

108. 分泌顆粒分解の誘導機構の研究

板倉 英祐

*千葉大学 大学院融合科学研究科 ナノサイエンス専攻 ナノバイオロジーコース

Key words : リソソーム, タンパク質分解, 分泌顆粒

緒言

分泌タンパク質は小胞体で合成されたのち、速やかに細胞外へ分泌されるが、ペプチドホルモンは分泌顆粒内で細胞質に貯蔵され、必要時に細胞外へ分泌される。しかし分泌刺激後にすべての分泌顆粒が無作為に分泌されるのではなく、老化した分泌顆粒よりも若い分泌顆粒が優先的に分泌されることが知られている。このことは不要になった分泌顆粒を排除する機構があることを示唆している。しかしその分子機構は明らかとなっていない。

そこで本研究では細胞内分泌顆粒の分解を誘導する経路を調べるため、分解量を測定する新しい細胞内分泌顆粒分解測定法を開発した。本アッセイ法を用いることで、細胞内の分泌顆粒が分泌のみでなく、細胞内分解を受けることを簡便かつ定量的に測定できるようになった。

方法および結果

1. 分泌顆粒分解測定法の開発

分泌顆粒がリソソームへ輸送されたかどうか確認する方法はこれまで透過型電子顕微鏡による細胞内微細構造観察や、ラジオラベルなどが使用されてきたが、1回の実験に多くの労力を要する。そのため簡便にかつ定量的にリソソームへ運ばれたペプチドホルモンの量を測定する方法の開発に取り組んだ。インスリン遺伝子に GFP (緑色蛍光タンパク質) と mCherry (赤色蛍光タンパク質) 配列を融合 (Insulin-CG) させ、インスリン産生細胞に導入した (図 1)。Insulin-CG が分泌されると細胞あたりの両蛍光が減少する。一方で Insulin-CG がリソソーム内に輸送されると、リソソーム内は酸性であるため pH 感受性の GFP は蛍光を失うが、pH 非感受性の mCherry の蛍光は残る。よってインスリンがリソソームへ輸送された指標として細胞あたりの mCherry/GFP の蛍光比率を用いることが可能となる。

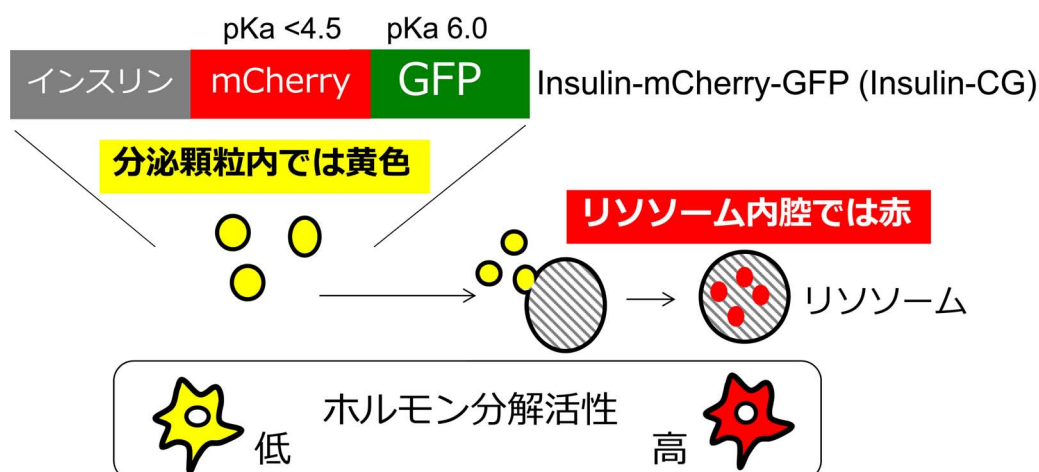


図1. 蛍光比率を利用した crinophagy 活性測定法の開発

酸性に感受性の GFP と非感受性の mCherry をインスリンに融合させたタンパク質を発現させる。ホルモンが分泌顆粒内にある場合は、両蛍光が陽性となるため、黄色となる。一方でリソソームへ運ばれると GFP 蛍光のみすみやかに消失するため、mCherry の蛍光が残り赤色となる。

2. 細胞内インスリンはアミノ酸飢餓時に分解される

Insulin-CG がリソソーム活性に影響を受けるか調べるため、Insulin-CG 発現細胞をリソソーム阻害剤である BafilomycinA1 を加えて培養した。その結果、mCherry/GFP 比率の低下が認められた (図 2A、B)。オートファジーは栄養飢餓時に誘導されることが知られている¹⁾。よって Insulin-CG 細胞を栄養飢餓に暴露すると、mCherry/GFP 比率の増加がみられた (図 2C)。これらのことから Insulin-CG がリソソームへ輸送された量を mCherry/GFP の比率によって測定できることが確認できた。

