

- Eichele, G., Lee, C.C., & Bradley, A. (1999) *Nature*, 400, 169-173.
- 12) Yang, S., Liu, A., Weidenhammer, A., Cooksey, R.C., McClain, D., Kim, M.K., Aguilera, G., Abel, E.D., & Chung, J.H. (2009) *Endocrinology*, 150, 2153-2160.
- 13) Milcu, S.M., Bogdan, C., Nicolau, G.Y., & Cristea, A. (1978) *Endocrinologie*, 16, 29-39.
- 14) Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., & Takahashi, J.S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 5339-5346.
- 15) Wang, X., Reece, S.P., Van, Scott, M.R., & Brown, J.M. (2010) *Brain Behav. Immun.*, 25, 127-134.
- 16) So, A.Y., Bernal, T.U., Pillsbury, M.L., Yamamoto, K.R., & Feldman, B.J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 17582-17587.

中村 勇規

(山梨大学大学院医学工学総合研究部免疫学講座)

The circadian clock regulates daily rhythms in allergic reaction

Yuki Nakamura (Department of Immunology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan)

GDP型Gタンパク質シグナリング

1. はじめに

インスリンは、血中のグルコース濃度すなわち血糖値の維持に重要なホルモンで、その分泌不全是糖尿病発症の主たる原因である。インスリンは、膵臓のランゲルハンス島(膵島)に存在する膵β細胞から分泌される。細胞内で合成されたインスリンは、顆粒膜に包まれた後に細胞膜近傍へ輸送される。グルコース刺激は、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介して顆粒膜と細胞膜の融合を促進し、インスリンを細胞外に放出させる。本稿では、低分子量Gタンパク質Rab27aとそのエフェクター分子を介したインスリン分泌の制御機構を概説する。

2. インスリン分泌

インスリン分泌に関する文献では、「分泌 (secretion)」、 「放出 (release)」、 「開口放出 (exocytosis)」という言葉がしばしば同義語のように用いられている。しかし、本来こ

れらの言葉は異なる事象を表現している。「分泌」とは、合成されたインスリンが顆粒膜にパックされ、最終的に細胞外に出るまでの一連の現象をさす。一方、「放出」は、インスリンが刺激により細胞外に出る現象のみをさす。「開口放出」は、細胞外にインスリンを出す形式の一つである。分泌と放出が混同されてきた原因の一つに、放出以外の分泌過程を解析することが困難であったことが挙げられる。1950年代後半にインスリンの測定が可能になってから20年の間は、分泌を評価する実験手法はインスリン放出量の測定に限られていた。さらに、膵β細胞ではインスリン含量がインスリン放出量に比べて極めて多いことが知られていた。そのため、1980年代までは、放出されるまでの過程よりも放出される量に重点がおかれたわけである。

1969年、Grodskyはtwo compartment storage theoryを提唱した¹⁾。このモデルでは、細胞内に蓄えられているインスリン顆粒を「stable」と「labile」の二つに分類している。そして、インスリン分泌とは、インスリン顆粒がstableからlabileに進み、刺激により細胞外に放出される一連の現象であると説明した。さらに彼は、「labile compartment」を「readily-releasable」と考えた。このモデルの提唱から40年経った今、インスリン分泌過程は分子レベルでの解析が進んでいる。初期の研究では、先行していた神経細胞を用いた分泌研究の成果をそのままインスリン分泌に応用する試みがなされていた。しかし、神経細胞と膵β細胞を同じ土俵で議論することはできない。膵β細胞では、生理的刺激であるグルコースが直接または代謝されて間接的にインスリンを放出する。つまりインスリン分泌とは、脱分極刺激による分泌とは異なり、代謝物によるシグナル増幅も兼ね備えた複雑な過程である。

3. 低分子量Gタンパク質

低分子量Gタンパク質は、分子量が約2万~3万の単量体で働くGタンパク質である。他のGタンパク質と同様に、GTPと結合したGTP型とGDPと結合したGDP型の2種類の形態をとる。これまでの研究では、GTP型のみがエフェクターと呼ばれるタンパク質群と結合し、下流にシグナルを伝達することが示されてきた。そのため、GTP型は活性型、GDP型は不活性型とも呼ばれ、Gタンパク質は細胞内でオン/オフスイッチとして働くと考えられてきた。

通常、GDP型Gタンパク質はGDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) と複合体を形成し、細胞質に局在す

