

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790354
研究課題名（和文） Rab27たんぱく質を中心とした調節性分泌機構の分子基盤の解明
研究課題名（英文） Molecular basis of Rab27 GTPase-mediated regulated exocytosis

研究代表者
松永 耕一（MATSUNAGA KOHICHI）
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：20570162

研究成果の概要（和文）：

調節性分泌経路におけるRab27を中心とした分子メカニズムを調べるため、様々な分泌細胞内でのRab27a結合たんぱく質の網羅的探索をおこなった。これにより特異的に結合するたんぱく質を数十種以上同定し、各分泌細胞に特異的な結合たんぱく質も多数発見された。これにより本申請の目的であった、Rab27の分泌制御メカニズム解明のための基礎的なデータを得ることが出来た。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the molecular mechanism of Rab27 GTPase-mediated regulated exocytosis, I performed comprehensive proteomic analysis of Rab27a binding proteins in various secreting cells. I identified dozens of novel Rab27a binding proteins and also identified cell strain specific binding proteins. Therefore, I obtained basic data to clarify the molecular mechanism for regulating Rab27-mediated exocytosis pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：β細胞、Rab27、調節性分泌

1. 研究開始当初の背景

（1）細胞内で合成された物質を細胞外へ放出する過程を分泌というが、そのなかでも調節性分泌とは、細胞外からの刺激を感知し、それに応じて分泌小胞に貯留してある生理活性物質を細胞外に放出する機構であり、その過程は厳密に制御されている。調節性分泌経路は、多細胞生物内における複雑な生理活

動を統合的に行うための、細胞間コミュニケーションのツールとして多様に分化してきた。例えば膵臓ランゲルハンス島のα細胞、β細胞では、血中のグルコース濃度を感知して、それぞれ血糖値を上げるグルカゴン、逆に血糖値を下げるインスリンを分泌し、血糖値を一定に調節している。また脳下垂体では、自律機能の中枢である視床下部からの刺激を受けて各種ホルモンを分泌するが、例えば

コルチコトロフで分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は副腎皮質からの副腎皮質ホルモンの分泌を促し、様々なストレスに対する反応を制御している。さらに内分泌系だけでなく、神経細胞におけるシナプス小胞の開口放出、メラノサイトで合成されたメラニン色素の皮膚ケラチノサイトへの受け渡し、消化管上皮細胞からの消化酵素の外分泌等、調節性分泌経路は多岐にわたっている。そしてこれら分泌経路の破綻は糖尿病をはじめとした様々な代謝疾患を引き起こすので、調節性分泌経路の分子機構の解明は代謝疾患における病態解明につながると考えられる。しかしながら各分泌細胞における分泌様式は一様ではなく、例えば刺激後から分泌反応が起こるまでの時間は神経細胞ではミリ秒単位、内分泌細胞では秒単位、外分泌細胞では分単位と、分泌小胞の開口放出のキネティクス一つをとっても、細胞の種類によって多様になっている。このようにそれぞれの調節性分泌細胞は個性的な分泌様式を持つことから、分泌過程を制御する分子も一部異なることが予想される。

(2) これまで国内外の研究により、様々な調節性分泌細胞では Rab27 たんぱく質が共通して発現・機能していることがわかってきた。Rab27 は細胞内膜輸送を調節している small GTPase であり、そのアイソフォームの一つ Rab27a の自然変異マウス *ashen* からの膵β細胞では、グルコース刺激によるインスリン分泌が半分に減少し、グルコース負荷後の血糖値が高値になる。さらにその名の由来の通り、メラニン色素の受け渡しもうまく行かないために体毛の淡色化が起こっている (*J Clin Invest.* 115:388-96 2005.)。Rab27 はアミノ酸配列の類似する 10 種類以上のたんぱく質ファミリー {Rab27 エフェクターファミリー (Exophilin/synaptotagmin-like protein family)} と結合することがわかっている。これら Rab27 エフェクターは、例えば膵β細胞では Granuphilin である一方、膵α細胞では Exophilin4/slp2 であり (*Mol Biol Cell.* 18:688-96 2007.)、分泌細胞の種類によって相互作用しているものが異なっているが、その機能差異の詳細はよくわかっていない。これまで膵β細胞における Rab27a とそのエフェクター Granuphilin については比較的機能解析がなされているが、Rab27a 欠損では前述の通りインスリン分泌能が阻害されるが、Granuphilin ノックアウトマウスでは逆に亢進しており、全く正反対の表現型を示す。この事実は、Rab27a, Granuphilin の各々の作用に未知の分子が関与することを

