



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1580号
学位記番号	第322号
氏名	横川 慧
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	細胞間接着を介した膵島 α 細胞のグルカゴン分泌調節機構の解明
論文審査担当者	主査： 肥田 重明 副査： 平嶋 尚英，服部 光治，山村 壽男

名古屋市立大学学位論文

細胞間接着を介した膵島 α 細胞の
グルカゴン分泌調節機構の解明

平成 28 年度（2017 年 3 月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科
医療機能薬学専攻
生体超分子システム解析学分野

横川 慧

本論文は 2017 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 肥田 重明 教授
副査 平嶋 尚英 教授
服部 光治 教授
山村 寿男 准教授

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Satoru Yokawa, Tadahide Furuno, Takahiro Suzuki, Yoshikazu Inoh, Ryo Suzuki, Naohide Hirashima
Effect of cell adhesion molecule 1 expression on intracellular granule movement in pancreatic α cells. (2016) *Cell Biochem. Biophys.*, 74, 391-398.
2. Satoru Yokawa, Takahiro Suzuki, Satoshi Inouye, Yoshikazu Inoh, Ryo Suzuki, Takao Kanamori, Tadahide Furuno, Naohide Hirashima
Visualization of glucagon secretion from pancreatic α cells by bioluminescence video microscopy: identification of secretion sites in the intercellular contact regions. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 485, 725-730.

本論文の基礎となる研究は、平嶋 尚英 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

第 I 章 序論

I-1.	膵臓ランゲルハンス島（膵島）細胞と糖尿病	
I-1-1.	糖尿病の現状	-1-
I-1-2.	糖尿病治療	-2-
I-1-3.	糖尿病とグルカゴン	-4-
I-1-4.	膵島細胞の構成とホルモン分泌	-5-
I-1-5.	グルカゴンとGlucagon-like peptide (GLP)-1/2の相同性	-7-
I-1-6.	接着分子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1)	-9-
I-1-7.	本研究の目的	-10-

第 II 章 PGCG-GLaseをレポーターとするグルカゴン分泌解析

: 生物発光イメージング法による定量的可視化と細胞接着の役割

II-1.	緒言	
II-1-1.	ガウシアルシフェラーゼ (<i>Gaussia Luciferase:GLase</i>)	-11-
II-1-2.	ビデオレート生物発光イメージング法による可視化解析	-12-
II-1-3.	生物発光イメージング法を用いたグルカゴンイメージング	-15-
II-2.	材料と方法	
II-2-1.	使用試薬	-16-
II-2-2.	プラスミド作製	-16-
II-2-3.	細胞培養と遺伝子導入	-20-
II-2-4.	GLaseとPGCG-GLaseの発光活性測定	-20-
II-2-5.	免疫染色法	-20-
II-2-6.	ウェスタンブロッティング法	-21-
II-2-7.	生物発光イメージング法の実施	-21-
II-2-8.	統計処理	-22-
II-3.	結果 および考察	
II-3-1.	Preferred法による発光量変化	-23-
II-3-2.	細胞外からの刺激によるPGCG-GLase分泌	-24-
II-3-3.	PGCG-GLase安定発現 α 細胞における融合タンパク質の 細胞内局在・分泌	-27-
II-3-4.	生物発光イメージング法によるPGCG-GLase分泌の観察	-29-

本文では以下の略語を用いた。

BCA : Bicinchoninic acid disodium

BSA : Bovine serum albumin

CADM1 : Cell adhesion molecule 1

CASK : Calcium/calmodulin dependent serine protein kinase

CMV : Cytomegalovirus

ECL : Enhanced chemiluminescence system

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EM-CCD : Electron multiplying charge coupled device

GABA : gamma-aminobutyric acid

GLase : *Gaussia* luciferase (Protein)

GLP-1/2 : Glucagon-like peptide 1/2

GLuc : *Gaussia* luciferase (Gene)

GRPP : Glicentin related pancreatic peptide

HEPES : N-2-hydrixyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid

KRHB : Krebs-Ringer-HEPES buffer

MAGUK : Membrane-associated guanylate kinase

MPGF : Major proglucagon fragment

MSD : Mean square displacement

N-CAM : neural cell adhesion molecule

Necl-2 : Nectin-like protein-2

NP-40 : Nonidet P-40

PBS : Phosphate buffered saline

PC : Prohormone convertase

PCR : Polymerase chain reaction

PDZ domain : Postsynaptic density- 95/Discs large/ Zona-occludens-1 domain

PGCG : Proglucagon

PVDF : Polyvinylidene difluoride

RA175 : Retinoic acid 175

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SgIgSF : Spermatogenic immunoglobulin superfamily

