



Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of insulin granule exocytosis

菅原, 健二

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-07-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3121

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003121>

※ 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	菅原 健二
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3121 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 7 月 13 日

【 学位論文題目 】

Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of insulin granule exocytosis(インスリン開口分泌における Rab11 およびそのエフェクターRip11 の役割)

審 査 委 員

主 査	教 授	匂坂 敏朗
	教 授	片岡 徹
	教 授	古瀬 幹夫

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of insulin granule exocytosis

インスリン開口分泌における **Rab11** およびそのエフェクター**Rip11** の役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
生理学・細胞生物学講座 細胞分子医学
(指導教員：清野 進 教授)

菅原 健二

【背景】

膵β細胞におけるインスリン分泌はさまざまな細胞内・細胞外シグナルにより制御されている。中でも重要な分泌刺激因子であるグルコースは膵β細胞内に取り込まれて代謝され、ATP を産生させる。その結果、細胞内の ATP/ADP の比が増加することで細胞膜上に存在する K_{ATP} チャンネルが閉鎖し、膜の脱分極が生じる。これを VDCC が感知して活性化し、細胞外から細胞内へ Ca²⁺ を流入させる。細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加はインスリン顆粒の開口放出を惹起し、インスリンが分泌される。さらに、消化管ホルモンである GLP-1 や GIP 刺激によって産生された cAMP は protein kinase A (PKA) 依存性経路および PKA 非依存性経路を介してインスリン分泌を増強する。後者には cAMP-GEFII/Epac2 が関与する。

Rab 蛋白質は低分子量 GTPase に属しており、エフェクター分子を介して細胞内の小胞輸送に関与することが知られている。現在まで 50 種類以上の Rab 蛋白質が同定されているが、膵β細胞では Rab3 や Rab27A がインスリン顆粒膜に局在し、インスリン顆粒の開口放出に関与することが報告されている。Rab11 はエンドソームのリサイクリングに関与する Rab 蛋白質として同定され近年、PC12 細胞や脂肪細胞などで分泌顆粒の開口放出にも関与することが報告されているが、膵β細胞のインスリン開口放出における役割は不明である。

【目的】

本研究では、インスリン開口放出制御における Rab11 およびそのエフェクター蛋白質の役割を明らかにすることを目的とした。

【結果】

Rab11 はインスリン分泌に関与する

Rab11 ファミリーには現在まで Rab11A、Rab11B および Rab25 が同定されている。RT-PCR 法を用いた解析によりインスリン分泌細胞株 MIN6 においては Rab11A および Rab11B が発現していること、また免疫染色法にて Rab11A および Rab11B はインスリン顆粒と共局在することを確認した。高濃度グルコースや cAMP 刺激による調節性インスリン分泌への関与を調べるため、GTP 結合型のドミナントアクティブ Rab11 変異体および GDP 結合型のドミナントネガティブ Rab11 変異体をヒト成長ホルモン (GH) とともにインスリン分泌細胞株 MIN6 に導入し、種々の刺激による分泌を培地中に放出された GH を測定することでモニターした。その結果、Rab11B のドミナントアクティブおよびドミナントネガティブ変異体のいずれを MIN6 細胞に導入しても高濃度グルコース (16.7 mM) 単独および高濃度グルコース+cAMP 活性化剤(10 μ M forskolin/10 μ M IBMX)による分泌は阻害されたことから Rab11B のインスリン分泌への関与が示唆された。

Rip11 は cAMP によるインスリン分泌増強に関与する

Rab 蛋白質は各々のエフェクター蛋白質との相互作用により機能すると考えられている。Rab11 にも数種類のエフェクター蛋白質が現在まで同定されている。そこで、インスリン分泌に関与する Rab11 の下流シグナルを明らかにする目的でエフェクター蛋白質のスクリーニングを行った。まず RT-PCR 法により MIN6 細胞において FIP2、FIP3、FIP5/Rip11、Rabphilin-11、MyosinVb の発現が確認された。次に、発現が確認されたエフェクター蛋白質の種々の変異体と GH を MIN6 細胞に導入し、GH 分泌の阻害効果を指標にインスリン分泌に関与する Rab11 エフェクター蛋白質の同定を行った。Rab11 結合領域を欠いた

Rip11 変異体を発現させたところ、高濃度グルコース刺激による分泌には影響がなかったが、cAMP 刺激による GH 分泌およびインスリン分泌の増強はともに阻害された。また、免疫染色法、超遠心による細胞器分画、電子顕微鏡による解析により Rip11 の MIN6 細胞における局在を検討したところ、Rip11 はインスリン顆粒と共局在することが示された。以上のことから、Rab11 エフェクター蛋白質のうち、Rip11 は cAMP シグナルによるインスリン分泌増強効果に関与することが示唆された。

