

腸管ホルモン放出を制御するメカニズムの解明

坪井 貴 司

東京大学大学院総合文化研究科 准教授

緒 言

分泌反応は、ホルモン、神経伝達物質、酵素、粘液などが細胞から放出される際の共通の機構であり、ヒトの高次生命現象を支える細胞の基本的活動である。その破綻は、ホルモン分泌異常、脳機能障害、アレルギー反応等の種々の疾患に直結する。小腸内分泌細胞から分泌されるグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) や、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) などの腸管ホルモン (インクレチン) は、糖や脂質依存的に門脈血中に分泌される。分泌されたインクレチンは、膵β細胞膜上の G タンパク質共役型 GIP および GLP-1 受容体に結合し、血中グルコース濃度依存的に膵β細胞からのインスリン分泌を促進する。

近年、小腸内分泌細胞に甘味受容体、脂質受容体、そして ATP 感受性 K⁺ チャネルが発現していることが報告された¹⁻³⁾。これらの受容体やチャネルが、腸管腔内の糖や脂質を感受し、小腸内分泌細胞において機能することで、インクレチン分泌が起こると考えられる。しかし、小腸内分泌細胞内に存在するインクレチンを含んだホルモン顆粒が、どのような分子メカニズムで細胞外に分泌されるのか、その詳細な機構については明らかにされていない。

ホルモン分泌顆粒は、細胞内のゴルジ体で産生され、細胞内で成熟する。その後、成熟したホルモン分泌顆粒は、細胞膜近傍まで運ばれ (リクルート過程)、細胞膜上に結合し (ドッキング過程)、細胞膜との融合可能な状態への準備段階 (プライミング過程) を経る。その後ホルモン分泌顆粒は、細胞外からのカルシウムイオン流入により、細胞膜と融合し、内容物であるホルモンを細胞外へと分泌する (開口放出)。我々の体内で、このインクレチン分泌反応が起こるためには、細胞内に存在するインクレチンを含んだホルモン分泌顆粒の一部分が、あらかじめ細胞膜とドッキングし、常に開口放出可能なプライミング状態にあると考えられる。つまり、細胞内に貯蔵

されているホルモン分泌顆粒が絶えず細胞膜方向へ輸送され、細胞膜とドッキングしていると考えられる。

これまでの研究から、ホルモン分泌顆粒のリクルート過程から開口放出に至るまでの一連の過程は、低分子量 G タンパク質 Rab ファミリーが制御していることが明らかになった⁴⁾。この Rab ファミリーは、ヒトにおいて 60 種類以上の異なるアイソフォームが存在し、インクレチン分泌においても特異的な Rab アイソフォームが機能すると考えられている。最近の研究から、副腎髄質クロマフィン細胞内に存在するカテコールアミン分泌顆粒の細胞膜とのドッキングおよびプライミング過程の制御には、Rab27A とその結合タンパク質 (エフェクタータンパク質と呼ばれる) である Rabphilin およびシナプトタグミン様タンパク質ファミリー 4a (synaptotagmin-like protein 4-a ; Slp4-a) が機能することが明らかになっている⁵⁾。しかしながら、小腸内分泌細胞からのインクレチン分泌において、どの Rab アイソフォームがどのようなエフェクタータンパク質と共に機能し、インクレチン分泌を制御しているのか、明らかにされていない。そこで本研究では、小腸内分泌細胞がどのような分子機構でインクレチンを分泌するのか、その実態を明らかにすることを試みた。

実験方法

1. 小腸内分泌細胞株 GLUTag 細胞に存在する

インクレチン分泌制御関連 Rab ファミリーおよびエフェクタータンパク質の同定

インクレチンの一つである GLP-1 を分泌する小腸内分泌 L 細胞株 GLUTag 細胞を用いて、RNeasy Mini Kit (キアゲン) により total RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製した。SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) を使用し、リアルタイム PCR により、ホルモンや神経伝達物質放出に関連性が報告されている Rab ファミリー (Rab3A, 27A, 27B, 33A, 37) および Rab 結合タンパク質