SNAP-25 : Synaptosomal-associated protein of 25 kDa

SynCAM : Synaptic cell adhesion molecule

TIRF : Total internal reflection fluorescence

TSLC1 : Tumor suppressor in lung cancer 1

VAMP-8 : Vesicle associated membrane protein

第 I 章 序論

I-1. 膵臓ランゲルハンス島（膵島）細胞と糖尿病

I-1-1. 糖尿病の現状

生体内の血中糖濃度は、膵臓ランゲルハンス島（膵島）細胞や視床下部、腸などの組織・臓器から分泌されるホルモンが末梢組織に作用し、空腹時で70～110 mg/dl、食後で140 mg/dl未満になるように制御されている。糖尿病は、膵島β細胞から血糖降下ホルモンであるインスリンの分泌量の低下や末梢組織でのインスリン抵抗性の増加などの原因によって、血糖制御機構が破綻することにより発症する代謝疾患群である [Cornell., 2015]。持続的な高血糖は、血管平滑筋の緊張増加や動脈硬化などの血管障害を引き起こすことから、細小血管障害（網膜症、腎症、神経障害）や大血管障害（心筋梗塞、脳梗塞）をはじめとした合併症を併発する。また、神経障害によって自覚症状が乏しくなるため、糖尿病と診断された際には深刻な症状となっている場合が多く治療予後が悪いことが知られている。

日本国内の糖尿病診断の基準は、主に空腹時血糖値、75 gのブドウ糖を経口で投与した際の負荷後2時間血糖値、ヘモグロビンA1c (HbA1c) が用いられている。正常型は、空腹時血糖が110 mg/dl未満、負荷後2時間血糖値が140 mg/dl未満、HbA1cが4.6～6.2%とされ、糖尿病型では空腹時血糖値が126 mg/dlまたは負荷後2時間血糖値が200 mg/dlを超え、HbA1cが6.5%以上となる。また、境界型は、正常型と糖尿病型の中間の区分であり、糖尿病型に準じる状態であるため、食生活や運動習慣などを見直して耐糖能異常を改善するのが望ましい (Figure 1-1) [糖尿病治療ガイド, 2014]。

糖尿病は発症原因によって、I型（膵島β細胞の破壊に伴う絶対的インスリン欠乏）、II型（膵島β細胞からのインスリン分泌量および末梢組織でのインスリン感受性の低下による相対的インスリン欠乏）、妊娠糖尿病（妊娠に伴う耐糖能異常）、その他（遺伝子異常、他の疾患に伴う耐糖能異常）の4つに大別することができる。II型糖尿病は、高タンパク質・高脂肪・炭水化物中心の食生活や社会環境の発展に伴う食生活の変化や運動不足などの後天的な要因によって発症し、全糖尿病患者数の90%以上を占めている [Kahn et al., 2014; Chen et al., 2011]。世界の総人口における糖尿病有病率は、2015年は8.8%（約4億2,000万人）、2040年には10.4%（約6億4,000万人）に増加するとされる [Abu et al., 2004]。糖尿病患者数は、中国、インド、アメリカの順に多く、世界の糖尿病患者数の37%を西太平洋地域が占めている。また、世界の糖尿病関連医療費は、2015年は6,730億ドル（約74兆円）であったが、2040年には8,020億ドル（約88兆円）に上ると予想されている。2015年の日本国内の糖尿病関連医療費は290億ドル（約3兆2,000億円）であった。2015年での国内における成人（20歳～79歳）の糖尿病罹患率は7.9%であり、患者数は720万人であった。今後さらに糖尿病関連治療費と患者数は増加すると考えられる [IDF diabetes atlas. 7th, 2015]。

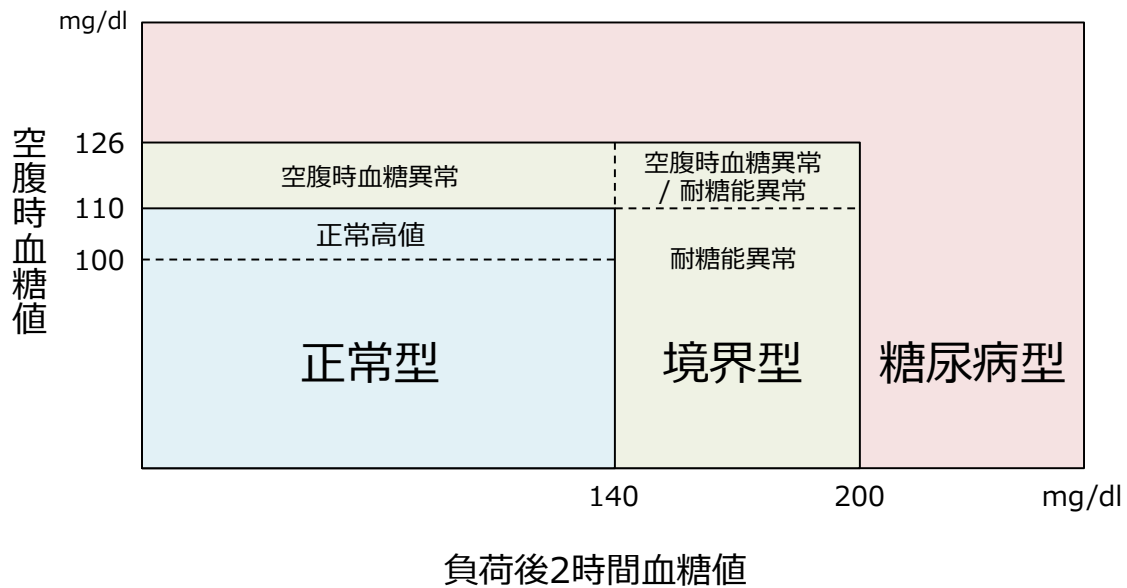


Figure 1-1. 糖尿病の判定区分。正常型（空腹時血糖値 110 mg/dl 未満、負荷後2時間血糖値 140 mg/dl 未満、HbA1c 4.6 ~ 6.2%）、境界型（空腹時血糖値 110 ~ 126 mg/dl、負荷後2時間血糖値 140 ~ 200 mg/dl）、糖尿病型（空腹時血糖値 126 mg/dl 以上または負荷後2時間血糖値 200 mg/dl 以上、HbA1c 6.5%以上）とされる。境界型の中でも耐糖能異常の区分に入る患者は、糖尿病型へ移行する可能性が高いため、定期検診を受けるなど注意が必要である [糖尿病治療ガイド, 2014]。

