

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

所 属	群馬大学生体調節研究所 遺伝生化学分野
氏 名	松永 耕一
研究テーマ	Exophilin8 遺伝子改変マウスを用いたインスリン分泌制御メカニズムの解明

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

【研究目的】

調節性分泌とは、内分泌細胞や神経細胞等が特定の刺激を感知して生理活性物質等を細胞外に放出する細胞内小胞輸送(メンブレントラフィック)の一つである。この経路では、**単量体GTPase Rab27** が共通して機能しており、そのエフェクター、エキソフィリン(Exophilin)ファミリーは10種類以上存在する。その一つExophilin8はこれまでにin vivoレベルでは研究されておらず、インスリン分泌における分子機構についても、不明な点が多い。本研究では、in vivoにおいてExophilin8を介した調節性分泌機構を解明するために、①ノックアウトマウスを作成し、解析を行った。また、Exophilin8を介した分子機構を調べるために、②Exophilin8結合たんぱく質の網羅的探索を行い、同定された新規結合たんぱく質の機能解析を行った。

【研究成果、考察等】

①Exophilin8ノックアウトマウスを作成し、耐糖能試験を行ったところ、腹腔内投与のグルコース負荷において、**耐糖能が野生型に比べて低下した**。また、インスリン抵抗性は確認できなかった。このマウスから膵島を取り出しベリフュージョンアッセイを行ったところ、**β細胞ではグルコース刺激、及び細胞内cAMP産生を高めるForskolin存在下でのグルコース刺激によるインスリン分泌が、第一相、第二相とも低下したが、野生型と比べて特に後者において顕著に低下した**。これらの知見はExophilin8が、in vivoでグルコース応答性のインスリン分泌を制御していることを示した。

②Exophilin8結合たんぱく質の探索を行ったところ、未報告の新規結合たんぱく質が数種類同定された。そのうちの一つ(BP1と呼称)に着目し、解析を進めると、**BP1は、膵β細胞内でExophilin8と複合体を形成し、細胞内全体のインスリン顆粒膜上に局在した**。Exophilin8とBP1の複合体は、特に**細胞辺縁のコーナー部分に存在する顆粒に多く局在**することがわかった。また、膵β細胞にBP1を**強制発現させると、グルコース刺激依存性インスリン分泌量を増大**させた。次に、Exophilin8の、BP1との結合に必要な領域を特定し、BP1と結合できないExophilin8 変異体を作製し、ノックアウトマウス由来の膵島に発現させるレスキュー実験を行った。その結果、**本変異体は、野生型Exophilin8 を入れ戻した場合と異なり、インスリン分泌減弱を回復させることができなかった**。このことから、新規結合たんぱく質BP1は、Exophilin8 のインスリン分泌促進作用に必要であることが示された。

次に siRNA を用いたノックダウン解析を行った。**Exophilin8, BP1 それぞれのノックダウンにより、グルコース刺激誘導性のインスリン分泌を著しく減少させた**。それぞれのノックダウン細胞に対して抗インスリン抗体で免疫染色を行ったところ、興味深いことに**どちらのノックダウンでも、細胞辺縁のコーナー部分に集中したインスリン顆粒が消失**することがわかった。さらに **Exophilin8-BP1 複合体に結合するアクチン網及び細胞膜局在たんぱく質の探索を行ったところ、分泌顆粒の開口放出に重要な役割を担っている数種類のたんぱく質を同定**した。さらにこれらが Exophilin8, BP1 たんぱく質と複合体を形成していることも確認し、これらのノックダウンによっても、インスリン分泌の減少及び細胞辺縁のインスリン顆粒が消失した。以上の結果から、Rab27 エフェクターである Exophilin8 は、新規結合たんぱく質 BP1 と複合体を形成してインスリン顆粒に局在し、細胞膜のたんぱく質とアクセスすることにより、インスリン顆粒を細胞膜近傍に集積させ、その後の適切なインスリン分泌に必要なたんぱく質であることが今回の研究により示された。

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016. 5. 19	第59回日本糖尿病学会年次学術集会 范福順、松永耕一、泉哲郎 Rab27 エフェクターExophilin8 によるインスリン分泌制御機構 ポスター発表
2	2016. 3. 11	第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 范福順、松永耕一、泉哲郎 Rab27 エフェクターExophilin8 ノックアウトマウスのインスリン分泌制御における解析 一般演題
3	2015. 10. 1	第62回北関東医学会総会 范福順、松永耕一、泉哲郎 インスリン分泌制御における Exophilin8 たんぱく質の機能 ポスター発表
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2016. 12 月予定	現在投稿準備中であるが、セルプレスジャーナルの「Cell Metabolism」誌に投稿予定
2		
3		
4		