る。細胞外からの刺激は、GDIを複合体から解離させることで、GDP型Gタンパク質の局在をターゲットとなる膜にリクルートする。膜にアンカーされたGDP型Gタンパク質はGEF (guanine nucleotide exchange factor)により、GTP型に変換される。GTP型がエフェクターを介して下流にシグナルを伝達することは前述の通りだが、最終的にはGAP (GTPase-activating protein)によるGDP型への再変換によって一連のサイクルは終了する。低分子量Gタンパク質の機能や活性、細胞内局在は、各Gタンパク質に特異的なエフェクターやGDI, GEF, GAPによって制御されている。

低分子量Gタンパク質はRasやRho, Rab, Arf, Ranなどのサブファミリーから成り、一部オーバーラップはあるもののそれぞれが特異的な細胞機能を制御している。Rabファミリーは60以上のメンバーから成る低分子量Gタンパク質で、エフェクターを介してメンブレントラフィックを制御している。Rab27aは、膵β細胞に高発現しているRabファミリーの一員で、インスリン顆粒の開口放出上流の過程を制御している。

4. GTP型 Rab27a 結合タンパク質

Slac2c/Exophilin8/MyRIP, Noc2, Slp4/granuphilinはいずれも、膵β細胞に発現するRab27aのエフェクターである(図1)。Slac2c/Exophilin8/MyRIPは、GTP型Rab27a結合サイトに加えてmyosinVa/VIIaやアクチンとの結合サイトを有する。先行するメラノサイトでの研究より、この

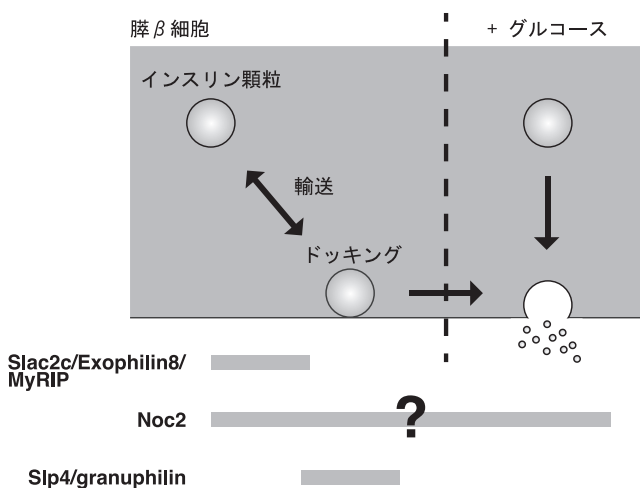


図1 膵β細胞におけるRab27aエフェクターの役割
Slac2c/Exophilin8/MyRIP, Noc2, Slp4/granuphilinはいずれも膵β細胞に発現し、インスリン分泌過程の異なるステップを制御する。

エフェクターはGTP型Rab27aとmyosinVa/VIIaとの結合を仲介し、アクチンフィラメントに沿ってインスリン顆粒を輸送すると予想された²⁾。実際、膵β細胞においてもmyosinVaやSlac2c/Exophilin8/MyRIPが、それぞれ単独ではインスリン顆粒の運動に関与することが報告された^{3,4)}。しかし、メラノサイトとは異なり、膵β細胞ではSlac2c/Exophilin8/MyRIPとmyosinVaの結合を否定する報告がなされている⁵⁾。Slac2c/Exophilin8/MyRIPはメラノサイトとは異なる複合体を形成し、インスリン顆粒の輸送に関与すると考えられる。

Noc2は、Rab3aのエフェクターであるrabphilin-3AのN末端側と78%の相同性を示すタンパク質である⁶⁾。膵β細胞におけるNoc2の役割は完全には明らかにはされていないが、Noc2遺伝子欠損マウスの解析よりインスリン分泌機構を制御すると考えられている⁷⁾。酵母ツーハイブリッド法により、Noc2結合タンパク質としてzyxinが同定されている⁸⁾。線維芽細胞において、zyxinがアクチン結合タンパク質であるα-actininと結合することから、Noc2はα-actininと結合してアクチン線維の再編成を介してインスリン分泌を制御する可能性がある。グルコース刺激は、2相性のインスリン分泌を惹起する。急峻であるが持続性の短い第1相分泌と、第1相に引き続いて起こり穏やかな増加を示す第2相分泌である。以前より、アクチン線維の再編成が第2相分泌に関わる可能性が報告されてきたが、その詳細な分子メカニズムは不明である。Noc2がα-actininを介してこのメカニズムに関与すると考えると、非常に興味深い。

