

## 研究テーマ

## 糖尿病での2相性インスリン開口放出不全機構の解明

**1. 目的** インスリンは膵臓のランゲルハンス氏島にあるβ細胞より分泌され、標的細胞に作用することで血糖を効率的に下げる唯一のホルモンである。インスリンはβ細胞内の分泌顆粒（インスリン顆粒）に貯蔵されており、開口放出によって2相性に細胞外へ分泌される。2型糖尿病ではこの分泌形式が破綻していることから、2相性インスリン分泌機構の解明は、2型糖尿病の予防、治療法を開発するためにも非常に重要な課題であるが不明な点が多く残されている。インスリン分泌は分泌顆粒の貯蔵から開口放出までダイナミックに調節されており、単一顆粒レベルでの時空間的イメージング解析が強力な研究手段となる。私達はGFP標識インスリン顆粒システムと全反射蛍光（TIRF）顕微鏡を組み合わせたインスリン分泌顆粒動態の形質膜TIRFイメージング解析法を確立し、まず分泌第1相インスリン開口放出機構（形質膜SNARE蛋白質シンタキシン1Aに予めドッキングした顆粒からの開口放出機構）を解明した（図1）（1, 2）。しかし分泌第2相インスリン開口放出機構は未だ不明である。分泌第2相は細胞質から形質膜へ新たに移動し、短時間しかドッキングしない顆粒（newcomers）が担っており、解明に向けては形質膜だけを観察する現状のTIRF顕微鏡では限界があり、より細胞内部まで同時に観察可能な顕微鏡システムが必須となる。本研究では、入射角可変式全反射蛍光（V-TIRF）顕微鏡を開発し、今まで測定困難だった細胞内部の顆粒の貯蔵から形質膜への移動、さらに開口放出までを高空間時間分解能で4D（x, y, z, time）イメージング解析し、2相性のインスリン開口放出の素過程の全容の解明を目的とした。

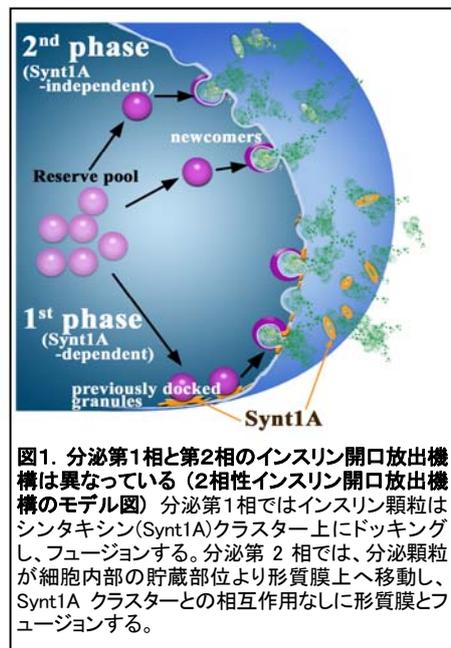


図1. 分泌第1相と第2相のインスリン開口放出機構は異なっている（2相性インスリン開口放出機構のモデル図）分泌第1相ではインスリン顆粒はシンタキシン(Synt1A)クラスター上にドッキングし、フュージョンする。分泌第2相では、分泌顆粒が細胞内部の貯蔵部位より形質膜上へ移動し、Synt1A クラスターとの相互作用なしに形質膜とフュージョンする。

**2. 方法** V-TIRF顕微鏡は従来のTIRF顕微鏡（3, 4）とは異なり、エバネッセント場を任意に調節することができるため、カバーガラス上の細胞の形質膜近傍から細胞質内部までの蛍光変化を任意の厚さで高空間分解能で観察可能な顕微鏡である（5）。これにより今まで測定困難だった細胞内部での顆粒の貯蔵から形質膜への供給さらに開口放出までを高空間時間分解能で4D(x,y,z,t)解析することが可能となる。今回、このV-TIRF顕微鏡（図2）を用いて、β細胞にGFP-insulinおよびmCherry-actinを発現させることでmCherry標識したアクチンとGFP標識インスリン顆粒を同時可視化解析し、分泌第2相における細胞内部での顆粒の貯蔵、形質膜への移動、及びそれに伴うアクチン動態変化の実態を観察した。

