

学 位 論 文 要 旨

氏名 山岡 真美

論 文 題 目

..... PI3K regulates endocytosis after insulin secretion by mediating signaling crosstalk between
..... Arf6 and Rab27a
..... (PI3Kは Arf6 と Rab27a のシグナルを介してインスリン分泌後のエンドサイトーシスを制御する)

要 旨

.....【緒言】..... 低分子量 G タンパク質 Rab27a は、他の G タンパク質と同様に GTP 型にのみ特定の分子が結合して、インスリン分泌（エキソサイトーシス）を制御すると考えられてきた。薬理学講座では、これまで不活性型と考えられてきた GDP 型 Rab27 に結合する分子を複数同定し、その結合がインスリンを取り囲んでいた分泌小胞膜の回収（エンドサイトーシス）を制御することを明らかにした (JCS., 2008)。さらに、グルコース刺激によって Rab27a が GTP 型から GDP 型へ変換されること、その変換には Rab27a-GAP である EPI64 が必要であることを報告した (BBRC., 2010)。本論文では、膵 B 細胞における EPI64 の機能を明らかにするため、EPI64 結合タンパク質を探索し、その機能解析を行った。.....

.....【研究対象及び方法】..... アフィニティカラムクロマトグラフィ法とマス解析を組み合わせることで、EPI64 新規結合タンパク質を探索した。結合の様式は、精製タンパク質を用いた pull down assay や deletion mutant を用いた免疫沈降法により調べた。細胞内の局在は、培養膵 B 細胞である MIN6 を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。さらに、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF-MS) を用いて、.....




細胞内の動態やエンドサイトーシスに及ぼす影響を検討した。

【結果】 EPI64 新規結合タンパク質として、ARNO を同定した。ARNO は、低分子量 G タンパク質 Arf6 を GTP 型に変換することでエンドサイトーシスを制御する酵素である。生化学的な解析より、EPI64 は C 末端側を介して ARNO の PH ドメインと直接結合した。さらに、この結合はグルコース依存的であった。グルコース刺激は、EPI64 を細胞質から細胞膜直下へと移行させたが、その細胞内移行には ARNO が必要であった。TIRF-MS を用いた解析より、グルコース刺激後 20 秒で ARNO が、30 秒で EPI64 が細胞膜に移行した。さらに、ARNO の膜移行には、PI3K から生成されたイノシトールリン脂質 PIP₃ が必要であった。細胞膜に移行した ARNO は、細胞膜直下でクラスリンの集積を促進した。さらに、EPI64 と ARNO の結合と活性は、インスリン顆粒膜のエンドサイトーシスに必要であった。




【考察】 本論文により、ARNO が EPI64 を細胞膜近傍に移行させるリクルーターとして働くことが示された。ARNO の下流に位置する GTP 型 Arf6 は、クラスリンの集積を促進することで細胞膜を陥入し、エンドサイトーシスの前半過程を制御する。一方、EPI64 の下流に位置する GDP 型 Rab27a は、陥入した膜をくぶり切り取るダイナミンと同じタイミングで働くことで、エンドサイトーシスの後半過程を制御する。私は、EPI64 と ARNO が異なるエンドサイトーシスのステージを協調的に制御していると考えている。

【結語】 グルコース刺激により開始されるエンドサイトーシスは、ARNO によるクラスリンピットの形成と、引き続いて起こる EPI64 による coronin 3 を介したアクチンの束化から構成される。一連の過程は、各分子の時間的・空間的な制御によって行われている。エキソサイトーシスを促進する既存の糖尿病治療薬は、エンドサイトーシスの破綻から生じたインスリン分泌障害を増悪する。これは分泌時に細胞膜へ融合した分泌小胞膜が回収されずに、細胞膜上に蓄積するためである。本研究成果は、エンドサイトーシスをターゲットとした新しい糖尿病治療薬を開発する基盤になり得る。

