



Critical Role of the N-Terminal Cyclic AMP-Binding Domain of Epac2 in Its Subcellular Localization and Function

新村, 學

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-08-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3124

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003124>

※ 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 新村 学
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第 3124 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 8 月 10 日

【 学位論文題目 】

Critical Role of the N-Terminal Cyclic AMP-Binding Domain of Epac2 in Its Subcellular Localization and Function (細胞内局在と機能における Epac2 の N 末端側 cAMP 結合ドメインの重要性)

審 査 委 員

主 査 教 授 片岡 徹
教 授 匂坂 敏朗
教 授 古瀬 幹夫

学位論文の内容要旨

Critical Role of the N-Terminal Cyclic AMP-Binding Domain of Epac2 in Its Subcellular Localization and Function

細胞内局在と機能における Epac2 の N 末端側 cAMP 結合ドメインの重要性

(指導教員：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 細胞分子医学分野 清野 進 教授)

新 村 学

【背景および目的】cAMP は神經細胞や内分泌細胞において、神經伝達物質放出やホルモン分泌を制御する重要なシグナルであり、protein kinase A (PKA) によるリン酸化を介してその機能を発揮すると長らく考えられてきた。ところが、Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) と呼ばれる cAMP 結合タンパク質が発見されて以来、PKA 非依存性経路による細胞機能の調節には Epac が関与すると考えられている。

Epac には Epac1 及び Epac2 の 2 つのアイソフォームが存在し、双方ともに N 末端側には cAMP 結合ドメインを、C 末端側には低分子量 G タンパク質 Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) ドメインを有する。Epac1 と Epac2 の構造上の差として、Epac1 は cAMP 結合ドメインを 1 つしか有さないのに対して、Epac2 は cAMP 結合ドメインを 2 つ有する点が挙げられる。Epac1 は神經突起の伸張、細胞接着などに関与する一方、Epac2 はアポトーシスやホルモン分泌などに関与することが報告されているが、その分子機構は不明である。Epac2 のインスリン分泌における役割を直接明らかにする目的で Epac2 欠損マウスが作製・解析され、その詳細は既に報告されている。Epac2 欠損マウスにおいて Epac2 プローブを用いてノザンプロット解析を行ったところ、副腎には Epac2 とハイブリダイズし、しかも従来の Epac2 のサイズとは明らかに異なる転写物の存在が認められた。

そこで本研究では、Epac2 に関連した新たな遺伝子産物の構造と機能を明らかにすることを目的とした。

【結果】

Epac2 の新規スプライシングバリエント (Epac2B) の同定

当研究室において作製された Epac2 欠損マウスを用いて、Epac2 の 3' 末端側の配列をプローブとしてノザンプロット解析を行ったところ、大脳皮質及び下垂体における Epac2 の発現は完全に消失し、また肝臓においては肝臓型

Epac2 の発現が認められたが、副腎に明らかなバンドが検出された。そのバンドのサイズは、大脳皮質や下垂体において検出される転写物 (4.0 kb) よりも小さく、また肝臓において検出される転写物 (3.5 kb) よりも大きいことから、従来報告されている Epac2 とは異なる転写物と推測された。従って、この転写物は Epac2 の新規アイソフォームあるいは新規スプライシングバリエントであると仮定し、クローニングを試みた。

マウス及びヒトゲノムのデータベーススクリーニングにより、新規アイソフォームではないことが確認された。そこで、新規スプライシングバリエントか否かを判断するために、マウス及びヒト EST データベーススクリーニングを行ったところ、Epac2 とは 5'末端側の配列が異なる cDNA クローンが同定された。その配列をもとにして、マウス副腎を用いて RT-PCR 解析を行ったところ、予測されたサイズのバンドが増幅された。この結果、マウス副腎には Epac2 とは N 末端側の配列のみが異なる Epac2 の新規スプライシングバリエントが発現していることが示唆され、この新規スプライシングバリエントを Epac2B と命名し、これまでに同定されていた脳や膵島に発現する Epac2 を Epac2A、肝臓に発現する Epac2 を Epac2C と命名し直した。

Epac2B の機能ドメイン構造

Epac2B の cDNA 配列解析の結果、Epac2B は 867 アミノ酸から構成されるが、Epac2A の cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域を欠損することが明らかとなり、Epac2B は Epac1 と類似の機能ドメイン構造を有することが示唆された。また、データベーススクリーニングにより、Epac2B のゲノム構造は Epac2A のイントロン 4 から転写され、その結果 Epac2A のエクソン 1a からエクソン 4 に対応するエクソンを欠損することが明らかとなった。

