

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

インスリン分泌細胞における小胞体-ゴルジ体中間区画に局在する Rab2A の機能解析  
Functional analysis of Rab2A localized to the ER-Golgi intermediate compartment  
in insulin-secreting cells

菅原 太一

### 要旨

#### [背景と目的]

真核生物の細胞は脂質膜で区画化された様々な細胞小器官（オルガネラ）をもち、輸送小胞を介した小胞輸送を一つの手段として互いに連絡し合っている。例えば、タンパク質の生合成およびその高次構造を形成する場としての小胞体（Endoplasmic reticulum: ER）と、タンパク質に糖鎖修飾などを行い目的地に配送するゴルジ体（Golgi apparatus）は輸送小胞を介して絶えずタンパク質・脂質の受け渡しを行っている。本研究で注目した、小胞体-ゴルジ体中間区画（ER-Golgi intermediate compartment: ERGIC）は高等真核細胞の初期小胞輸送経路において ER とゴルジ体の中間に位置するオルガネラであり、小胞状およびチューブ状の形態を有している。ER において生合成された膜タンパク質や分泌性タンパク質は、小胞体出口部位と呼ばれる ER の特定の部位から形成される COPII (Coat protein complex II) 小胞に詰め込まれる。COPII 小胞内のタンパク質は ERGIC を経由し、ゴルジ体へ順行輸送される。また、ER 局在型タンパク質が誤って ER から ERGIC へ漏洩してしまった場合、そのタンパク質は COPI (Coat protein complex I) 小胞に詰め込まれ ERGIC から ER に逆行輸送される。このように、ERGIC は初期小胞輸送過程において、ERGIC→ER および ERGIC→ゴルジ体へのタンパク質選別輸送を担っている。

ER・ゴルジ体間の小胞輸送過程（小胞へのタンパク質詰め込み、出芽、オルガネラ間移動、目的オルガネラ膜との繫留・融合）は様々なタンパク質群が協奏的に機能することによって制御されている。低分子量 GTP 結合タンパク質である Rab ファミリーは小胞輸送を制御する重要なタ

ンパク質群の一つである。その Rab ファミリーの一つ、Rab2A は ERGIC に局在しており、ERGIC からゴルジ体への順行輸送と ER への逆行輸送を制御している。GTP が結合し、脂質膜への親和性が高まった Rab2A は ERGIC 膜に結合し、小胞輸送を促進するための様々な Rab2A のパートナー分子（エフェクター）を ERGIC 膜上にリクルートする。例えば、GAPDH は解糖系における必須酵素としてよく知られているが、Rab2A のエフェクターの一つでもある。ERGIC 膜上における Rab2A/GAPDH 複合体形成を発端として、COPI コートタンパク質複合体が形成され、ERGIC からの小胞輸送が促進すると報告されている。

ERGIC はそのアイデンティティーが最近確立され始めたばかりの新しいオルガネラである。そのため、ERGIC が ER やゴルジ体へタンパク質を選別輸送するだけのオルガネラなのか、あるいは別の生理的機能を持ち合わせたオルガネラなのかという問いに答えられないままだった。本研究では、グルコース刺激依存的にインスリンを分泌する分化細胞（マウス膵  $\beta$  細胞由来の細胞株：MIN6 細胞）に注目し、その細胞種特異的に発達している新規の ERGIC（Lub-ERGIC）を発見した。その Lub-ERGIC が (i) インスリン分泌細胞でどのような機能を持つか、(ii) その機能がどのように制御されているか、(iii) インスリン分泌細胞の機能発現・恒常性維持においてどのような生理学的意義をもつかを明らかにし、ERGIC の新規機能を理解するための一助とすることを本研究の目的とした。

## [結果]

MIN6 細胞における ERGIC の形態を調べるために、ERGIC53（ERGIC のマーカータンパク質）を免疫蛍光抗体法により蛍光染色した。その結果、従来の ERGIC に加えて、細胞質中に直径 2~4  $\mu\text{m}$  にもおよぶ巨大な新規の ERGIC が存在していることが