**3. 結果および考察** V-TIRF 顕微鏡を用いて、まずβ細胞内のインスリン顆粒の貯蔵状態を調べたところ、細胞には形質膜上の顆粒のプールと、形質膜より約400-500nm内部に存在する細胞質内顆粒プールの少なくとも2つの顆粒の貯蔵プールが存在していた（図2）。高グルコース刺激下での分泌第1相に相当する刺激後5分以内のインスリン分泌では、前者の形質膜上貯蔵プールの顆粒（previously docked granules）のフュージョンが選択的に観察された。一方、刺激後5分以降のインスリン分泌第2相では、後者の細胞質内貯蔵プールより形質膜に選択的に供給され、非常に短時間（<50 ms）dockingした顆粒のフュージョンが観察された。このように新規V-TIRF 顕微鏡を用いて、2相性インスリン分泌を担っている newcomer 顆粒の細胞内貯蔵プール及びフュージョンまでの細胞内トラフィックの実態を初めて明らかにすることができた（図2）。

β細胞内インスリン顆粒(GFP)とアクチン(mCherry)を同時にTwo-color VTIRF解析したところ、アクチンネットワークは細胞質内貯蔵プールを保持しており、刺激により重合/脱重合による動態変化起こし、脱重合された領域で形質膜へnewcomer顆粒が輸送されていた（図3）。またnewcomer顆粒とアクチンネットワークとの相互作用に分子モーターであるミオシンVaが関与していることをミオシンVa欠損ラット(Dilute-opisthotonus rats)から調製したβ細胞を用いて明らかにしており、その調節分子機構

を現在検討している。以上の結果は、アクチン重合/脱重合の空間的制御およびミオシンVaが第2相分泌におけるnewcomer顆粒の細胞内輸送を制御していることを強く示唆している(論文投稿準備中)。

第2相のインスリン放出はグルコース等の燃料基質による刺激にのみ見られ、高カリウム刺激では第1相だけが観察されること、また細胞内ATPの低下によって減少することが知られており、第2相分泌はグルコース代謝により細胞内で持続して産生されるATPを介した反応と考えられる。また第2相においても細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇が必須であり(6)、R-type電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル(Cav 2.3)が活性化されることが最近報告された。従って、第2相インスリン放出は第1相Ca<sup>2+</sup>上昇機構(7)とは異なったCa<sup>2+</sup>チャネルによりさらに上昇した細胞内Ca<sup>2+</sup>とATPが共役して、アクチンやミオシンVa等の細胞骨格系タンパク質を調節することにより、顆粒の形質膜への移送を調節している可能性が考察される(8)。

