



Rim2 α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis

Yasuda, Takao

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-09-25

(Date of Publication)

2011-03-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5051

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005051>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	安田 貴雄
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5051 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Rim2 α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis （Rim2a はインスリン顆粒開口分泌におけるドッキングとプライミング状態を決定づける）

審 査 委 員

主 査	教 授	匂坂 敏朗
	教 授	南 康博
	准教授	伊藤 俊樹

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Rim2 α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis

Rim2 α はインスリン顆粒開口分泌における
ドッキングとプライミング状態を決定づける

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

細胞分子医学

(指導教員：清野 進 教授)

安田 貴雄

[背景および目的]

インスリンを産生・分泌する膵 β 細胞はグルコースの恒常性を維持するのに重要な役割を果たしている。インスリン分泌における細胞内シグナルの分子メカニズムは様々な遺伝子改変マウスの研究により明らかとなってきたが、インスリン分泌の最終段階である開口分泌(小胞の輸送、細胞膜とのドッキング、プライミング、膜融合)のメカニズムはほとんど分かっていない。

以前、我々は膵 β 細胞株より、cAMP 依存性、PKA 非依存性インスリン分泌増強を担う Epac2 と相互作用する分子として、Rim2 α (Rab3-interacting molecule 2 α)を同定した。Rim2 α は、低分子量 G 蛋白質である Rab3 の標的分子であり、様々な開口放出関連分子と相互作用する scaffold 蛋白質である。Rim2 α は膵 β 細胞、下垂体、副腎髄質を含む内分泌細胞や神経内分泌細胞に主に発現することより、ホルモンの開口分泌に関わる分子であることが予想されたが、その機能の詳細はこれまで明らかではなかった。

Rim2 α のアイソフォームである Rim1 α は主に脳で発現しており、シナプス小胞の開口放出に関わる分子である。Rim1 α 欠損のマウスや線虫の解析より、Rim1 α は海馬のシナプスにおける神経伝達物質放出増強作用に関与し、記憶の長期増強に重要な分子であること、並びに開口放出のドッキング以降のステップに関与していることが明らかとなっている。Schoch らによって Rim2 α 欠損マウスが作製され、脳を中心とした表現系解析が行われたが、明らかな異常は認められなかった。しかしながら、Rim2 α 欠損マウスの内分泌機能は解析されていない。

今回、我々は独自に作製した Rim2 α 欠損マウスを用いて、Rim2 α の内分泌細胞や神経内分泌細胞における役割を明らかにすることを目的とした。さらに、Rim2 α 欠損膵 β 細胞株を樹立し、インスリン顆粒の開口分泌における Rim2 α の役割を解析した。

[結果]

Rim2 α 欠損マウスの表現系解析

我々はRim2 α 遺伝子の Exon4 をNeo カセットに置き換えることによって、Rim2 α 欠損マウスを作製した。Rim2 α 欠損マウスでは膵島は肥大しており、膵 α 細胞の数が相対的に増加していた。また、腹腔内糖負荷試験により、糖負荷 60 分後の血糖値はRim2 α 欠損マウスで野生型マウスに比べて有意に上昇していた。その際のインスリン分泌量は糖負荷前、後ともにRim2 α 欠損マウスで低下していた。さらに、経口糖負荷試験においては、糖負荷後の血糖上昇がより顕著であり、インスリン分泌量も低下していることを見出した。

Rim2 α は内分泌細胞や神経内分泌細胞に発現していることから、他のホルモン分泌にも関わる分子である可能性が考えられた。実際、Rim2 α 欠損マウスでは、インスリン分泌増強作用を有するインクレチンホルモン glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)の分泌が顕著に低下していた。また growth hormone (GH)分泌不全(低体長を示す)やアドレナリン分泌の低下も認められた。以上の結果から、Rim2 α はグルコースの恒常維持に関与するホルモン分泌に必要であることが明らかとなった。