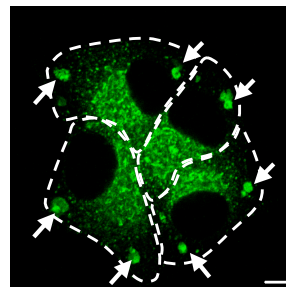


図 1: MIN6細胞のERGIC53染色像  
矢印: 新規のERGIC (Lub-ERGIC)  
点線: 細胞輪郭  
スケールバー: 5  $\mu\text{m}$

わかった（図 1）。この新規の ERGIC には、小胞体関連分解（ER-associated degradation: ERAD）において重要な役割を担う機能性タンパク質群が蓄積しており、さらにその膜

近傍にはユビキチン化されたプロインスリン（インスリン前駆体）が凝集体を形成していた。以後、この新規の ERGIC を Lub-ERGIC とよぶ。ERAD は、ER 内腔に蓄積した構造的に異常なミスフォールディングタンパク質を細胞質側に送り込み（レトロトランスロケーション）、ユビキチンで標識し、プロテアソーム依存的に分解する機構であり、ミスフォールディングタンパク質の過剰な蓄積によって生じる ER ストレスを軽減する。

緑色蛍光タンパク質である GFP を Rab2A に融合させた GFP-Rab2A を MIN6 細胞に過剰発現させたところ、GFP-Rab2A が Lub-ERGIC に局在しており、Rab2A が Lub-ERGIC からの小胞輸送を制御していることが示唆された。Rab2A に対する RNA 干渉法と生化学的分画法を組み

合わせた実験によって、Rab2A を発現抑制（ノックダウン）した細胞では、LUB-ERGIC にプロインスリンや ERAD 関連タンパク質群がより一層濃縮することがわかった。さらに、Rab2A ノックダウン細胞の LUB-ERGIC においてユビキチン化されたプロインスリンの凝集形成が亢進した。これらの結果から、Rab2A の機能・活性が阻害されると、LUB-ERGIC における ERAD 反応の促進に応じて、ユビキチン化プロインスリン凝集体の形成が亢進することが示唆された。

MIN6 細胞において、Rab2A の活性（一定時間内の GTP 取り込み量で定義した）を制御する生理的作用を探索したところ、高濃度グルコース（以下、高グルコースとする）の作用時間に応じて、Rab2A の活性が変化することがわかった。すなわち、高グルコースで短時間処理した MIN6 細胞では Rab2A 活性が一時的に増加するが、高グルコースを慢性的に MIN6 細胞に作用させると（15 時間～）、Rab2A の活性が減少することがわかった。慢性的な高グルコースを作用させたときの Rab2A の活性減少には GAPDH が関与しており、その条件下では PARP によってポリ ADP リボシル化された GAPDH が Rab2A から解離することによって、Rab2A の活性を減少させることが示唆された。

次に、Rab2A が LUB-ERGIC の機能制御を通じて、MIN6 細胞の機能発現・恒常性維持においてどのような役割を担うかを調べた。MIN6 細胞の Rab2A をノックダウンすると、一時的な高グルコース刺激によるインスリン分泌量が減少した。また、Rab2A ノックダウン細胞では、慢性的な高グルコース作用下における ER ストレスが減少することと、過度の ER ストレスによって誘導される細胞死（アポトーシス）に耐性をもつことがわかった。これまでの結果をまとめると、活性化した Rab2A は LUB-ERGIC からのプロインスリン輸送を促し、インスリン分泌を促進するが、不活性化した Rab2A は LUB-ERGIC における ERAD 反応を活発化させ、ER ストレス下におけるインスリン分泌細胞の生存に寄与することが示唆された。

