

TRANSPORTSOME

特定領域研究:生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能

QUARTERLY
Winter
2007

膜輸送複合体の実体と機能

目 次

「平成19年度第1回班会議報告／領域前半期を振り返って」 「膜輸送複合体」総括班	2
微小管結合タンパク質による細胞膜変形とエンドサイトーシスの制御 上江洲 章吉、中西 宏之	4
心筋 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)の構造と機能 ―最近の進歩― 岩本 隆宏	8
Ca^{2+} シグナルから膜電位変化へシグナル変換する分子集積体としての トランスポートソームの機能解析 今泉 祐治、山村 寿男、大矢 進	11
cAMPセンサーEpac2と低分子量G蛋白質Rap1のインスリン分泌制御に おける役割 柴崎 忠雄、高橋 晴美、三木 隆司、清野 進	15
編集後記	20

表紙について

実験医学の「私の発見体験記」という企画でジャンクトフィリンの分子同定エピソードの執筆依頼を受けまして、編集部の方にご指導されながら原稿をあげました。タンパク質の分子同定や機能解析が進行する過程での失敗談、研究者間交流や奇抜な体験などを解説するという企画とのことでした。一般社会と同様に、物質的に豊かになった研究室内では各個人の関係が多少希薄化しており、経験の浅い若手研究者が先輩方から上記のようなエピソードを直接聞く機会が少なくなっているそうです。そのような背景の中で、大学院生を含む若手研究者はまだまだ不透明さの残る研究環境におり、研究成果が結実する工程での非科学的側面の小話が掲載されている雑誌やブログを好む傾向があるそうです。

大学院生と助手の頃には「アホンダラ、バカ、開きめくら」などとなじりながら、先輩研究者から実験手技を、指導教官から研究の方向性や論文の作成を習いました。現在の教室に同様の方式を持ち込みますと、数週間以内にバワハラ&アカハラの典型例として学内人権委員会に糾弾されるはずです。当時、落ち込んだり、不安や不愉快になった際には、実験室からほど近い川原で気分転換する習慣になりました。雄大さの残る叡山を中心とする山並みや緩やかな鴨川の流れが、気持ちを落ち着かせるのかも知れません。また、西高東低と言われた当時の大御所研究者、民間企業で研鑽を重ねたノーベル賞受賞者や不本意な成果に終始した多くの研究者も同様の風景を見ているはずです。さらには大げさですが、栄華を誇った平家一門、本能寺で討たれた織田信長、幕末の血気盛んな志士など類似の景色を眺めたことと想像されます。なんて微小スケールの題材に対して人は一喜一憂するのでしょうか？、川原を訪れる時はいつも曇り空の下で山々が霞んでいました。他人と類似の成果は好まれませんので、基礎生物学では近隣の方々とも異なる難儀を抱えることになりますが、研究課題は無限にありますし、何とか乗り越えて意義ある成果に結び付けてみましょう。現在は河川工事等で風情が半減していますが、難儀している本特定の先生方への小さなギフトとして表紙の写真を贈ります。

(竹島)

「平成19年度第1回班会議報告／領域前半期を振り返って」

平成19年7月23日～25日の2泊3日の日程で、神奈川県湘南国際センターにて、平成19年度第1回班会議・研究報告会が行われました。領域外から参加いただいた方々も含め、約150名の参加者があり、深夜に及ぶ熱気にあふれたディスカッションがもたれました。今回は中間評価を控えたまとめの班会議であり、16計画班と35公募班の全班からの発表がありました。また、ハイライトレクチャーでは、大阪大学の倉智嘉久先生「統合生理学の構築を目指して」、岡崎統合バイオサイエンスセンターの岡村康司先生「2つの電位センサー蛋白に見る新たな膜電位の役割」、大阪大学の月田早智子先生「毛細胆管から発展した上皮細胞生物学」、福岡大学の井上隆司先生「Lipid- and phosphorylation-mediated regulation of vascular receptor-operated Ca^{2+} entry channel TRPC6」の4人の著名な先生方に御講演を頂きました。

本特定領域は、従来の単一分子のアプローチでは解明し得なかった、生体の恒常性維持に必須な「膜輸送機能の共役・協調」の分子機構に迫るべく、その協調現象の背景に、輸送分子群、機能制御分子群、それらを束ねる足場タンパク質群からなる分子集積（膜輸送複合体：「トランスポートソーム」）を想定し、その実体解析（分子構築と複合体としての機能）（A01）、生体膜との相互作用の解析（A02）、調節・生理機能、病態との関連性解析（A03）の3つの観点から研究を進めています。前半期の研究では、各班の連携のもとに多様なトランスポートソームとプラットフォーム（トランスポートソームの存在の基盤となる「場」）の実体が解析され、またトランスポートソームと生理機能、病態との関連例が示されました。特に、プラットフォームの動的特性とプラットフォーム自体の階層性が予想以上に明確になり、また、分子可視化追跡技術、輸送体タンパク質定量解析技術において、トランスポートソーム研究に最適化した膜タンパク質解析技術が領域内で開発され、後半期の研究に向けて大きな成果が得られたと思います。班会議の研究進捗発表においても、A01のトランスポートソーム実体証明に向けた着実な進歩、A02のプラットフォームのダイナミックな特性についての華々しい進展、A03の多彩な系を題材にした輸送分子の調節、生理機能、病態との関連性の個々のエキサイティングな進展について、各班のカラーが良く出た発表がなされました。

A01班（トランスポートソームの構成と機能に関する研究）は、トランスポートソームの「存在証明」を担当し、トランスポートソームの分子構築と複合体としての機能の実証を目指しております。前半期の研究において、いくつかの新規トランスポートソームが見出され、当初の発想より細分化された「階層」におけるトランスポートソームの存在が明らかになりつつあります。A01の特記すべき成果をまとめてみると、1) 輸送分子のサブユニット複合体として Na^+/H^+ 交換輸送体NHEと結合タンパク質CHPの相互作用の様式が結晶構造のもとに示された。2) 足場タンパク質を中心とした輸送分子や酵素・シグナル分子の複合体として、上皮細胞のPDZタンパク質を足場としたトランスporter複合体、カベオリンを足場としたチャンネル・NO産生酵素

の複合体、上皮細胞系においてHippoシグナル制御系と膜輸送を連関させるRASSF6を足場とした複合体の同定がなされた。3) さらに巨視的な階層として、プレシナプスアクティブゾーン構造におけるシナプス小胞、膜融合装置、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの精密かつ動的な配置に代表される、特定のsubcellular構造に密接に関連したトランスポートソームが明らかにされた。4) 相互作用ネットワーク構築の一環としてマイクロアレイのデータを用いた共発現情報データベースが開発され公開された。TRPチャネルや電位依存性 Ca^{2+} チャネルなどに見られるように、複合体形成が輸送分子自体の機能を大きく変化させる例が見出されたことは、トランスポートソームという一つの生理機能単位が実際に存在することを強く指示するものです。多機能的かつ階層をまたいで動的に変化するトランスポートソーム像が露にされつつあります。

A02班（トランスポートソームと生体膜の相互作用の解明）は、トランスポートソームが機能する「場」（プラットフォーム）のダイナミックな特性を解析し、トランスポートソームをsubcellularな視点から追求しています。この班からの特記すべき成果は、1) 小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルと細胞表層膜の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルおよび新規小胞体TRICチャネルとの機能共役が解明され、結合膜構造と小胞体自体のトランスポートソームのプラットフォームとしての意義がより明確にされた。2) 脳グリア細胞においては K^+ チャネルと水チャネルが界面活性剤不溶性微小膜ドメイン中の近接する2つの異なるコンパートメントに別々に集積することが両者の機能共役の分子基盤となることが示された。3) 膜輸送体と膜脂質の関連研究では、2分子同時イメージング技術開発によるGPIアンカー型受容体のシグナル分子との会合の可視化とその動態の解明、リン脂質結合BARドメインおよびその関連EFCDドメインの生体膜との相互作用の解明がなされた。4) 膜輸送体と細胞骨格系の関連解析では、SGIP1と命名された新規タンパク質が発見され、その微小管およびリン脂質との結合活性が示された。また、半導体デバイス上の人工リン脂質膜における相分離ドメイン構造の解析などA02班の目的に沿ったユニークな研究成果が得られています。

A03班（トランスポートソームの生理機能とその破綻による病態に関する研究）は、トランスポートソームの機能と局在の調節、他の機能要素との関わり、細胞・組織・個体における生理機能とその破綻による病態に関する研究を進めています。特記すべき成果としては、1) 遺伝性疾患発症機構について、リンの恒常性に関するリン酸トランスポートソームの機能調節に関する研究、AQP2遺伝子異常による腎性尿崩症やWNKキナーゼ異常による偽性低アルドステロン症II型の分子病態解析、肝細胞胆管側膜のトランスポートソームの異常によるPFIC IおよびII型の発症機構が解明された。2) 新技術研究として、レーザー・非線形光学技術を応用した新たな *in vivo* イメージング法に基づく小胞動態の解析技術、LC-MS/MSを用いたトランスポートソームタンパク質の定量法が確立された。3) トランスポートソーム機能の調節系としてのRINファミリー、Rhebの解析、

さらにトランスポートソームに連結して細胞増殖・死・極性を制御するHippoシグナル伝達系の解析が成された。さらに、シナプスでのドパミンの合成、放出、取り込みに関わる機構がセットでセブチン・スカフォールドによって保持されているという驚くべき事実も見出されています。特に、トランスポーターのスカフォールドとして働くWNKキナーゼの異常、またセブチン・スカフォールドの異常が疾患の発症と関連付けられたことは、従来の輸送分子異常と疾患の関連付けの研究から、トランスポートソーム異常と疾患の連関の研究へと進展した素晴らしい成果です。

さて、特定領域研究も後半に入ります。特定領域の「有機的連携による相乗効果」を十分活用いただき、前半期の研究をより発展させていただくとともに、A01班は「各トランスポートソームの実体解析を完了し、生化学的・理論的再構成により検証する」、

A02班は「前半期に動的特性を明らかにした各プラットフォーム（「場」）における輸送分子の振舞いを明らかにする」、A03班は「前半期に捉えたトランスポートソームと生理機能、病態との関連を、複合体機能から説明し、トランスポートソームの生理的意義を明らかにする」といった各研究項目の到達目標を念頭において、研究を進めていただきたいと思います。一方、特定領域は平成20年度新規発足分より制度的に新しくなります。実質的にどのような変更となるか動向の見きわめが必要ですが、当特定領域も後半に向かい「まとめ」を意識して研究を進めていただくとともに、ポスト・トランスポートソームについても、少しずつ考えはじめていただきたいと思います。

「膜輸送複合体」総括班



微小管結合タンパク質による細胞膜変形とエンドサイトーシスの制御

上江洲 章吉、中西 宏之 (A02計画班)

熊本大学大学院医学薬学研究部細胞情報薬理学分野

1. はじめに

微小管は、チューブリン α/β のヘテロダイマーから形成されるダイナミックなポリマーであり、一般にマイナス端を中心体側に、プラス端を細胞の末梢に伸ばしている。微小管は、細胞骨格として様々なタンパク質や複合体などの交通路となるだけでなく、細胞分裂、オルガネラの輸送、細胞の運動や接着、細胞極性の形成など様々な細胞機能に関わっている。また微小管は中心体や基底小体、さらには線毛や鞭毛などの基本構造となっている。このような微小管に関わる機能と構造はモータータンパク質や微小管に結合するさまざまなタンパク質(微小管結合タンパク質)によって制御されている。しかし、その制御機構は十分に解明されていない。われわれは、微小管に関わる機能と構造の制御機構を解析する目的で、新しい微小管結合タンパク質の同定を試み、SGIP1 α を見出した。SGIP1 α は、微小管結合活性を有し、かつ細胞膜リン脂質に対する結合活性も持っており、エンドサイトーシスや神経突起の伸長を制御している。ここではまずSGIP1 α について紹介し、続いてチューブリン・微小管結合活性を有し、かつエンドサイトーシスを制御する他のタンパク質について概説する。

2. 新しい微小管結合タンパク質SGIP1 α

1) チューブリンブロットオーバーレイ法による同定

微小管結合タンパク質は古典的には生化学的手法を用いて精製・同定されてきた。組織あるいは細胞の内在性チューブリンを重合させ、形成された微小管を遠心沈降させることで微小管結合タンパク質が共沈することを利用したものである。実際、微小管結合タンパク質であるMAP2やタウは、微小管と共沈する分子として脳から同定されている。この古典的手法を用いて同定される分子は組織の可溶分画に回収されることが不可欠である。われわれは、新しい微小管結合タンパク質を見出すためには従来の方法とは異なったアッセイ法が必須と考え、新しいチューブリンブロットオーバーレイ法を用いて新しい分子の同定を試みた(図1)。このアッセイは不溶性分子でもアッセイできる利点があり、われわれはこのアッセイを用いてラット脳の不可溶性画分より、分子量約100kDaの分子(p100と命名)を精製・同定した。p100は、中央部にプロリンに富むドメインを有するが、それ以外に既知のタンパク質やドメインとの相同性を示さなかった。最近、p100と高い相同性を有する遺伝子が肥満に関わる遺伝子としてSGIP1 (Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like interacting protein 1) という名前前で報告された。p100とSGIP1のアミノ酸配列をアライメントさせると、p100はSGIP1に比べて2箇所のペプチド配列の挿入があり、両者はスプライシング・バリエーションの関係と考えられた。そこで、われわれはp100をSGIP1 α と命名した¹⁾。