I-1-2. 糖尿病治療

糖尿病の治療では、食事療法と運動療法を中心に行い、さらに患者に合わせた効果的な薬物治療を行うことで血糖、体重、血圧、血清脂質を適切に調節する。それにより、糖尿病の合併症を予防し健常人と同様の生活を行うことを目標とする。糖尿病治療の指標には、血糖値とHbA1cが用いられる。HbA1cは、患者の過去1~2ヶ月の平均血糖値を反映しており、血糖管理の重要な目標である。血糖値は、日内変動などの細かな変化を把握できない。血糖値は、HbA1cを補完するものであり、空腹時血糖値、負荷後2時間血糖値を用いることで患者の治療効果を総合的に判断することが可能である。合併症予防ではHbA1cを7.0%未満、血糖の正常化を目指すには6.0%未満が目標とされる。食事療法は、性別や年齢などから適正なエネルギー摂取量を決定し、栄養素の過不足なくバランスのとれた食事を行うことが必要である。運動療法は、急性効果としてブドウ糖や脂肪酸利用が促進され血糖値が低下し、慢性効果ではインスリン抵抗性が改善する効果があるとされる。食事・運動療法による代謝改善が不十分である場合は、薬物療法を行う必要がある。糖尿病の治療薬は、インスリン薬、インスリン抵抗性改善系（ビグアナイド薬、チアゾリジン薬）、インスリン分泌促進薬（スルホニル尿素薬、グリノド薬、Dipeptidyl peptidase (DPP) -4 阻害薬、Glucagon like peptide (GLP) -1薬）、糖吸収抑制・排出促進系（ α -グルコシダーゼ阻害薬、ナトリウム・グルコース共輸送体 (GLUT) -2阻害薬）に分類される (Figure 1-2) [糖尿病治療ガイド, 2014]。

この中で、DPP-4阻害薬はGLP-1の分解を阻害することで膵島 β 細胞からのインスリン分泌量の増加と膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌量を抑制する作用を有しており、GLP-1薬とともにグルカゴンの機能を制御する新たな薬物として用いられている。糖尿病の治療は基本的に対症療法のみであり、今後糖尿病の発症・増悪機序を解明することで、より効果的な新たな治療薬・治療法を開発することが望まれている。