Slp4/granuphilinは、膵β細胞に特異的に高発現し、インスリン顆粒に相互作用する分子として同定された⁹⁾。その後の解析により、GTP型Rab27a結合タンパク質であることが明らかになった。Slp4/granuphilinはSNAREタンパク質であるsyntaxin1aのclosed formと結合し、インスリン顆粒を細胞膜にドッキングさせる。実際、Slp4/granuphilinを欠損したマウスの膵β細胞では、細胞膜にドッキングするインスリン顆粒の数が減少している⁹⁾。一方、このマウスから単離した膵島では、グルコース刺激で惹起されるインスリン分泌量が増加していた。それゆえ、Slp4/granuphilinはインスリン顆粒を細胞膜近傍につなぎ止めることで、分泌刺激非存在下で構成性分泌が起こることを防いでいると考えられている。

Noc2とSlp4/granuphilinは、Rab27aに加えてRab3aとも結合することが知られている。Rab3aは膵β細胞にも発現する低分子量Gタンパク質である。Rab27aとRab3aの

相同性が高いことから、この結合を非特異的と片付けることは簡単である。しかし、これらのエフェクター分子がインスリン分泌過程の異なるステップを、各過程に特異的な低分子量Gタンパク質と結合することで制御している可能性は否定できない。

5. GDP型 Rab27a 結合タンパク質

筆者らは、既存の Rab27a エフェクターを欠損したマウスと Rab27a 機能欠損マウスとの間には、機能的に大きな隔りがあると考えていた。そこで、新たな Rab27a 結合タンパク質をアフィニティカラムクロマトグラフィ法により探索し、複数のタンパク質を同定した。その一つが coronin3 (coronin1c) である¹⁰⁾。coronin3 は、中央に WD40 リピートをもつ coronin ファミリーに属し、ユビキタスに発現している。当初は、WD40 リピートに含まれる五つの羽根がベータプロペラ構造を形成すると考えられていた。しかし、最近では N 末端側の二つの隠れた羽根を加えて七つの羽根から成るベータプロペラ構造を形成することが報告されている。この構造は、タンパク質-タンパク質相互作用に関わると考えられてきたが、実際の結合パートナーは同定されていなかった。また、coronin3 は C 末端側の 30~40 アミノ酸から成るコイルドコイル構造を介して、オリゴマーを形成するとともにアクチン線維と結合する。

筆者らは当初、coronin3 は GTP 型 Rab27a に結合すると予想した。しかし、coronin3 は GDP 型 Rab27a にも結合することが判明した¹⁰⁾。それまでの報告で GDP 型 G タンパク質に結合する分子は、protrudin のみであった¹¹⁾。protrudin は、PC12 細胞において GDI コンセンサス配列を介して GDP 型 Rab11 と結合することが知られている。そのため、protrudin の機能は GDP 型 Rab と結合して機能を果たす「GDP 型依存性エフェクター分子」ではなく、Rab サイクルの「制御因子」であるといえる。一方、coronin3 は GDI コンセンサス配列を持たず、かつ GTP 型 Rab27a 結合ドメインである SHD ドメインも持たない。結合ドメインの探索の結果、coronin3 は前述のベータプロペラ構造を介して GDP 型 Rab27a と結合することがわかった。この構造は、これまでに同定された G タンパク質のエフェクターや制御因子にはみられない。coronin3 は、GDP 型 Rab27a に加えて GDP 型 Rab3a にも直接結合する。しかし、結合定数から比較した場合、Rab3a と coronin3 の結合の強さは Rab27a と coronin3 の 5% にしかすぎないため、coronin3 の主要な結合パートナーは Rab27a であると考えられる。