2) 微小管結合と細胞膜変形

微小管共沈法によって、SGIP1 α はチューブリンのみならず微小管とも直接結合することを確認した。その解離定数は10⁻⁷モルオーダーであった。SGIP1 α をいくつかのフラグメントに分けて調べたところ、N末端の約100アミノ酸が微小管結合領域(MPDメインと命名)であることを見出した(図2)。このMPDメインを細胞に過剰発現させると、チューブ状の構造物が細胞体に形成されたが、微小管との走行とは完全に一致しなかった。しかし、当時われわれはこの構造物の正体を明らかにすることができなかった。最近、後述するFCH・EFC/F-BARDメインタンパク質が、細胞膜リン脂質に結合し、過剰発現によって細胞膜にチューブ状の構造物を形成することが報告された^{2,3,4)}。この構造物がSGIP1 α のMPDメインによって引き起こされるチューブ構造と類似していたことより、われわれはSGIP1 α のMPDメインが細胞膜のリン脂質と結合する

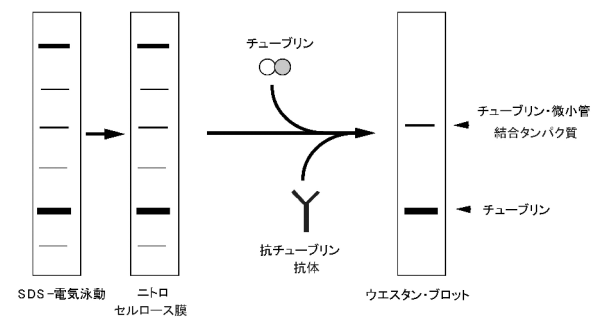


図1 チューブリンブロットオーバーレイ法。
サンプルをSDS-PAGEしたのち、ニトロセルロース膜に転写させ、その膜をチューブリンとインキュベーションした。続いてニトロセルロース膜を抗チューブリン抗体でウエスタンブロットし、チューブリンに直接結合する分子をバンドとして検出した。

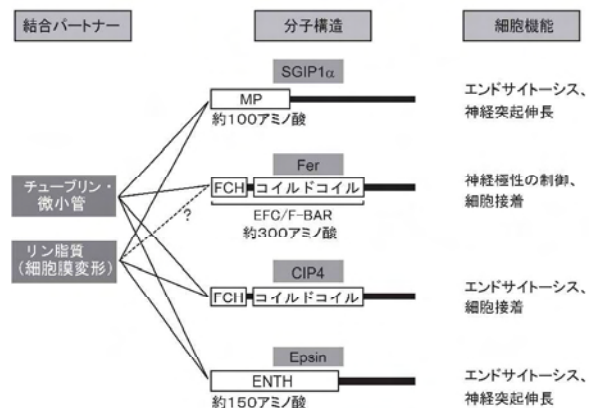


図2 チューブリン・微小管結合とリン脂質の結合活性を持つ分子とその機能。

のではないかと考えた。MPドメインをCOS7細胞に過剰発現させ、DiIc16(3)を用いて細胞膜を染色したところ、チューブ構造はDiIc16(3)と共染色された(図3A)。in vitroにおけるSGIP α のリン脂質に対する結合活性を検討したところ、MPドメインはホスファチジルセリン(PS)とホスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸(PI(4,5)P₂)を含むホスホイノシドに強く結合することを見出した(図3B)。PI(4,5)P₂に対する解離定数は 10^{-7} モルオーダーであった(図3C)。また、SGIP1 α のMPドメインは単にリン脂質に結合するだけでなく、合成リポソームをチューブ状に変形させる活性も有していた(図3D)。このように、MPドメインは新しいリン脂質結合ドメインであり、細胞膜を変形させる活性を有することが明らかとなった。一方、MPドメインの微小管結合活性について、MPドメインを過剰発現させた細胞をまずトリトンX-100で処理して細胞質と細胞膜のタンパク質を除去したのちに固定すると、MPドメインは微小管の走行と一致した。これらのことより、SGIP1 α のMPドメインはin vivoとin vitroで微小管結合とリン脂質結合の両方の活性を有することが明らかとなった。MPドメインが同時に微小管とリン脂質に結合できるかは不明である。しかしSGIP1 α は、ゲルろ過の解析により多量体を形成することが明らかになっており、多量体として微小管と細胞膜リン脂質に同時に結合していると考えられる。

3) エンドサイトーシスと神経突起伸長の制御

リン脂質に結合し、細胞膜をチューブ状に変形させるドメインとして、後述するFCH・EFCドメイン/F-BARドメインやENTHDドメイン等が知られており、これらのドメインを持つタンパク質は、クラスリン依存性エンドサイトーシスにおける細胞膜の湾曲化や切断に関わっている。したがって、SGIP1 α もクラスリン依存性エンドサイトーシスに関わっていることが予想された。実際、SGIP1 α を過剰発現させるとEGFやトランスフェリンのエンドサイトーシスが阻害された(図4A)。一方、siRNAによってSGIP1 α をノックダウンさせると、トランスフェリンのエンドサイトーシスは抑制されたが、EGFのエンドサイトーシスはほとんど影響を受けなかった(図4B)。これは、EGFのエンドサイトーシスにはリダンダントな経路があるためと考えられる。さらに、われわれは神経細胞でのSGIP1 α のノックダウンが神経突起の伸長を促進させることを見出している。SGIP1 α はエンドサイトーシスのみならず、微小管と細胞膜の変化がカップリングした様々なプロセスに関わり、神経突起の伸長等の細胞の形態変化を制御していると考えられる。

3. FCH・EFC/F-BARドメインタンパク質

FCH (Fps/Fes/CIP4 homology)ドメインは、細胞骨格の再編成、小胞輸送、エンドサイトーシスに関わる多くのタンパク質に見出されている。FCHドメインの機能として、CIP4の解析から微小管との結合が最初に報告されている(図2)⁵⁾。

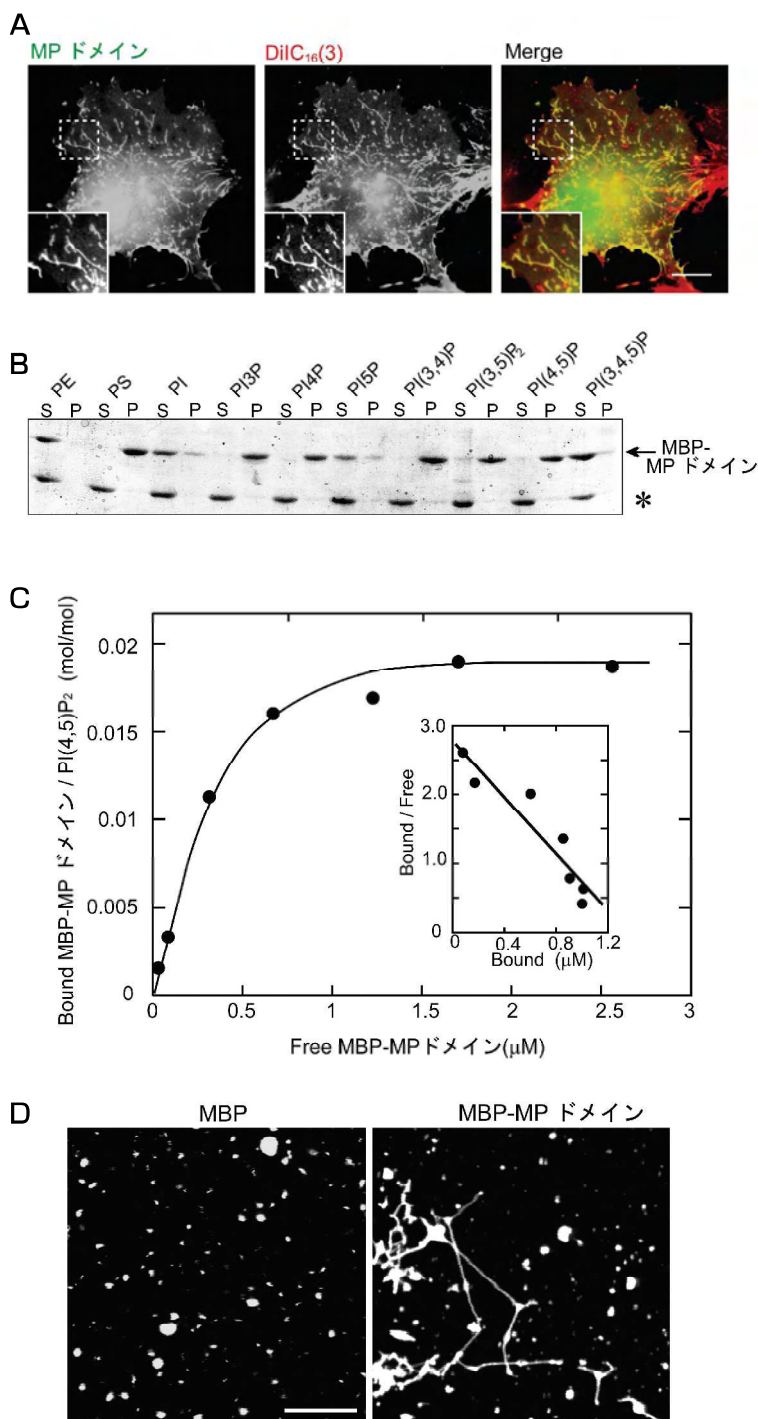


図3 SGIP1 α のリン脂質結合活性。

(A) 細胞膜変形活性。pEGFP-MPドメインをCOS7に発現させ、膜の透過処理をせずに固定し、DiIc16(3)を用いて細胞膜を染色した。Scale bar, 10mm。(B) MPドメインのリン脂質結合活性。MBP-MPドメインを、様々なリン脂質を含んだリポソームとインキュベートした後、遠心して上清画分(S)と沈殿画分(P)に分離した。(C) 定量解析。MBP-MPドメインのタンパク量を変えてPI(4,5)P₂を含んだリポソームとインキュベートし、遠心したのち遊離、およびリポソームと結合したMPドメインを計測した。(D) MPドメインによる合成リポソーム変形活性。(文献1より改変)

FCHドメインをもつFerに関しても、細胞に発現させたFerが微小管と共局在することが報告されている⁶⁾。ところが、FCHドメイン単独では微小管に局在せず、FCHドメインのC末端側にあるコイルドコイルドメインが微小管への局在に重要であることが示されている。Fesに関しても、細胞に発現させたFesは微小管に局在するだけでなく、FCHドメイン依存性に微小管のバンドリングや核形成に関与するとの報告がある⁷⁾。一方で、FesのFCHドメインはチューブリンとの結合を示すが、微小管への結合に必要なわけではないとの報告もある⁸⁾。

最近、FCHドメインを持つ分子はすべてそのドメインのC末端側にコイルドコイルドメインを持つことより、FCHドメインとコイルドコイルドメインを含めた約300アミノ酸がひとつの機能ドメインとしてとらえられ、EFC(extended FC)と命名されている³⁾。このEFCドメインはほぼ同時期に別のグループによってF-BARとも命名されている⁴⁾。GIP4を含むさまざまなタンパク質のEFC/F-BARドメインはリン脂質に結合し、細胞膜をチューブ状に変形させる活性をもっていることが明らかにされている。一方、われわれはEFC/F-BARドメインが1つのドメインとして微小管にも結合することを見出している。しかし、EFC/F-BARドメインはすべて細胞膜変形作用と微小管結合活性とをもっているわけではなく、タンパク質によって、いずれ

か一方の活性、あるいは両方の活性を有しているかもしれない。

4. ENTHドメインタンパク質

ENTH(epsin N-terminal homology)ドメインは、進化的に保存された約150アミノ酸からなるドメインであり、エンドサイトーシスに関わるepsinやAP180などの様々なタンパク質のN末端に存在する(図2)。ENTHドメインは、EFC/F-BARドメインと同じくリン脂質とくにPI(4,5)P2に結合し、細胞膜を変形させる活性を有する⁹⁾。ENTHドメインタンパク質は、この活性を介してクラスリン依存性エンドサイトーシスに必須の役割を果たしている。また、ENTHドメインはチューブリンと微小管にも結合することが報告されている¹⁰⁾。epsinは神経細胞の微小管に沿って局在し、epsinのENTHドメインをPC12細胞に強制発現させると神経突起の伸長が起こる。epsinもエンドサイトーシスのみならず、微小管と細胞膜の変化がカップリングした様々なプロセスに関わり、神経突起の伸長等の細胞の形態変化を制御していると考えられる。