Rim2 α 欠損マウスのインスリン分泌反応

Rim2 α 欠損膵島ではインスリン含量が増加しており、単離膵島におけるグルコースや強制脱分極刺激によるインスリン分泌反応が低下していた。さらに、cAMP によるインスリン分泌の増強効果も低下していた。

そこで、初代培養膵 β 細胞を全反射蛍光顕微鏡(total internal reflection fluorescence microscopy: TIRFM)により解析したところ、Rim2 α 欠損膵 β 細胞は細胞膜近傍のインスリン顆粒数が顕著に低下しており、ドッキングしたインスリン顆粒(old face)由来の分泌が欠如していることが明らかとなった。さらに、刺激により細胞膜に運ばれて瞬時に細胞膜と融合するインスリン顆粒(restless newcomer)による分泌も低下し

ていた。

Rim2 α 欠損膵 β 細胞株の樹立と機能解析

Rim2 α の膵 β 細胞内における詳細な機能解析をするために、膵 β 細胞特異的に腫瘍を形成する *IT6* マウスと Rim2 α 欠損マウスを交配し、腫瘍組織から Rim2 α 欠損膵 β 細胞株を樹立した。Rim2 α 欠損膵 β 細胞株において、開口放出関連蛋白質の発現量や細胞内局在は Rim2 α を発現する膵 β 細胞株と比較して変化は認められなかった。しかしながら、グルコースや強制脱分極刺激によるインスリン分泌反応は著明に低下していた。また、TIRFM 解析により細胞膜近傍のインスリン顆粒数が顕著に減少していることが判明した。一方、Rim2 α 欠損膵 β 細胞株にアデノウィルスを用いて野生型の Rim2 α を発現させると、インスリン分泌反応や細胞膜近傍のインスリン顆粒数が回復した。以上より、Rim2 α はインスリン分泌において、インスリン顆粒開口分泌のドッキングステップに必要であることが明らかとなった。

インスリン顆粒のドッキングとプライミングステップにおける Rim2 α の関与

Rim2 α は開口分泌のステップに重要な分子である Rab3A や Munc13-1 と結合する。我々は、グルコース刺激により Munc13-1 が Rim2 α より解離することを明らかにした。しかし、恒常的 GTP 型の Rab3A を添加すると、グルコース刺激下でも Munc13-1 が Rim2 α から解離しなくなった。

Rim2 α と Rab3A や Munc13-1 との相互作用がインスリン顆粒の開口分泌のどのステップに関与しているかを検証するために、それぞれと結合しない Rim2 α 変異体を作製し、Rim2 α 欠損膵 β 細胞株に発現させた。Rab3A と結合しない Rim2 α 変異体が発現させると、細胞膜近傍のインスリン顆粒数は回復しなかったが、グルコース刺激によるインスリン分泌反応は回復した。一方で、強制脱分極刺激によるインスリン分泌反応は、野生型の Rim2 α を発現させた時よりも、分泌が増加した。このことから、Rim2 α と Rab3A との相互作用はインスリン顆粒のドッキングステップに必要

であると考えられた。さらにドッキングステップはインスリン分泌に必須ではなく、むしろブレーキの役割をしている可能性が示された。

次に、Munc13-1 と結合しない Rim2 α 変異体を発現させると、細胞膜近傍のインスリン顆粒数は回復したが、インスリン分泌反応は回復しなかった。しかしながら、Rim2 α 欠損 β 細胞株に直接Munc13-1を活性化させる phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)刺激を行うとインスリン分泌反応が回復したことより、Rim2 α と Munc13-1 との相互作用はドッキング以降のステップに必要であることが明らかとなった。

ドッキング以降のステップには、プライミングと膜融合のステップがあり、膜融合には Syntaxin1 の構造変化が重要である。Syntaxin1 が閉じた状態から開いた状態に構造変化することでインスリン顆粒上の SNARE 蛋白質と複合体を形成し、インスリン顆粒を細胞膜に融合できる状態にする。その過程に Munc13-1 が関与することが想定されている。恒常的に開いた状態の Syntaxin1 を Rim2 α 欠損 β 細胞株に発現させると、Rim2 α 欠損下においても、インスリン分泌反応を回復した。したがって、Rim2 α と Munc13-1 との相互作用が Syntaxin1 の構造変化に関与していることが明らかとなった。