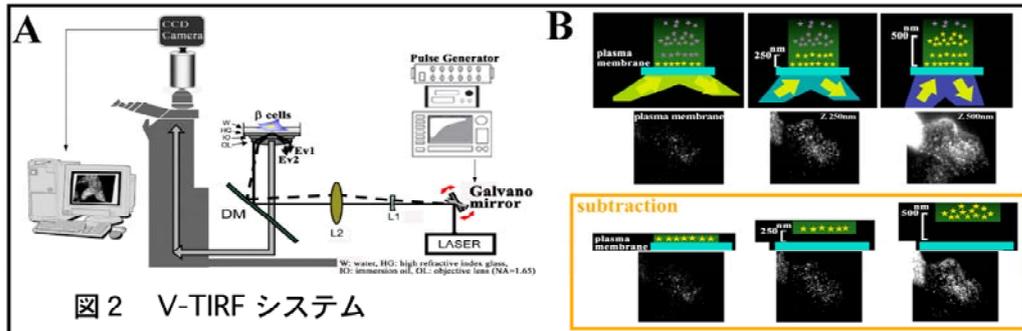


図2 V-TIRFシステム: A)パルスジェネレーター制御によりガルバノミラーを高速に駆動させ、レーザー入射角の異なるTIRF照明を作り、細胞のTIRF照明領域(形質膜から約500nm細胞内部まで)を高速に変化させる。B)システムではガルバノミラーを3ステップ(TIRF込み出し厚 Z<100nm, Z<250 nm, Z<500nm)で駆動させ、各ステップ50-ms intervalで画像取得している(1サイクル150-msで駆動)。Z<100nmではGFP標識したインスリン顆粒の細胞形質膜へのドッキング状態、Z<500nmでは細胞内部のインスリン顆粒貯蔵プールが可視化できる。これにより今まで測定困難だった貯蔵部位(Z<500nm)から形質膜へ顆粒の移動(Z<250 nm)、さらに開口放出まで(Z<100nm)を高空間時間分解能で4D解析することが可能である。

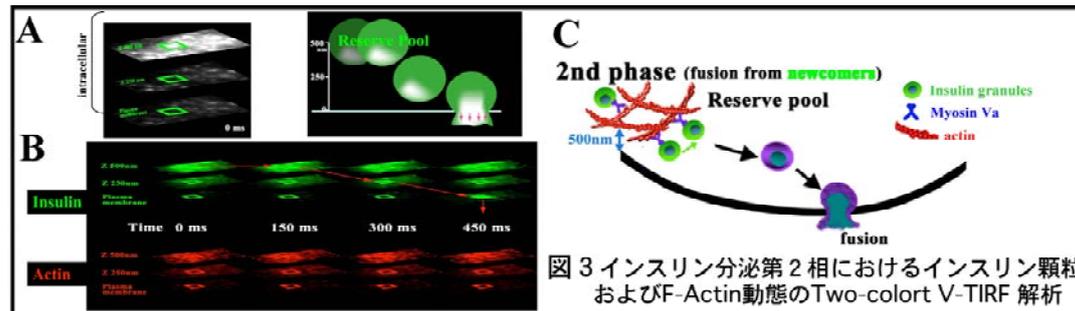


図3 インスリン分泌第2相におけるインスリン顆粒およびF-Actin動態のTwo-color V-TIRF解析: A)刺激後5分以降のインスリン分泌第2相において、Z500nmに存在する細胞質内貯蔵プールに存在していた顆粒がZ250nmを通過してplasma membraneに動いて行きfusionする様子、すなわちnewcomerの細胞内貯蔵、形質膜への移動、および形質膜とのfusionをとらえることに成功した。B) Z500nmに存在する細胞質内貯蔵プールはアクチンネットワークによって保持されていることがわかった。C)分泌第2相でみられるnewcomerの細胞内貯蔵プールであるReserve poolは、形質膜から500nm細胞内部に存在すること(顆粒の直径が約300nmであることから、Reserve poolは形質膜上、約顆粒2個分の位置に相当)、またさらにReserve poolはアクチンネットワークと共存しており、ミオシンVaによって制御されている。

## 5. 参考文献

- Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara T., Nakamichi Y., Okamura T., Akimoto Y., Kawai J., Matsushima S., Kawakami H., Watanabe T., Akagawa K. and Nagamatsu S. *J. Cell Biol.* 177: 695-705, 2007.
- Nagamatsu S., Ohara-Imaizumi, M., *Cell biology.* *Science.* 318:1249-50, 2007.
- Nagamatsu S., Ohara-Imaizumi, M. *Methods in Molecular Biology* 440: 251-260, 2007.
- Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Nagamatsu S. *Biochem Biophys Res Commun.* 390:16-20, 2009.
- Wakazono, Y., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu S., Yamamoto, S., Terakawa. S. *Proc. SPIE.* 6088: 449-454, 2006.
- Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Sakurai T, Nagamatsu S. *Biochem Biophys Res Commun.* 385:291-5, 2009.
- Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S. *Exp Diabetes Res.* 2009. (in press)
- 今泉美佳, 永松信哉 *糖尿病学の進歩2009* pp20-24, 2009.