

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06535

研究課題名（和文）インスリン顆粒の開口放出過程における細胞膜ドッキングとプライミングの関係解明

研究課題名（英文）Relationship between docking and priming steps during insulin granule exocytosis

研究代表者

水野 広一（mizuno, kouichi）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：30321821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：インスリンは、開口放出により膵臓細胞から分泌される。細胞膜に結合したドッキング顆粒はプライミングを受け、刺激依存的に細胞膜と融合すると考えているが、プライミング過程で何が起こるのか不明である。本研究は、プライミング因子のMunc13に着目し、インスリン分泌に関与するMunc13の同定、およびMunc13による分泌制御機構の解明を目的とした。研究の結果、遍在型Munc13bがインスリン顆粒の開口放出を制御するプライミング因子であることが明らかになった。また、開口放出の直前にMunc13bがドッキング顆粒上に集積することから、開口放出の直前にプライミングが起こることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりインスリン顆粒の開口放出を制御するプライミング因子が遍在型Munc13bであること、またプライミングが起きるのは、開口放出直前であることを明らかにした。この知見は、神経細胞とは異なる内分泌細胞特有の開口放出制御機構の解明に貢献するだけでなく、Munc13bを標的としたドッキング顆粒からのインスリン分泌を促進する新たな作用機序を持つ糖尿病治療薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Insulin is secreted from pancreatic cells by exocytosis. We believe that docking granule, which attaches to the cell membrane, undergo priming and then fuses with plasma membrane in a stimulation-dependent fashion. However, it is still unclear what is happening during priming. This study focused on Munc13, which is known to a priming factor, and aimed to identify Munc13 isoform which involved in insulin secretion and to elucidate its regulatory mechanism of insulin secretion. As a result, it is revealed that ubiquitous form of Munc13b is a priming factor controlling the insulin granule exocytosis. It is also clarified that priming occurs just before exocytosis, based on the observation that Munc13b accumulates onto docking granules just before exocytosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：調節性分泌 インスリン 開口放出 分泌顆粒 生細胞観察

1. 研究開始当初の背景

グラニューフィリンは、低分子量 G タンパク質 Rab27a の GTP 結合型と特異的に結合するエフェクターであり、両者は共にインスリン顆粒に局在し、その輸送を制御している¹⁾。グラニューフィリン KO マウスの膵細胞では、細胞膜ドッキングしたインスリン顆粒は消失しており、グラニューフィリンはインスリン顆粒を細胞膜に係留するドッキング因子であると考えられる²⁾。グラニューフィリンが、細胞膜に局在し膜融合装置である SNARE 複合体を構成するシンタキシンとも結合することから³⁾、Rab27a・グラニューフィリン・シンタキシンを含むタンパク質複合体がインスリン顆粒を細胞膜に繋ぎ止めている可能性がある(図 1)。

シンタキシンは N 末端側に Habc ドメイン、中央に SNARE モチーフを含む H3 ドメイン、C 末端側に膜貫通領域を持つ膜タンパク質であり、開放型と閉鎖型の 2 つの立体構造をとる。閉鎖型の立体構造では、Habc ドメインが H3 ドメインを覆い隠しており、他の SNARE 分子と結合出来ず、膜融合能は抑制されている。グラニューフィリンが閉鎖型のシンタキシンと特異的に結合することから、グラニューフィリンによるドッキングは開口放出に対して抑制的と予想され、実際にグラニューフィリン KO マウス由来細胞では、ドッキング障害があるにもかかわらず、刺激依存性インスリン分泌が増大している³⁾。

細胞膜近傍のみ観察可能な全反射蛍光顕微鏡を使いグラニューフィリン標識膵細胞の顆粒運動を直接観察することで、大多数を占めるグラニューフィリン陽性顆粒の運動は陰性顆粒と比較して制限がかかっており、グラニューフィリンがドッキング顆粒のマーカーとして利用可能なことが判明した。加えて、開口放出の解析から、グラニューフィリン陽性のドッキング顆粒は陰性顆粒と比べて開口放出確率が低く、グラニューフィリンを介した細胞膜ドッキングが開口放出に対して抑制的であることも明らかとなった⁴⁾。一方、グラニューフィリン陽性ドッキング顆粒が分泌刺激に応答し開口放出したことから、ドッキング顆粒が細胞膜と融合する際、ドッキング複合体中のシンタキシンが閉鎖型から SNARE 複合体形成可能な開放型に立体構造変化する可能性が示唆された。

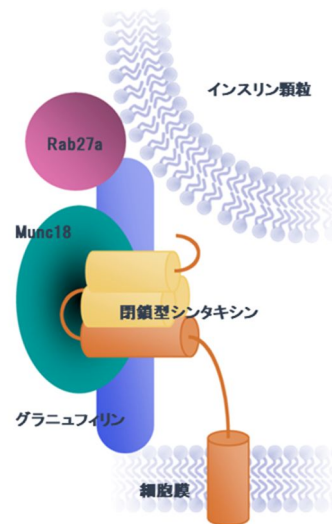


図1: インスリン顆粒を細胞膜に繋ぎ止めるドッキング装置の模式図

2. 研究の目的

閉鎖型シンタキシンは、Munc18 と高親和性に結合することで安定化しており、このままでは他の SNARE タンパク質とは結合出来ない。プライミング因子 Munc13 は、この閉鎖型シンタキシンと Munc18 の強い結合を解き、シンタキシンを開放型とすることで SNARE 複合体の形成を促進する因子と考えられている⁵⁾。

