

オートファジーによるインスリン顆粒の品質管理機構

群馬大学 生体調節研究所 遺伝生化学分野

松永 耕一

1. 背景と目的

オートファジーは細胞内成分を非特異的に分解する大規模タンパク質分解システムであり、オートファゴソームと呼ばれる膜構造体が細胞質やオルガネラを取り囲み、リソソームと融合することによって分解が完了する。オートファジーは酵母からヒトまで真核生物に広く保存された分解機構であるが、多様な形態、機能を有する哺乳動物細胞では、オートファジーによる分解系の分子機構や利用形態もより多彩になっていると考えられる。

本研究テーマでは高次分化細胞の一つである分泌細胞、特に膵β細胞内におけるオートファジーの役割に着目した。β細胞内には約 10000 個のインスリン顆粒が存在するが、血液中の高グルコース濃度に反応して開口放出するインスリン顆粒は全体の 1-5%程度である。そのターンオーバーは 3-5 日程度とされ、開口放出されなかった顆粒の運命については不明な点が多い。Rab27a 欠損β細胞ではグルコース刺激に応答するインスリン分泌量が半減するが、インスリン顆粒の総数はあまり変わらない¹。すなわち分泌低下に伴い、顆粒が細胞内に停留することが予想され、顆粒の総数や質を調節するために、オートファジーのような膜輸送による分解系が寄与している可能性がある。本研究では、インスリン顆粒の分解機構としてのオートファジーの役割を調べると共に、インスリン顆粒を選択的に認識し、分解する分子機構を探求することにより、インスリン顆粒品質管理の生理的、病理的意義を調べる。

2. 方法

2-1: マウスからの膵島単離

Rab27a 欠損マウスである *ashen* マウス、及び Rab3a ノックアウトマウス、及びそれぞれの野生型のマウスから膵ランゲルハンス島を、コラゲナーゼを膵管から注入する方法により単離した¹。単離した膵島を一日 RPMI1640 培地にて培養した後、トリプシン処理をしカバーガラス上で単相培養した。

2-2: 免疫染色によるオートファゴソームの検出

方法 2-1 にて単相培養した膵島細胞をパラホルムアルデヒドにて固定し、オートファゴソームマーカーである LC3 に対する抗体、及びインスリン顆粒のマーカーとしてインスリンに対する抗体を用いた間接蛍光抗体法により二重染色し、顕微鏡観察を行った。オートファジー活性は、細胞内の LC3 のドット状構造が示すオートフ

アゴソーム数を計測し、細胞一個当たりの平均値を求めることにより評価した。

3. 結果と考察

間接蛍光抗体法を用いた顕微鏡観察により、富栄養状態の培地下にもかかわらず、野生型の膵β細胞に比べ、*ashen* マウスβ細胞でオートファゴソーム形成が亢進していることがわかった(図1、2)。これはオートファゴソーム形成初期のマーカータンパク質である Atg16L の細胞染色でも同様の結果が得られており、オートファゴソーム形成が促進されていることが確認された。さらにその中の一部がインスリン顆粒と共局在しており、オートファゴソームがインスリン顆粒を選択的に取り囲んでいる可能性が示唆された(図1)。これらの知見はインスリン分泌低下に伴い、細胞内に蓄積した顆粒の総数の調節やその品質を維持するために、オートファジーが誘導されている可能性を示唆するものである。現在さらにオートファジーを阻害する薬剤等を用いたときにインスリン顆粒の総量はどうか、β細胞の状態に変化がないか等を調べている。

ashen マウスβ細胞と同様にグルコース刺激によるインスリン分泌が著しく阻害されることが知られている Rab3a ノックアウトマウス²のβ細胞においても同様の観察をしたところ、*ashen* マウスβ細胞の時と同様に富栄養培地下においても、野生型とくらべてオートファゴソーム形成が亢進していることがわかった(図2)。これによりオートファジーの誘導は欠損した Rab タンパク質の種類に関わらず、インスリン分泌が阻害されていることにより誘導されていることが強く示唆された。

