はSynt1A非依存性であることから、分泌第1相と第2相におけるインスリン開口放出は全く異なった分子機構から構成されていることを明らかにした(J. Cell Biol., 2007)。しかし以上の結果は形質膜でのインスリン顆粒動態解析に基づいたものであり、顆粒の貯蔵からフュージョンまでの開口放出全容を明らかにするためには、形質膜だけを観察する通常のTIRF顕微鏡だけでは限界があり、より細胞内部まで同時に観察可能な顕微鏡システムが必要である。そこで私達はTIRF-Confocal-Hybrid顕微鏡を開発した。この顕微鏡は従来のTIRF顕微鏡と異なり、細胞の形質膜近傍をTIRF観察、細胞内部をconfocal観察することで、細胞全体の観察を行う事ができ、すなわち、顆粒の貯蔵からフュージョンまでの2相性インスリン開口放出全容の観察に適した顕微鏡システムである。

### 2. 研究の目的

新規TIRF-Confocal-Hybridシステムを用いた分泌顆粒の動態解析により、1)インスリン分泌第1相、第2相それぞれの開口放出経路の構成過程を明確にする。2)インスリン顆粒と開口放出調節分子を同時に可視化解析し、2相性開口放出の各過程での調節分子群の制御機構を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) インスリン-GFPで顆粒を標識した膵β細胞を

TIRF-Confocal-Hybrid顕微鏡下に置き、グルコースによる分泌刺激を行う。分泌第1相、第2相における分泌顆粒の動態を時間的、空間的に解析し、細胞質内部での分泌顆粒の貯蔵状態から顆粒膜と形質膜とのフュージョン/インスリン開口放出に至る各々の過程の顆粒動態の実態を明らかにする。

(2) 調節分子の full length, dominant negative 体の過剰発現、又はその分子の特異抗体、阻害剤、siRNAを導入したβ細胞、あるいは調節分子欠損マウスから調製したβ細胞の分泌顆粒動態を解析し、正常β細胞と比較検証することにより、2相性開口放出の各過程に働く特異的な調節分子を明確にし、その調節機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) グルコース刺激におけるβ細胞膜直下のCa<sup>2+</sup>上昇と2相性インスリン顆粒開口放出の関係を明らかにする目的で、GFPラベルしたインスリン顆粒の開口放出とFura RedによるCa<sup>2+</sup>イメージングの同時測定を行なった。高グルコース刺激の分泌第1相では[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の急激な上昇に伴ってprevious docked granulesからのフュージョンが主に見られたが、一方、第2相では[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は緩徐に減少し、newcomersからのフュージョンが観察された。高KCl刺激では急激な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に伴うprevious docked granulesからのフュージョンが見られ、低KCl刺激では緩徐な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に伴うnewcomersからのフュージョンが選択的に観察された。このようにグルコースによる2相性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇パターンがフュージョンする顆粒のタイプを決定していることが示唆された。

(2) 分泌第2相における顆粒の貯蔵から形質膜への輸送機構を明らかにする目的で、β細胞内insulin顆粒(GFP)とactin(mCherry)を同時可視化し、4D解析を行った所、形質膜より約500nm内部に顆粒プール(reserve pool)があり、分泌第2相ではreserve poolより供給された顆粒からの開口放出が観察された。Actin networkはreserve poolを保持し、刺激により重合/脱重合による動態変化起こし、脱重合された領域で形質膜へ顆粒が輸送されていた。また顆粒とアクチンとの相互作用にmyosinVが関与していた。以上の結果よりactin重合/脱重合の空間的制御が第2相分泌を調節していることが示唆された。

(3) 膵β細胞は刺激に応じてインスリンを分泌すると同時に、インスリン受容体を介してインスリンを受容しPI3Kを活性化している。インスリンによる膵β細胞からのインスリン分泌制御機構を明らかにする目的で、膵