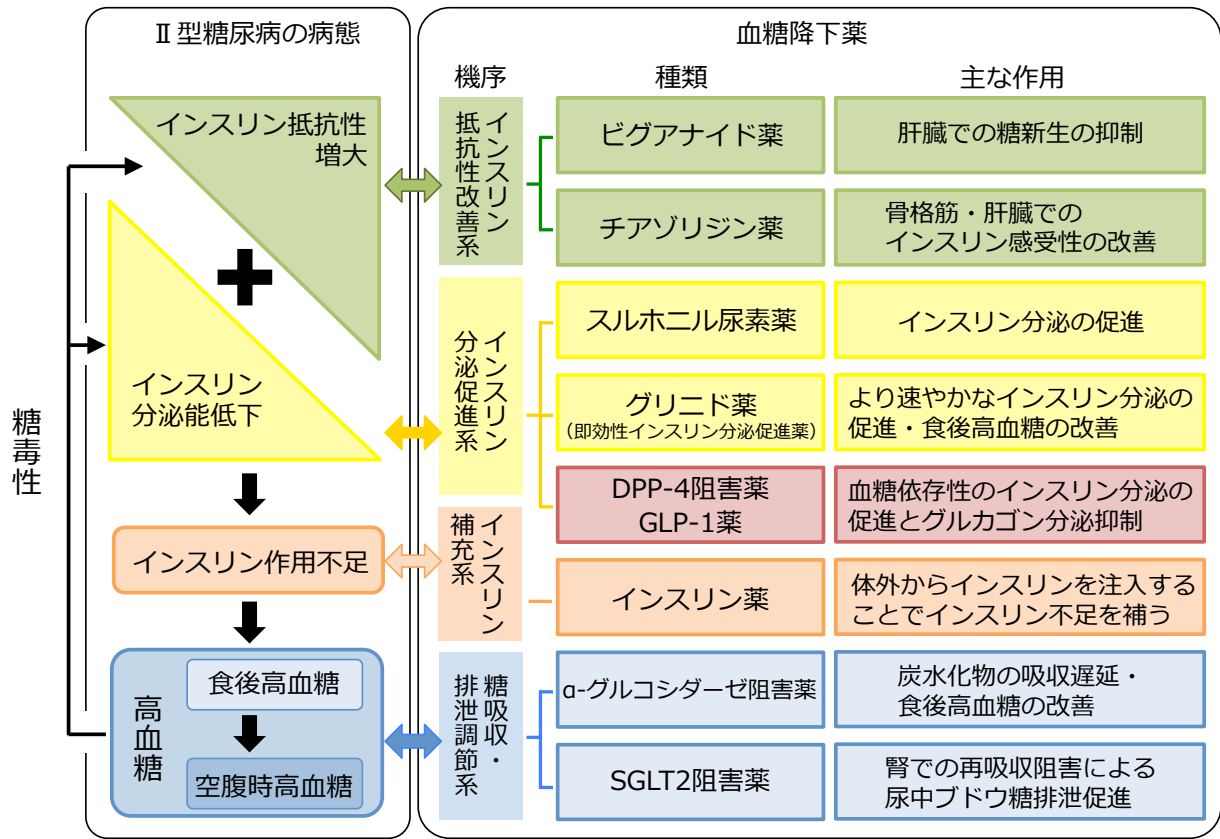


Figure 1-2. II型糖尿病治療薬の分類。

薬物治療は、患者の病態に合わせて1剤から使用し、2剤以上併用する際は作用機序の異なる薬剤を用いる。〔糖尿病治療薬ガイドより一部改変, 2014〕

I-1-3. 糖尿病とグルカゴン

インスリンは、1921年にBantingとBestによって血糖降下ホルモンとして発見された [Banting et al., 1922]。その後、今日に至るまでインスリンと膵島 β 細胞に関する研究は、世界中で精力的に行われている。その結果、膵島 β 細胞の細胞機能調節機構やインスリン分泌・作用機構が明らかにされ、糖尿病と膵島 β 細胞及びインスリンの関係が解明されつつある。これらの知見は、糖尿病で不足するとされるインスリンの分泌促進薬であるスルホニル尿素治療薬やインスリン抵抗性改善薬であるビグアナイド薬などの各種作用薬が開発の基礎となり、世界中で糖尿病患者の治療に貢献してきた。

一方で、グルカゴンは、1923年にKimballとMurlinらによってインスリン製剤中から血糖上昇物質として発見された [Kimball et al., 1923]。その後、1948年にSutherlandらの研究から、グルカゴンが膵島 α 細胞由来の血糖上昇ホルモンとして肝臓におけるグリコーゲン分解に作用することが認識されるようになった [Sutherland et al., 1948]。膵島 α 細胞とグルカゴンに関する研究は、 α 細胞の組織内での存在量が少ないことや研究に適した細胞株が乏しいことなどから、膵島 β 細胞とインスリンに関する研究と比較して遅れていた。近年、遺伝子改変マウスが容易に作製できるようになり、膵島 α 細胞の重要性が明らかになりつつある。膵島 α 細胞を特異的に欠損したマウスでは、ストレプトゾシンを用いて後天的に膵島 β 細胞を破壊しても血糖が上昇しないことが報告された [Hancock et al., 2010]。また、全身のグルカゴン受容体を欠損したマウスに同様の操作をおこなった場合にも同様の結果が得られ [Lee et al., 2011]、このマウスにグルカゴン受容体を発現させると血糖が上昇することも報告されている。これらの結果は、糖尿病の発症には、インスリンが低下するよりもグルカゴンが存在することが重要であることを示唆している。さらに、II型糖尿病患者の膵島は、非糖尿病患者と比較し α/β 細胞比が増加している [Spijker et al., 2015] ことから、糖尿病の発症にはグルカゴンが中心的な役割を果たすとされる「グルカゴン中心仮説」が提唱されるようになった [Unger et al., 2012]。インスリン分泌促進とグルカゴン分泌抑制作用をもつGLP-1薬やDPP-4阻害薬が新たな糖尿病治療薬として開発され、治療効果を挙げつつある。今後、糖尿病治療をより効果的に行うためには、より詳細に膵島 α 細胞機能とグルカゴン分泌機構の解明を行い、糖尿病との関連性を理解する必要がある。

I-1-4. 膵島細胞の構成とホルモン分泌

膵島は、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ϵ 細胞、PP細胞からなる島状の構造を有し、生体内の血糖調節の中心的役割を担う組織である。膵島 α 細胞からは血糖上昇ホルモンであるグルカゴンとグルタミン酸が、 β 細胞は血糖降下ホルモンであるインスリンと γ -アミノ酪酸(GABA)が、 δ 細胞はグルカゴンとインスリンの双方の分泌抑制を担うソマトスタチンがそれぞれ分泌され、他の膵島細胞に作用する (Figure 1-3) [Xu et al., 2006; Gromada et al., 2007; Gaisano et al., 2012]。また、細胞接着因子を介した相互作用も存在しており、膵島構造の異常が耐糖能障害に直結することから膵島細胞の構造は膵島機能に重要な役割を果たすとされる [Borden et al., 2013]。膵島細胞は、動物種によって異なる分布を示し、マウスやラットなどの齧歯類では膵島 β 細胞が中心部に集積し、辺縁部に α 細胞、 δ 細胞が分布する。一方で、ヒトやサルの上長類では、 $\alpha \cdot \beta \cdot \delta$ 細胞が入り組んだ複雑な構造となるが、詳細に観察すると膵島 α 細胞が血管周囲に分布し、その周囲を β 細胞が囲むように位置している (Figure 1-4) [Bosco et al., 2010; Caicedo., 2013]。また、膵島細胞の構成比も異なり、マウスでは β 細胞が大部分を占めるのに対して、ヒトでは α 細胞の存在比が高い (Table 1A)。このように、膵島細胞間の同種・異種間接着の割合はマウスとヒトでは大きく異なるため (Table 1B) [Cabrera et al., 2006]、細胞接着を介した相互作用も変化すると考えられている。