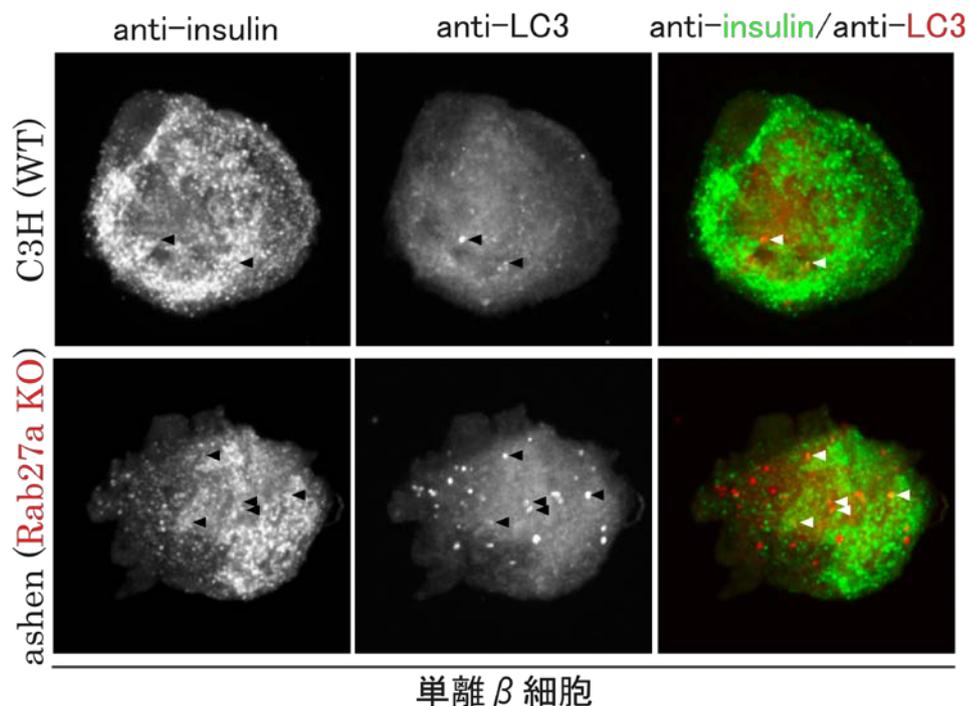


図1: *ashen* マウスβ細胞では恒常的にオートファジーが亢進している

野生型(C3H)及びRab27a欠損(*ashen*)マウスβ細胞を単離し、抗インスリン抗体と抗LC3抗体(オートファゴソームマーカー)により二重染色した。矢頭はLC3ドットと共局在しているインスリン顆粒を示す。

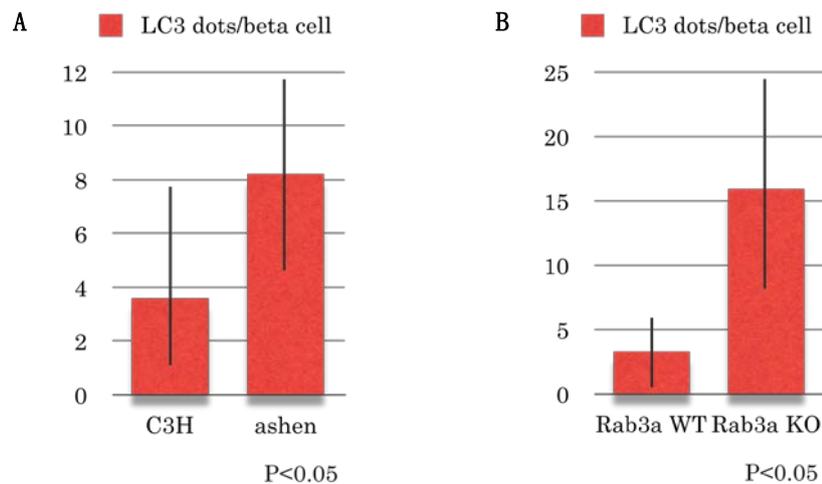


図 2: *ashen* マウス β 細胞及び Rab3a ノックアウトマウス β 細胞における富栄養条件下でのオートファジー活性

野生型 (C3H or Rab3a WT) と Rab27a 欠損 (*ashen*) (A) 及び Rab3a KO (B) マウス β 細胞を単離し、抗 LC3 抗体 (オートファゴソームマーカー) により染色した。30 個の細胞の LC3 ドットを計測し、細胞一個当たりの平均値を求めた。

4. まとめ

本研究により、グルコース刺激下でのインスリン分泌が阻害されている Rab27a 欠損マウス (*ashen*) β 細胞、及び Rab3a 欠損マウス β 細胞において、オートファジーが栄養条件に関わらず恒常的に亢進しており、さらにインスリン顆粒をオートファゴソームが取り囲んでいることが観察された。これはオートファジーによるインスリン顆粒の品質や在庫を管理するシステムが存在する可能性を示すものである。

最近になり細胞内に侵入した細菌、損傷したミトコンドリア、凝集タンパク質などを特異的に分解する、選択的オートファジーが発見され^{3, 4}、現在も続々と新たな報告がされている。 β 細胞内のインスリン顆粒のうち、開口放出しなかった一部の顆粒のその後の運命については不明な点が多く、本研究結果から選択的オートファジーにより分解されている可能性が考えられた。しかしながら相手がミトコンドリアのように選択的なメカニズムが存在するのか、また生成後時間のたった顆粒が優先的に分解されるのかなど、詳細な機序は全く不明であり、分泌顆粒を特異的に認識するオートファジーの報告例もない。今後どのような状態のインスリン顆粒がオートファゴソームに認識され、分解されているのか、そこに選択性はあるのか、もしあるのならばその分子メカニズムはどのようなものなのかを、電子顕微鏡などを用いた詳細な形態観察や、プロテオーム解析法などを用いた手法により明らかにして行く予定である。

5. 参考文献

1. Kasai, K. *et al.* Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J Clin Invest* **115**, 388-396 (2005).
2. Yaekura, K. *et al.* Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null

- mice. *J Biol Chem* **278**, 9715–9721 (2003).
3. Nakagawa, I. *et al.* Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306**, 1037–1040 (2004).
 4. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F. & Youle, R.J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**, 795–803 (2008).