学位論文審査の結果の要旨

| | | | |
|--|---------|-------|---|
| 審査区分 (課)・論 | 第 563 号 | 氏名 | 山岡 真実 |
| 審査委員会委員 | 主査氏名 | 小野 克重 |  |
| | 副査氏名 | 中川 幹子 |  |
| | 副査氏名 | 松尾 哲孝 |  |
| <p>論文題目 PI3K regulates endocytosis after insulin secretion by mediating signaling crosstalk between Arf6 and Rab27a (PI3K は Arf6 と Rab27a のシグナルを介してインスリン分泌後のエンドサイトシスを制御する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Journal of Cell Science</p> <p>論文要旨 低分子量 G タンパク質 Rab27a は、他の G タンパク質と同様に GTP 型にのみ特定の分子が結合して、インスリン分泌 (エキソサイトシス) を制御すると考えられてきた。これまで不活性型と考えられてきた GDP 型 Rab27 に結合する分子を複数同定し、その結合がインスリンを取り囲んでいた分泌小胞膜の回収 (エンドサイトシス) を制御することを明らかにされている。また、グルコース刺激によって Rab27a が GTP 型から GDP 型へ変換されること、その変換には Rab27a-GAP である EPI64 が必要であることを報告されている。本研究では、膵 B 細胞における EPI64 の機能を明らかにするため、EPI64 結合タンパク質を探索し、その機能解析を行った。アフィニティカラムクロマトグラフィ法とマス解析を組み合わせることで、EPI64 新規結合タンパク質を探索した。結合の様式は、精製タンパク質を用いた pull down assay や deletion mutant を用いた免疫沈降法により調べた。細胞内の局在は、培養膵 B 細胞である MIN6 を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。さらに、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF-MS) を用いて、細胞内の動態やエンドサイトシスに及ぼす影響を検討した。EPI64 新規結合タンパク質として、ARNO を同定した。ARNO は、低分子量 G タンパク質 Arf6 を GTP 型に変換することでエンドサイトシスを制御する酵素である。生化学的解析より、EPI64 は C 末端側を介して ARNO の PH ドメインと直接結合した。さらに、この結合はグルコース依存的であった。グルコース刺激は、EPI64 を細胞質から細胞膜直下へと移行させたが、その細胞内移行には ARNO が必要であった。TIRF-MS を用いた解析より、グルコース刺激後 20 秒で ARNO が、30 秒で EPI64 が細胞膜に移行した。さらに、ARNO の膜移行には、PI3K から生成されたイノシトールリン脂質 PIP₃ が必要であった。細胞膜に移行した ARNO は、細胞膜直下でクラスリンの集積を促進した。さらに、EPI64 と ARNO の結合と活性は、インスリン顆粒膜のエンドサイトシスに必要であった。本論文により、ARNO が EPI64 を細胞膜近傍に移行させるリクルーターとして働くことが示された。ARNO の下流に位置する GTP 型 Arf6 は、クラスリンの集積を促進することで細胞膜を陥入し、エンドサイトシスの前半過程を制御する。一方、EPI64 の下流に位置する GDP 型 Rab27a は、陥入した膜をくびり切り取るダイナミンと同じタイミングで働くことで、エンドサイトシスの後半過程を制御する。私は、EPI64 と ARNO が異なるエンドサイトシスのステージを協調的に制御していると考えている。グルコース刺激により開始されるエンドサイトシスは、ARNO によるクラスリンピット形成と、引き続いて起こる EPI64 による coronin 3 を介したアクチンの束化から構成される。一連の過程は、各分子の時間的・空間的な制御によって行われている。エキソサイトシスを促進する既存の糖尿病治療薬は、エンドサイトシスの破綻から生じたインスリン分泌障害を増悪する。これは分泌時に細胞膜へ融合した分泌小胞膜が回収されずに、細胞膜上に蓄積するためである。</p> <p>本研究は、インスリン分泌後半のエンドサイトシスにおいて PI3K 刺激に関わる Rab27a、ARNO および EPI64 の関与を初めて明らかにした意義あるものであり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものであると判断した。</p> | | | |

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

| | | | |
|---|-------|------|--|
| 審査区分 ①・論 | 第563号 | 氏名 | 山岡真実 |
| 審査委員会委員 | | 主査氏名 | 小野克重  |
| | | 副査氏名 | 中川幹子  |
| | | 副査氏名 | 松尾哲孝  |
| <p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察等に関して以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. なぜ EPI64 タンパク質に結合する因子の検索を試みようと思ったのか述べよ。 2. EPI64 がエンドサイトシスへどのように関与しているのかのこれまでの知見を含めて述べよ。 3. EPI64 に対する結合蛋白として p48 に決定した理由は何か述べよ。 4. 膵細胞にブドウ糖刺激する際のインスリン小胞のエキソサイトシスに ARNO は関与するか述べよ。 5. Rab27a-GDP に対して ARNO は GEF 活性を示すか説明せよ。 6. MIN6 細胞膜にインスリン受容体が機能していることを確認できるか説明せよ。 7. 実験に用いたグルコース濃度(3mM, 20mM)は臨床における血糖濃度として妥当であるか説明せよ。 8. 糖尿病を想定した高血糖状態では本研究でのグルコース刺激は適切であるか回答せよ。 9. インスリン小胞のエンドサイトシスに Ca²⁺チャネルテザリングが関与するか述べよ。 10. EPI64 の細胞膜移動におけるグルコース刺激はインスリン刺激で代用できるか答えよ。 11. グルコース刺激によるインスリン小胞のエキソサイトシス/エンドサイトシスの機序に細胞内 Ca²⁺動態はいかに関与しているのか答えよ。 12. グルコース刺激によるインスリン小胞のエキソサイトシス/エンドサイトシスの機序におけるカルシニューリンの関与は何か述べよ。 13. グルコース刺激によるインスリン小胞のエンドサイトシスの細胞膜移動に先立つエキソサイトシス関連 SNARE タンパクの検出をなぜ実施しなかったのか述べよ。 14. 細胞外 Ca²⁺濃度依存性のグルコース刺激実験をなぜ実施しなかったのか述べよ。 15. 膵 B 細胞疲労がインスリン産生障害でなく B 細胞でのインスリン小胞のエンドサイトシス障害である根拠を述べよ。 16. EPI64 に対する結合蛋白の決定に際し、例えば二次元電気泳動などの検討を行ったりしたか答えよ。 17. 実験細胞に対するグルコース刺激の具体的な方法を説明せよ。 18. 見出した ARNO の発現の特異性はどの程度か説明せよ。 19. グルコース刺激によるインスリン分泌のタイミングと ARNO や EPI64 発現の時間的關係はどうなっているのか説明せよ。 20. ARNO や EPI64 をノックダウンした場合にエンドサイトシスはどうなるのか説明せよ。 21. HeLa 細胞と MIN6 細胞でのエンドサイトシスのメカニズムはどのような点が異なるのか説明せよ。 22. 創薬のターゲットを探すためには糖尿病状態でのエンドサイトシスの異常の機序を知る必要があるが、本研究成果とこれまでの関連研究ではこの観点からどのように説明付けられるか答えよ。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p> | | | |

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。