Epac2A 及び Epac2B の発現

Epac2A と Epac2B は 5'末端側の配列が異なるため、各々に特異的な配列に対するプローブを作製し、野生型マウスの大脳皮質及び副腎を用いてノザンプロット解析を行った。その結果、Epac2A は大脳皮質に発現するのに対して、Epac2B は副腎に発現することが明らかとなった。副腎での Epac2B の発現分布をさらに詳細に検討するために、マウス副腎を用いて *in situ hybridization* 解析を行ったところ、Epac2B は副腎皮質に発現することが明らかとなった。これらの結果から、Epac2B は副腎皮質に特異的に発現するスプライシングバリエントであることが示された。

Rap1 に対する Epac2A、Epac2B 及び Epac1 の GEF 活性

Epac2A は cAMP により活性化され、Rap1 に対する GEF として機能する。そこで外因性に Epac2A、Epac2B 及び Epac1 をそれぞれ発現させたヒト腎由来 293 細胞を用いて、cAMP により惹起される GEF 活性を検討したところ、Epac2A、Epac2B 及び Epac1 はいずれも cAMP アナログ 8-Bromo-cAMP の濃度依存性に Rap1 に対する GEF 活性を発揮した。

Epac2A 及び Epac2B の細胞内局在

免疫細胞化学的解析により、インスリン分泌細胞株 MIN6 に外因性に発現させた Epac2A は細胞膜近傍に局在するのに対し、Epac2B は主に細胞質に局在することが明らかとなった。Epac2A と Epac2B の構造的な違いは、後者が cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域を欠如する点のみであることを考慮すると、cAMP 結合ドメイン A は細胞膜への輸送に重要な役割を果たす可能性が考えられた。この仮説を検証するために、Epac2A の cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域のみをコードするコンストラクトを MIN6 細胞に導入し、その細胞内局在を検討した。その結果、cAMP 結合ドメイン A を含む

N 末端側領域は細胞膜近傍に局在したことから、この領域は細胞膜への輸送に重要な役割を果たすことが確認された。さらに、cAMP との結合能を有さない G114E 変異体も細胞膜近傍に局在したことから、Epac2A の cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域の cAMP との結合能は、細胞膜近傍への局在を規定する因子とはならないことが示唆された。

cAMP によるホルモン分泌制御における Epac2A 及び Epac2B の役割

Epac2A の細胞内局在と機能との関連性を明らかにするために、MIN6 細胞において、cAMP によるホルモン分泌制御における Epac2A 及び Epac2B の役割を比較した。MIN6 細胞において Epac2A あるいは Epac2B を外因性に発現させ、ホルモン分泌のトレーサーとしてヒト成長ホルモン (GH) を同時に遺伝子導入し、GH の分泌を測定した。Epac2A を外因性に発現させた MIN6 細胞において、5.6 mM グルコースのみによる刺激、2.8 mM グルコース+1 mM 8-Bromo-cAMP による刺激では GH 分泌が惹起されなかったのに対して、5.6 mM グルコース+1 mM 8-Bromo-cAMP による刺激では GH 分泌が惹起された。一方、Epac2B を外因性に発現させた MIN6 細胞においては、5.6 mM グルコースのみによる刺激、2.8 mM グルコース+1 mM 8-Bromo-cAMP による刺激、5.6 mM グルコース+1 mM 8-Bromo-cAMP による刺激のいずれにおいても GH 分泌は惹起されず、Epac2A とは対照的な結果であった。Epac2A 及び Epac2B はいずれも Rap1 に対する GEF 活性を示すことを考慮すると、Epac2A と Epac2B の機能的な相違は、細胞内局在の差異に起因する可能性が示唆された。

Epac2A が細胞膜近傍に局在することが機能的な役割を持つのか否かを明らかにするために、Epac2B の N 末端に膜移行シグナル (Gap43 の N 末端側の 20 アミノ酸) を付加したコンストラクト (N-Epac2B) を作製し、ホルモン分泌に関する効果を検討した。MIN6 細胞に外因性に発現させた N-Epac2B は、Epac2A と同様に細胞膜近傍に局在した。さらに、N-Epac2B を外因性に発現

