

主論文の要旨

**Actin Dynamics Regulated by the Balance of Neuronal
Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and Cofilin
Activities Determines the Biphasic Response of
Glucose-induced Insulin Secretion**

〔N-WASP と cofilin 活性のバランスによって調節されるアクチン動態が
グルコース応答性インスリン分泌の 2 相性反応を決定する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ユタカ 教授)

上西 栄太

【緒言】

膵β細胞からのインスリン分泌は生体におけるグルコース代謝の中心的役割を担っており、その分泌は様々な細胞内シグナルによって厳密に調節されている。グルコース応答によるインスリン分泌動態は速やかな分泌である第1相と、それに続く持続的な分泌の第2相から構成され、2相性インスリン分泌として知られている。しかしながら、2相性インスリン分泌の詳細な分子メカニズムは殆ど知られていない。

近年、クロム親和性細胞や外分泌細胞などで、顆粒の開口分泌の制御にアクチン動態が重要であることが報告されている。膵β細胞において、低分子量 G 蛋白質である Rho や Cdc42、Rac1 は F-アクチンを制御し、グルコース応答性インスリン分泌 (GIIS) に関与するという報告が散見され、アクチン動態が GIIS に及ぼす影響についての知見が集積しつつある。しかしながら、2相性インスリン分泌におけるアクチン動態の関与について、その詳細な分子機構は殆ど知られていない。そこで本研究ではアクチン動態を制御する中心的な分子である Cdc42 に注目し、Cdc42 とその下流シグナルである Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) および cofilin が GIIS の 2相性反応に及ぼす影響についての詳細な検討を行った。

【方法および結果】

インスリン分泌細胞株である MIN6 細胞を高濃度グルコースで刺激すると Cdc42 は 3分・15分で活性化されることを pull-down assay 法により明らかとした (Fig. 1A)。さらにこの活性化は電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入に依存しない、グルコース代謝そのものによって生じていた (Fig. 1.B,C)。次に、Cdc42 の下流シグナルとして知られている N-WASP が、グルコース刺激による N-WASP のリン酸化を介さず、活性型 Cdc42 との直接結合によって活性化されることを免疫沈降法により明らかとした (Fig. 1.D,E)。さらに N-WASP の活性化に伴い、細胞内局在が細胞質から細胞膜面へと移行することを免疫染色法により明らかとした (Fig. 1F)。

次に、N-WASP の VCA ドメイン (Arp2/3 複合体と G-アクチンとの結合領域) を欠損させたドミナントネガティブ変異体 (N-WASP DN) を作製し (Fig. 2A)、蛍光タンパク質で標識した G-アクチンを adenovirus を用いて、同時にマウス単離膵β細胞に発現させ、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) で解析を行った (Fig. 2B)。高濃度グルコース刺激で認められた膜面での蛍光強度の増加は N-WASP DN を発現することで完全に消失した。この Cdc42/N-WASP/Arp2/3 複合体を介したアクチン重合がインスリン分泌に及ぼす影響を検討する目的で、各種インスリン分泌実験を行った (Fig. 3.A-G)。マウス単離膵島または MIN6 細胞を用いて Cdc42、N-WASP、Arp2/3 複合体をそれぞれ knock down し、インスリン分泌への影響を検討した結果、knock down 群全てにおいて GIIS が有意に低下した。また、マウス単離膵島および MIN6 細胞に N-WASP DN を発現させ GIIS を検討したところ、N-WASP WT と比較して有意に低下した。さらに 2相性インスリン分泌反応を評価する目的で MIN6 細胞に N-WASP DN を発現させ、灌流実験を行った (Fig. 4.A,B)。N-WASP DN 群では高濃度グルコース刺激に

におけるインスリン分泌の第 2 相が有意に低下したが、第 1 相には変化が認められなかった。N-WASP mutant と蛍光タンパク質で標識したインスリンを同時にマウス単離膵β細胞に発現させ、TIRFM で解析を行った結果、N-WASP DN 群では高濃度グルコース刺激下による第 2 相のインスリン顆粒の細胞膜への膜融合が有意に低下した。そしてその顆粒の性質はすべて、刺激によって初めて細胞膜に recruitment された顆粒が瞬時に細胞膜に融合する様式、即ち restless newcomer だった(Fig. 4.C-F)。以上の結果から、Cdc42/N-WASP/Arp2/3 複合体によって調節されるアクチン重合は、restless newcomer の膜面への recruitment を促すことで GIIS の第 2 相に関与していることが示唆された。