(エフェクタータンパク質)の遺伝子発現量を解析した。Rabファミリーおよびエフェクタータンパク質の発現量は、 β アクチン発現量によるサンプル間の補正を行った値を利用した。

次に発現の確認されたRabファミリーおよびエフェクタータンパク質のGLUTag細胞での内在性発現をウエスタンブロットにより検討した。タンパク質レベルでの発現が確認できたRabファミリーおよびエフェクタータンパク質のGLUTag細胞内における分布を蛍光免疫染色法と全反射蛍光顕微鏡および共焦点蛍光顕微鏡を用いて解析した。

2. 全反射蛍光顕微鏡によるGLP-1分泌機構の可視化解析

GLP-1は、分泌顆粒に濃縮される過程で様々なプロセスを受ける。そのため、遺伝子組換え技術を用いてGLP-1に直接蛍光タンパク質を融合させることは、技術的に非常に困難と考えられる。そこでGLP-1分泌顆粒の特異的な蛍光標識には、ニューロペプチドY(NPY)に黄色蛍光タンパク質(Venus)を直接融合したプラスミド(NPY-Venus)をGLUTag細胞に遺伝子導入することで行った。細胞膜から100nm以内存在する蛍光標識した分子を特異的に検出できる全反射照明型蛍光顕微

鏡を用いて、分泌刺激(グルコースや高カリウム刺激等)をGLUTag細胞に与えた際のNPY-Venus分泌顆粒動態、細胞膜上に存在するNPY-Venus分泌顆粒数、分泌反応数を解析した。

3. GLP-1分泌制御関連タンパク質の機能解析

GLUTag細胞に内在的に発現しているRabおよびRabエフェクタータンパク質をRNA干渉法(small interference RNA; siRNA)を用いて特異的にノックダウンし、その際のNPY-Venus分泌反応への影響を全反射蛍光顕微鏡によって解析した。RabおよびRabエフェクタータンパク質の発現抑制の効果は、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットにより確認した。

結 果

小腸内分泌L細胞株GLUTag細胞に発現しているRabファミリーおよびエフェクタータンパク質をリアルタイムPCR法により解析した。解析の結果、Rab3AとRab27Bの2種類のRabとSlp2-a、Slp5の2種類のエフェクタータンパク質のmRNAレベルでの発現が見られた。そこで、発現の見られたRabファミリーおよびエフェクタータンパク質のタンパク質レベルでの発現