Rip11 は PKA 依存性経路に関与する

cAMP シグナルによるインスリン分泌増強効果には PKA によるリン酸化が関与する PKA 依存性経路、および、Epac2/Rap1 が関与する PKA 非依存性経路が知られていることから、Rip11 が関与する分泌増強効果がいずれの経路に影響しているか検討した。Epac2 欠損マウスから単離、作製したインスリン分泌細胞株を用いて、Rip11 変異体による GH 分泌アッセイを行なった結果、Epac2 欠損細胞株においても MIN6 細胞同様、cAMP 刺激による分泌増強効果の阻害が見られた。したがって、Rip11 は Epac2 を介する経路でなく PKA 依存性経路に関与することが推測された。

Rip11 は PKA のリン酸化基質である

Phosphatase 阻害剤オカダ酸で MIN6 細胞を処理すると、Western blot 解析にて Rip11 のバンドは上方にシフトし、さらに同条件下で高濃度グルコース+forskolin/IBMX で MIN6 細胞を刺激すると、もう一段階上方にバンドがシフトすることが確認され、Rip11 は 2 箇所でもリン酸化されることが示唆された。PKA 阻害剤である H-89 の存在下では高濃度グルコース+forskolin/IBMX 刺激によるバンドシフトは起こらないことから、Rip11 は PKA のリン酸化基質であ

ることが示唆された。次に、2段階目のリン酸化を受ける可能性があるセリン/スレオニン残基を同定するために、14S、35S、243S、244S、307S、335S、356S、357S、474S、539Sのアラニン置換体を用いて同様の実験を行ったところ、357Sのアラニン置換体では高濃度グルコース+forskolin/IBMX 刺激によるバンドシフトが認められなかったことから、Rip11はPKAによって357番目のセリンがリン酸化されることが示唆された。

【考察】

Rab11は多くのレセプターやチャネルのエンドソームから細胞膜へのリサイクリングに関与していることが報告されている。しかし、近年、PC12細胞においては、Rab11Bは単にリサイクリング系の維持のみに働くのではなく、カルシウムイオンによる調節性開口放出機構に関与することが示された。本研究において、MIN6細胞ではRab11Bとインスリン顆粒は共局在しており、さらにRab11B変異体の強制発現により高濃度グルコース刺激および高濃度グルコース+cAMP刺激による分泌を大きく阻害した。PC12細胞と同様に、膵β細胞においてもインスリン顆粒の開口放出に関してRab11Bの関与が強く示唆された。

Rab蛋白質は、それらの異なったエフェクターとの相互作用により多様な膜動態に関するシグナル伝達を調節していることが知られている。Rab11のエフェクター蛋白質は現在までに、FIP1、FIP2、FIP3、FIP4、Rip11/FIP5、Rabphilin-11/Rab11BP、Sec15(exocystの構成因子)などが同定されている。その中で、今回β細胞からのインスリン分泌に関わるRab11エフェクター蛋白質として、Rip11を見出した。Rip11はMIN6細胞に発現していた。Rip11変異体のMIN6細胞への強制発現は、高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌に殆ど影響を与えなかったが、高濃度グルコース+cAMP刺激によるインスリン分泌を大きく阻害した。さらに、Rip11はインスリン顆粒膜上に局在することが

示された。Rip11はリサイクリングエンドソームの細胞膜への移行を調節することが報告されているが、本研究により、膵β細胞においてRip11は、今までの報告にはない新たな機能として、cAMP刺激によるインスリン分泌増強に関与することが示唆された。

cAMP刺激によるインスリン分泌増強作用には、PKAのリン酸化が関与するPKA依存性経路、およびEpac2/Rap1が関与するPKA非依存性経路が知られている。今回の結果より、以下の理由でRip11が関与するインスリン増強作用は、PKA依存性経路に関わると考えられた。(1) Epac2ノックアウトインスリン分泌株を用いたGHアッセイにおいても、MIN6細胞と同様に、Rip11変異体の強制発現によりcAMP刺激によるhGH分泌を阻害した。(2) Rip11は2箇所でリン酸化を受け、一方の箇所のリン酸化はcAMP刺激により357セリンで起こることが示唆された。357セリンはRHRxSIモチーフを形成しており、セリン残基のN末端側2〜4番目に塩基性アミノ酸残基を、1つC末端側に疎水性残基をもつ。これはPKAの認識領域と一致する。さらに、このリン酸化はPKA阻害剤であるH-89の存在下では起こらないことを併せると、Rip11はPKAの直接的な基質である可能性が高い。

以上のことより、膵β細胞においてRip11はPKAのリン酸化基質であり、GLP-1やGIPなどの細胞外シグナルにより細胞内cAMP濃度が上昇すると、活性化されたPKAにより357セリン残基がリン酸化を受け、PKA依存性経路を活性化することでインスリン分泌の増強効果を発揮すると考えられる。