$\beta$ 細胞からのインスリン分泌における PI3K の役割について検討を行った。膵 $\beta$ 細胞および Min6 細胞をインスリン処理するとグルコース刺激開始から開口放出応答および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答までの潜時が PI3K 活性依存的に短縮された。 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性チャネルである TrpV2 の細胞膜上における量がインスリン処理により PI3K 活性依存的に増加した。TrpV2 阻害剤処理および RNA 干渉 (RNAi) により TrpV2 タンパク量を減少させた MIN6 細胞ではインスリン処理による開口放出応答潜時の短縮は観察されなかった。以上の結果より、インスリンは PI3K 活性を介して細胞膜表面の TrpV2 量を増加させることにより、 $\text{Ca}^{2+}$  応答潜時を短縮し、第 1 相インスリン開口放出を促進的に制御していることがわかった。

(4) *CDKAL1* 遺伝子の変異は第 1 相インスリン分泌障害を介して、2 型糖尿病の一要因を成していると考えられるが、その分子機構は不明である。本研究では、*CDKAL1* ノックアウト (KO) マウスにおけるインスリン分泌機構を解析した。KO  $\beta$ 細胞では第 1 相インスリン開口放出の低下が見られ、グルコース刺激に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の遅延、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの応答性の低下、ATP 生成の低下が観察された。一方、KO 細胞における CDK5 活性は、野生型細胞との間で違いは認められなかった。以上の結果より、*CDKAL1* は CDK5 以外の経路を介して、ATP 生成、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの応答性、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を促進することにより、第 1 相インスリン分泌をコントロールしていることが明らかとなった。

(5) 膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌は百日咳毒素 (PTX) 処理により増強されること、また膵 $\beta$ 細胞には  $\text{G}\alpha\text{o}$  が多量に局在していることから、 $\text{G}\alpha\text{o}$  がインスリン分泌を抑制的に調節していることが以前から示唆されてきたが、その分子機構は不明であった。本研究では膵 $\beta$ 細胞特異的  $\text{G}\alpha\text{o}$  ノックアウト (KO) マウスにおけるインスリン分泌機構を解析した。膵 $\beta$ 細胞特異的  $\text{G}\alpha\text{o}$  KO マウスにおいては、ランゲルハンス氏島の形態に変化が見られなかったが、グルコース応答性インスリン分泌の有意な上昇が *in vivo* および単離ランゲルハンス氏島において観察された。 $\text{G}\alpha\text{o}$  KO  $\beta$ 細胞における電子顕微鏡解析および全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡解析結果では、形質膜にドッキングしている顆粒 (previously docked granules) の増加、また previously docked granules のフュージョン効率の増加が認められ、その結果、インスリン分泌第 1 相の増加が観察された。以上の結果より、 $\text{G}\alpha\text{o}$  は形質膜へのインスリン顆粒のドッキング、および放出可能な状態となるプライミング過程を制御することにより、分泌第 1 相を抑制的に調節していることを明らかにした。

(6) TIRF-Confocal-Hybrid 顕微鏡システム法

を他のグルコース応答性分泌細胞に応用する試みとして、腸内分泌細胞株 STC-1 細胞内の GLP-1 顆粒動態の可視化解析を行った。Venus を融合した human growth hormone (hGH-Venus) を STC-1 細胞に発現させることで GLP-1 顆粒を特異的に標識し解析したところ、GLP-1 顆粒の一部は、予め形質膜にドッキングしており (previously docked granules)、高グルコース刺激を行うと、GLP-1 顆粒開口放出が 2 相性に観察された。すなわち、第 1 相では previously docked granules と細胞内部から供給されて形質膜上に短時間ドッキングした顆粒 (newcomers) からのフュージョンが見られ、その後の第 2 相では newcomers からのフュージョンが観察された。膵 $\beta$ 細胞でも高グルコース刺激により、2 つのタイプの顆粒 (previously docked granules と newcomers) から 2 相性の開口放出が観察されることから、2 つのタイプの顆粒が担う 2 相性開口放出は内分泌細胞におけるグルコース応答性ホルモン分泌に共通のメカニズムであることが示唆された。