本研究は、膵細胞に発現する Munc13 アイソフォームを同定し、その発現を siRNA 導入によるノックダウン、あるいは CRISPR / Cas9 を使ったゲノム編集によるノックアウトすることで抑制してインスリン分泌への影響を検討することで、インスリン分泌に関与する Munc13 を同定することを目的とする。これらの成果を踏まえ、生細胞観察から開口放出に伴う Munc13 の動態と開口放出前の顆粒運動を検証し、Munc13 による分泌制御機構を解明することでインスリン顆粒の開口放出におけるプライミングとドッキングの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞での Munc13 遺伝子ノックダウン: Munc13 アイソフォーム特異的な siRNA を膵β細胞にトランスフェクション法により導入し、遺伝子ノックダウンを行った。Munc13 遺伝子ノックダウンの確認は、Munc13 タンパク質発現量をウエスタン法で検討することで行った。

(2) CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた Munc13 ノックアウト膵細胞株の作製: 各 Munc13 アイソフォームに対する gRNA 及び Cas9 がコードされたプラスミドをマウス膵細胞株 MIN6 細胞にトランスフェクション法により導入した。ゲノム DNA の変異は、細胞のクローニング後に標的領域のゲノム DNA をダイレクトシーケンシングすることで解析し、Munc13 遺伝子がノックアウトされた細胞株を実験に用いた。Munc13 ノックアウトは、抗 Munc13 抗体を用いたウエスタン法でも確認した。入戻し実験では、組換えアデノウイルス発現系を用い、内因性程度に外因性 Munc13 を発現させた。

(3) インスリン分泌解析：培地中および細胞内のインスリンを測定することでインスリン分泌応を検討した。

(4) 開口放出の直接観察：膵細胞のインスリン顆粒を蛍光標識し、全反射顕微鏡を用いて開口放出を直接観察した。顆粒が開口する際の顆粒内 pH 変化に起因する一過性の蛍光増大とそれに引き続く急速な蛍光減少の2つを指標に開口放出を同定した。開口放出は、直前の顆粒状態に基づき以下の3種に分類し解析した； 予め細胞膜近傍に存在した顆粒の開口放出 深部から細胞膜に到達した顆粒が暫く留まった後に起こす開口放出 深部から細胞膜に到達した顆粒が留まることなく起こす開口放出。

(5) キメラ Munc13 発現系の作成： SLiCE クローニングにより Munc13a と Munc13b の cDNA を任意の場所で繋ぎ合わせることでキメラ Munc13 の cDNA を作製した⁶⁾。これを用いて組換えアデノウイルス発現系を作製した。

4. 研究成果

(1) 抗 Munc13 抗体を用いたウエスタン法によりマウス単離膵島および MIN6 細胞に Munc13a と普遍型 Munc13b が発現していることを見出した。次に siRNA 導入により各 Munc13 アイソフォームをノックダウンしたところ、Munc13b をノックダウンした場合だけグルコース刺激によるインスリン分泌が抑制を受け、Munc13a ノックダウンはインスリン分泌に何ら影響を与えなかった。また、グルコース刺激によるインスリン顆粒の開口放出を直接観察したところ、Munc13b ノックダウン MIN6 細胞で、予め細胞膜近傍に存在する顆粒からの開口放出が抑制を受けて、他の様式の開口放出は影響を受けなかった。

(2) CRISPR-Cas9 をゲノム編集に使い、Munc13a および普遍型 Munc13b ノックアウト MIN6 細胞を作製し、グルコース刺激によるインスリン分泌を検討したところ、Munc13b ノックアウト細胞はグルコース刺激によるインスリン分泌応答が消失し、その代償として細胞内インスリン含量が増加していた。さらに、Munc13b ノックアウト細胞のインスリン分泌障害は、外因性に Munc13b を発現することで回復した。一方、Munc13a ノックアウト細胞は、親株と同様のグルコース応答性を示すと共に、Munc13b ノックアウト細胞に Munc13a を過剰発現してもそのインスリン分泌障害は回復しなかった。以上の知見は、普遍型 Munc13b がインスリン分泌を制御する Munc13 であることを示している。

(3) Munc13b ノックアウト細胞に蛍光標識 Munc13b を入れ戻し、全反射顕微鏡下に開口放出に伴う Munc13b の動態と開口放出直前の顆粒運動を併せて解析した。予め細胞膜近傍に存在する顆粒からの開口放出の内、約半数で開口放出直前に一過性の Munc13b 蓄積が観られた。この知見は、プライミング過程が、開口放出直前に起きる可能性を示しており、神経細胞を用いた研究から提唱されている、プライミング過程は分泌刺激より前に起きる、という説とは異なっていた。さらに、Munc13b 蓄積の有無による開口放出直前の顆粒運動の違いを比較検討したところ、Munc13b 蓄積が観られた顆粒の開口放出前運動は制限されていた。この知見は、グラニューフィリン陽性ドッキング顆粒特異的にプライミング因子 Munc13b が作用し、その開口放出を制御している可能性を示している。そこでグラニューフィリン標識細胞を用い、普遍型 Munc13b ノックダウンのグラニューフィリン陽性顆粒の開口放出への影響を検討したところ、Munc13b ノックダウンによりグラニューフィリン陽性ドッキング顆粒の開口放出は、ほぼ消失した。