6. GDP 型 Rab27a によるエンドサイトーシスの制御

coronin ファミリーは、様々な細胞でファゴサイトーシスなど膜の取り込みを制御することが知られている。そのため、筆者らは膵β細胞で coronin3 がエンドサイトーシスを制御しているのではないかと考えた。実際、coronin3 をノックダウンした培養膵β細胞では、エンドサイトーシスマーカーである FM4-64 の取り込みが抑制された¹⁰⁾。また、coronin3 のドミナントネガティブ変異体を発現させ、内在性の coronin3 と GDP 型 Rab27a の結合を抑制した細胞でも同様に FM4-64 の取り込みが抑制された。さらに、様々なエンドサイトーシス経路のうち、特にフォグリンのエンドサイトーシスが、coronin3 を介した GDP 型 Rab27a により制御されることが明らかになった。フォグリンは、インスリン顆粒膜に局在する膜貫通型タンパク質で、エキソサイトーシス後にエンドサイトーシスによって細胞内に回収される。そのため、筆者らは GDP 型 Rab27a と coronin3 が、分泌後にインスリンを取り囲んでいた顆粒膜を細胞内に回収する役割を担っていると考えている。

エンドサイトーシスは、複数の過程より構成される。脂質の変換、クラスリンの集積から始まり、ダイナミンによって細胞膜からくびり切り取られた小胞は細胞内に取り込まれ、エンドソームやリソソームなどのオルガネラに運ばれる。私たちは GDP 型 Rab27a が coronin3 を介して、エンドサイトーシスのどのステージに働くのかを調べた¹²⁾。coronin3 のドミナントネガティブ変異体を発現した細胞に、フォグリンの内腔ドメインを認識する抗体を加えると、エンドサイトーシスが抑制された結果、フォグリン抗体は細胞膜近傍に集積した。次に、細胞膜上のフォグリン抗体を酸で洗浄したが、抗体の分布に影響はみられなかった。さらに、coronin3 のドミナントネガティブ変異体を発現した細胞では、フォグリンタンパク質が細胞膜近傍に集積しているにも関わらず、ビオチン化法により求めた細胞膜上のフォグリン量は、コントロールに比べて減少していた。さらに、この細胞を電子顕微鏡で観察すると、細胞膜近傍に顆粒状の膜構造物が集積していた。以上より、GDP 型 Rab27a は coronin3 と結合し、エンドサイトーシス経路のうち、細胞内に取り込まれた後のステップを制御することが明らかになった (図 2)。最近、私たちは全反射顕微鏡を用いてエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構を検討しており、coronin3 がダイナミンの集積とはほぼ同じタイミングで働いていることを確認している (未発表データ)。

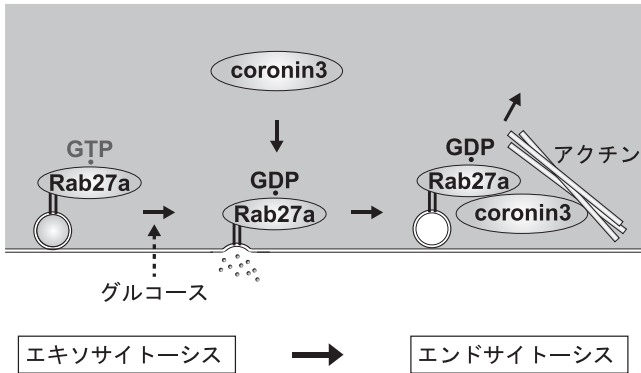


図2 coronin3によるエンドサイトーシスの制御

coronin3はGDP型Rab27aに結合し、開口放出で細胞膜と融合したインスリン顆粒膜を細胞内に回収する。GTP型Rab27aがインスリン顆粒を細胞膜近傍に供給するという従来の報告と合わせると、Rab27aのGTP型とGDP型はオン・オフを切り替えるだけの単純なスイッチではなく、別々の役割を受け持ち、分泌過程における顆粒膜の行きと帰りを制御している。

グルコース刺激はインスリン顆粒膜を細胞膜に融合し、中のインスリンを放出する。では、グルコースがインスリンを放出すればする程に、細胞の容積は増大するのであるか？ 私たちは、グルコース刺激がRab27aをGTP型からGDP型に変換することを見いだした¹⁰⁾。つまり、グルコースは膜の融合と同時にエンドサイトーシスを開始するシグナルでもあるわけである。エキソサイトーシスによって細胞膜に供給された顆粒膜は、次のエキソサイトーシスに備えるためにGDP型Rab27a依存性のエンドサイトーシスによって回収されると考えられる。言い換えれば、Rab27aのサイクルがインスリン顆粒膜のリサイクリングと同期しているといえる。筆者らは、このメカニズムが分泌細胞が分泌後も細胞自身の容積を一定に保つ「膜のホメオスタシス」に重要であると考えている。