させた MIN6 細胞でホルモン分泌を検討したところ、5.6 mM グルコースのみによる刺激、2.8 mM グルコース+1 mM 8-Bromo-cAMP による刺激では GH 分泌が惹起されなかったのに対して、5.6 mM グルコース+1 mM 8-Bromo-cAMP による刺激では、Epac2A を外因性に発現させた MIN6 細胞で見られた GH 分泌に匹敵するレベルにまで GH 分泌が惹起された。また、Epac2A あるいは N-Epac2B とともに、Rap1 の GTPase 活性を促進するタンパク質である Rap1GAP を共発現させると、両者の GH 分泌増強効果はともに抑制された。以上の結果から、Epac2A が細胞膜近傍に局在してインスリン分泌を惹起する際には、Epac2A の N 末端側領域が重要な役割を果たし、また Rap1 の活性化が必要であることが示唆された。

【考察】Epac2A 及び Epac2B は、いずれも 8-Bromo-cAMP 濃度依存性に Rap1 に対する GEF 活性を發揮し、GEF 活性に対して同等の親和性を示す。Epac2A は 2 つの cAMP 結合ドメインを有するのに対して、Epac2B は 1 つの AMP 結合ドメインしか有さない。さらに、cAMP 結合ドメイン B は cAMP 結合ドメイン A よりも cAMP に対して高い親和性を有することが報告されている。これららの知見を考え合わせると、cAMP 結合ドメイン B は cAMP による GEF 活性に不可欠であることが示唆される。

免疫細胞化学的検討により、Epac2A の N 末端側領域は Epac2A が細胞膜近傍に局在するのに重要な役割を果たすことが明らかとなった。Epac2A は膜貫通領域を有さないため、Epac2A は細胞膜内ではなくむしろ細胞膜近傍に局在し、細胞膜タンパク質と間接的に相互作用していると考えられる。Epac2A の N 末端側領域は cAMP への結合能を有するが、cAMP への結合能を欠損した cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域である G114E 変異体もまた細胞膜近傍に局在することから、cAMP 結合能は Epac2A が細胞膜近傍に局在するには必要ではないと考えられる。

Epac1 と Epac2B は同様の機能ドメインを有し、類似した細胞内局在を示すことから、Epac1 と Epac2B は細胞質において類似した機能を有するのかかもしれない。また、Epac2A あるいは Epac2B を外因性に発現させた MIN6 細胞における分泌実験において、Epac2A の N 末端側領域は Epac2A を細胞膜近傍に局在させることによりインスリン分泌を惹起することが示された。

哺乳類細胞において、膜標的シグナルとしていくつかのモチーフが同定されているが、その中には Gap43 の N 末端側 20 アミノ酸や CAAX モチーフが含まれる。しかし、cAMP 結合ドメイン A には膜標的シグナルが見出されないことから、Epac2A の N 末端側領域には新規膜標的シグナルが含まれている可能性がある。

膵β細胞におけるインスリン分泌は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇してインスリン顆粒が細胞膜に融合することにより惹起される。グルコースによるインスリン分泌は ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルの閉鎖を必要とし、次いで電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開放して Ca^{2+} が細胞内に流入し、インスリン顆粒の開口放出が惹起される。膵β細胞は cAMP によりグルコースコンピテントになり、cAMP による K_{ATP} チャネルの感作がこの過程に関与することが報告されている。グルコースによるインスリン分泌は、一過性の第 1 相、引き続き起こる持続的な第 2 相から成る二相性分泌である。cAMP シグナルは両相とも増加させることでインスリン分泌を増強するが、Epac2A/Rap1 シグナルは cAMP 依存性、PKA 非依存性のインスリン分泌増強を担い、主にインスリン顆粒プールのサイズの増大、細胞膜へのリクルートの促進により第 1 相の増強に関与すると考えられている。本研究において、Epac2B を細胞膜へ局在化することでホルモン分泌が増強されたことを考え合わせると、膵β細胞における Epac2A の N 末端側領域を介した細胞膜近傍への局在は、下流のシグナルである Rap1 を介したインスリン顆粒プールの増大によるインスリン分泌の第 1 相の増強に重要であると考えられる。