以上の結果より、Rim2 α は Rab3A を介してインスリン顆粒のドッキングに、Munc13-1 を介してプライミングに必要であることが明らかとなった。

Epac2 依存性インスリン分泌増強経路における Rim2 α の関与

Epac2 と結合しない Rim2 α 変異体を Rim2 α 欠損 β 細胞株に発現させると、グルコース応答性インスリン分泌反応は回復したにも関わらず、Epac 特異的 cAMP アナログ(8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM)刺激によるインスリン分泌増強は認められなかった。したがって、Rim2 α は cAMP 誘導性 Epac2 依存性のインスリン分泌増強に必須の分子であることが明らかとなった。

[考察]

Rim2 α は cAMP 依存性かつ PKA 非依存性の経路である Epac2 経路の標的分子として、我々の研究室で同定された分子であるが、その開口分泌機構における役割は明らかでなかった。本研究によって、Rim2 α 欠損マウスと Rim2 α 欠損 β 細胞株を用いて、Rim2 α のインスリン顆粒の開口分泌における役割を明らかにすることができた。

Rab3A と結合しない Rim2 α 変異体の導入によって、ドッキングは回復しないがグルコース応答性インスリン分泌反応は回復するという事実は、Rim2 α と Rab3A との相互作用がドッキングには必要であるが、ドッキングステップはグルコース応答性インスリン分泌には必須でないことを意味している。さらに、その Rim2 α 変異体の導入によって、強制脱分極刺激によるインスリン分泌が野生型の Rim2 α を導入した時より上昇した。同様の現象が、ドッキング顆粒が非常に少ない Granuphilin 欠損マウスでも起こることより、ドッキングステップはインスリン分泌に対してブレーキの役割を担っている可能性が考えられる。

さらに、Rim2 α は Munc13-1 と相互作用することでプライミングに、Epac2 と相互作用することで cAMP 依存性 Epac2 経路に必要である。また、我々は Rim2 α が電位依存性カルシウムチャネルの不活性化の抑制効果を持っていることも明らかにした。

[結語]

Rim2 α はインスリン顆粒の開口分泌において、Rab3A と相互作用することによりドッキングを、Munc13-1 と相互作用することによりプライミングを決定づける分子であることが明らかになった。さらに、Rim2 α 欠損マウスで GIP や GH、アドレナリン分泌が低下していることから、これらのホルモンの開口分泌に重要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2128 号	氏 名	安田 貴雄
論文題目 Title of Dissertation	Rim2α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis Rim2 α はインスリン顆粒開口分泌におけるドッキングとプライミング状態を決定づける		
審査委員 Examiner	主 査 勾 坂 敏 朗 Chief Examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner 副 査 伊 藤 俊 樹 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景と目的】
Rim2 α (Rab3-interacting molecule 2 α)は cAMP 結合蛋白質 Epac2 と結合する分子として、当研究室において同定された。Rim2 α は、低分子量 G 蛋白質 Rab3 の標的分子であり、様々な開口分泌関連分子と相互作用する scaffold 蛋白質である。Rim2 α はインスリンの開口分泌に関わることが示されているが、その役割の詳細は明らかにされていない。
本研究では、当研究室において作製された Rim2 α 欠損マウスと Rim2 α 欠損膵 β 細胞株を用いてインスリン顆粒の開口分泌における Rim2 α の役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】
Rim2 α 欠損マウスに経口糖負荷試験を行い、血糖値、インスリン分泌反応を評価した。また、Rim2 α 欠損マウスから単離した膵島を用いて、インスリン分泌実験を行った。さらに、Rim2 α 欠損マウスの初代培養膵 β 細胞からのインスリン開口分泌の動態を全反射蛍光顕微鏡(total internal reflection fluorescence microscopy : TIRFM)により解析した。
細胞レベルでの Rim2 α の機能をより詳細に解析するために、膵 β 細胞特異的に腫瘍を形成する IT6 マウスと Rim2 α 欠損マウスを交配し、腫瘍組織から Rim2 α 欠損膵 β 細胞株を樹立した。Rim2 α 欠損膵 β 細胞株における開口分泌関連蛋白質の発現量や局在への影響を調べた。
さらに、Rim2 α 欠損膵 β 細胞株に野生型 Rim2 α 、Rab3A と結合しない Rim2 α (E36A/R37S) 変異体、Munc13-1 と結合しない Rim2 α (K136E/K138E)変異体、Epac2 と結合しない Rim2 α (PDZ-AAA)変異体、恒常的に開いた状態の Syntaxin1 変異体をそれぞれ発現させ、インスリン分泌や TIRFM 解析により細胞膜近傍のインスリン顆粒数を調べた。
Rim2 α 欠損マウスにおける glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)、growth hormone (GH)、アドレナリン分泌などのホルモン分泌にも検討を加えた。
【結果】
1. 経口糖負荷試験において、Rim2 α 欠損マウスは耐糖能障害とインスリン分泌不全を示した。さらに、Rim2 α 欠損マウスの単離膵島からのグルコースや強制脱分極刺激によるインスリン分泌や cAMP によるインスリン分泌の増強効果の低下が認められた。
2. TIRFM 解析の結果、Rim2 α 欠損マウスの膵 β 細胞膜近傍のインスリン顆粒数は顕著に低