coronin3は、無刺激時には細胞質に局在している。では、細胞質のcoronin3はどのようにして細胞膜近傍でおこるエンドサイトーシスを制御できるのであろうか？ グルコース刺激により、細胞膜近傍でRab27aがGDP型に変換される。coronin3は、変換されたGDP型Rab27aと結合することで、細胞膜近傍につき止められる¹²⁾。さらに、私たちはGDP型Rab27aと結合したcoronin3がFアクチン同士を架橋し、この架橋がエンドサイトーシスに必要であることを明らかにした¹³⁾。coronin3は、非刺激時にはN末端側とC末端側が分子内結合し、closed conformationを形成している。グルコース刺激によりGDP型Rab27aと結合したcoronin3はopen conformationに変換さ

れ、C末端側のアクチン結合サイトにF-アクチンがアクセスできるようになると考えられる¹⁴⁾。

7. おわりに

私たちは、GDP型Gタンパク質に結合し機能する分子「GDP型依存性エフェクター」の概念を提唱している¹⁵⁾。今回は紙面の都合上でcoronin3を中心に述べたが、既に複数のGDP型依存性エフェクター分子を見いだしている¹⁶⁾。これまでのGタンパク質研究は、GTP型Gタンパク質に結合する分子の探索とその性状解析により行われてきた。しかし、Gタンパク質の機能をその下流に位置する従来のエフェクター分子群の機能の総和で説明できない例が多々ある。私たちは、これまで無視されてきたGDP型依存性エフェクターの存在がその差異を説明できるのかもしれないと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、故仁木一郎教授（大分大学）、石崎敏理教授（大分大学）、岩松明彦博士（プロテイン・リサーチ・ネットワーク）、石原寿光教授（日本大学）、東家一雄教授（関西医療大学）、泉哲郎教授（群馬大学）、貝淵弘三教授（名古屋大学）らとの共同研究により行われたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

- 1) Grodsky, G.M., Curry, D., Landahl, H., & Bennett, L. (1969) *Acta Diabetol. Lat.*, 6 (Suppl 1), 554-578.
- 2) Fukuda, M. & Kuroda, T.S. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 43096-43103.
- 3) Mizuno, K., Ramalho, J.S., & Izumi, T. (2011) *Mol. Biol. Cell*, 22, 1716-1726.
- 4) Varadi, A., Tsuboi, T., & Rutter, G.A. (2005) *Mol. Biol. Cell*, 16, 2670-2680.
- 5) Waselle, L., Coppola, T., Fukuda, M., Iezzi, M., El-Amraoui, A., Petit, C., & Regazzi, R. (2003) *Mol. Biol. Cell*, 14, 4103-4113.
- 6) Kotake, K., Ozaki, N., Mizuta, M., Sekiya, S., Inagaki, N., & Seino, S. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 29407-29410.
- 7) Matsumoto, M., Miki, T., Shibasaki, T., Kawaguchi, M., Shinozaki, H., Nio, J., Saraya, A., Koseki, H., Miyazaki, M., Iwanaga, T., & Seino, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 8313-8318.
- 8) Wang, J., Takeuchi, T., Yokota, H., & Izumi, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 28542-28548.
- 9) Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S., & Izumi, T. (2005) *J. Cell Biol.*, 171, 99-109.
- 10) Kimura, T., Kaneko, Y., Yamada, S., Ishihara, H., Senda, T., Iwamatsu, A., & Niki, I. (2008) *J. Cell Sci.*, 121, 3092-3098.
- 11) Shirane, M. & Nakayama, K.I. (2006) *Science*, 314, 818-821.
- 12) Kimura, T., Taniguchi, S., Toya, K., & Niki, I. (2010) *Bio-*

chem. Biophys. Res. Commun., 395, 318–323.

- 13) Kimura, T., Taniguchi, S., & Niki, I. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.*, 496, 33–37.
- 14) Kimura, T. & Niki, I. (2011) *Endocr. J.*, 58, 1–6.
- 15) Kimura, T. & Niki, I. (2011) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 107, 219–223.
- 16) Kimura, T., Yamaoka, M., Taniguchi, S., Okamoto, M., Takei, M., Ando, T., Iwamatsu, A., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Ishizaki, T., & Niki, I. (2013) *Mol. Cell. Biol.*, in press.