N-WASP と同様に PAK1 も Cdc42 の下流シグナルとして知られている。PAK1 もグルコース代謝でのみ活性化され、その下流シグナルである LIMK1 を活性化した(Fig. 5.A,B)。さらに MIN6 細胞を高濃度グルコースで刺激すると PAK1/LIMK1 のエフェクターである cofilin の非活性化型であるリン酸化型 cofilin が増加した。また、高濃度カリウム刺激では細胞内カルシウム流入により非リン酸化型 cofilin が増加した(Fig. 5C)。LIMK には LIMK1 と LIMK2 の subtype が存在し、細胞の種類によってその優位性が異なることが知られている。MIN6 細胞における mRNA の発現を real-time PCR 法により評価した結果、膵β細胞では LIMK1 と LIMK2 が同等量発現していた(Fig. 5D)。各種阻害剤を用いた検討により、高濃度グルコース刺激によるリン酸化型 cofilin の増加は、LIMK2 ではなく、LIMK1 を介した経路であることが明らかとなった(Fig. 5E)。

cofilin はその脱リン酸化型により F-アクチンを切断するアクチン脱重合の key molecule である。cofilin によるアクチン動態の制御がインスリン分泌に及ぼす影響を検討した。まず、cofilin を siRNA により knock down し、MIN6 細胞を用いて GIIS を検討した。Knock down 群で GIIS は有意に低下し(Fig. 6A)、GIIS の第 2 相が明らかに低下したが、第 1 相には変化が認められなかった(Fig. 6B)。次に、恒常的非リン酸化変異体である cofilin S3D を作製した。これは内在性 cofilin とその phosphatase を競合することで内在性 cofilin を阻害し、アクチン重合を抑制する。Knock down 群と同様に、cofilin S3D 群においても GIIS は有意に低下し、GIIS の第 2 相のみが有意に低下した(Fig. 6.C,D)。

【考察】

我々は本研究でグルコース刺激によって制御された Cdc42/N-WASP/Arp2/3 複合体シグナルと Cdc42/PAK1/LIMK1/cofilin シグナルが協調的に働き、アクチン動態を制御することで GIIS の 2 相性反応を調節することを明らかにした。グルコース刺激前の定常状態では N-WASP は活性化されておらず、cofilin はほとんどが脱リン酸化型で存在している。これは即ちアクチンフィラメントが脱重合優位であることを示している。グルコース刺激下では速やかに N-WASP は活性化されると同時に cofilin もリン酸化され、F-アクチン優位となる。cofilin がリン酸化されることでアクチンの脱重

合が促進され、アクチンモノマーが供給されることによってアクチン重合が促進される。グルコース刺激 5 分以内の第 1 相では G-アクチンが優位であり、その後は cofilin が徐々にリン酸化され、F-アクチンが優位な状態へと移行する。我々の結果から、アクチン重合に関与する N-WASP や cofilin のノックダウンおよびそれぞれのドミナントネガティブ変異体を用いた灌流実験から、F-アクチン優位相を抑制すると GIIS の第 2 相が低下することが示唆された。即ち、速やかで一過性の分泌である第 1 相は、G-アクチン優位相による分泌であり、持続的な分泌である第 2 相は、F-アクチン優位相による分泌であると考えられる。実際、アクチン脱重合剤である cytochalasin B や latrunculin B を用いると、著明で急峻なインスリン分泌応答が得られることが知られている。さらに、高濃度カリウム刺激では急峻で一過性のインスリン分泌が得られることが知られているが、我々の結果から高濃度カリウム刺激では cofilin が脱リン酸化され、G-アクチンが優位となることから、我々の考察と矛盾しない。以上の結果から、我々は次のモデルを提唱した (Fig. 7.A,B)。GIIS の第 1 相は G-アクチン優位相、即ち Cdc42/PAK1/LIMK1/cofilin シグナルが優位であり、第 2 相は F-アクチン優位相、即ち Cdc42/N-WASP/Arp2/3 複合体シグナルが優位である。そしてこれらのシグナルのバランスによって GIIS の 2 相性反応が決定されている。

【結語】

本研究により N-WASP と cofilin の活性化のバランスによって制御されたアクチン動態が、グルコース応答性の 2 相性インスリン分泌反応を決定していることが明らかにされた。2 相性インスリン分泌動態の障害は糖尿病状態における特徴的な現象であり、N-WASP と cofilin によって制御されるアクチン動態についてのさらなる理解が、糖尿病状態での膵β細胞の病態生理や病因の解明に大いなる手がかりを与えてくれるものと期待される。