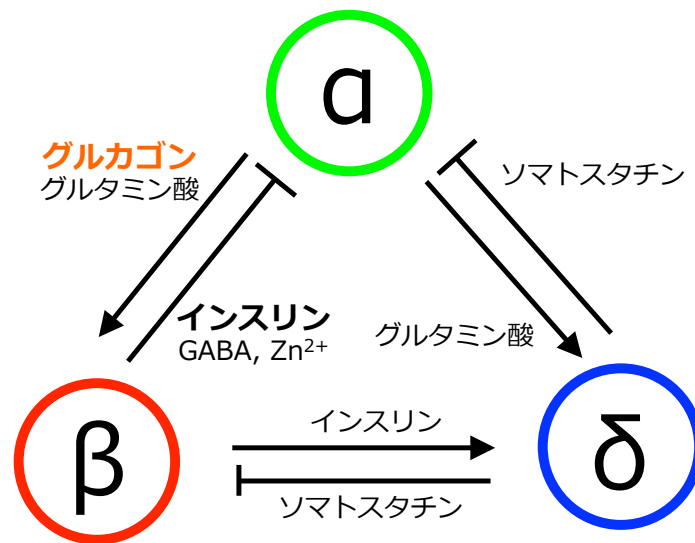


Figure 1-3. 膵島細胞における液性因子を介した細胞間機能調節の模式図。グルカゴンは、細胞外のグルコース濃度に加えて膵島 β 細胞や δ 細胞からの液性・接着因子によって分泌制御を受ける。

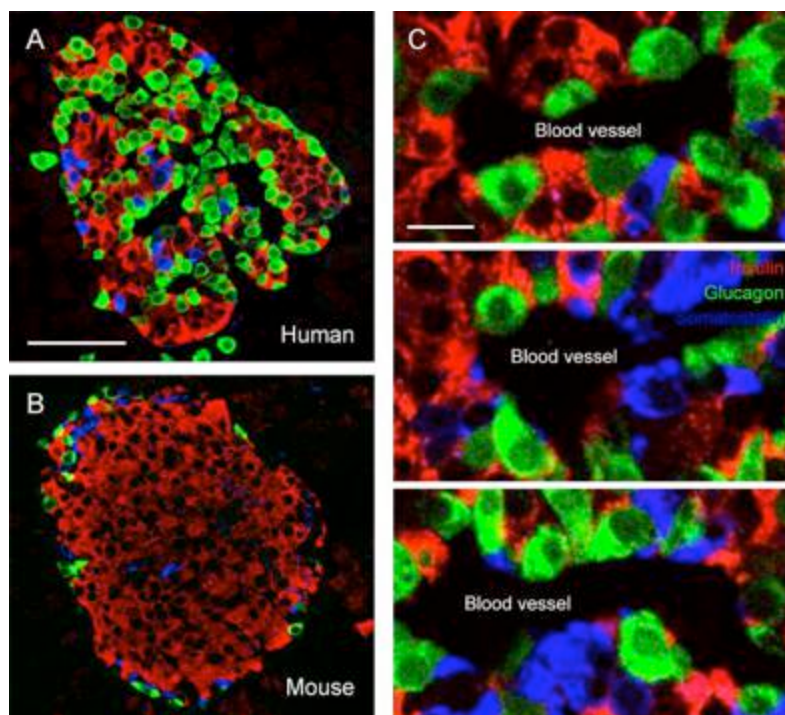


Figure 1-4. ヒト・マウスの膵島構造の違い。A, B) 蛍光抗体染色法によるヒト (A) ・マウス (B) 膵島構造図。インスリン (赤)、グルカゴン (緑)、ソマトスタチン (青) を示している。動物種によって膵島構造は異なることが知られているが、特にマウス膵島は、中心部にβ細胞が分布し、辺縁部にα・δ細胞が分布する。(C) ヒトの膵島は、血管周辺部にα細胞が、内部はβ細胞が分布している。
Scale bar = 50 μm (A), 10 μm (C) [Caicedo, 2013]

Table 1. 膵島α・β・δ細胞比と細胞間接着。

(A) 動物種による膵島細胞構成比の違い。(B) 動物種による膵島細胞間の同種・異種間接着の割合。膵島構成比の違いにより、細胞間接着の割合はヒトとマウスで大きく異なる。α細胞の同種細胞間接着の割合は数倍に上昇しており、ヒトの膵島機能の発現により寄与することが考えられる [Cabrera et al., 2006改変]。

A	α cells (%)	β cells (%)	δ cells (%)
Mouse	18	77	5
Human	38	55	7

B	Mouse		Human	
	異種細胞間	同種細胞間	異種細胞間	同種細胞間
Cell type	%	%	%	%
α cells	98 ± 1	2 ± 1	90 ± 3	10 ± 3
β cells	28 ± 6	71 ± 4	71 ± 5	29 ± 5