## 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 11 件)

① Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S. Regulation of resident and newcomer insulin granules by calcium and SNARE proteins. *Front Biosci.* 16:1197-210 (2011) 査読有

② Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, and Nagamatsu S. Deletion of *CDKAL1* Affects First-phase Glucose-stimulated Insulin Exocytosis *PLoS One* 5, e15553 (2010) 査読有

③ Zhao A, Ohara-Imaizumi M, Brissova M, Benninger RK, Xu Y, Hao Y, Abramowitz J, Boulay G, Powers A C, Piston D, Jiang M, Nagamatsu S, Birnbaumer L and Gu G.  $\text{G}\alpha\text{o}$  represses insulin secretion by reducing vesicular docking in pancreatic  $\beta$  cells *Diabetes* 59:2522-2529 (2010) 査読有

④ Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S. Insulin/phosphatidylinositol 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic beta-cells. *Biochem J.* 432, 375-386 (2010) 査読有

⑤ Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S. Glinide, but not

sulfonylurea, can evoke insulin exocytosis by repetitive stimulation: imaging analysis of insulin exocytosis by secretagogue-induced repetitive stimulations. *Exp Diabetes Res*. 2009:278762 (2009) 査読有

⑥Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H2, Nagamatsu S. Imaging exocytosis of single glucagon-like peptide-1 containing granules in a murine enteroendocrine cell line with total internal reflection fluorescent microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*. 390:16-20. (2009) 査読有

⑦Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Sakurai T2, Nagamatsu S (1Photon Medical Research Center, Hamamatsu University School of Medicine,) Pattern of rise in subplasma membrane Ca<sup>2+</sup> concentration determines type of fusing insulin granules in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 385:291-295. (2009) 査読有

⑧Kawai J, Ohara-Imaizumi M, Nakamichi Y, Okamura T, Akimoto Y, Matsushima S, Aoyagi K, Kawakami H, Watanabe T, Watada H, Kawamori R & Nagamatsu S. Insulin exocytosis in Goto-Kakizaki rat beta-cells subjected to long-term glinide or sulfonylurea treatment. *Biochem J* 412 93-101. (2008) 査読有

⑨Okamoto M<sup>#</sup>, Ohara-Imaizumi M<sup>#</sup>, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S & Kadowaki T. (<sup>#</sup>equal contribution) Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* 51 827-835. (2008) 査読有

⑩Nagamatsu S & Ohara-Imaizumi M. Imaging Exocytosis of Single Insulin Secretory Granules With TIRF Microscopy. *Methods in Mol Biol* 440 259-268. (2008) 査読有

⑪Akimoto Y, Sawada H, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S & Kawakami H. Change in long-spacing collagen in descemet's membrane of diabetic Goto-Kakizaki rats and its suppression by antidiabetic agents. *Exp Diabetes Res* 2008:81834 (2008) 査読有

[学会発表] (計19件)

- ①青柳共太、今泉美佳、西脇知世乃、中道洋子、永松信哉 ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼによるインスリン分泌制御機構の可視化解析. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、岡山、2010年5月27日-29日  
②今泉美佳、青柳共太、永松信哉 インスリ

ン分泌顆粒細胞内輸送のイメージング: 病態との関連. 第2回細胞内ロジスティクス班会議(文部科学省科学研究費補助金『新学術領域』)、札幌、2010年6月30日-7月1日

③Mica Ohara-Imaizumi Deletion of CDKAL1 affects first-phase glucose stimulated insulin exocytosis. The 4<sup>th</sup> Diabetes Leading-edge Conference. 大津、2010年7月24日-25日

④青柳共太、今泉美佳、西脇知世乃、中道洋子、永松信哉 Insulin / Phosphatidylinositol 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic beta-cells. 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、12月7日-10日