(4) Munc13a と普遍型 Munc13b のアミノ酸配列は、非常に似ており、共に N 末端側から C2A、C1、C2B、DUF1041、MHD と C2C の6個のドメイン構造を同じ配列で持っている。そこで Munc13a と

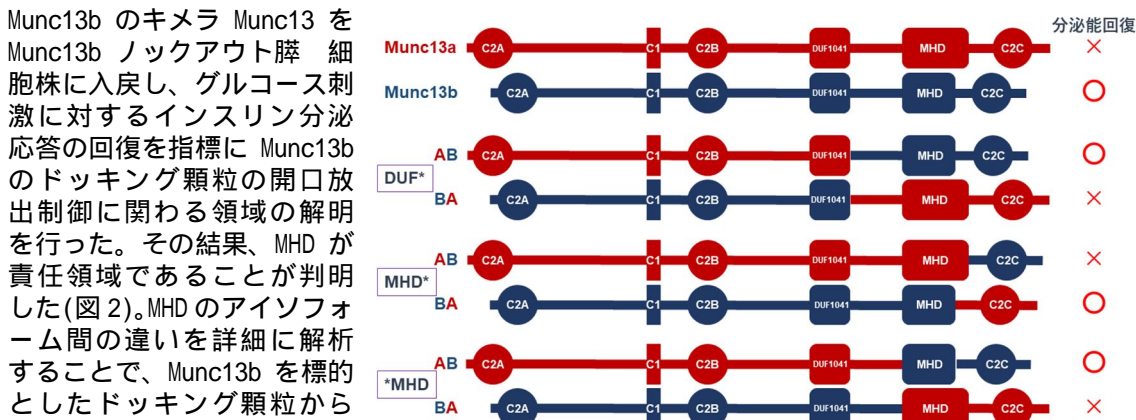


図2: キメラMunc13を用いたグルコース依存的インスリン分泌回復の責任領域マッピング

糖尿病治療薬の開発に繋がる可能性がある。

<引用文献>

1. Yi Z, Yokota H, Torii S, Aoki T, Hosaka M, Zhao S, Takata K, Takeuchi T, Izumi T. 2002. The Rab27a/granophilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol Cell Biol.* 22, 1858-1867.
2. Gomi H, Mizutani S, Kasai K, Itohara S, Izumi T. 2005. Granophilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol.* 171, 99-109.
3. Torii S, Zhao S, Yi Z, Takeuchi T, Izumi T. 2002. Granophilin modulates the exocytosis of secretory granules through interaction with syntaxin 1a. *Mol Cell Biol.* 22, 5518-5526.
4. Mizuno K, Fujita T, Gomi H, Izumi T. 2016. Granophilin exclusively mediates functional granule docking to the plasma membrane. *Sci Rep.* 6, 23909.
5. Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J. Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. 2011. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 542-549.
6. Motohashi K. 2017. Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) Method Using Cell Lysates from Laboratory Escherichia coli Strains and its Application to SLiP Site-Directed Mutagenesis. *Methods Mol Biol.* 1498, 349-357.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuno Kouichi、Izumi Tetsuro	4. 巻 47
2. 論文標題 Munc13b stimulus-dependently accumulates on granuphilin-mediated, docked granules prior to fusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 31～41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22005	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 -

1. 著者名 Zhao Kunli、Matsunaga Kohichi、Mizuno Kouichi、Wang Hao、Okunishi Katsuhide、Izumi Tetsuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional hierarchy among different Rab27 effectors involved in secretory granule exocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	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） 10.7554/eLife.82821	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 -

1. 著者名 Wang Hao、Mizuno Kouichi、Takahashi Noriko、Kobayashi Eri、Shirakawa Jun、Terauchi Yasuo、Kasai Haruo、Okunishi Katsuhide、Izumi Tetsuro	4. 巻 69
2. 論文標題 Melanophilin Accelerates Insulin Granule Fusion without Predocking to the Plasma Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2655～2666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db20-0069	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 趙崑荔、松永耕一、水野広一、王昊、奥西勝秀、泉哲郎
2. 発表標題 複数の Rab27 エフェクター Exophilins が制御する、インスリン顆粒開口放出機構
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野 広一, 泉 哲郎
2. 発表標題 Munc13によるインスリン顆粒の開口放出制御
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王 昊, 水野 広一, 奥西 勝秀, 泉 哲郎
2. 発表標題 Rab27エフェクター蛋白質メラノフィリンは、細胞膜にドッキングしていないインスリン顆粒からの開口放出を促進させる
3. 学会等名 日本糖尿病学会
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 泉研究室 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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------