I-1-5. グルカゴンとGlucagon-like peptide (GLP)-1/2の相同性

グルカゴンは、膵島 α 細胞内でプログルカゴン (Proglucagon: PGCG) がProhormone convertase 2 (PC2) によってプロセッシングを受けることで生成される29アミノ酸残基のペプチドホルモンである (Figure 1-4A) [Rouillé et al., 1997; McGirr et al., 2013]。グルカゴンは、肝臓細胞に発現するGsタンパク質共役型受容体であるグルカゴン受容体に結合することで細胞内cAMPを上昇させ、グリコーゲン分解・糖新生の促進を介して生体内の血糖上昇を促すことが知られている。それに加えて、脳、腸、脂肪組織などにも作用することで、満腹中枢の刺激、腸管運動の抑制、脂肪分解を促進する [Bankir et al., 2016; Taleb et al., 2017]。グルカゴンは、動物種を超えて非常に高い保存性を持っており、ヒト・ウシ・ブタ・マウス・ラットでアミノ酸配列が完全に同一である。また、プログルカゴンに含まれるGLP-1/2ほぼ同一配列であることから、これらのペプチドホルモンは動物種を超えて普遍的な役割を果たしてきたと考えられる (Figure 1-5B, C)。

また、プログルカゴンは、腸管L細胞や胃細胞にも発現しており、L細胞に発現するProhormone convertase 1/3 (PC1/3) によってプロセッシングを受けることでGlicentinやGLP-1/2を生成する [Rouillé et al., 1997] (Figure 1-5A)。このGLP-1/2は、グルカゴン分泌の抑制とインスリン分泌促進作用を有しているため、グルカゴンと相反する血糖降下作用を持つ [Drucker, 2006]。グルカゴンは、肝臓、腎臓、血中においてセリン・システインプロテアーゼであるDPP-4などの酵素による分解を受けるため、その半減期は3~4分と非常に短い。また、グルカゴンとGLP1/2はアミノ酸配列の相同性が高く、そのプロセッシングによるグルカゴン生成過程でGLP-1/2だけでなく、それらを含むMajor proglucagon fragment (MPGF) など複数のプロセッシング産物が生成される。そのため、グルカゴンのみを認識する抗体はなく、特異的な検出が困難である (Figure 1-5B, C)。現在、グルカゴンの定量には、グルカゴンのN末とC末を認識する2種類の抗体を用いたサンドイッチ法によるELISA法が汎用されているが、時間と手間がかかるという問題点があるため [Wewer et al., 2014]、より簡便な手法が望まれている。

(C) グルカゴンとGLP-1/2のアミノ酸の相同性。3種のペプチドで完全一致するアミノ酸を赤、グルカゴンと一致するアミノ酸を青で示した。

I-1-6. 接着分子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1)

接着分子CADM1 (TSLC1、RA175、Necl-2、SgIgSF、SynCAM1) は、同時期に複数の研究グループで同定されたため、様々な名称がつけられていたが、2006年に名称がCADM1に統一された [Kuramochi et al., 2001; Urase et al., 2001; Wakayama et al., 2001; Shingai et al., 2003; Biederer et al., 2002]。CADM1のmRNAの発現はほぼ全ての臓器で認められ、多様な機能を持つことが示唆されている。CADM1は、442アミノ酸から成る一回膜貫通型タンパク質で、細胞外に免疫グロブリン様ループを3つ、細胞内にアクチン結合タンパク質である4.1タンパク質との結合配列、膜結合型グアニル酸シクラーゼとの結合ドメインであるPDZタイプIIモチーフを有している (Figure 1-6) [Yageta et al., 2002; Murakami et al., 2014]。CADM1は、細胞膜上でホモ二量体を形成し、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 非依存的に隣接する細胞のCADM1と同種親和性に、または、nectin-3、nectin-like molecule (Necl)-1、Necl-5、class-I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM) と異種親和性に結合して細胞間接着に寄与することが知られている [Chan et al., 2012; Rikitake et al., 2012]。

膵島細胞におけるCADM1の発現は、マウスでは α 細胞膜上に特異的にみられるが、ヒトでは α 細胞のみならず他の膵島細胞にも発現している (Figure 1-7)。その機能の多くは未だ不明なままであるが、CADM1遺伝子欠損マウスから単離した膵島を用いた研究では、CADM1が膵島 α 細胞間のギャップジャンクション形成に関与し、グルカゴンの過剰分泌を抑制することが示唆された [Ito et al., 2012]。その一方で、CADM1の発現は、膵臓癌の中でもホルモン分泌が亢進している患者のグルカゴノーマで亢進しており [Ito et al., 2012]、またII型糖尿病患者の α 細胞で減少することが報告されている [Inoue et al., 2014]。このように、CADM1によって膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌が制御されることが示唆されているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。