示唆している (*J Cell Biol* 171; 99, 2005)。

2. 研究の目的

調節性分泌の分子メカニズムは十分に解明されておらず、それぞれの分泌細胞の特異性についても謎が多い。申請者は多様な調節性分泌細胞に共通して機能する Rab27 と結合するたんぱく質を網羅的に探索し、それぞれの分泌細胞で同定された Rab27 結合たんぱく質の比較機能解析を行うことにより、多様な調節性分泌細胞の分子機構を解明する。分泌細胞間で、Rab27 を介した分泌経路における必須のメカニズム (分泌細胞間で共通の結合たんぱく質) と、細胞の特異性を発現させるメカニズム (分泌細胞間で異なる結合たんぱく質) があるかどうかを調べ、それらの機能解析をする。すなわち調節性分泌にはどのような分子機構が共通して必須で、どのような分子機構がそれぞれの分泌細胞の特異性 (刺激の感知、輸送のキネティクス等) を決定しているかを調べ、調節性分泌経路の分子基盤の解明を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 申請者は以前、MEF タグと呼ばれる、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、タンデムにつなげたアフィニティータグを用いた多段階免疫沈降法 (図 1) と、質量分析装置による網羅的結合たんぱく質の探索を、オートファジーという細胞内小胞輸送系に機能する Beclin と呼ばれるたんぱく質に対して行い、新規のたんぱく質を二種類発見した (Atg14L, Rubicon と命名)。その結果、Beclin たんぱく質が異なる二つの複合体を構成し、オートファジー経路とエンドサイトーシス経路二種類の小胞輸送系に、それぞれ異なった制御を行っているということを世界で初めて発見した (*Nature Cell Biol* 11:385, 2009)。

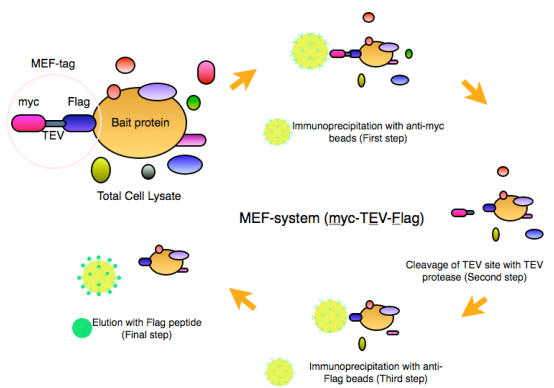


図 1 MEF-tag 多段階免疫沈降法の概要

そこで本研究でも既に経験のあるこのMEFタグを用いたシステムを用い、マウス膵β細胞由来株 MIN6 細胞、マウス膵α細胞由来株 α TC1.6 細胞、マウスメラノーマ細胞株 B16 細胞において、Rab27 結合たんぱく質の網羅的探索を行った。そして同定された Rab27 結合たんぱく質群から共通のものと異なるものを比較し、共通に同定された新規たんぱく質、また細胞特異的に同定されたたんぱく質に分類した。

(2) 具体的な実験の流れは以下の通りである。①まず MEF-Rab27a を安定に発現した細胞株 (MIN6, α TC1.6, B16) をレトロウイルスによる発現系により樹立した。次に 14 cm 細胞培養ディッシュ 10 枚分 (MEF タグのみを安定発現した株をコントロールとして用い、これも 10 枚用意) の細胞をプロテアーゼインヒビターを添加した 1% Triton-X100 により溶解し、不溶性画分を遠心分離によって取り除いた。これをたんぱく質抽出液として、以下の免疫沈降実験に用いた。②たんぱく質抽出液に anti-myc モノクローナル抗体 (9E10) とプロテイン G アガロースビーズを添加し、4°C で 90 分インキュベーションした後、遠心操作によりビーズを回収した。ビーズを緩衝液で洗浄した後、TEV プロテアーゼを添加し、室温で 60 分インキュベーションした。上清を回収し、次の実験に用いた。③上清に anti-Flag アガロースビーズを添加し、室温で 90 分インキュベーションし、遠心操作によりビーズを回収した。ビーズを緩衝液で洗浄した後、Flag ペプチドを添加し、室温で 60 分インキュベーション後、上清を回収した。これを精製された MEF-Rab27a とその結合たんぱく質として、次の実験に用いた。④精製されたサンプルは SDS-PAGE による分離を行い、Oriole gel stain (BioRad 社) によるたんぱく質染色を行った。現れたバンドをカットし、トリプシンによる消化後、質量分析計を用いてたんぱく質同定を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス膵β細胞由来株 MIN6 細胞、マウス膵α細胞由来株 α TC1.6 細胞、マウスメラノーマ細胞株 B16 細胞の MEF-Rab27a 安定発現株において、MEF-tag を用いた Rab27 結合たんぱく質の網羅的探索を行った。MIN6 については 20 本のたんぱく質バンドを検出し、これらについてすべて質量分析計を用いたところ、44 種類のたんぱく質同定に成功した (図 2)。さらに同様の実験を α TC1.6 細胞、B16 細胞にも行ったところ、それぞれ 16 本、10 本のバンドを検出し、21 種類、9 種類のたんぱく質同定に成功した (図 3)。これら同定されたたんぱく質の 3 割程度は細胞内小胞輸送 (メンブレントラフィック) 系の