5. クラスリン依存性エンドサイトーシスにおける微小管の役割

微小管がエンドサイトーシス後期、すなわち初期エンドソームと後期エンドソームの間の小胞輸送に関わっていることは

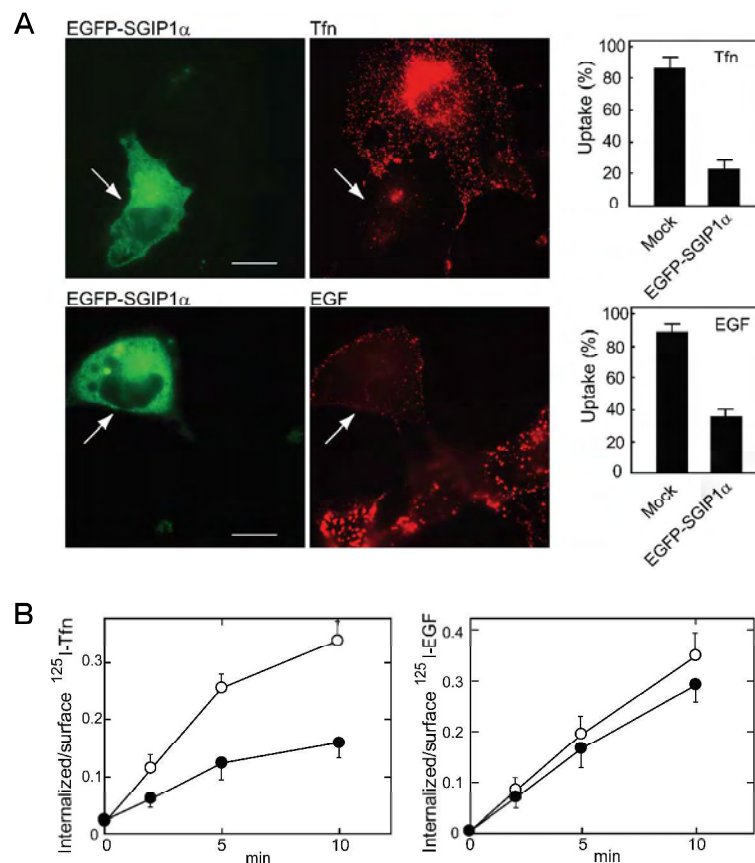


図4 SGIP1αによるエンドサイトーシスの抑制。

(A)過剰発現の実験。pEGFP-SGIP1αを過剰発現させたCOS7細胞を蛍光色素標識されたトランスフェリン(Tfn)およびEGFとインキュベートし、取り込みを観察した。(A左)蛍光画像。Scale bars, 20μm。(A右)定量解析。(B)ノックダウンの実験。神経系培養細胞N1E115にコントロール、あるいはSGIP1α siRNAをトランスフェクションしたのち、[125I]ラベルされたトランスフェリン(Tfn)およびEGFの細胞内取り込みを観察した。SGIP1α siRNAはEGFの取り込みに影響しない。(○) コントロールRNAi。(●) SGIP1α RNAi。(文献1より改変)

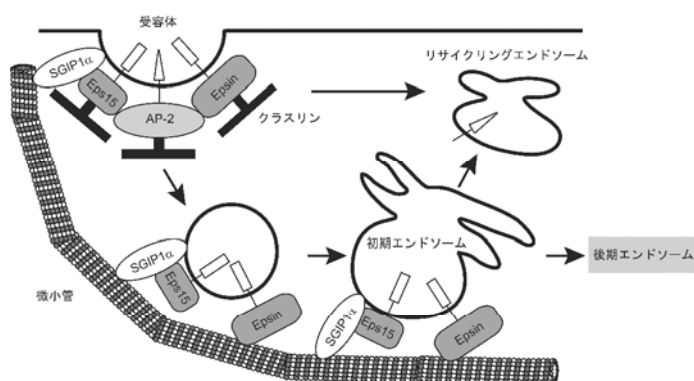


図5 エンドサイトーシスと微小管。

クラスリン依存性エンドサイトーシスの初期過程では、受容体等がAP-2やEpsin、Eps15などのアダプタータンパク質に捕捉される。次にクラスリン被覆ピットからクラスリン被覆小胞となり、その後被覆が離脱する。微小管依存性にクラスリン被覆小胞から初期エンドソーム、後期エンドソームへと運ばれる経路と、小胞から微小管非依存性にリサイクリングエンドソームへと輸送される経路があり、この二つの経路は受容体と結合するアダプタータンパク質によって決定されると考えられる。EpsinやEps15-SGIP1 α 複合体は微小管との結合を介して、被覆小胞から初期エンドソームへの早期ソーティングに関与していると考えられる。

確立されている(図5)。しかし、エンドサイトーシス初期において、最近まで微小管の役割ははっきりとしていなかった。一般的に微小管はエンドサイトーシス初期に関わっていないと考えられていた。これは、微小管脱重合剤のノコダゾールが細胞のエンドサイトーシス初期を阻害しない実験結果に由来する。しかし、エンドサイトーシスのアッセイは前もって細胞を低温でインキュベーションする必要があり、この低温は微小管を破壊することより、ノコダゾールの効果がマスクされている可能性がある。実際、低温でインキュベーションしない条件下で、ノコダゾールがエンドサイトーシス初期を抑制することが報告されている¹¹⁾。また、以前より小胞はまず初期エンドソームを経てから、後期エンドソームあるいはリサイクリングエンドソームへと振り分けられると考えられていたが、実際には微小管依存性にクラスリン小胞から初期エンドソーム、後期エンドソームへと運ばれる経路と、微小管非依存性に小胞から直接リサイクリングエンドソームへと輸送される経路があり、小胞がどちらに向かうかは早い段階(少なくともクラスリン被覆小胞の時期)にすでに決定されていると報告されている(図5)¹²⁾。この二つのどちらの経路を進むかは受容体等と結合するアダプタータンパク質によって決定される可能性がある。もし微小管結合活性をもっているアダプタータンパク質と結合すれば、微小管依存性に初期エンドソームに輸送され、逆に微小管結合活性を持たないアダプタータンパク質と結合すれば、直接リサイクリングエンドソームに輸送されるのかもしれない。われわれはSGIP1 α がアダプタータンパク質のEps15と結合することを見出し、epsinやEps15-SGIP1 α 複合体は微小管との結合を介して、小胞の早期ソーティングに関与していると考えられる。

変形がカップルしたプロセスは、エンドサイトーシスに限らず、神経突起伸長などの細胞の形態変化、細胞運動、さらには細胞分裂など広く重要な細胞機能に関与しており、今日の医学・生物学上の重要な研究課題となっている。今後、SGIP1 α を中心にこれらの問題をチャレンジしていきたいと考えている。

引用文献

- 1) Uezu, A. et al. : J.B.C. 282: 26481-26489, 2007
- 2) Kamioka, Y. et al. : J.B.C. 279: 40091-40099, 2004
- 3) Tsujita, K. et al. : J. Cell Biol., 172: 269-279, 2006
- 4) Itoh, T. et al. : Dev. Cell, 9: 791-804 2005
- 5) Tian, L. et al. : J. Biol. Chem., 275 :7854-7861, 2000
- 6) Kogata, N. et al.: Mol. Biol. Cell, 14: 3553-3564, 2003
- 7) Takahashi, S. et al.: J. Biol. Chem., 278: 49129-49133, 2003
- 8) Laurent, C.E. et al.: Mol. Cell Biol., 24: 9351-9358, 2004
- 9) Ford, M.G. et al.: Nature, 419: 361-366, 2002
- 10) Hussain, N.K. et al.: J. Biol. Chem., 278: 28823-28830, 2003
- 11) Subtil, A. & Dautry-Varsat A.: J. Cell Sci., 110: 2441-2447, 1997
- 12) Lakadamyali, M.: Cell, 124,: 997-1009, 2006

6. おわりに

以上、微小管と細胞膜リン脂質に結合するタンパク質についてわれわれの最近の成果を中心に述べ、エンドサイトーシスにおける微小管結合の役割について考察した。微小管と細胞膜

心筋 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)の構造と機能 —最近の進歩—

岩本 隆宏 (AO3公募班)

福岡大学医学部薬理学

1. はじめに

細胞内 Ca^{2+} シグナルは、細胞膜および(筋)小胞体膜に存在する様々な Ca^{2+} 透過チャネルや Ca^{2+} 輸送体の機能連関によって形成され、筋収縮、ホルモン分泌、神経活動、遺伝子発現など様々な細胞機能を制御している。筆者は、これまで10年以上にわたり、重要な Ca^{2+} 輸送体である $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX)の構造と機能およびその病態学的意義について研究を進めてきた。この輸送体は細胞膜を介して3個の Na^+ と1個の Ca^{2+} を交換輸送するが、その輸送方向は細胞内外の Na^+ と Ca^{2+} の電気化学的エネルギー勾配により決定される。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の存在は、1960年代にReuterら¹⁾が心筋において、またBlausteinら²⁾がイカ神経軸索において外液 Na^+ 依存性の Ca^{2+} 輸送活性を検出したことから示唆されていたが、この分子実体は1990年にNicolliら³⁾がイヌ心筋からNCX1をクローニングしたことで実証された。現在では、哺乳動物に3種のNCX遺伝子(NCX1、NCX2、NCX3)が存在することが分かっている。このミニレビューでは、心筋NCX1の構造と機能に関する最近の進歩について概説したい。

2. 心筋NCX1の機能および局在

心筋細胞の興奮収縮連関(E-C coupling)では、脱分極刺激によりL型電位依存性 Ca^{2+} チャネル(ジヒドロピリジン受容体:DHPR)からの Ca^{2+} 流入が筋小胞体(SR)の Ca^{2+} 遊離チャネル(リアノジン受容体:RyR2)からの Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release)を引き起こす。この心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は局所的には Ca^{2+} スパークとして観察され、また心筋細胞全体としては Ca^{2+} トランジェントとして捉えられる。一方、心筋細胞内の増加した Ca^{2+} は収縮蛋白質トロポニンCに結合し心筋収縮を引き起こした後、SRの Ca^{2+} -ATPase(SERCA2a)によりSRに再取り込みされるとともに、一部は心筋細胞膜のNCX1や Ca^{2+} -ATPaseを介して細胞外へ排出される。

この心筋 Ca^{2+} シグナル形成には、心筋細胞横行小管(T管)の三つ組構造(triad)や二つ組構造(dyad)と呼ばれる結合膜構造が重要であると考えられている。竹島らは、ジャンクトフィリン(JP-2)が心筋細胞のDHPRとRyR2の機能共役を形成する結合膜構造の構築に必要な不可欠であることを明らかにした⁴⁾。また最近、Mohlerらは、アンキリンB(AnkB)がNCX1、 Na^+/K^+ -ATPase(NKA; $\alpha 1$ or $\alpha 2$ isoforms)およびIP3受容体(InsP3R)の複合体形成のためのアダプター蛋

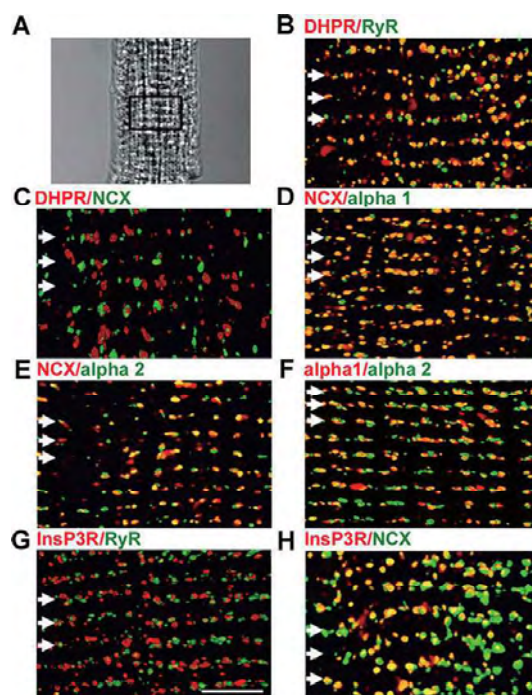


Fig. 1. The Ankyrin-B-based complex of NKA, NCX1, and InsP3R is localized in a specialized T-tubule microdomain of cardiomyocytes. Adult cardiomyocytes were labeled with indicated antibodies. 3D reconstructions of each cell (A, differential interference contrast) are shown for each combination. Staining pairs include (B) DHPR (red) and RyR (green), (C) DHPR (red) and NCX (green), (D) NCX (red) and NKA alpha 1 (green), (E) NCX (red) and NKA alpha 2 (green), (F) NKA alpha 1 (red) and NKA alpha 2 (green), (G) InsP3R (red) and RyR (green), and (H) InsP3R (red) and NCX (green). Voxel co-localization was performed for non-sarcolemmal voxels. T-tubule/Z-lines are indicated by white arrows. Scale bar = 5 μm . [from Mohler et al.⁵⁾]