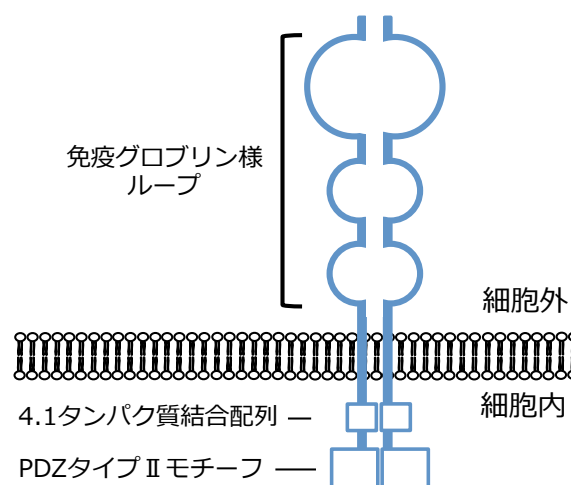


Figure 1-6. CADM1の模式図。細胞外領域に三つの免疫グロブリン様ループ、細胞内にアクチンと結合する4.1タンパク質の結合配列と細胞極性に関与する膜結合型グアニル酸シクラーゼと結合するPDZタイプIIモチーフを有する。細胞膜上でホモ二量体を形成し、隣接する細胞に発現するCADM1と同種親和性に、または、隣接する細胞のnectin-3、necl-1/5、CRTAMと異種親和性に結合する。

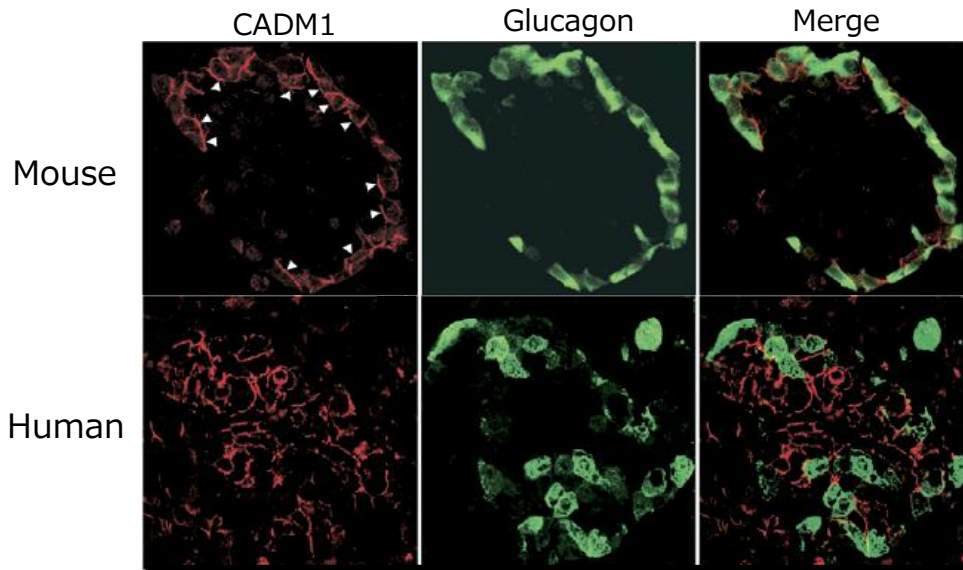


Figure 1-7. マウス・ヒトの膵島細胞における接着分子CADM1の分布。
 赤：CADM1、緑：グルカゴン。上段でマウス膵島の膵島におけるCADM1の分布を示している。マウス膵島細胞においてCADM1は α 細胞膜上に発現しているが、矢頭は α 細胞以外と他の膵島細胞の接着面においてCADM1が発現する部位を示している。下段はヒトの膵島におけるCADM1の分布を示している。マウスと比較して α 細胞が膵島内部にも存在しており、CADM1は α 細胞のみならず他の膵島細胞にも発現している。 [Koma et al., 2008]

I-1-7. 本研究の目的

開口放出に関する研究は、インスリンを分泌する膵島 β 細胞、神経伝達物質を分泌する神経細胞、炎症性メディエーターを分泌するマスト細胞を中心に行われてきた。特に、膵島 β 細胞のインスリン分泌に関する分子機構の研究は、糖尿病治療におけるインスリンの重要性の認識と共に活発に行われ、細胞の活性化から開口放出に至るまでの過程において非常に多くの知見が得られている。この中で、2光子励起顕微鏡や全反射蛍光（TIRF: Total internal reflection fluorescence）顕微鏡を用いた蛍光イメージングは、開口放出に関する様々な分子機構を明らかにし、さらに細胞間相互作用が膵島細胞のホルモン分泌の分子機構に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、膵島 α 細胞のグルカゴン分泌機構に関する研究は、グルカゴンを特異的に認識する抗体がないことから、グルカゴン顆粒の形成から開口放出に至るまでを追究した研究が少なく、その知見は乏しい。特に、膵島 α 細胞間接着が開口放出に及ぼす影響に関する研究は適切な手段がなかったため行われてこなかった。

本研究では、分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法を用いることで膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌の相対定量測定系及び可視解析系の構築を目指した。さらに、グルカゴン分泌制御に関与するとされる接着分子CADM1に着目し、高速で空間的断面を解析可能なニポウディスク方式共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、細胞間接着を介した膵島 α 細胞の細胞内顆粒動態を明らかにすることで細胞接着を介した膵島 α 細胞のグルカゴン分泌機構の解明を目指した。