【結語】Rab11BおよびそのエフェクターRip11は膵β細胞において調節性インスリン分泌に関与し、Rip11はPKA依存性経路を介したcAMPによるインスリン分泌増強作用に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2085号	氏 名	菅原 健二
論文題目 Title of Dissertation	<p>Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of insulin granule exocytosis</p> <p>インスリン開口分泌における Rab11 およびそのエフェクター Rip11 の役割</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 勾 坂 敏 朗 Chief Examiner</p> <p>副 査 片 岡 徹 Vice-examiner</p> <p>副 査 古 瀬 幹 夫 Vice-examiner</p>		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

【目的】

Rab11 は低分子量 GTPase に属しており、近年、分泌顆粒の開口放出への関与が報告されているが、膵β細胞のインスリン開口放出における役割は不明である。本研究では、インスリン開口放出制御における Rab11 およびそのエフェクター蛋白質の役割を明らかにすることを目的とした。

【結果】

・ Rab11 はインスリン分泌に関与する

Rab11 ファミリーには現在まで Rab11A、Rab11B および Rab25 が同定されている。RT-PCR 法を用いた解析によりインスリン分泌細胞株 MIN6 においては Rab11A および Rab11B が発現していること、また免疫染色法にて Rab11A および Rab11B はインスリン顆粒と共局在することを確認した。さらに、MIN6 細胞への野生型および変異体 Rab11B の強制発現により、高濃度グルコースおよび cAMP 刺激による分泌が阻害されたことから、Rab11B の調節性インスリン分泌への関与が示唆された。

・ Rip11 は cAMP によるインスリン分泌増強に関与する

次に、インスリン分泌に関与する Rab11 の下流シグナルを明らかにする目的でエフェクター蛋白質のスクリーニングを行った。RT-PCR 法により MIN6 細胞において FIP2、FIP3、FIP5/Rip11、Rabphilin-11、MyosinVb の発現が確認された。さらに、MIN6 細胞への Rip11 変異体の強制発現により、高濃度グルコース刺激による分泌には影響が無かったが、cAMP 刺激による分泌増強は著明に阻害された。また、免疫染色法、超遠心による細胞器分画、電子顕微鏡による解析により Rip11 の MIN6 細胞における局在を検討したところ、Rip11 はインスリン顆粒と共局在することが示された。以上のことから、Rab11 エフェクター蛋白質のうち、Rip11 は cAMP シグナルによるインスリン分泌増強効果に関与することが示唆された。

・ Rip11 は PKA 依存性経路に関与する

cAMP シグナルによるインスリン分泌増強効果には PKA によるリン酸化が関与する PKA 依存性経路、および、Epac2/Rap1 が関与する PKA 非依存性経路が知られていることから、Rip11 が関与する分泌増強効果がいずれの経路に影響しているか検討し

た。Epac2 欠損マウスから単離、作製したインスリン分泌細胞株を用いて、Rip11 変異体による GH 分泌アッセイを行なった結果、Epac2 欠損細胞株においても MIN6 細胞同様、cAMP 刺激による分泌増強効果の阻害が見られた。したがって、Rip11 は Epac2 を介する経路でなく PKA 依存性経路に関与することが推測された。

・ Rip11 は PKA のリン酸化基質である

Phosphatase 阻害剤オカダ酸で MIN6 細胞を処理すると、Western blot 解析にて Rip11 のバンドは上方にシフトし、さらに同条件下で cAMP 刺激すると、もう一段階上方にバンドがシフトすることが確認され、Rip11 は 2 箇所でもリン酸化されることが示唆された。PKA 阻害剤である H-89 の存在下では cAMP 刺激によるバンドシフトは起こらないことから、Rip11 は PKA のリン酸化基質であることが示唆された。次に、2 段階目のリン酸化を受ける可能性があるセリン/スレオニン残基を同定するために、14S、35S、243S、244S、307S、335S、356S、357S、474S、539S のアラニン置換体を用いて同様の実験を行ったところ、357S のアラニン置換体では cAMP 刺激によるバンドシフトが認められなかったことから、Rip11 は PKA によって 357 番目のセリンがリン酸化されることが示唆された。

以上のことより、膵β細胞において Rip11 は PKA のリン酸化基質であり、細胞外シグナルにより細胞内 cAMP 濃度が上昇すると、活性化された PKA により 357 セリン残基がリン酸化を受け、PKA 依存性経路を活性化することでインスリン分泌の増強効果を発揮すると考えられた。

【結語】

Rab11B およびそのエフェクター Rip11 は膵β細胞において調節性インスリン分泌に関与し、Rip11 は PKA 依存性経路を介した cAMP によるインスリン分泌増強作用に関与することが示唆された。

以上、本研究は、Rab11B およびそのエフェクター Rip11 がインスリン分泌を制御することを明らかにしたものであり、インスリン分泌機構の分子メカニズム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。