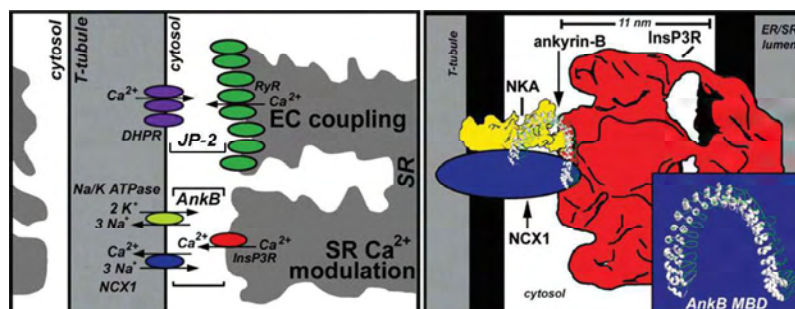


Fig. 2. Model of the cardiac Ankyrin-B complex

(Left) Model of the ankyrin-B-dependent complex of NKA, NCX1, and InsP3R at T-tubule/SR sites distinct from the classic "diad." (Right) Scale model of ankyrin-B complex based on approximate dimensions of represented proteins. [from Mohler et al.⁵⁾]

白質として重要な役割を果たすことを報告した⁵⁾。単離心筋細胞の免疫染色解析(三次元構築)から、NCX1/NKA/InsP3R共役系はDHPR/RyR2共役系とは異なるT管結合膜構造の異なるマイクロドメインに局在することが示された(Fig. 1)。興味深いことに、JP-2欠損心筋細胞では結合膜構造の構築異常が認められ、同調性のないランダムCa²⁺トランジェントが観察された⁴⁾。また、AnkBのE1425G変異体を発現する心筋細胞ではNCX1/NKA/InsP3R複合体形成が阻害され、同様の同調性のないランダムCa²⁺トランジェントが観察された⁶⁾。このように、DHPR/RyR2共役系とNCX1/NKA/InsP3R共役系は、正常な心筋Ca²⁺トランジェントの形成・維持に極めて重要な役割を果たしており、これらの共役異常は不整脈(期外収縮)や心不全の原因になると考えられる(Fig. 2)。おそらく、前者は“SRのCa²⁺遊離制御システム”として、また後者は“SRのCa²⁺含量制御システム”として寄与するものと推定される。しかしながら、心筋InsP3Rの機能的役割は未だ不明確であり、またSRのCa²⁺含量調節におけるNCX1の役割は論争中であることから、特に後者の機能については今後の詳細な解析が必要である。

3. 心筋NCX1の構造および制御機構

心筋NCX1には、細胞内のNa⁺とCa²⁺に依存した活性制御機構が存在している⁷⁾。心室筋細胞膜(ジャイアントパッチ)から測定した外向きNCX電流の典型例をFig. 3に示す。細胞内Ca²⁺存在下で細胞内側に100mM Na⁺を処置すると、ピーク電流に引き続いて時間依存性(t_{1/2}=5~10 s)に減衰し定常状態に達する外向きNCX電流が記録される。この減衰速度は細胞内Na⁺濃度に依存することから、この現象は“Na⁺依存性不活性化(I₁不活性化)”と呼ばれる。これは見かけ上、チャネルの不活性化過程に類似している。また、細胞内側のCa²⁺濃度を除去するとNCX電流はほとんど流れなくなる。この現象は“Ca²⁺依存性不活性化(I₂不活性化)”と呼ばれる。Fig. 4に、NCX1のイオン輸送サイクルモデルを示す。このモデルは、NCX1分子に細胞外イオンが結合するE₂状態と細胞内イオンが結合するE₁状態が存在し、各イオンを結合したNCX1分子の転位反応によりNa⁺とCa²⁺が連続的に輸送されることを示している。このモデルでは、E₁3Na_i-E₂3Na_oの転位反応が電位依存性となる。一方、細胞内Na⁺濃度が増加するとE₁3Na_i状態からI₁不活性化に入り易くなり、また細胞内Ca²⁺濃度が減少するとE₁状態からI₂不活性化状態に入り易くなる⁷⁾。

心筋NCX1は970個のアミノ酸からなる分子量約120kDaの糖蛋白質である。NCX1は膜トポロジー解析から9回膜貫通型構造であると推定されている⁸⁾。Fig. 5に示すように、NCX1分子内の繰り返し領域(α-1、α-2)には相対向する膜ループが存在し、イオン輸送通路(ポア)を構成すると推定されている⁸⁾。また中央の大きな細胞内ドメインは活性制御を司る領域と考えられている。実際に、細胞内ドメインを欠失させた変異型NCX1では、イオン輸送機能は保持されるものの、I₁およびI₂不活性化機構が消失することが知られている。細胞内ドメインのN末側膜近傍には、塩基性と疎水性のアミノ酸に富む領域(XIP領域、eXchange Inhibitory Peptide)が存在している。このXIP領域に変異を導入すると、I₁不活性化速度が変化することが報告されている。このXIP領域にはPIP₂が結合し、NCX1

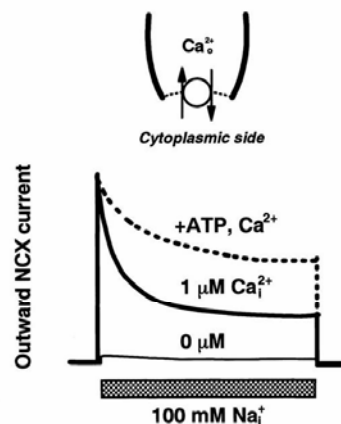


Fig. 3. Outward exchange currents in excised giant membrane patch. Time-dependent changes in outward exchange currents initiated by application of 100 mM Na⁺_i at 1 μM Ca²⁺_i (bold line) are shown. Removal of Ca²⁺_i inactivates the current, whereas intracellular application of modifiers such as ATP, PIP₂, or Ca²⁺_i decelerates the current inactivation.

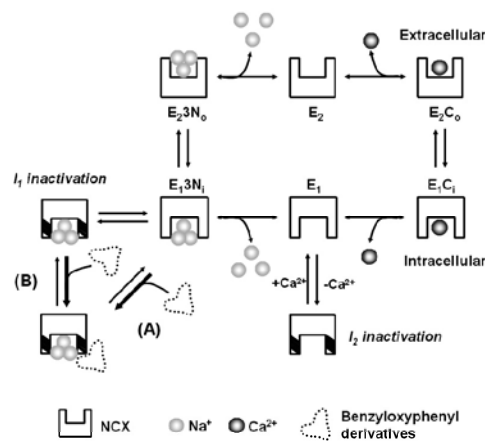


Fig. 4. Model of the NCX transport cycles

In the E₁ conformation, the 3Na⁺ or 1Ca²⁺ binding site(s) on NCX face the intracellular side; in the E₂ conformation, these sites face the extracellular side. The benzyloxyphenyl derivatives apparently bind to the NCX molecules either (A) in the E₁3N_i configuration and/or (B) in the I₁ inactivated state. [from Iwamoto et al.⁸⁾]

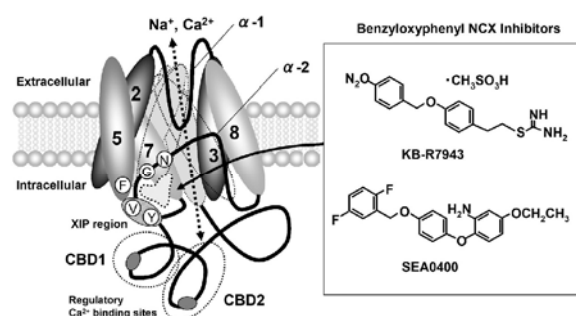


Fig. 5. A nine-transmembrane model of NCX1 molecule and putative interaction domains for benzyloxyphenyl derivatives.

Benzyloxyphenyl derivatives may interact with a specific receptor site, leading to blocking ion transport pore(s). Transmembrane helices, partially illustrated, are indicated by cylinders. The amino acid residues of NCX1 whose mutation alters the sensitivities to benzyloxyphenyl derivatives are indicated. XIP, exchange inhibitory peptide; F, Phe-213; V, Val-227; Y, Tyr-228; G, Gly-833; N, Asn-839. [from Iwamoto et al.⁸⁾]

を活性型に移行させると考えられている⁹⁾。また、細胞内ドメインには、2つの酸性アミノ酸クラスターからなる高親和性のCa²⁺結合部位 (CBD1、CBD2) が存在する (Fig.5)。このクラスター内に変異を導入すると、制御Ca²⁺の親和性 (I₂不活性化) が変化することが報告されている。しかし、I₁不活性化とI₂不活性化はまったく独立した機構ではなく、両者は機能的に密接な関係にあることが示唆されている。

最近、NCX1の細胞内ドメインの三次元立体構造がNMR (Hilge¹⁰⁾)と結晶解析 (Nicoll¹¹⁾)により明らかにされた。Fig.6に示すように、CBD1はイムノグロブリン様のβサンドイッチ構造を取り、その一端に4個のCa²⁺を高親和性に結合する領域を持っている。このCBD1のfolding構造の維持にはCa²⁺結合が必要であり、Ca²⁺非結合型は構造変化によりunfolding構造になると推定された。このCa²⁺結合依存性の構造変化はI₂不活性化を誘導する分子機序であると考えられた。一方、CBD2はCBD1と類似構造をしているが、Ca²⁺結合は低親和性であり、CBD2のfolding構造の維持にはCa²⁺結合は必ずしも必要ないと推定された。

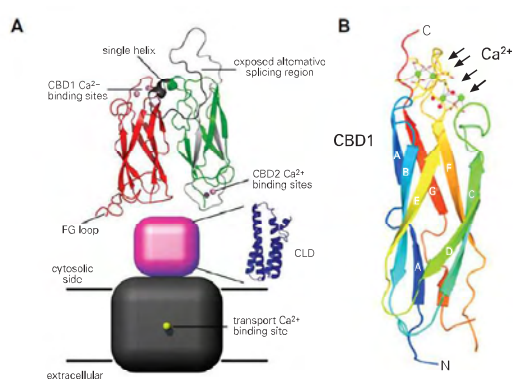


Fig.6. Model of the intact Na/Ca exchanger.

A: The Na/Ca exchanger is composed of two anti-parallel oriented Ca²⁺-binding domains CBD1 (red) and CBD2 (green), as well as a third cytosolic domain shown in pink/blue and a transmembrane domain shown in grey. CLD, catenin-like domain; FG loop, loop between the F and G β-strands. [from Hilge et al.¹⁰⁾]. B: Crystal structure of CBD1. The seven β-strands are colored from the N terminus (N) in blue to the C terminus (C) in red. The four Ca²⁺ ions are depicted as green spheres. [from Nicoll et al.¹¹⁾].

4. 心筋NCX1の制御機構の生理学的・薬理的意義

I₁およびI₂不活性化機構は、心筋NCX1が生理的なCa²⁺濃度調節を行うために必須の制御機構であると考えられている。Weberらは、心筋細胞のbeat to beatなCa²⁺トランジェントの形成・維持に、NCX1のI₂不活性化機構が極めて重要な役割を果たすことを示した¹²⁾。つまり、NCX1は心筋拡張期にI₂不活性化状態 (CBD1のCa²⁺非結合型) にあり、収縮期に活性化状態 (CBD1のCa²⁺結合型) になるように巧みに制御されていると考えられた。また、著者らはXIP領域への変異導入によりI₁不活性化を破壊した活性型NCX1変異体を繊維芽細胞に高発現させたところ、ウアパイン処置 (Na⁺負荷) により致死性のCa²⁺過剰負荷を引き起こすことを見出した¹³⁾。一方、野生型NCX1の高発現細胞では同様の処置でCa²⁺過剰負荷は起こらなかった。さらに、最近、著者らはこの活性型NCX1変異体を

心筋特異的に高発現させたマウスを作製したところ、拡張型心筋症様の心不全を呈することを見出した (投稿中)。このように、I₁不活性化機構は細胞内にNa⁺が蓄積する病態時 (虚血/再灌流時など) にNCX1を介するCa²⁺過剰負荷が生じないようにする防御システムとしての役割を果たすとともに、正常な心筋Ca²⁺トランジェントの維持にも重要な機構であると考えられる。

また、I₁不活性化機構はbenzyloxyphenyl系NCX阻害薬 (KB-R7943、SEA0400など) の分子機序と密接に関連している。すなわち、NCX阻害薬はNCX1をI₁不活性化状態に固定する、もしくはI₁不活性化状態に移行しやすくすることにより、イオン輸送を阻害する (Fig.4)⁸⁾。通常、細胞内Na⁺濃度が増加すると、NCX1のCa²⁺流入モードが働き易くなるが、この時、I₁不活性化は起こり易い状態になる。一方、細胞内Na⁺濃度が低い時は、Ca²⁺流出モードが働き易くなるが、この時、I₁不活性化は起こり難い状態になる。この理論から、NCX阻害薬は見かけ上、I₁不活性化の起こり易いCa²⁺流入モードを抑え易いことになる。著者らは、これまでに変異解析からNCX阻害薬の親和性に関わるNCX1の重要なアミノ酸 (Phe-213、Val-227、Tyr-228、Gly-833、Asn-839) を同定している (Fig.5)⁸⁾。Benzyloxyphenyl系NCX阻害薬は、そのレセプター部位がI₁不活性化状態に存在する可能性が高いと考えられる。

5. おわりに

上述したように、心筋NCX1のT管膜局在機構ならびに細胞内Na⁺・Ca²⁺依存性の活性制御機構について分子レベルでの研究が進んできた。しかしながら、心筋NCX1分子複合体の生理機能や活性制御機構についてはまだ未解明な部分も多く、今後詳細な研究が必要であると思われる。一方、非心筋細胞 (血管平滑筋細胞、腎上皮細胞、神経細胞など) におけるNCX1分子複合体の研究については、心筋細胞より遅れており、その生理機能はもとより、局在・集積機構、活性制御機構など、解明すべき課題が山積している。筆者らは、これらの課題を一つでも多く解明できるよう、今後さらに努力して行きたいと考えている。

参考文献

- 1) Reuter, H. et al. (1968) *J. Physiol.* 195, 451-470.
- 2) Blaustein, M.P. et al. (1969) *J. Physiol.* 200, 497-527.
- 3) Nicoll, D.A. et al. (1990) *Science* 250, 562-565.
- 4) Takeshima, H. et al. (2000) *Mol. Cell* 6, 11-22.
- 5) Mohler, P.J. et al. (2005) *PLoS Biology* 3, 2158-2167.
- 6) Mohler, P.J. et al. (2003) *Nature* 42, 634-639.
- 7) Hilgemann, D.W. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 136-158.
- 8) Iwamoto, T. et al. (2007) *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 7, 188-198.
- 9) Hilgemann, D.W. (2004) *Science* 304, 223-224.
- 10) Hilge, M. et al. (2006) *Mol Cell* 22, 15-25.
- 11) Nicoll, D.A. et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 21577-21581.
- 12) Weber, C.R. et al. (2001) *J. Gen. Physiol.* 117, 119-131.
- 13) Pan, Y. et al. (2000) *Am. J. Physiol.* 279, C393-C402.

Ca²⁺シグナルから膜電位変化へシグナル変換する分子集積体としての トランスポートソームの機能解析

今泉 祐治、山村 寿男、大矢 進 (AO2公募班)

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

1. はじめに

細胞内局所Ca²⁺の動態は時間的・空間的性質および発生機序や生理機能からCa²⁺スパーク、Ca²⁺ホットスポット、Ca²⁺リップル、Ca²⁺ウェーブ、Ca²⁺オシレーションなど様々な名称が付けられている。なかでもCa²⁺スパークはレーザー共焦点顕微鏡の発達によって心筋で発見されて以来¹⁾、詳細な機能解析が進んでいる。心筋横行小管上の1分子の電位依存性Ca²⁺チャネルの自然開口によるCa²⁺流入で、近接した接合部筋小胞体上のリアノジン受容体Ca²⁺遊離チャネル(RyR; 主に2型、ただし部位によっては3型も一部関与)数分子が開口、あるいはリアノジン受容体の自然開口することによる半値幅50ミリ秒、最大径1ミクロン程度の一過性の局所Ca²⁺濃度上昇をCa²⁺スパークと呼んでいる。心筋では電位依存性Ca²⁺チャネルとのリアノジン受容体の機能的な連関とそれを支える制御機構が、分子実態としても構造的にも詳細に明らかとなってきている²⁾。さらに心不全や不整脈の病態に関してRyR・筋小胞体(Ca²⁺スパーク)機能異常の観点からの解明も進んでいる。Ca²⁺スパークが心筋活動電位や洞房結節ペースメーカー電位に影響を与えることは知られているものの、心筋Ca²⁺スパークは基本的に、興奮収縮連関時のCa²⁺流入によるCa²⁺遊離(CICR)で細胞内Ca²⁺濃度上昇が増幅される機構の1単位を反映している。従って心筋Ca²⁺スパーク発生を担うトランスポートソームは本質的にCa²⁺シグナル増幅装置と考えられる。

一方、トランスポートソームの重要な生理機能の一つとして、細胞内Ca²⁺信号の電気信号への変換が考えられる。細胞内で生じた局所Ca²⁺信号が細胞を超えて組織全体へ伝播され、同期した組織機能の発揮に寄与するためには、電気信号へ変換されることが不可欠であり、この信号変換は統合的生理機能の発現において極めて重要なステップとなる。多くの平滑筋細胞や幾つかの神経細胞においては、小胞体からのRyR(あるいはIP3受容体)を介した自発性Ca²⁺遊離により生じたCa²⁺スパークが、近傍の細胞膜上に存在するCa²⁺活性化K⁺あるいはCl⁻チャネルの活性を上昇させることにより、効率良く電気信号へと変換する機構が存在する。

また消化管・門脈・尿道などの各種臓器におけるカハール介在細胞はペースメーカー的に機能し、組織の蠕動運動や緊張度調節に根源的な役割を果たしていることが近年明らかとなってきた³⁾。これらのカハール介在細胞ではCa²⁺スパークから拡大したCa²⁺ウェーブがCa²⁺活性化Cl⁻チャネル(分子実態は不明)などを活性化させ、ペースメーカー電位を発生させることにより、細胞内Ca²⁺オシレーションからペースメーカー電位発生へ信号変換されると推測されている。このペースメーカー電位発生機構は最も洗練されたまた生体統合機能にとって極めて重要な信号変換機構の1つと考えられる。

2. 平滑筋での細胞内局所Ca²⁺シグナルの電気信号への変換 機構における2型リアノジン受容体の機能

自発一過性外向き電流(Spontaneous Transient Outward Current: STOCs)はCa²⁺スパークよりもはるか以前(1986年)に平滑筋の特異な電流成分として発見され⁴⁾、多くの臓器平滑筋において観測されてきた⁵⁾。心筋Ca²⁺スパークを発見したLedelereおよびNelsonらによって平滑筋細胞でもCa²⁺スパークが実測された⁶⁾。さらにSTOCsとの同時測定により、まさに細胞膜直下の特定の筋小胞体からRyRを介して周期性を持って生じるCa²⁺スパークが細胞膜上の大コンダクタンスCa²⁺活性化K⁺(BK_{Ca})チャネルを活性化することによりSTOCsを発生させ、静止膜電位を保つことに寄与していることが明らかとなった^{7,8)}(図1左)。平滑筋ではほぼ例外なくBKCaチャネルが機能発現していることから、RyR発現の程度と両分子間の機能連関の程度に応じてSTOCsが発生し、その機能的寄与の程度が決まると推定される。すなわち、平滑筋で筋小胞体上RyRと細胞膜上BK_{Ca}チャネルを含むマイクロドメインがトランスポートソームを形成し、その局所で生じるCa²⁺スパークシグナルからSTOCsという電気信号への変換を担っていると言えることができる。

多くの臓器平滑筋は生理的な条件下で若干の自発性緊張を有し、それは比較的に浅い(-50 ~ -70 mV)静止膜電位に強く

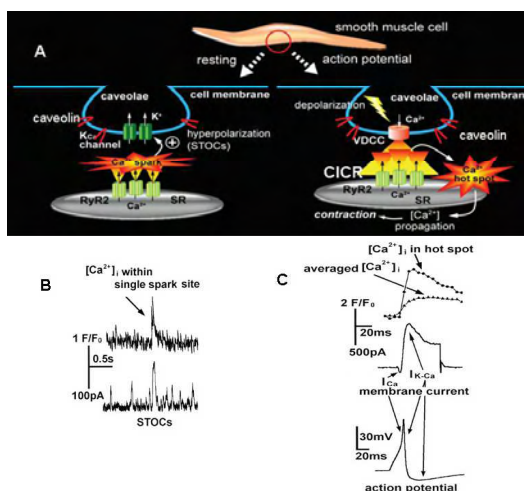


図1 平滑筋細胞におけるCa²⁺スパーク(A左)とCa²⁺ホットスポット(A右)の概念図と電気現象と細胞内Ca²⁺濃度上昇。安静時にRyRを介する筋小胞体からの自発Ca²⁺遊離(Ca²⁺スパーク)が生じ、近傍の細胞膜上のBK_{Ca}チャネルを活性化して自発一過性外向き電流を発生させるが、極めて一過性の現象(C)。活動電位発生時にCa²⁺によるCa²⁺遊離(CICR)を介してCa²⁺ホットスポットが生じる(D)。これはBK_{Ca}チャネルを活性化して活動電位の再分極相・過分極性後電位を形成するとともに、他の筋小胞体へCICRを伝播して細胞全体のCa²⁺濃度を上昇させて収縮に寄与する。

依存することが知られている。一般に平滑筋静止膜電位を負側に維持する要因は幾種類かの K^+ チャネル活性であり、上記の Ca^{2+} スパーク/STOCs発生による BK_{Ca} チャネル活性もその一因子と考えられる⁹⁾。実際、 BK_{Ca} チャネル $\beta 1$ サブユニット欠損マウス¹⁰⁾で高血圧や膀胱収縮異常が生じ、 BK_{Ca} α サブユニット欠損マウス^{11, 12)}では高血圧・尿失禁・勃起不全・側頭性てんかんや日内行動リズム異常などが生じることが明らかとなっており、平滑筋機能異常は静止膜電位が若干浅くなった結果と考えられている。高血圧自然発症ラットの動脈において $\beta 1$ サブユニット発現低下により BK_{Ca} チャネル機能が低下しているという報告¹³⁾があるが、逆に補償的に発現増加しているという報告¹⁴⁾もあって決着はついていない。一方、 $RyR2$ 遺伝子欠損マウスは胎生致死のため¹⁵⁾、 RyR の Ca^{2+} スパーク/STOCs/ BK_{Ca} チャネル活性による静止膜電位や筋緊張への寄与は充分検討されてこなかった。また平滑筋臓器によっては2型に加え、3型 RyR も殆ど匹敵する程度に発現しており、それぞれの役割が充分に明らかではない。

そこで我々は $RyR2$ 異型接合性欠損マウス(竹島研から供与)の膀胱平滑筋を用いて $RyR2$ の寄与を明らかにした¹⁶⁾。 $RyR2$ タンパク発現低下により Ca^{2+} スパークおよびSTOCsの発生頻度が低下し(図2)、膀胱平滑筋組織としては静止膜電位が数mV有意に脱分極方向へシフトしていた。単離細胞では Ca^{2+} スパークは一過性の過分極を生じさせるが、電気的シンチウムを形成する平滑筋組織内では各細胞でランダムに生じるSTOCsは平均化され、静止膜電位を数mV過分極方向へシフトさせるものと考えられる。 $RyR3$ 、電位依存性 Ca^{2+} チャネル($\alpha 1C$ と $\beta 2$)、小胞体 Ca^{2+} ポンプ(SERCA2A)のmRNA発現量や筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵量は変化していなかった。フェノタイプとして有意な頻尿と一回尿量の減少が生じたが、これは恐らく平滑筋緊張が上昇したことによると推定された。すなわち $RyR2$ による Ca^{2+} スパークの発生とその Ca^{2+} 信号をSTOCsという電気信号に変換するトランスポートソーム機能は、尿貯留・排泄調節という膀胱機能発現において根源的な果たす役割を果たすことが示された。

3. 平滑筋の興奮収縮連関においてトランスポートソームでのCICR機構は収縮に寄与するのか?

平滑筋は由来する臓器によって電子依存性 Ca^{2+} チャネル発現量や主に発現している K^+ チャネルの種類と発現量も異なるため、興奮性も大きく異なる。例えば興奮性の低い大径の弾性動脈や気管平滑筋においては生理的条件下では収縮薬による刺激や筋直接電気刺激でも活動電位が生じない。しかし例えば自発活動電位を生じる門脈などでも、生じた際の興奮収縮連関による収縮や BK_{Ca} チャネル活性化による活動電位の再分極相・後過分極相の形成には、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入量だけで充分であり、CICRによる Ca^{2+} 増幅機構は

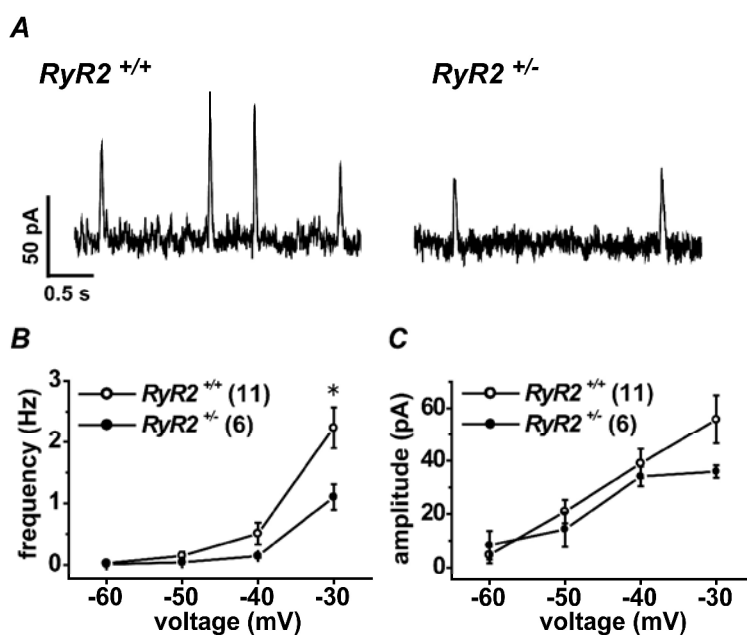


図2 正常マウス($RyR2^{+/+}$)および $RyR2$ 異型接合性欠損マウス($RyR2^{+/-}$)から単離した膀胱平滑筋細胞において電位固定下で記録したSTOCsの比較。原図(A)は保持電位-30 mVで測定したSTOCs。発生頻度は保持電位の脱分極側への変化に伴い増加するが、その値は-30 mVで $RyR2^{+/-}$ の方が有意に小さかった(B)。STOCsのピーク電流値には有意な差は無かった(C)。

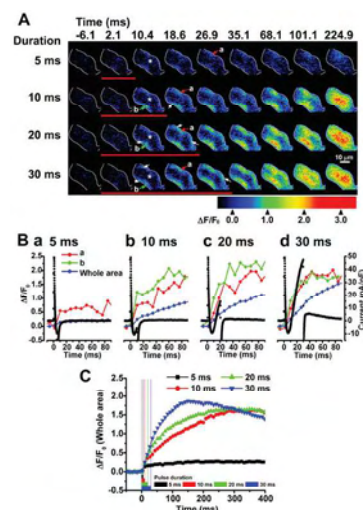


図3 マウス膀胱平滑筋細胞から記録した Ca^{2+} 画像(A)と膜電流(B)。同一細胞で保持電位-60 mVから0 mVへ5, 10, 20, あるいは30 ミリ秒間繰り返して脱分極させた。ピペット内液に100 μM Fluo-4を含む。 Ca^{2+} 上昇は細胞膜直下の特定部位から開始し、脱分極時間の延長とともに増大・拡大する。赤下線は刺激している間に得られた画像を示す。Bの赤・緑・青の線は Ca^{2+} ホットスポット内(Aのaおよびbの部位)の、あるいは細胞全体の平均(青)の蛍光強度(F/F_0 ; 脱分極前を F_0 とする)を示す。膜電流は脱分極に伴い、まず内向きの電位依存性 Ca^{2+} 電流が流れ、脱分極が20ミリ秒以上において主に BK_{Ca} チャネルを介する外向き電流が生じる。CはBでの細胞全体の平均 F/F_0 の時間変化。脱分極5ミリ秒の場合は殆ど Ca^{2+} 上昇が生じず、刺激時間5と10ミリ秒の間に上昇がスパーク様にごく一過性で消失するかCICRが細胞全体に広がるか、all-or-noneな変化の閾値が存在する。10ミリ秒以上の脱分極では最大 Ca^{2+} 濃度へ達するまでの時間経過が短縮される。脱分極刺激が終了してから Ca^{2+} 濃度のピークが生じることに注意。

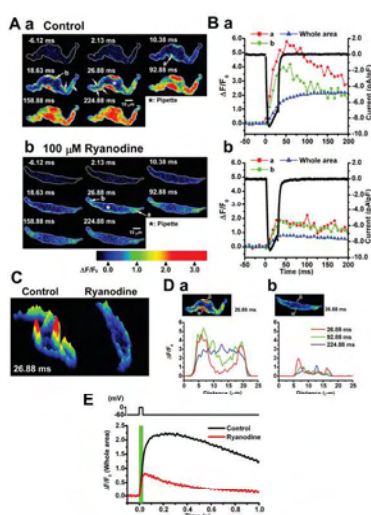


図4 マウス膀胱平滑筋細胞から記録したCa²⁺画像(A)と膜電流(B)。保持電位-60 mVから0 mVへ30ミリ秒間脱分極させた。それぞれ対象(a)とピペット内液に100 μMのリアノジンを加えた(b)場合の記録。Ca²⁺電流を測定するため、30 mM TEAと1 mM 4-APを外液に加えてK⁺電流を抑制した。CはCa²⁺濃度分布を3次元的に示した。Dでは細胞断面でのCa²⁺濃度分布。Eは細胞全体の蛍光強度比の時間経過。

生理的には必要がないと主張するグループ¹⁷⁾もある。膀胱平滑筋でもCICRは機能できるが、Ca²⁺チャネルとRyRの機能的カップリングが弱いため、興奮収縮連関による収縮において生理的な意義を有するかは不明とするグループ¹⁸⁾もあって、CICR機構がどの程度寄与するかは依然として確立されていない。

従来から我々は膀胱や精管の平滑筋でCICRが生理的条件下で十分に機能し、活動電位の再分極相・後過分極相の形成に大きな寄与をしていることを示してきた⁷⁾が、さらに明確に収縮へも寄与していることを示した¹⁹⁾。電位固定下のマウス膀胱平滑筋において、脱分極パルスの持続時間を5ミリ秒から段階的に延長すると、Ca²⁺上昇は5ミリ秒ではCa²⁺スパーク様で一過性であるが、刺激幅を延長すると持続的に拡大するCa²⁺シグナル(Ca²⁺ホットスポットと呼んでいる)が同じ細胞膜直下の部位で観察されるようになる(図3)。これらからマウス膀胱平滑筋の興奮収縮連関時のCICRは2段階で生じることが明らかとなった。パッチ電極内液から作用させたリアノジンにより、脱分極中のCa²⁺電流量は影響を受けず、その電流積分値から算出された細胞内Ca²⁺濃度は10 μMに達する。しかし細胞内Ca²⁺濃度上昇は収縮が生じない程度まで著しく抑制された(図4)。RyR2異型接合性欠損マウスでは、脱分極によるCICRも減弱しており(図5)、単一活動電位で生じた興奮収縮連関による収縮にはRyR2を介したCICRが不可欠であることが明確に示された¹⁶⁾(図1右)。さらにメチルβサイクロデキストリン処置によりCa²⁺スパークも

Ca²⁺によるCa²⁺遊離もほぼ消失することから、カベオラ構造がこの機能発現に不可欠であることが示唆された²⁰⁾。

4. Ca²⁺シグナルから膜電位変化へのシグナル変換トランスポートソームの可視化解析—今後の展望—

BK_{Ca}チャネル、電位依存性Ca²⁺チャネル、TRPチャネルやNa⁺-Ca²⁺交換体などがカベオラを含むトランスポートソーム内で共役している機構が示唆されている。トランスポートソームにおけるCa²⁺信号から電気信号への変換に関する分子機構解明においてブレイクスルーを図るにあたり、新たな手法として一分子レベルでの可視化技術の導入を行った。全反射蛍光顕微鏡とホールセルクランプ法の併用により、電位固定化で細胞膜内および膜直下200 nm以内でのナノスケールの蛍光分子動態が測定可能となった(直径100 nmと200 nmの蛍光ビーズが識別可能で20 ミリ秒毎の動態画像取得可能)。またパッチピペットからCa²⁺蛍光色素Fluo4を細胞内に導入し、脱分極刺激時の膜直下の局所Ca²⁺濃度変化をナノスケールの画像分解能で計測することが可能となった。この技術を用いて単離膀胱平滑筋細胞の電位依存性Ca²⁺チャネル分子(1または数分子)が開口して流入したCa²⁺がマイクロドメイン内でCICRを引き起こす過程を可視化することに成功した(投稿中)。またトランスポートソームを形成するマイクロドメイン内での

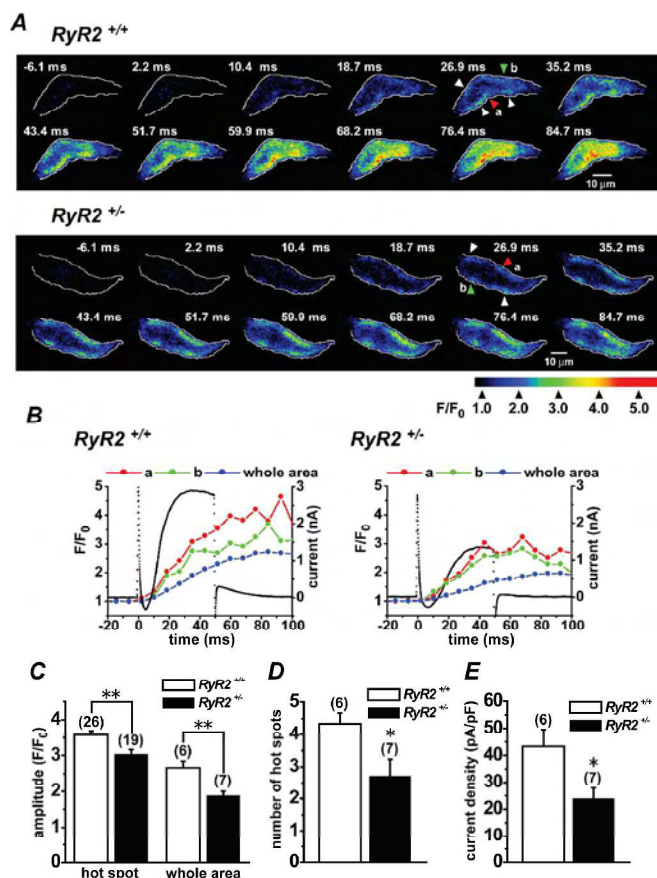


図5 RyR^{+/+}およびRyR^{-/-}から単離した膀胱平滑筋細胞での脱分極によるCa²⁺濃度上昇および膜電流変化の比較。Ca²⁺ホットスポット内および細胞全体の平均の蛍光強度比、細胞内に生じるホットスポットの数、ピーク外向き電流ともにRyR^{-/-}ではRyR^{+/+}より少なかった。

BKチャネル局在とCa²⁺スパークによるチャネル活性化を解析するため、CFPおよびYFPでそれぞれラベルしたBKチャネルαおよびβ1サブユニットを培養動脈平滑筋細胞に発現させ、サブユニットの会合を含めチャネル分子の動態を一分子可視化技術により解析した。さらに蛍光ラベルしたカベオリン1との位置関係を解析している(投稿中)。トランスポートソームでの上記の信号変換分子集積を解明する上で一分子可視化技術は極めて有効であり、画期的な技術となる可能性が高い。

5. 終わりに

細胞内局所Ca²⁺シグナルを細胞電気信号へ変換する機能、あるいは組織内の特定細胞のCa²⁺シグナルを組織全体に伝播する電気信号へ変換する機能は、分子複合体としてのトランスポートソーム機能の中でも特に重要なものの一つと考えられる。Ca²⁺活性化イオンチャネルはカベオリンなどのトランスポートソーム内に局在し他分子と複合体を形成することにより、その変換素子としての機能効率を高めると想定される。平滑筋におけるCa²⁺スパーク/STOCは、RyRとBK_{Ca}チャネルおよび電位依存性Ca²⁺チャネルを含むトランスポーターによる信号変換の典型例と言えよう。その分子連関機構をナノスケールで解明する上で一分子可視化技術は極めて有効である。さらにカハール介在細胞でのペースメーカー電位発生は究極の細胞内Ca²⁺信号から電気信号への変換機構と考えられ、その重要性からもトランスポートソームを形成する分子実体と分複合体形成の機構解明が求められる。

引用文献

- 1) Cheng H, *et al.* (1993) *Science* 262, 740-744.
- 2) Lederer JW, *et al.* (2004) *J Muscle Res Cell Motil.* 25, 602-603. Review
- 3) Sanders KM, *et al.*, (2006). *Annu Rev Physiol.* 68, 307-343. Review
- 4) Benham CD & Bolton TB (1986). *J Physiol* 381, 385-406.
- 5) Bolton TB & Imaizumi Y (1996). *Cell Calcium* 20, 141-152. Review
- 6) Nelson MT, *et al.* (1995) *Science.* 270, 633-637.
- 7) Imaizumi Y, *et al.* (1998). *J Physiol* 510, 705-719.
- 8) Imaizumi Y, *et al.* (1999) *Jpn J Pharmacol* 80, 1-8. Review
- 9) Jaggar JH, *et al.* (2000). *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C235-C256. Review
- 10) Brenner R, *et al.* (2000) *Nature.* 407, 870-876.
- 11) Meredith AL, *et al.* (2004) *J Biol Chem.* 279, 36746-36752.
- 12) Meredith AL, *et al.* (2006) *Nat Neurosci.* 9, 1041-1049.
- 13) Amberg GC, *et al.* (2003) *Circ Res.* 93, 965-971.
- 14) Kiyoshi H, *et al.* (2006) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291, H2723-H2734.
- 15) Takeshima H, *et al.* (1998) *EMBO J.* 17, 3309-3316.
- 16) Hotta S, *et al.* (2007) *J Physiol.* 582, 489-506.
- 17) Kamishima T & McCarron JG (1996). *J Physiol* 492, 61-74.
- 18) Collier ML, *et al.* (2000). *J Gen Physiol* 115, 653-662.
- 19) Morimura K, *et al.* (2006) *Am J Physiol Cell Physiol.* 290, C388-C403.
- 20) Hotta S, *et al.*, (2007) *J Pharmacol Sci.* 103, 121-126.

cAMPセンサーEpac2と低分子量G蛋白質Rap1の インスリン分泌制御における役割

柴崎 忠雄、高橋 晴美、三木 隆司(A03公募班)、清野 進

神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学

発表論文：

Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, Sunaga Y, Matsumura K, Yamanaka M, Zhang C, Tamamoto A, Satoh T, Miyazaki JI, Seino S. Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19333-19338, 2007.

1. はじめに

神経細胞、内分泌細胞、神経内分泌細胞、外分泌細胞などの分泌細胞における分泌は、分泌顆粒の細胞膜への融合によって完了する^{1,2)}。すなわち、ペプチドホルモン、神経ペプチド、消化酵素はdense-core granuleと呼ばれる分泌顆粒に蓄えられ、様々な刺激によってこれらの顆粒が細胞膜へ融合することにより細胞外に放出される。膵β細胞はdense-core granuleをもつ典型的な内分泌細胞であり、インスリン分泌を制御することにより糖代謝の恒常性の維持に不可欠な働きをしており、その機能破綻は糖尿病を引き起こす。

グルコース誘導性のインスリン分泌とその増強はインスリン分泌制御の基本的な制御メカニズムである。膵β細胞では、細胞内Ca²⁺の上昇が開口放出の制御に必須のシグナルであるが、その他の様々な細胞内シグナルも制御に関与しており、なかでもcAMPは強力にインスリン分泌を増強する³⁾。

生体では食物の腸管内摂取が引き金になって、腸内分泌細胞とK細胞からそれぞれGLP-1とGIPと呼ばれるインクレチンホルモンが分泌される。これらのホルモンが膵β細胞に作用すると、アデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMPの細胞内濃度が上昇し、インスリン分泌がグルコース濃度依存性に強力に増強される⁴⁾。cAMP増加以降の細胞内シグナル伝達については、古くからcAMPによるプロテインキナーゼ A (PKA) が活性化され、PKAの標的分子のリン酸化を介して発揮されるものと考えられてきた。しかしながら、約8年前、筆者らは膵β細胞のグルコースによるインスリン分泌の制御にきわめて重要であるATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)と結合する分子をスクリーニングし、K_{ATP}チャネルの調節サブユニットであるスルホニル尿素受容体(sulfonylurea receptor 1, SUR1)とEpac2が結合することを見出した⁵⁾。Epac2は、当時複数の研究室で相次いで同定された新たなcAMP結合タンパクのファミリー^{6,7)}に属する分子であった。さらにEpac2の膵β細胞での分泌における役割を検討したところ、Epac2がcAMP依存性、PKA非依存性のインスリン分泌増強に関与していることが明らかにされた^{5,8)}。K_{ATP}チャネルはグルコースによるインスリン分泌の制御に必須の分子であり、cAMPはインスリン分泌をグルコース濃度依存性に増強する。したがって、K_{ATP}チャネルとEpac2の相互作用がインクレチンホルモンによるグルコース濃度依存性インスリン分泌増強を担っている可能性も考えられる。

しかしながら、cAMPがどのように開口放出を制御しているかはなお多くが不明である。インスリン顆粒の動態における

cAMPシグナルの役割を解明することは、より普遍的にdense-core granuleの開口放出の制御機構を解明することにつながると考えられる。本研究では、膵β細胞のインスリン顆粒の開口放出におけるcAMPシグナルの役割を全反射顕微鏡(total reflection fluorescence microscopy, TIRFM)を用いて解析した。さらに、このcAMPの顆粒の動態に及ぼす効果がEpac2の機能を介して発揮されているのか、またこの効果にEpac2によるRap1の活性化が関与しているのかについて検討し、Epac2/Rap1シグナルが細胞膜近傍のインスリン顆粒の密度を制御することにより、cAMPによるインスリン顆粒の動態を制御していることが明らかになった。

2. インスリン顆粒の開口放出における3つの様式

筆者らがインスリン分子と蛍光分子Venusの融合タンパク(insulin-Venus)を発現させるアデノウイルスと全反射顕微鏡(total reflection fluorescence microscopy, TIRFM)を用いて細胞膜下約40nmまでの距離に存在するインスリン顆粒の動態をモニターしたところ、これまで知られていなかった新たな事実が明らかになった。インスリン分泌細胞株であるMIN6細胞を用いた既報のTIRFM解析によれば、細胞膜へのインスリン顆粒の融合には2つの様式があることが知られていた⁹⁾。すなわち、一つ目は細胞膜に既にドックした顆粒(これまでpreviously docked granuleと呼ばれていた)の融合によるものである(筆者らは用語の混乱を防ぐためこれらの顆粒をold faceと呼ぶことを提唱する)。もう一つは細胞膜に新たにリクルートされた顆粒(以前からnewcomerと呼ばれていたものに相当)の細胞膜への融合である。しかしながら、筆者らが膵β細胞の初代培養細胞を用いてインスリン顆粒の動態を詳細に解析したところ、newcomerにも、①新たにリクルートされTIRFMではドック状態が確認されないまま直ちに細胞膜に融合する顆粒(restless newcomerと命名)と、②新たにリクルートされ、ドックしその後細胞膜に融合する顆粒(resting newcomerと命名)の2種類の顆粒があることが明らかになった(図1A)。

3. K⁺刺激とグルコースが引き起こすインスリン顆粒動態の違い

Ca²⁺誘導性のインスリン顆粒の細胞膜への融合現象を野生型マウスより単離した膵β細胞の高濃度(60 mM) K⁺刺激で検討したところ、融合は刺激直後に一過性に生じた(図1B)。K⁺刺激によって融合した顆粒の60%以上はold faceであったが、細胞膜に既にドックしていた顆粒のうちわずか約17%が

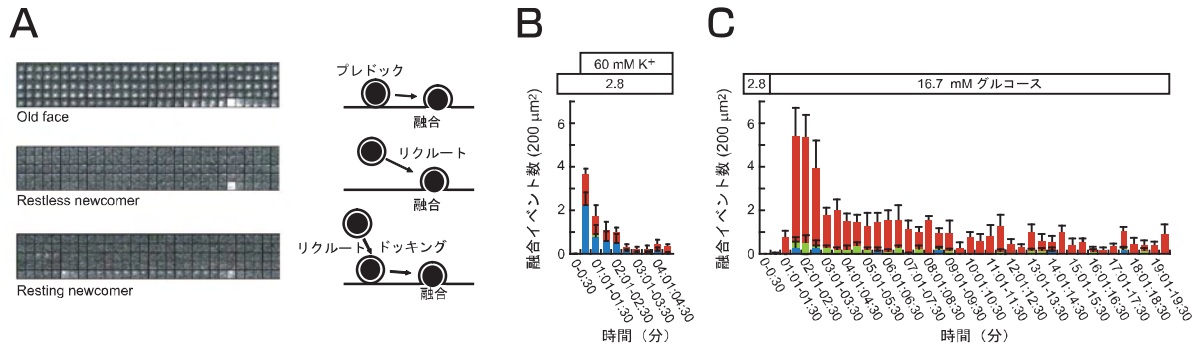


図1 膵β細胞のインスリン顆粒動態の解析 (原著論文より改変引用)

(A) インスリン顆粒の3つの融合モード。TIRFMで見られた典型的な顆粒動態を経時的に示す。(上段) Old face:あらかじめ細胞膜にドックされており、刺激に応じて細胞膜と融合する。(中段) Restless newcomer:刺激により細胞膜面に新たにリクルートされ直ちに細胞膜と融合する。(下段) Resting newcomer:刺激により細胞膜面に新たにリクルートされ、ドッキングした後、細胞膜と融合する。(B、C) 高濃度(60 mM K^+ 、(B)あるいは高濃度グルコース(16.7 mMグルコース)で刺激した際の顆粒の細胞膜への融合イベント数。30秒毎の細胞膜200 μm^2 あたりのイベント数をヒストグラムで表す。Old face、Restless newcomer、Resting newcomerをそれぞれ青、赤、緑で示す。データは5-6回の独立実験の平均±SEを示す。

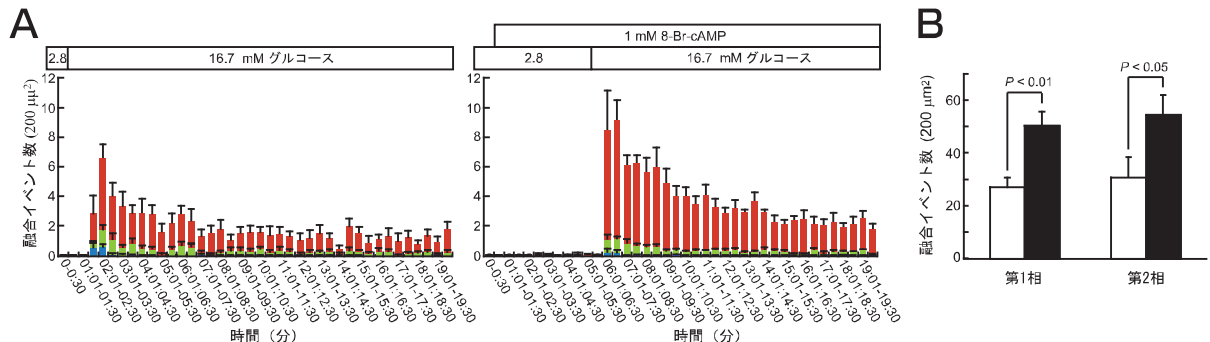


図2 膵β細胞におけるcAMPのインスリン顆粒動態におよぼす効果 (原著論文より改変引用)

(A) 野生型マウスより単離した膵β細胞を高濃度グルコース(16.7 mMグルコース)で刺激した際の融合イベント数。30秒毎の細胞膜200 μm^2 あたりのイベント数をヒストグラムで表す。左はグルコース単独刺激、右は1 mM 8-Br-cAMP存在下でグルコース刺激した際の融合イベント数。Old face、Restless newcomer、Resting newcomerをそれぞれ青、赤、緑で示す。データは6回の独立実験の平均±SEを示す。(B) cAMPによる第1相と第2相の融合イベント数の増加。非存在下(白カラム)と比較し8-Br-cAMP存在下(黒カラム)では、第1相(グルコース刺激後0-5分)と第2相(グルコース刺激後5-15分)いずれにおいても融合イベント数の総和が有意に増加した。

融合したにとどまった。一方、グルコースによる刺激によっては、(刺激後50秒ほどして見られる)急峻で一過性の増加による第1相と、緩徐で持続性の融合による第2相の開口放出が見られた(図1C)。興味深いことにグルコースによる融合現象は第1相も第2相も大部分はrestless newcomerによるものであった。 K^+ 刺激が Ca^{2+} の細胞内流入を引き起こすのに対し、グルコースはATPをはじめとする様々な代謝シグナルを生み出し、 Ca^{2+} の細胞内流入を介して分泌を惹起する。したがって、これら両者が異なる細胞内シグナルを活性化させることにより異なった様式の開口放出が引き起こされるものと考えられた。これまで、グルコースによって引き起こされる第1相、第2相のインスリン分泌は、それぞれ、predocked granuleからなるreadily releasable pool(RRP)、細胞膜から離れて存在する顆粒からなるreserve poolからの分泌であると考えられてきた¹⁰⁾。しかしながら、筆者らはグルコースによるインスリン分泌の初期相をなす顆粒の動態は、 Ca^{2+} 誘導性のインスリン顆粒の細胞膜への融合とは異なっておりことを見出した。すなわち、グルコースによる第1相のインスリン分泌を担うRRPの顆粒は、必ずしもpredocked granuleではなく、細胞膜から離れた部位に存在する顆粒が即座に開口放出されることが明らか

になった。筆者らのTIRFMでは細胞膜直下約40nm以内のインスリン顆粒のみが観察できることから、第1相の分泌を構成するRRPのなかにはそれ以上細胞膜からはなれた場所に存在する顆粒もあると考えられる。

4. cAMPによるrestless newcomer数増加によるインスリン顆粒の開口放出の増強

インスリン顆粒の開口放出におけるcAMPシグナリングの役割を明らかにする目的で、筆者らは細胞内のcAMPを増加させる刺激を用いて顆粒融合を観察した。cAMPの細胞膜透過性アナログである8-Br-cAMPは、単独処置によっては顆粒のドッキングや膜への融合を変化させなかった(図2A)が、グルコースによる顆粒の融合は第1相、第2相の両方で明らかに増強した(図2B)。細胞膜面200 μm^2 あたりの顆粒の膜融合イベント数は、8-Br-cAMPとグルコースの両者による刺激ではグルコース単独刺激の場合と比較し、第1相、第2相とも約2倍に増加した(図2B)。興味深いことに、8-Br-cAMPによる開口放出の増加はすべてrestless newcomerの増加によるものであった。

5. Epac2欠損マウスにおけるcAMPによる第1相インスリン

開口放出増強の消失

筆者らは以前cAMP結合タンパクであるEpac2がcAMPの分子標的として機能し、cAMP依存性だがPKAリン酸化にはよらないインスリン分泌に関与していることを、Epac2に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験で示した^{5,8)}。

Epac2のインスリン分泌増強における役割をより直接的に証明する目的で、筆者らはEpac2欠損マウスを作製した。Epac2欠損マウスから単離した膵β細胞のグルコース単独

刺激によるインスリン顆粒の融合は、野生型マウスの膵β細胞と差が見られなかった。しかしながら、グルコース誘導性のインスリン分泌の8-Br-cAMPによる増強は、Epac2欠損膵β細胞では第2相の融合は野生型膵β細胞と同等の増加が認められたものの、第1相の融合の増加は消失していた(図3A、B)。これらの結果から、Epac2はrestless newcomerの数を増加させることにより、cAMPによるインスリン顆粒の開口放出の第1相の増加に重要な役割を果たしていることが示された。

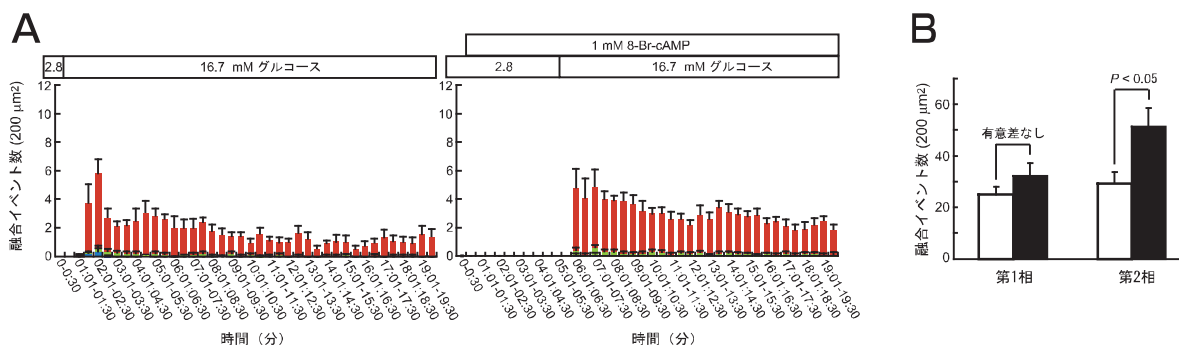


図3 Epac2欠損マウスの膵β細胞におけるcAMPのインスリン顆粒動態におよぼす効果 (原著論文より改変引用)

(A) Epac2欠損マウスより単離した膵β細胞を高濃度グルコース (16.7 mMグルコース) で刺激した際の融合イベント数。30秒毎の細胞膜200μm²あたりのイベント数をヒストグラムで表す。左はグルコース単独刺激、右は1 mM 8-Br-cAMP存在下でグルコース刺激した際の融合イベント数。Old face, Restless newcomer, Resting newcomerをそれぞれ青、赤、緑で示す。データは6回の独立実験の平均±SEを示す。(B) cAMPによる第1相と第2相の融合イベント数の増加。非存在下 (白カラム) と比較し8-Br-cAMP存在下 (黒カラム) では、第2相 (グルコース刺激後5-15分) では融合イベント数の総和が有意に増加したものの、第1相 (グルコース刺激後0-5分) の融合イベント数の総和には有意な増加は見られなかった。

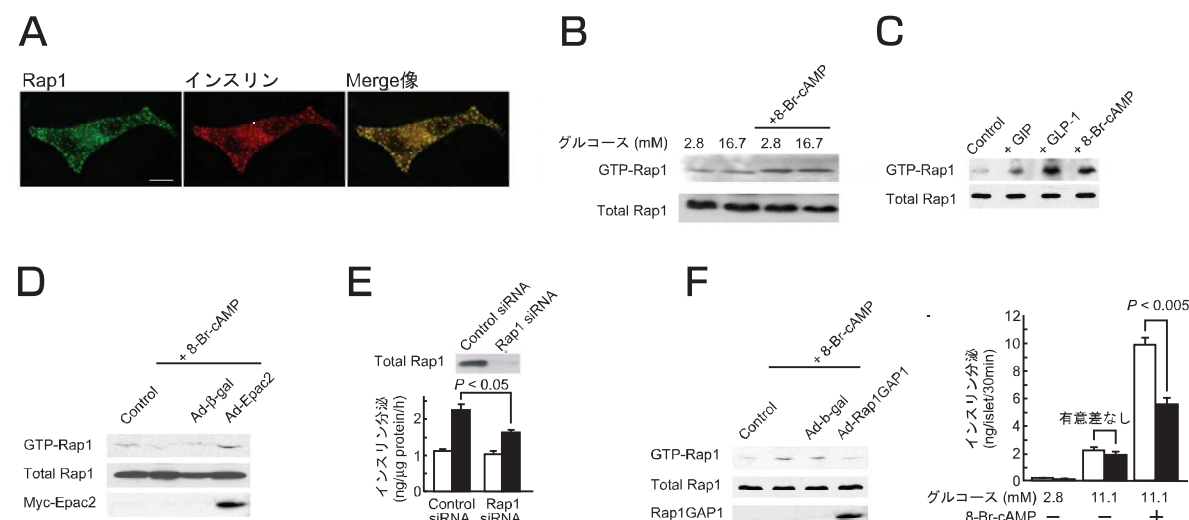


図4 Epac2によるRap1の活性化とそのインスリン分泌における効果 (原著論文より改変引用)

(A) 膵β細胞株 (MIN6細胞) におけるRap1の細胞内局在。Rap1とインスリンの免疫染色像およびそれらのmerge像を示す。スケールバーは10μm (B) 8-Br-cAMPによるRap1の活性化。MIN6細胞を8-Br-cAMPの存在下あるいは非存在下で2.8 mMあるいは16.7 mMグルコースで処置し、Rap1の活性化を検討した。活性化Rap1は、処置したMIN6細胞のホモジェネートを用い、活性化型Rap1と特異的に結合するRalGDSのGST融合タンパクを用いてプルダウンしRap1抗体で検出した。(C) イングレチンホルモンによるRap1の活性化。(B)と同様の実験を8-Br-cAMPの代わりにイングレチンホルモンであるGLP-1およびGIPで検討した。(D) cAMPによるRap1の活性化におけるEpac2の役割の検討。Epac2欠損膵β細胞株における8-Br-cAMPによるRap1の活性化を示す。Epac2欠損膵β細胞株では8-Br-cAMPによるRap1の活性化は消失しているが、アデノウイルスによるEpac2の遺伝子導入により、cAMPによるRap1の活性化がレスキューされた。(E) cAMPによるインスリン分泌増強におけるRap1の役割。MIN6細胞の内因性のRap1発現をsiRNAを使って抑制 (図上段) したところ、高濃度 (16.7 mM) グルコースによるインスリン分泌量 (白カラム) は変化しなかったが、8-Br-cAMPによるインスリン分泌増強 (黒カラム) は、対照群と比較し有意に低下していた。(F) Rap1GAP1によるRap1活性化の抑制とそのインスリン分泌における効果。(左) MIN6細胞にRap1GAP1をアデノウイルスで遺伝子導入することにより8-Br-cAMPによるRap1の活性化が抑制された。(右) Rap1GAP1を遺伝子導入したMIN6細胞 (黒カラム) では対照群 (白カラム、βガラクトシダーゼ導入群) と比較し、グルコース単独刺激によるインスリン分泌は差が見られなかったものの、8-Br-cAMP存在下での分泌は有意に減少していた。データは2回の独立実験の平均±SEを示す。

6. Epac2を介したcAMPによるRap1活性化のPKA非依存性インスリン分泌増強への関与

Epac2はRap1に対するグアニンヌクレオチド交換活性を有し、cAMP依存性にRap1を活性化する^{6,7)}。Rap1は多彩な細胞機能の制御に関わっているものの、開口放出における役割については明らかでない。そこでまず、膵β細胞株であるMIN6細胞でRap1の細胞内局在を解析した。すると興味深いことにRap1のシグナルはインスリン顆粒と多くが共局在した(図4A)。ついでRap1のcAMPによる活性化をMIN6細胞で検討したところ、Rap1は高濃度(16.7 mM)グルコースの処置では活性化されなかったが、GIP、GLP-1、8-Br-cAMPいずれの処置によっても活性化された(図4B,C)。さらに膵β細胞におけるcAMPによるRap1活性化にEpac2が必須であるかどうかを証明する目的で、Epac2欠損マウスを176マウス(膵β細胞に機能性の腫瘍が発症するトランスジェニックマウス)¹¹⁾と交配してEpac2欠損膵β細胞株を作製し、この細胞株を用いてRap1活性化を検討した。Epac2欠損膵β細胞株では8-Br-cAMPによるRap1活性化が消失しており、アデノウイルスによりEpac2を遺伝子導入したところRap1活性化がレスキューされ(図4D)、膵β細胞ではEpac2がcAMPによるRap1活性化に必須の役割を担っていることが明らかになった。

次にRap1の活性化がcAMPによるインスリン分泌増強に関与しているかどうかをRap1に対するsiRNAを使って検討した。Rap1をノックダウンしたMIN6細胞ではグルコースによるインスリン分泌は正常であったが、8-Br-cAMPによるインスリン分泌増強は、対照群と比較し約40%低下していた(図4E)。さらに、Rap1を不活性化するRap1 GAP1をアデノウイルスを用いて単離膵島に導入し、8-Br-cAMPによるRap1の活性化を抑制したところ、8-Br-cAMPによるインスリン分泌増強は、やはり対照群と比較し有意に減弱していた(図4F)。以上の結果から、cAMPによるインスリン分泌増強にはEpac2によるRap1の活性化が重要な役割を果たしていることが示された。

7. 終わりに

Epac2はcAMP結合能とRap1活性化能を有する分子であり、膵β細胞におけるcAMP依存性PKA非依存性のインスリン分泌に関与すると考えられている。今回、Epac2欠損マウスより単離した膵β細胞やEpac2欠損膵β細胞下部を用いた研究から、膵β細胞でのcAMPによるRap1活性化にはEpac2が必須であることが直接的に証明された。さらにTIRFMを用いて、cAMPによるインスリン顆粒の開口放出の初期の増加にEpac2が必要であることが示された。TIRFMの結果とインスリン顆粒の動態をランダムウォークの方法でシミュレーションした結果を合わせて考察すると、cAMPは細胞膜の直下にあると想定されているRRPを増大することにより、インスリン顆粒の融合頻度を増加させている可能性が示唆された。

以上のように、TIRFMを用いた解析はインスリン顆粒の開口放出の動態を詳細に解析する上で極めて有用な手法である。前述したとおり K_{ATP} チャネルとEpac2の相互作用の解明は、インクレチンの作用がグルコース応答性に引き起こされることを説明する上で重要な役割を果たしている可能性があり、TIRFMを用いたインスリン顆粒の動態解析をこれらの解析に応用したいと考えている。紙面の関係で、Epac2に特異的に

作用するアナログを用いた解析結果やインスリン顆粒動態シミュレーションの結果はご紹介することができなかったが、これらについては是非原著論文をご参照いただければ幸いである。

引用文献

- 1) Burgoyne, R.D., Morgan, A. (2003) *Physiol Rev* 83, 581-632.
- 2) Sudhof, T.C. (2004) *Annu Rev Neurosci* 27, 509-547.
- 3) Seino, S., Shibasaki, T. (2005) *Physiol Rev* 85, 1303-1342.
- 4) Drucker, D.J. (2006) *Cell Metab* 3, 153-165.
- 5) Ozaki, N. et al. (2000) *Nat Cell Biol* 2, 805-811.
- 6) Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., Graybiel, A.M. (1998) *Science* 282, 2275-2279.
- 7) de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A., Bos, J.L. (2000) *J Biol Chem* 275, 20829-20836.
- 8) Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., Seino, S. (2001) *J Biol Chem* 276, 46046-46053.
- 9) Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Ishida, H., Nagamatsu, S. (2002) *J Biol Chem* 277, 3805-3808.
- 10) Rorsman, P., Renstrom, E. (2003) *Diabetologia* 46, 1029-1045.
- 11) Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., Yamamura, K. (1990) *Endocrinology* 127, 126-132.

編集後記

約2年半になる本ニュー-スレター-"TRANSPORTSOME"の編集は、京都大学工学部森研究室と薬学部竹島研究室が担当しました。本特定領域研究の後半2年間については、編集部を東京医科歯科大学へ移動する予定です。班員間の相互理解や共同研究の向上において本ニュー-スレター-は重要な貢献をしており、今後も内容の充実を図りたいと思いますので、ご意見や要望等につきましては計画班員へ申し付けください。

本特定領域研究の領域代表者である金井好克先生の大阪大学への異動に伴い、この新年より事務局やURL等も移動しております。新しい連絡先につきましては下欄に示していますので、ご確認ください。

TRANSPORTSOME

第6号(2008年1月発行)

編集人:竹島 浩

発行人:金井 好克

発行所:特定領域研究「生体膜トランスポートシステムの分子構築と生理機能」事務局

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学教室内

Tei:06-6879-3521

Fax:06-6879-3529

E-mail: transportsome@pharmal.med.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/pharmal/transportsome/top.html>

印刷:(有)レイ・プリンティング