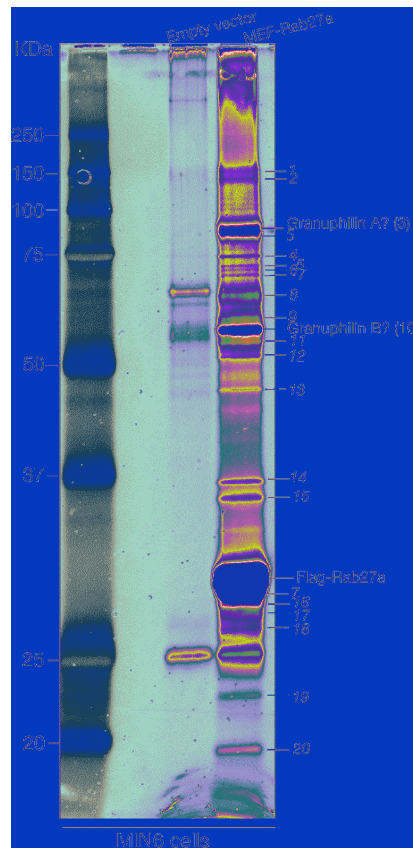


図 2 MEF-Rab27a 安定発現膵β細胞株 MIN6 において検出された 20 本のたんぱく質バンド

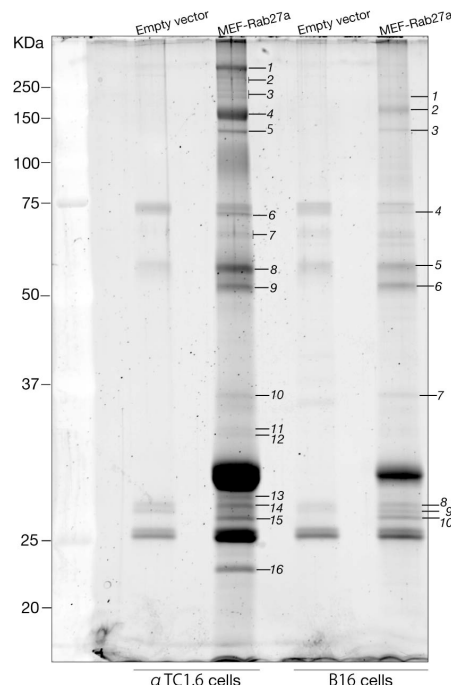


図 3 MEF-Rab27a 安定発現膵α細胞株 α TC1.6 及びメラノーマ細胞株 B16 において検出されたたんぱく質バンド

ものであった。
 さらにこれら同定された Rab27a 結合たんぱく質の細胞株で共通のものと細胞株特異的なものとで分類したところ、3種類の細胞で共通して同定されたたんぱく質は6種類あり、一方で細胞株特異的なものも多数あった(図4)。これは様々な分泌細胞間で、Rab27aを介した分泌経路における必須のメカニズム(分泌細胞間で共通の結合たんぱく質)と、細胞の特異性を発現させるメカニズム(分泌細胞間で異なる結合たんぱく質)がある可能性を示唆する知見であり、本申請の目的であった、Rab27の分泌制御メカニズム解明のための基礎的なデータを得ることが出来た。さらに膵β細胞株から同定された一つの新規 Rab27a 結合たんぱく質について解析を進めたところ、このたんぱく質はインスリン顆粒に局在することがわかった。さらにノックダウンにより発現を抑制すると、グルコース刺激に依存したインスリン分泌が低下するという知見が得られており、インスリン分泌に必須であることが示された(未発表)。これについては今後データを蓄積し、論文発表を行う予定である。その他の同定されたたんぱく質についても、随時解析を進めて行く予定である。

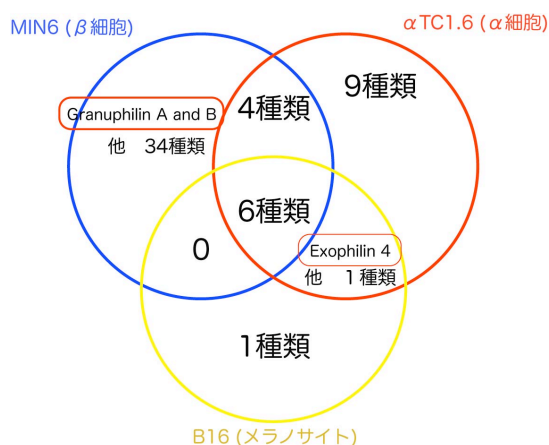


図4 3種類の細胞株から同定されたたんぱく質のうち、共通のものと細胞特異的なものとを分類した模式図

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 耕一 (MATSUNAGA KOHICHI)
 群馬大学・生体調節研究所・助教
 研究者番号：20570162

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし