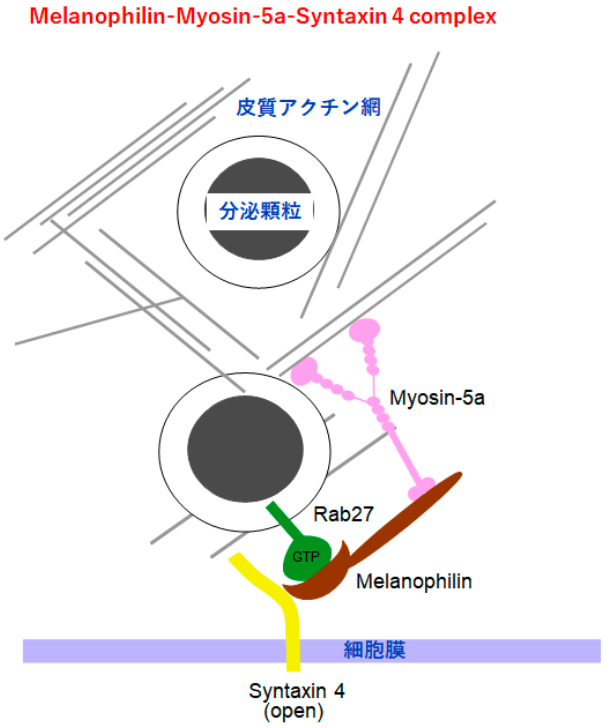
26　調節性分泌経路における分泌顆粒開口放出機構	泉　哲郎

【目的】単量体 GTPase Rab27 とその GTP 結合型に結合するエフェクター分子は、刺激に応じて生理活性物質を放出する調節性分泌経路において、分泌小胞膜の細胞内輸送を制御している。Rab27 エフェクターの 1 つ Melanophilin は、アクチン線維上で働くモーター・タンパク質 Myosin-Va と結合活性を持つことから、細胞辺縁部皮質アクチン網内における分泌小胞の捕捉または輸送に関わる可能性があるが、その役割は解明されていない。本研究では、膵β細胞におけるインスリン分泌過程を対象にして、その機能と作用機構を解明する。

【方法】Melanophilin をコードする遺伝子の自然変異を有する *leaden* マウスと野生型マウスの膵島および単離β細胞を用いて、インスリン分泌能を比較解析する。通常の生理学的、形態学的、生化学的解析に加え、全反射顕微鏡を用いて、蛍光標識したインスリン顆粒の開口放出を生きた細胞でリアルタイムに観測する。また、Melanophilin 分子と相互作用するタンパク質を同定し、その結合能を欠失させた変異体を *leaden* マウス膵β細胞に導入し、インスリン分泌能が回復するかどうかを調べ、Melanophilin 作用の分子機序を解明する。

【結果】*leaden* マウスでは、耐糖能が低下し、単離膵島におけるグルコース依存性インスリン分泌能が減弱していた。Melanophilin は、膵β細胞に発現し、インスリン顆粒膜に局在していた。インスリン顆粒の開口放出を全反射顕微鏡で直接観察すると、*leaden* マウス膵β細胞では、刺激前に細胞膜近傍に局在していなかった顆粒からの開口放出頻度が、野生型膵β細胞に比べて、特異的に減弱していた。膵β細胞内で、Melanophilin は、Rab27a, Myosn-Va, Syntaxin-4 に結合しており、そのいずれかの結合を失わせた Melanophilin 変異体は、野生型と異なり、*leaden* マウス膵β細胞におけるインスリン分泌能低下を回復させなかった。以上のことから、Melanophilin がこれら分子との複合体形成を介して、分泌顆粒が安定的な細胞膜ドッキングを介さずに膜融合を起こす機構を仲介している可能性が示唆された。

Rab27 エフェクターMelanophilin による分泌顆粒開口放出機構



26. 調節性分泌経路における分泌顆粒開口放出機構

泉　哲郎

群馬大学 生体調節研究所 遺伝生化学分野

Key words：インスリン顆粒，細胞膜ドッキング，皮質アクチン網，Rab27 エフェクター，SNARE

緒　言

本研究では、膵β細胞におけるインスリン顆粒を例にとって、分泌顆粒がいかにして細胞辺縁部皮質アクチン網に輸送され、開口放出可能な状態に至るのか、その機構を解明する。これまで、刺激に応じて生理活性物質を放出する調節性分泌経路において、分泌小胞膜と細胞膜の融合という最終過程は詳細に研究されてきたが、それに至るまでの細胞内部で起こる前過程の仕組みは解明が遅れている［1］。単量体 GTPase Rab27 は、調節性分泌経路において、分泌小胞膜の細胞内輸送を制御しているが、その GTP 結合型に結合するエフェクター分子を介して、具体的にどのように作用しているのかは十分に解明されていない［2］。11 種ある Rab27 エフェクターのうち、Exophilin-8、Melanophilin は、アクチン束上で働くモーター・タンパク質ミオシンに結合活性を持つことから、顆粒のアクチン網捕捉に関与する有力な分子と考えられる。最近、私たちは、Exophilin-8 が、RIMBP2 という分子を介して Myosin-7a と間接的に結合することによって、分泌顆粒を皮質アクチン網に集積させることを見出した［3］。もう一方の Melanophilin は、皮膚メラノサイト（色素細胞）からケラチノサイト（角化細胞）へのメラノソーム（メラニン色素を含む細胞内小胞）の移行に関与し、その変異はマウスにおける毛色、ヒトにおける皮膚色素の淡色化を引き起こすことが知られているが［4, 5］、他組織における機能はほとんど知られていない。私たちは、Melanophilin が膵β細胞に発現し、インスリン顆粒膜上の Rab27a、皮質アクチン網内の Myosin-Va と結合していることを見出した。そこで、Melanophilin 変異マウス *leaden* とその膵島、膵β細胞を用いて、インスリン分泌能を解析したところ、耐糖能とインスリン分泌能の低下を認めた。次に、細胞膜直下の事象を特異的に観察できる全反射顕微鏡でインスリン顆粒の開口放出を直接観察すると、*leaden* 膵β細胞では、刺激前にあらかじめ細胞膜近傍に局在していなかった顆粒からの開口放出頻度が、野生型膵β細胞に比べて特異的に減弱していた。また、Melanophilin が、分泌顆粒膜と細胞膜との融合に関わる SNARE タンパク質の 1 つ Syntaxin-4 と結合することを見出し、上記 Rab27a、Myosn-Va との相互作用に加え、Syntaxin-4 との相互作用が、Melanophilin によるインスリン分泌促進に重要であることがわかった。

方　法

1.　Melanophilin 変異マウス *leaden* の解析

leaden マウスと、それに対応する対照マウス C57BR/cdJ を用いて、グルコースあるいはインスリンを腹腔内に投与後、血液中のグルコース濃度を測定し、耐糖能、インスリン感受性を個体レベルで比較した。また、膵管内にコラゲナーゼを注入し、膵島を単離し、灌流実験により、グルコース依存性インスリン分泌能を調べた。さらに単離膵島をトリプシン処理し、膵β細胞を単層培養し、EGFP-プロインスリンをコードするアデノウィルスを感染させて分泌顆粒を蛍光標識し、全反射顕微鏡でリアルタイムにインスリン顆粒開口放出を観測した。

2.　インスリン分泌過程における Melanophilin の機能と作用機序の解析

膵β細胞内で Melanophilin と結合する分子を免疫沈降法で探索した。さらに、これら分子との結合活性を失わせる Melanophilin 変異体を作製し、*leaden* マウス膵島または膵β細胞に導入し、細胞内局在とインスリン分泌能を調べ、野生型 Melanophilin を導入した場合と比較して、分子間相互作用の生理学的意味と、インスリン分泌過程における Melanophilin の作用機序を解析した。

結　果

1.　Melanophilin 変異マウス *leaden* の表現型

leaden マウスは、対照マウスに比し、耐糖能が低下していたが、インスリン感受性は変化していなかった。また、Melanophilin は、膵島に発現し、*leaden* マウス単離膵島は、野生型膵島に比し、刺激依存性インスリン分泌能が低下していた（図 1）。さらに、インスリン顆粒を蛍光標識した膵β細胞を用いて、分泌顆粒の開口放出を観察すると、あらかじめ細胞膜近傍に安定的に局在する過程を経ずに、急速に細胞膜直下に現れて膜融合する、*Passenger* と呼ばれるタイプの開口放出［6］が、*leaden* 膵β細胞で、特異的に減弱していることが判明した（図 2）。

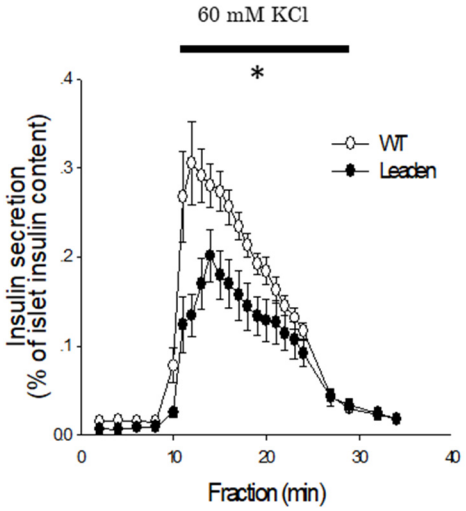


図 1.　*leaden* マウス膵島の刺激依存性インスリン分泌能

マウスより単離した膵島の灌流実験。*P < 0.05（Student's t-test）.

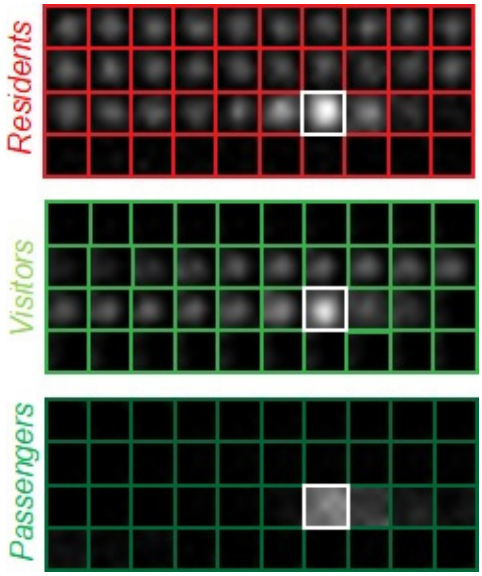


図 2.　全反射顕微鏡観察によるインスリン分泌顆粒開口放出

開口放出様式の 3 つのタイプ（*Resident*、*Visitor*、*Passenger*）。103 ms ごとの像、白枠は膜融合開始時を示す。*Resident*、*Visitor* 型開口放出は、蛍光標識した分泌顆粒が、それぞれ刺激前あるいは刺激中に可視化され、膜融合前に細胞膜近傍に局在しているが、*Passenger* 型開口放出は、膜融合前に可視化されておらず、あらかじめ細胞膜近傍に局在していないことがわかる。

2. Melanophilin と Syntaxin-4 の相互作用と、その機能的意義の解析

これまで、Melanophilin は、皮膚メラノサイトで、メラノソーム膜上の Rab27a とアクチン線維上で働くモーター・タンパク質 Myosin-Va と結合していることが知られている。私たちは、膵β細胞において、Melanophilin が、上記分子に加え、分泌顆粒膜と細胞膜との融合に関わる SNARE タンパク質の 1 つ Syntaxin-4 と結合することを見出した（図 3）。また、Melanophilin-Syntaxin-4 複合体は、分泌刺激後に上昇する細胞内 Ca^{2+}依存性に形成されることがわかった。

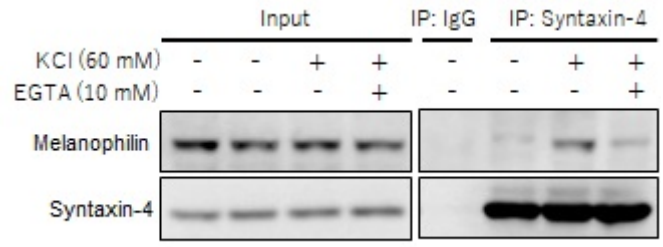


図 3. 膵β細胞株 MIN6 における、Melanophilin と Syntaxin-4 の相互作用

MIN6 細胞抽出液において Syntaxin-4 抗体による免疫沈降を行い、沈降物中のタンパク質を、電気泳動後、イムノブロット法で検出。Melanophilin-Syntaxin-4 複合体は、高 K^+溶液による分泌刺激後に形成されるが、あらかじめ EGTA で細胞外から細胞内に流入する Ca^{2+}をキレートしておくと、その形成が抑制される。

さらに、Melanophilin が、その N 端領域で Syntaxin-4 と結合することを見出し、同領域のアミノ酸に変異を導入することによって、Syntaxin-4 と結合できない変異体を作製した。そして、*leaden* マウス膵島に Melanophilin を導入したところ、変異型は、野生型と異なり、インスリン分泌能を回復させることができなかった（図 4）。全反射顕微鏡でインスリン顆粒開口放出を観察したところ、野生型のみ、減弱していた *Passenger* タイプの開口放出を回復させることがわかった。また、既知の Rab27a、Mysoin-Va との結合をそれぞれ欠失させた変異型 Melanophilin も、*leaden* マウス膵β細胞のインスリン分泌能を回復できなかった。以上のことより、Melanophilin は、Rab27a、Mysoin-Va に加え、新規に見出された Syntaxin-4 との相互作用を介して、インスリン分泌を促進させることがわかった。

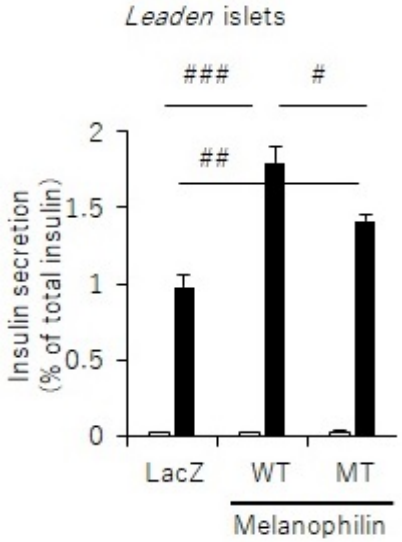


図 4. *leaden* 膵β細胞におけるインスリン分泌減弱の機能回復実験

leaden 膵島に、LacZ、野生型 WT、または Syntaxin-4 結合欠失変異型 MT の Melanophilin を導入し、低グルコース液（白棒グラフ）、高グルコース液（黒棒グラフ）刺激後インスリン分泌能を計測。
#P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 (one-way ANOVA).

考　察

分泌小胞は、まず、細胞膜と安定的に接着するという「ドッキング」過程の後に、開口放出可能な「プライミング」の状態になり、はじめて膜融合が起きると考えられてきた［1］。しかし、全反射顕微鏡などで、生細胞でリアルタイムに開口放出前の顆粒の動態を観察することができるようになり、開口放出前に安定的に細胞膜近傍に留まっている顆粒の他に、ドッキング過程を経ずに迅速に細胞膜に近づき、そのまますぐに膜融合を起こす顆粒が存在することがわかってきた［6］。これまで分泌小胞膜の細胞膜ドッキングに関わる分子はいくつか報告されてきたがが、非ドッキング小胞の開口放出に関する分子基盤はほとんどわかっていなかった。刺激後にはじめて分泌顆粒膜上のRab27a-Melanophilin複合体と細胞膜上のSyntaxin-4が結合することは、分泌顆粒膜があらかじめ細胞膜にドッキングすること無しに開口放出するという、*Passenger*型の開口放出様式の分子機序をうまく説明できると考えられた（図5）。本研究によって、必ずしも単一の機構によるとは限らない分泌小胞の開口放出前過程の分子基盤の一端が明らかになったと考えられる（本研究結果は、論文投稿中）。

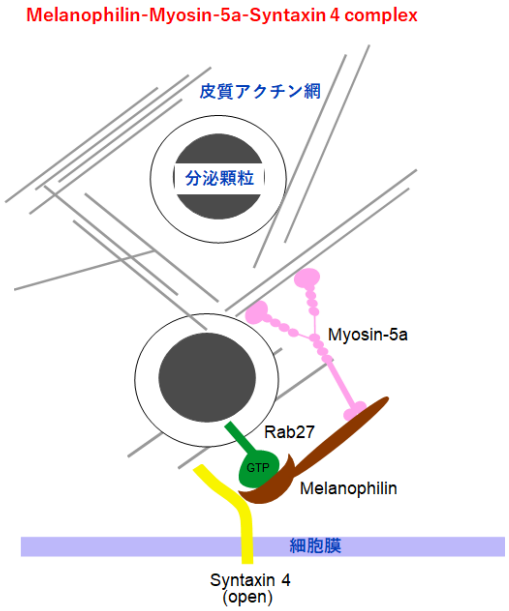


図 5.　Rab27 エフェクターMelanophilin による分泌顆粒開口放出機構

共同研究者・謝辞

本研究は、群馬大学生体調節研究所遺伝生化学分野の王昊博士を中心として、水野広一博士、奥西勝秀博士、小林絵里技術補佐員の協力によって成された。また、この研究報告書には記載していないが、関連する研究知見が、北里大学の高橋倫子博士、東京大学の河西春郎博士、横浜市立大学の白川純博士、寺内康夫博士の協力によって得られた。最後に、本研究をご支援いただいた、上原記念生命科学財団に、深謝いたします。

文　献

1) 泉哲郎. 調節性分泌経路における分泌顆粒の細胞膜ドッキングとプライミングの分子基盤と機能的意義. 生化学. 2017; 89, 797-807. DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890797

2) Izumi T, Gomi H, Kasai K, Mizutani S, Torii S. The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. Cell Struct Funct. 2003 Oct 28(5):465-474. PMID: 14745138

3) Fan F, Matsunaga K, Wang H, Ishizaki R, Kobayashi E, Kiyonari H, Mukumoto Y, Okunishi K, and Izumi T. Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-BP2 and myosin-VIIa. Elife, 2017 Jul 4;6. e26174. PMID: 28673385 DOI: 10.7554/eLife.26174

4) Matesic LE, Yip R, Reuss AE, Swing DA, O'Sullivan TN, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA. Matesic LE, Yip R, Reuss AE, Swing DA, O'Sullivan TN, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA. Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:10238-10243 PMID: 11504925 DOI: 10.1073/pnas.181336698

5) Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F, et al. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. Nat Genet. 2000 Jun 25(2):173-176 PMID: 10835631 DOI: 10.1038/76024

6) Kasai K, Fujita T, Gomi H, Izumi T. Docking is not a prerequisite but a temporal constraint for fusion of secretory granules. Traffic 2008 Jul 9(7):1191-1203. Epub 2008 Apr 4. PMID: 18397364 DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00744.x