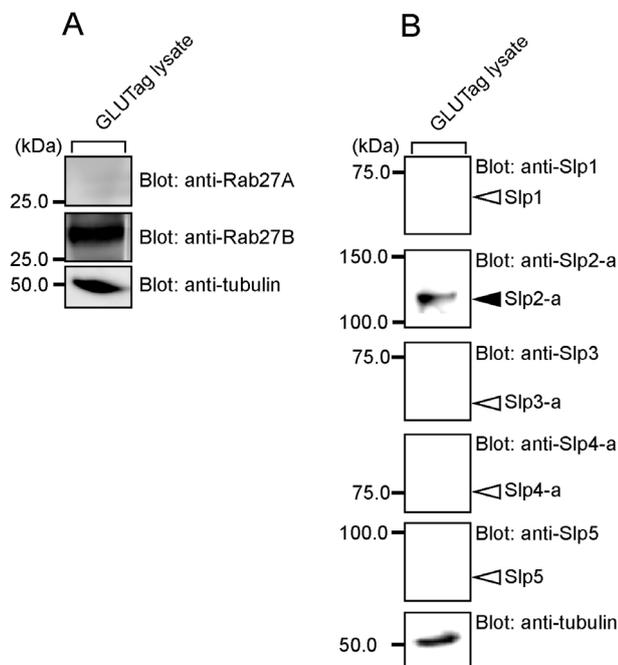


図1 小腸内分泌細胞株GLUTag細胞におけるRabファミリーおよびエフェクタータンパク質の発現

A. Rab27サブファミリーのGLUTag細胞における発現
B. SlpファミリーのGLUTag細胞における発現

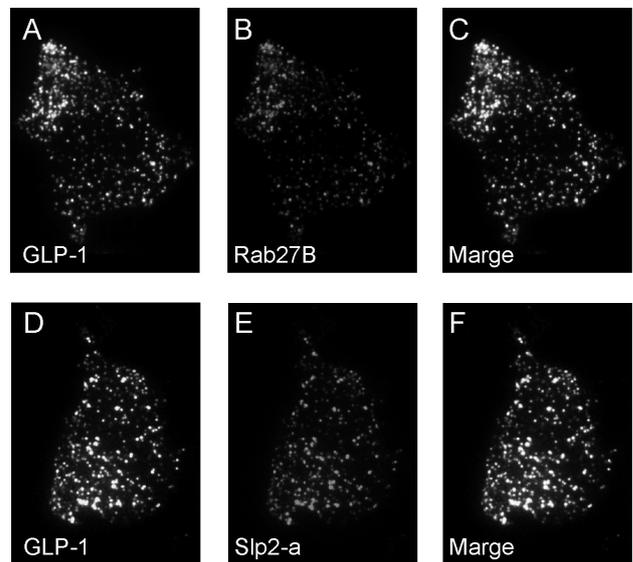


図2 小腸内分泌細胞株GLUTag細胞におけるRab27BとSlp2-aの細胞内局在

A, D: GLP-1の細胞内局在
B: Rab27Bの細胞内局在
C: GLP-1とRab27Bの共局在像
E: Slp2-aの細胞内局在
F: GLP-1とSlp2-aの共局在像

をウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、Rab27B (図 1A) と Slp2-a (図 1B) が GLUTag 細胞に内在的に発現していることが明らかになった。そこで Rab27B と Slp2-a の GLUTag 細胞内における分布を蛍光免疫染色法により検討した。その結果、GLP-1 分泌顆粒膜上に Rab27B と Slp2-a が局在することが分かった (図 2)。

Rab27B および Slp2-a の GLP-1 分泌における機能を全反射蛍光顕微鏡により可視化解析した。Rab27B および Slp2-a を GLUTag 細胞に過剰発現すると、細胞膜上に結合している NPY-Venus で標識した GLP-1 分泌顆粒 (NPY-Venus 分泌顆粒) 数が有意に増加し (図 3A)、さらに NPY-Venus 分泌反応数自体も有意に増加した (図 3B)。一方、siRNA を用いて GLUTag 細胞に内在的に発現している Rab27B または Slp2-a を特異的に単独ノックダウンすると、細胞膜上に結合している NPY-Venus 分泌顆粒数が有意に減少するだけでなく (図 3A)、NPY-Venus 分泌反応数自体も有意に減少した (図 3B)。しかし、いずれの場合においても、分泌動態には何ら影響を与えなかった。

考 察

Rab27 は、Rab3 に近縁の Rab サブファミリーで、ヒ

トやマウスにおいて Rab27A と Rab27B という 2 種類のアイソフォームが存在する。Rab27A の変異は、色素異常や免疫疾患などの症状を呈するヒトの遺伝病 Griscelli 症候群を引き起こす⁵⁾。また、Rab27A が特異的なエフェクター分子 (Rabphilin や Slp4-a) と結合することで、副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン分泌を制御することも明らかになっている⁵⁾。本研究の解析結果から、GLP-1 含有ホルモン分泌顆粒膜上には、Rab27B が存在し、Rab27B 特異的なエフェクタータンパク質である Slp2-a が Rab27B の結合しているホルモン分泌顆粒に結合、複合体を形成することで、GLP-1 分泌を制御することが示唆された。そして、この Rab27B と Slp2-a の複合体が、何らかの細胞膜上の標的分子と結合することにより、GLP-1 含有ホルモン分泌顆粒を細胞膜にドッキングさせ、分泌を促進させるのではないかと考えられる。今後は、GLUTag 細胞における Slp2-a が、どのような細胞膜上の標的分子と結合して、インクレチン分泌を制御するのか、その詳細な分子メカニズムの解明を試みる予定である。