#### [考察]

本研究では、インスリン分泌細胞の LUB-ERGIC が、高グルコース刺激による GAPDH 依存的な Rab2A の活性制御を介して、機能的にコントロールされていることが示唆された。その分子メカニズムは以下のように考えている。一時的な高グルコース作用下では、Rab2A/GAPDH 複合体が LUB-ERGIC→ゴルジ体へのプロインスリン輸送を促し、インスリン分泌を促進させる（図 2, 左）。一方で、高グルコース状態が継続すると、過剰な解糖系の亢進に伴う酸化ストレスによって活性化した PARP が、GAPDH をポリ ADP リボシル化し（図 2, 1）、Rab2A から GAPDH を解離させた後（図 2, 2）、Rab2A の活性を減少させる（図 2, 3）。この、慢性的な高グルコース作用に伴う Rab2A の不活性化によって、LUB-ERGIC から ER あるいはゴルジ体への小胞輸送が阻害される。そのような条件下でも、ER から LUB-ERGIC へのタンパク質・脂質流入は維持されたままであるため、ミスフォールディングプロインスリンや ERAD 関連タンパク

質群が ER から流れ込み, LUb-ERGIC に蓄積・濃縮する. その結果, LUb-ERGIC が ERAD に最適な場所となり, ミスフォールディングプロテインがユビキチン化タンパク質凝集体として細胞質中に隔離される (図 2, 3). この, Rab2A/GAPDH 依存的な LUb-ERGIC 機能制御機構は, 糖毒性に伴うストレス環境 (ER ストレスなど) に対する細胞内応答であると考えられる.

本研究では, MIN6 細胞において, ERGIC の一部である LUb-ERGIC に ERAD 機構が備わっていることを明らかにした. この知見は, ERGIC が積極的にタンパク質品質管理に貢献していることを直接的に示すものであり, ERGIC というオルガネラの新規機能を細胞生物学的にサポートするうえで重要な発見であると考えている.

また, 代表的な生活習慣病である二型糖尿病では血中グルコース濃度が上昇しており, その高血糖状態は ER ストレスによる膵  $\beta$  細胞死を誘発する一つの大きな原因とされている. 膵  $\beta$  細胞死はインスリン供給の低下をもたらし, 糖尿病の症状および合併症をさらに悪化させる. 本研究では, Rab2A がインスリン分泌だけではなく, タンパク質品質管理を介してインスリン分泌細胞の生存をも制御する鍵タンパク質であることが示唆された. したがって, Rab2A は二型糖尿病の病態 (インスリン供給不全および易膵  $\beta$  細胞死) を改善するための標的分子になる可能性があると考えている.

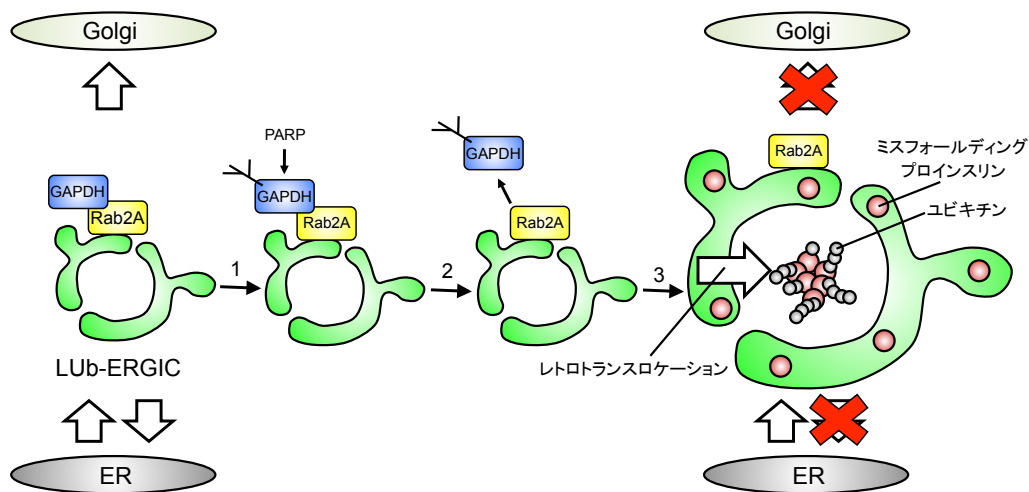


図 2: LUb-ERGICにおけるユビキチン化プロテイン凝集体の形成モデル