⑤今泉美佳、永松信哉: インスリン顆粒の細胞内trafficking. 第43回糖尿病学の進歩、松本、2009年2月20日

⑥今泉美佳: 膵β細胞からのインスリン開口放出の可視化解析. 第11回神奈川糖尿病フォーラム、神奈川、2009年2月26日

⑦今泉美佳: 膵β細胞からのインスリン開口放出の可視化解析. 平成21年度日本生化学会九州支部例会 シンポジウム、福岡、2009年5月17日

⑧今泉美佳、青柳共太、中道洋子、西脇知世乃、永松信哉: 分泌第2相インスリン開口放出におけるアクチン細胞骨格の調節機構. 第52回日本糖尿病学会年度学術集会、大阪、2009年5月21日-24日

⑨青柳共太、今泉美佳、西脇知世乃、中道洋子、永松信哉: ミチグリンドおよびグリメピリドを用いた繰り返し刺激に対するインスリン分泌応答の可視化解析. 第52回日本糖尿病学会年度学術集会、大阪、2009年5月21日-24日

⑩今泉美佳: 糖尿病での2相性インスリン開口放出機構の解明. 第40回病態代謝研究会 研究報告会、東京、2009年10月17日

⑪今泉美佳、青柳共太、佐藤栄人<sup>1</sup>、永松信哉(<sup>1</sup>順天堂大・医・神経内科学): インスリン分泌顆粒細胞内ロジスティックスのイメージング解析. 文部科学省科学研究費補助金・新学術領域「細胞内ロジスティックス」第一回細胞内ロジスティクス班会議、沖縄、2009年11月9日-12日

⑫青柳共太、今泉美佳、永松信哉: ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼによるインスリン分泌機構の可視化解析. 文部科学省科学研究費補助金・新学術領域「細胞内ロジスティックス」第一回細胞内ロジスティクス班会議、沖縄、2009年11月9日-12日

⑬今泉美佳、藤原智徳<sup>1</sup>、金井正美: 膵β細胞における2相性インスリン開口放出機構

のイメージング解析. 平成 21 年度杏林医学会、東京、2009 年 11 月 21 日

⑭今泉美佳, 青柳共太, 永松信哉: GLP1 顆粒開口放出のイメージング. 2<sup>nd</sup> Incretin& Islet Initiative、東京 2009 年 11 月 28 日

⑮今泉美佳 : インスリン開口放出機構におけるアクチン細胞骨格の役割. 第 1 回『微小領域の形作り』研究会 伊香保、4 月 24-25 日 2008

⑯永松信哉, 今泉美佳: 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、5 月 22-24 日、2008

⑰今泉美佳, 青柳共太, 中道洋子, 西脇知世乃, 永松信哉 : 膵β細胞における細胞膜直下 Ca<sup>2+</sup>上昇とインスリン顆粒開口放出の関係. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、5 月 22-24 日、2008

⑱青柳共太, 今泉美佳, 西脇知世乃, 中道洋子, 金子和真, 植木浩二郎, 門脇孝, 永松信哉: ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼによるインスリン分泌制御機構の可視化解析. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、5 月 22-24 日、2008

⑲今泉美佳 : インスリン開口放出のリアルタイム可視化解析 生理学研究会『病態と細胞外プリン-治療標的としての可能性を探る』 岡崎、9 月 4-5 日、2008

[図書] (計 2 件)

①今泉美佳, 永松信哉 (杏林大・医・生化学) : インスリン顆粒の細胞内 trafficking (β細胞研究の最前線) 糖尿病学の進歩2009、(社)日本糖尿病学会編、診断と治療社、東京、pp20-24, 2009

② Nagamatsu S and Ohara-Imaizumi M. Mechanism of insulin exocytosis analyzed by imaging techniques. Pancreatic beta cell in health and disease (eds; Seino S. and G. I. Bell) Japan, Springer pp177-194. 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今泉 美佳 (MICA OHARA-IMAIZUMI)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40201941

### (2) 研究分担者

青柳共太 (AOYAGI KYOTA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 50453527

### (3) 連携研究者

永松信哉 (NAGAMATSU SHINYA)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 80231489