下しており、Rim2 α 欠損 β 細胞株でも同様の結果が得られた。しかしながら、Rim2 α 欠損 β 細胞株において、開口分泌関連蛋白質の発現量や局在に変化は認められなかった。
3. Rim2 α 欠損 β 細胞株に野生型 Rim2 α を発現させると、グルコースや強制脱分極刺激によるインスリン分泌や細胞膜近傍のインスリン顆粒数が回復した。しかしながら、Rim2 α (E36A/R37S)変異体を発現させると、細胞膜近傍のインスリン顆粒数が回復しなかったことより、Rim2 α と Rab3A の相互作用はインスリン顆粒のドッキングに必要であると考えられる。また、Rim2 α (K136E/K138E)変異体を発現させると、細胞膜近傍のインスリン顆粒数は回復するものの、グルコースや強制脱分極刺激によるインスリン分泌が回復しなかったことより、Rim2 α と Munc13-1 の相互作用はドッキングより後のステップに必要であると考えられる。恒常的に開いた状態の Syntaxin1 変異体を発現させると、グルコースや強制脱分極刺激によるインスリン分泌を回復することができた。ドッキングより後の膜融合には Syntaxin1 が開くことが必要であるため、Rim2 α と Munc13-1 の相互作用はドッキングより後でかつ膜融合よりも前のステップ（プライミング）に必要であると考えられる。
4. Rim2 α (PDZ-AAA)変異体を発現させると、グルコース応答性インスリン分泌は回復したにも関わらず、Epac 特異的 cAMP アナログ(8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM) 刺激によるインスリン分泌増強は認められなかったことより、cAMP 誘導性 Epac2 依存性のインスリン分泌増強には Rim2 α と Epac2 の結合が必須であることが明らかとなった。
5. Rim2 α 欠損マウスは、食事負荷による GIP 分泌、インスリン負荷による GH やアドレナリン分泌が低下した。
【結論】
Rim2 α はインスリン顆粒の開口分泌において、Rab3A と相互作用することによりドッキングを、Munc13-1 と相互作用することによりプライミングを決定づける分子であることが明らかになった。さらに、Rim2 α 欠損マウスで GIP、GH、アドレナリン分泌が低下しており、これらのホルモンの開口分泌にも同様な役割を果たすことが示唆された。
以上、本研究はインスリン分泌機構における Rim2 α の機能を明らかにする上で重要な示唆を与えるものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。