【結語】Epac2A 及び Epac2B の構造、細胞内局在、機能を比較することにより、Epac2A の N 末端側領域が Epac2A を細胞膜近傍に局在させ、cAMP 依存性に Epac2A が Rap1 を活性化することで、インスリン分泌の増強に重要な役割を果たすことが示唆された。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2088 号	氏名	新 村 学
論文題目 Title of Dissertation			Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function (細胞内局在と機能における Epac2 の N 末端側 cAMP 結合ドメインの重要性)
審査委員 Examiner			主査 片岡 敏 副査 勾坂 敏朗 副査 古瀬良 軒夫

(要旨は1,000字～2,000字程度)

cAMP によるインスリン分泌増強機構には、protein kinase A (PKA) 依存性経路と PKA 非依存性経路が存在し、PKA 非依存性経路は cAMP 結合タンパク質である Epac2 により担われている。Epac2 のインスリン分泌における役割を詳細に明らかにする目的で作製された Epac2 遺伝子欠損マウスを用いたノザンプロット解析により、副腎には従来の Epac2 のサイズとは明らかに異なる mRNA のバンドが検出された。そこで、本研究者は、Epac2 の新たな遺伝子産物の構造と機能を明らかにするために研究を行い、以下の成果を得た。

副腎において検出されたバンドは、Epac2 とは N 末端側の配列のみが異なる Epac2 の新規スプライシングバリエントに対応し、これを Epac2B と命名した。また、これまでに同定されていた脳や胰β細胞に発現する Epac2 を Epac2A、肝臓に発現する Epac2 を Epac2C と命名し直した。Epac2B は 867 アミノ酸から構成され、Epac2A の cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域を欠損していた。また、Epac2B のゲノム構造は Epac2A のエクソン 1a からエクソン 4 に対応するエクソンを欠損し、Epac2A のイントロン 4 から転写されていた。マウス副腎を用いた *in situ* hybridization 解析では、Epac2B は副腎皮質に発現が認められた。

HEK293 細胞において、Epac2A、Epac2B 及び Epac1 はいずれも cAMP アナログ 8-bromo-cAMP 濃度依存性に Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 活性を発揮した。MIN6 細胞に外因性に発現させた Epac2A は細胞膜近傍に局在するのに対し、Epac2B は主に細胞質に局在した。Epac2A の cAMP 結合ドメイン A を含む N 末端側領域のみをコードするポリペプチドは細胞膜近傍に局在した。また、cAMP との結合能を有さない G114E 変異体でも同様に細胞膜近傍に局在した。

Epac2A を外因性に発現させた MIN6 細胞では、5.6 mM グルコース+1 mM 8-bromo-cAMP による刺激で成長ホルモン (GH) 分泌が惹起されたのに対して、Epac2B では惹起されなかつた。Epac2B の N 末端に膜移行シグナルを付加したポリペプチド (N-Epac2B) は、Epac2A と同様に細胞膜近傍に局在し、同様の刺激により Epac2A と同レベルにまで GH 分泌が惹起された。Epac2A, N-Epac2B ともに Rap1GAP の共発現により、GH 分泌増強効果は抑制され

た。

以上の結果より、Epac2A 及び Epac2B は、いずれも 8-bromo-cAMP 濃度依存性に Rap1 に対する GEF 活性を有することがわかった。cAMP 結合ドメイン B は cAMP 結合ドメイン A よりも cAMP に対して高い親和性を有することから、cAMP 結合ドメイン B は cAMP による GEF 活性に不可欠であることが示唆された。さらに、免疫細胞化学的検討により、Epac2A の N 末端側 cAMP 結合ドメインは Epac2A が細胞膜近傍に局在するのに重要な役割を果たすことが明らかとなった。cAMP への結合能を欠損した N 末端側 cAMP 結合ドメインの G114E 変異体もまた同様に細胞膜近傍に局在することから、cAMP 結合能は Epac2A が細胞膜近傍への局在に必要ではないことが示唆された。また、Epac2A や N-Epac2B を介したホルモン分泌増強効果が Rap1GAP により抑制されたことから、Epac2A が細胞膜近傍に局在して Rap1 を活性化することが、Epac2A を介したホルモン分泌増強効果に必要であることが示唆された。

本研究は、cAMP 依存性 Rap1-GEF である Epac2 の新規スプライシングバリエント Epac2B の構造と機能を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった Epac2 の cAMP 結合ドメインのインスリン分泌刺激における作用メカニズムについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。