木村 俊秀, 山岡 真美
(大分大学医学部薬理学教室)

GDP-bound G-protein signaling

Toshihide Kimura and Mami Yamaoka (Department of Pharmacology, Oita University Faculty of Medicine, 1-1 Idaigaoka, Hasamamachi, Yufu, Oita, 879-5593, Japan)

炎症シグナル伝達の間として機能する細胞内小胞の環境制御

1. はじめに

エンドソームやリソソームといった細胞内小胞が物質の運搬・分解だけでなく、様々な細胞機能に必須のシグナル伝達経路を活性化させるプラットフォームとして機能していることは、現在までに広く認識されつつある¹⁾。これらの細胞内小胞上では、小胞内あるいは細胞質からのシグナルを受け取ることで活性化される様々な分子が局在し、それらの分子がさらに下流の分子を活性化することによって、時間的・空間的に限局したシグナルを伝達する。その結果、細胞の増殖、分化、細胞骨格の再構成、細胞移動や転写・タンパク質合成の活性化など、様々な細胞応答が引き起こされる。小胞からのシグナル伝達を活性化させ、そして適切な時期に終結させるために、小胞輸送やイオン濃度といった小胞内環境が巧妙に制御されている。

本稿では、病原体センサーである Toll 様受容体 (TLR) の細胞内小胞からのシグナル伝達に重要な役割を果たす小胞局在型トランスポーター SLC15A4 と小胞内環境制御に焦点を当てて概説する。

2. 炎症応答における細胞内小胞からのシグナル伝達

細胞内小胞からのシグナル伝達は、免疫応答、特に炎症応答において重要な役割を担っている^{1,2)}。マクロファージや樹状細胞といった自然免疫を担う細胞では、細菌、ウイ

ルス、寄生虫などの病原体に特異的な分子パターンを認識する受容体を発現している。このパターン認識受容体が病原体を感知すると、細胞内シグナル伝達経路が活性化され、インターロイキン (IL)-6 や腫瘍壊死因子 α (TNF α) をはじめとする炎症性サイトカインや、I 型インターフェロン (IFN) の産生など様々な炎症応答が誘導される。TLR は、パターン認識受容体ファミリーの一つで、ヒトで 10 種類、マウスで 12 種類の機能的 TLR の存在が報告されている^{2,3)}。これらのうち、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, ならびに TLR13 は、病原体由来する核酸を認識する TLR で、主に細胞内小胞で機能すると考えられている²⁾。例えば、TLR9 は細菌やウイルスのゲノム DNA 上に存在する非メチル化 CpG (cytidine phosphate-guanosine) モチーフを認識し、感染炎症応答を惹起する。このモチーフを人工的に化学合成したオリゴヌクレオチド (CpG ODN) でマクロファージや樹状細胞を刺激すると、TLR9 は小胞体から CpG ODN を含有するエンドソーム/リソソームへと移行し、エンドサイトーシスによって取り込まれた CpG ODN と結合する。その結果、TLR9 下流のシグナル伝達経路が活性化され、サイトカイン産生などの炎症応答が誘導される。

TLR9 を介した炎症応答には、エンドソームからリソソームに至るまでの小胞輸送制御が重要であることが報告されている⁴⁾。樹状細胞の一つのサブセットである形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDCs) を CpG ODN で刺激を行うと、大量の I 型 IFN (特に IFN- α) の産生が誘導される。それに対して、pDCs 以外の樹状細胞 (conventional dendritic cells: cDCs) を刺激した際には、CpG ODN は細胞内に取り込まれるにも関わらず IFN- α の産生は誘導されない。興味深いことに、cDCs では取り込まれた CpG ODN は速やかにリソソームへと移行するのに対し、pDCs においては CpG ODN はエンドソームに長くとどまる。さらに、CpG ODN とカチオン性脂質 DOTAP (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate) との複合体を cDCs に取り込ませると、CpG ODN のリソソームへの移行が抑制され、pDCs の場合と同程度まで IFN- α の産生が亢進される。したがって、TLR9 に依存した IFN- α 産生にはエンドソームからリソソームへの輸送の制御が極めて重要であり、pDC には CpG DNA を含んだ小胞のリソソームへの移行を調節することで、炎症応答を活性化させる制御機構が存在していると考えられている。

小胞の輸送制御だけでなく、小胞内 pH といった小胞内