Insulin-mCherry-GFP

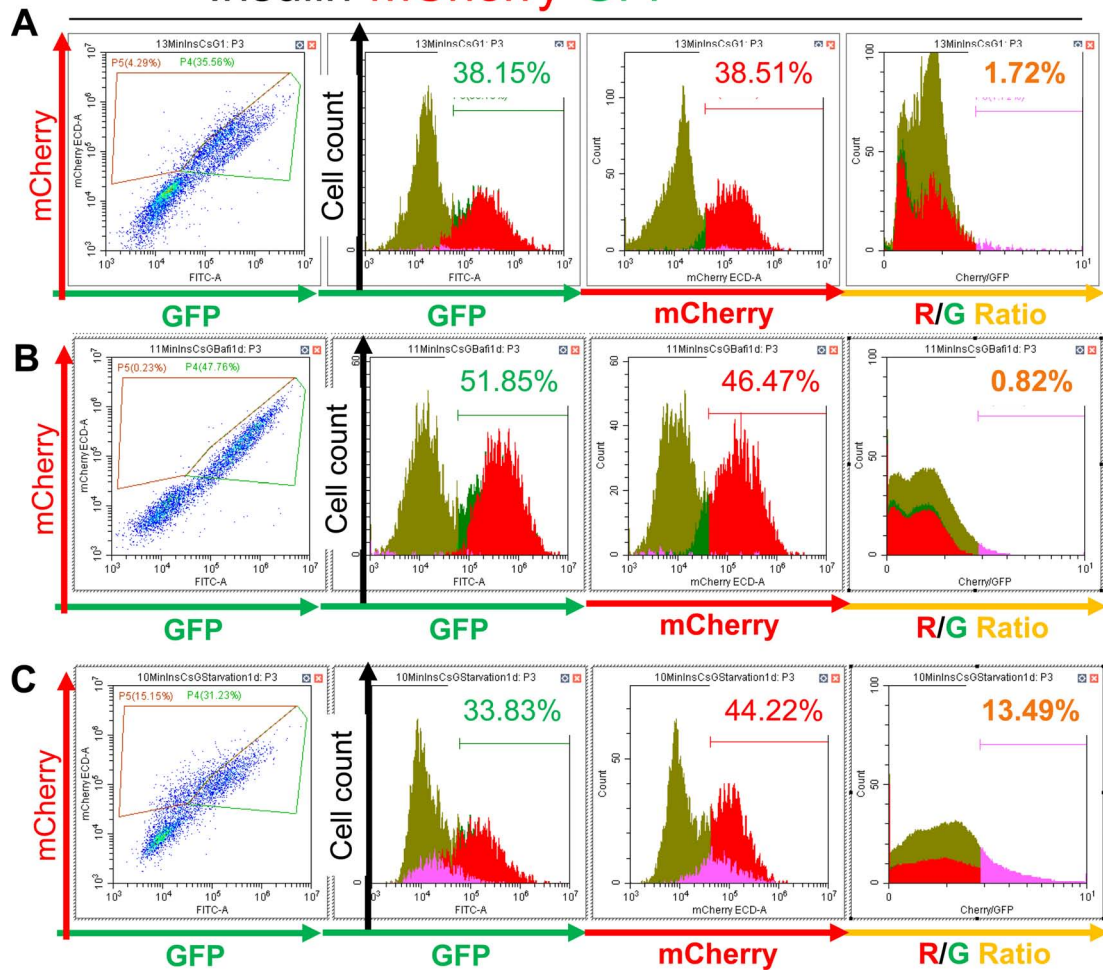


図2. インスリンはアミノ酸飢餓時に分解される

Ins-CG を発現するインスリン産生細胞を処理なし (A) もしくは BafilomycinA1 存在下 (B)、または栄養飢餓下 (C) で培養した後、細胞を回収し、フローサイトメーターによって細胞あたりの GFP と mCherry の発現量を測定した。GFP と mCherry のドットプロット、GFP、mCherry または mCherry/GFP 比率をヒストグラムで示す。

3. グルコース飢餓によるインスリンへの影響

ホルモン分泌が不要になった場合、細胞内の貯蔵されていた分泌顆粒は細胞内分解を受けると考えられる。インスリンは細胞外グルコース濃度が低下すると分泌抑制されることが知られている²⁾。細胞内 Insulin-CG の分泌と分解をとらえるため、Doxycycline 依存的プロモーターによって一過的に Insulin-CG を発現させたのち、細胞内 Insulin-CG の蛍光量を測定した (図3)。グルコース存在下では GFP ならびに mCherry 蛍光が消失したが、グルコース非存在下では両蛍光が細胞内に蓄積するが、mCherry/GFP 比率の増加は見られなかった。このことから予想通りグルコース飢餓によるインスリン分泌の抑制はみられたが、少なくとも培養細胞内ではグルコース飢餓時にインスリン分解は増加しないと考えられた。

Insulin-mCherry-GFP

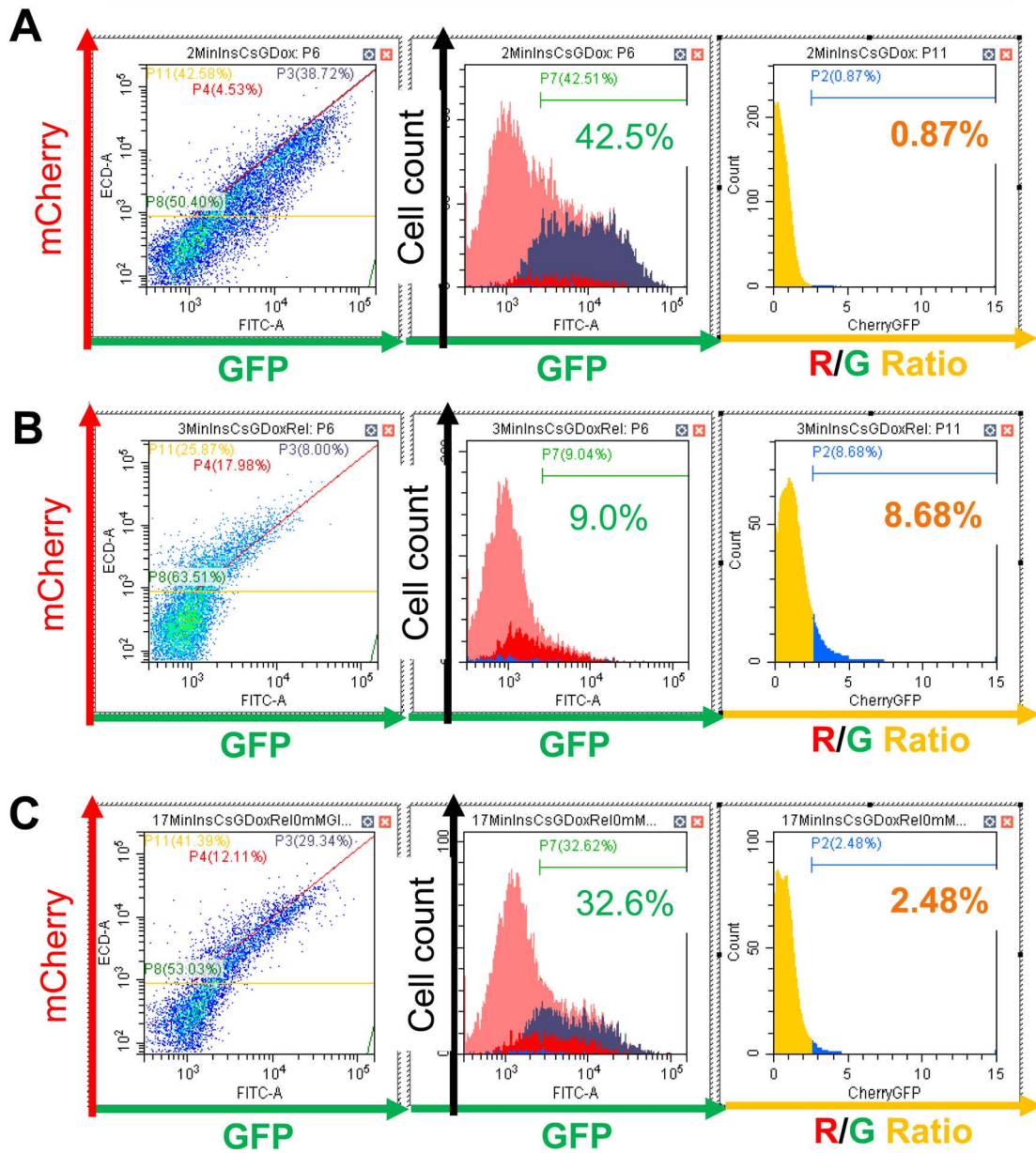


図3. グルコース飢餓によるインスリンへの影響

Doxycycline 依存的に Ins-CG を発現するインスリン産生細胞を Doxycycline 存在下 (A)、Doxycycline 処理したのち Doxycycline 非存在下で1日培養 (B)、Doxycycline 処理したのち Doxycycline とグルコース非存在下で1日培養 (C) した細胞を回収し、フローサイトメーターによって細胞あたりの GFP と mCherry の発現量を測定した。GFP と mCherry のドットプロット、GFP、mCherry または mCherry/GFP 比率をヒストグラムで示す。

4. 栄養飢餓はインスリンのリソソームへの輸送を促進する

Insulin-CG がリソソームに運ばれているか直接調べるために、栄養培地もしくは栄養飢餓培地で培養した細胞を固定後、リソソームマーカーである Lamp1 タンパク質を蛍光染色し、それぞれの局在を観察した (図4)。その結果、栄養培地においてドット状に観察される Insulin-CG はリソソームと共局在しないが、栄養飢餓後の Insulin-CG は GFP が消

失し mCherry 陽性のドット構造体の多くがリソソームと共局在した。mCherry よりも GFP がより分解されることから、Insulin-CG はリソソーム内に輸送されたことが確かめられた。

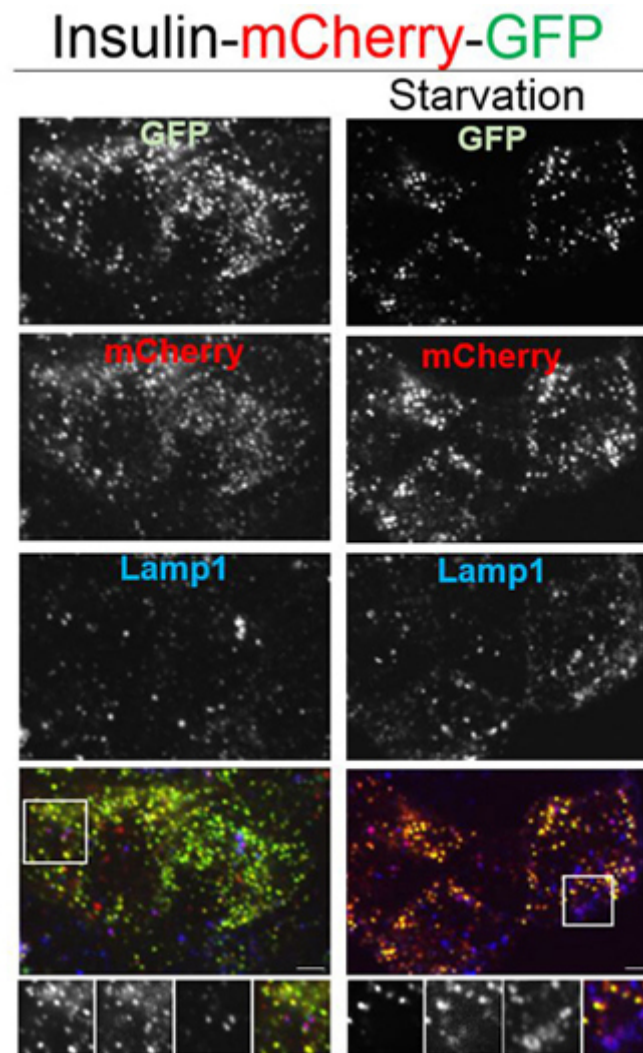


図 4. 栄養飢餓はインスリンのリソソームへの輸送を促進する

Ins-CG を発現するインスリン産生細胞を通常栄養培地または栄養飢餓下で培養した後、細胞を固定した。Lamp1 抗体による染色後、蛍光顕微鏡によって細胞を観察した。スケールバー：10 μ m

考 察

新規に開発した分泌顆粒分解測定法を利用することで、分泌されずに細胞内分解を受けるホルモンを簡便かつ定量的な測定が可能となった。実際にアミノ酸飢餓によってインスリンがリソソームで分解されることを効率的に観察できた。現在、本測定法を応用することで、分泌顆粒が直接リソソームと融合するクリノファジーの分子機構の解明に取り組んでいる。

また実験の過程で、ユビキチン化と選択的オートファジーの関連についても研究を行った。その結果、ユビキチン化タンパク質は恒常的オートファジーの主な基質でないことを見出し、国際紙に報告した³⁾。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) The role of Atg proteins in autophagosome formation. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:107-32. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005. Epub 2011 Jul 18. PMID: 21801009
- 2) Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. Rorsman P, Braun M. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:155-79. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183754. Epub 2012 Sep 4. PMID: 22974438
- 3) Dissection of ubiquitinated protein degradation by basal autophagy. Takayama K, Matsuura A, Itakura E. *FEBS Lett.* 2017 May;591(9):1199-1211. doi: 10.1002/1873-3468.12641. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28369861