要 約

本研究により、Rab27B とそのエフェクタータンパク質である Slp2-a が小腸内分泌細胞株 GLUTag 細胞のイ

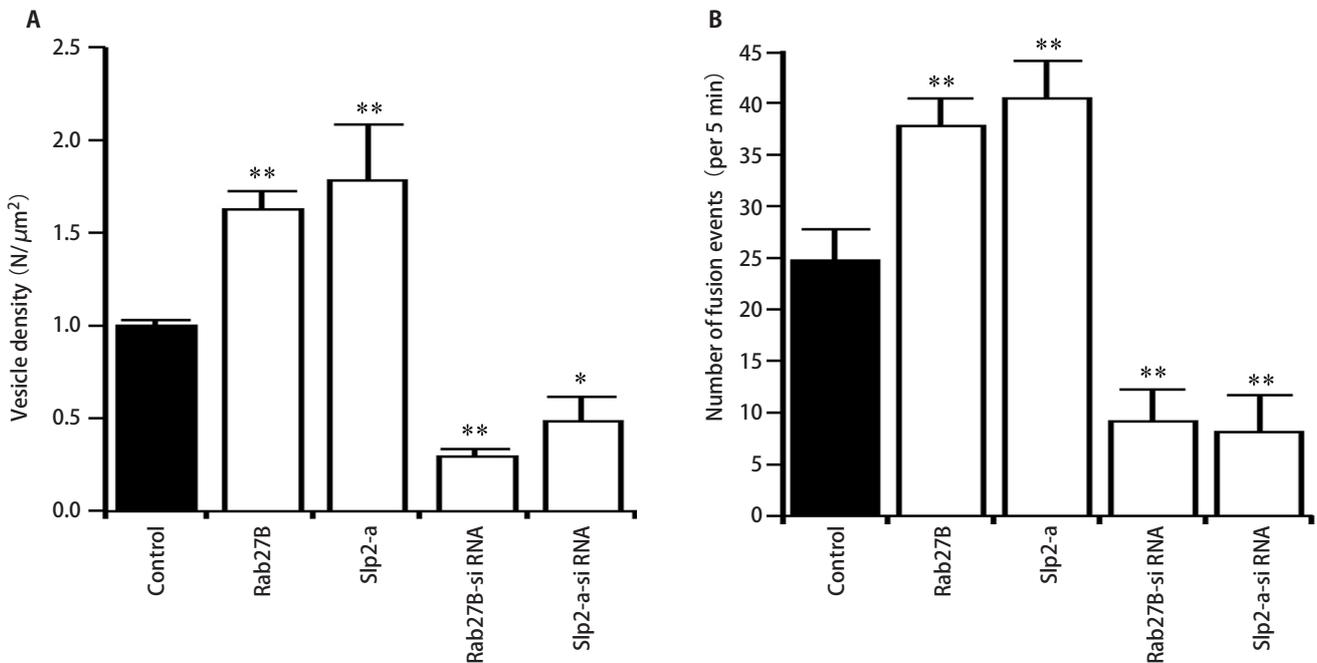


図 3 RNA 干渉を用いた Rab27B および Slp2-a 発現抑制によるホルモン分泌反応への影響

A : Rab27B および Slp2-a の発現促進および抑制による細胞膜上にドッキングしている顆粒数への影響

B : Rab27B および Slp2-a の発現促進および抑制によるホルモン分泌数への影響

アスタリスクはコントロールとの有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

ンクレチン含有ホルモン分泌顆粒膜上に存在することが明らかになった。そして、この Rab27B と Slp2-a 複合体が、インクレチン分泌をポジティブに制御する可能性が示唆される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) H.J. Jang, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 15069-15074, 2007.
- 2) F. Reimann, et al.: *Cell Metab.*, **8**, 532-539, 2008.
- 3) S. Edfalk, et al.: *Diabetes.*, **57**, 2280-2287, 2008.
- 4) M. Zerial, et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 107-117, 2001.
- 5) M. Fukuda: *J. Biochem.*, **137**, 9-16, 2005.