第II章 PGCG-GLaseをレポーターとするグルカゴン分泌解析

: 生物発光イメージング法による相対定量的可視化と細胞接着の役割

II-1. 緒言

グルカゴンの機能に関する研究は数多く行われているが、膵島 α 細胞からのグルカゴンの分泌機能の研究は未だ乏しくその詳細は未だ不明であり、グルカゴン分泌を可視化した例はない。そのため、「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」を用いてグルカゴンの可視化解析系を構築し、その分泌挙動を明らかにすることを試みた。

II-1-1. ガウシアルシフェラーゼ

ガウシアルシフェラーゼ (*Gaussia Luciferase: GLase*) は、海洋カイアシ類の一種である *Gaussia princeps* 由来の分泌型ルシフェラーゼで、17アミノ酸残基からなる分泌シグナルペプチドと168アミノ酸残基からなるルシフェラーゼにより構成され、基礎研究で一般的に用いられているホタルルシフェラーゼ (550アミノ酸残基) やウミシイタケルシフェラーゼ (311アミノ酸残基) と比較して分子量が小さい。また、GLaseの一次構造は71個のアミノ酸の繰り返し配列を持ち、10個のCys残基を有する。それぞれの繰り返し配列のみでも発光触媒活性を示すが、高触媒発光活性には、両方の繰り返し配列を必要とする。還元剤処理により、発光活性は消失するため、分泌過程でCys残基間のS-S結合形成が必須であると考えられる。GLaseは、発光基質セレンテラジン (Coelenterazine) を添加することで最大波長488 nmの瞬間発光を示し (Figure 2-1)、哺乳類細胞で発現させた際の発光活性は、ホタルルシフェラーゼと比較して約500 - 1,000倍の強さを有しているため、生物発光イメージングのレポータータンパク質として用いるのに最適である [Tannous et al., 2005; Inouye et al., 2008]。

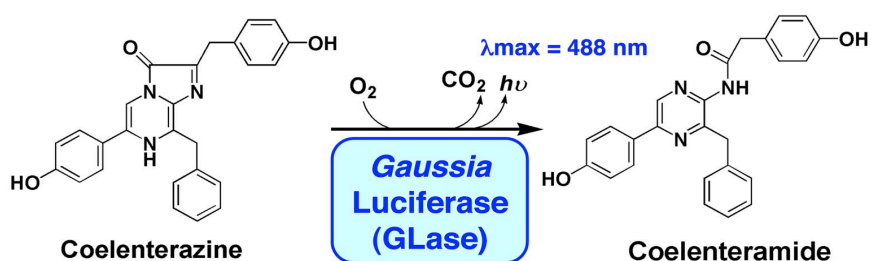


Figure 2-1.

発光酵素 *Gaussia Luciferase* による発光基質 Coelenterazine の酵素発光反応によって最大波長 488 nm の発光を示す。

II-1-2. ビデオレート生物発光イメージング法による可視化解析

本研究で用いた「分泌型タンパク質の生物発光イメージング法」の原理は、生細胞から分泌された目的タンパク質に付加したレポータータンパク質であるルシフェラーゼ(発光酵素)が培養液に加えたルシフェリン(発光基質)と酵素反応で生じる微弱な発光シグナルを高感度カメラ搭載発光顕微鏡によって捉える手法である (Figure 2-2A) [Inouye et al. 1992]。しかし、当時使用された分泌型ウミホタルルシフェラーゼはコドン最適化の問題に起因した発光量不足の問題や連続発光を示すために分泌タンパク質のイメージングに向かない等の問題があり、また当時の記録媒体の処理能力の低さなどの理由から開口分泌イメージングへの応用はほとんど行われなかった。一方、1994年以降の緑色蛍光タンパク質(GFP: Green fluorescent protein)などを用いた蛍光イメージング法の発達により、全反射蛍光(TIRF)顕微鏡や2光子励起顕微鏡による開口分泌イメージングが主流となって分泌機構の研究が行われてきた。しかし、近年、GLaseの応用とカメラ感度の向上により、生物発光イメージングによる分泌タンパク質動態の可視化解析が可能となった [Suzuki et al., 2007, 2011a, 2011b, 2014]。

開口分泌のイメージング法としては、主にTIRFと2光子励起顕微鏡が用いられている。TIRFは、レーザー光をガラス面に全反射させた際に生じるエバネッセンス光を用いてガラス接着面から100-500 nmまでの領域(細胞膜直下)を励起することが可能であるため、開口分泌に加えて細胞膜直下の顆粒動態を測定することが可能である。2光子励起顕微鏡は、蛍光物質に通常より長波長の光子を同時に2つ当てることで蛍光物質を励起する手法である。長波長であるため、測定対象の深部2 mm程度まで観察することができ、レーザー照射による生体への毒性も抑制できるため、マウスの神経活動などを生きた状態で観察することができる [Kobat et al., 2011]。また、細胞間隙に蛍光物質を流入させることにより開口分泌中の顆粒小胞の形態観察が可能である。一方で、生物発光イメージング法では細胞外に分泌されたタンパク質を特異的に検出して可視化することができるため、発光強度から分泌タンパク質の相対的定量解析が可能であり、また全細胞膜を観察対象とすることができるため分泌部位の局在解析にも利用できる (Figure 2-3)。また、タイムラプスイメージングとは異なり、ビデオレートイメージングは、30 ~ 500 msecの露光時間で連続撮影を行うことで、イメージング中に分泌されたほとんど全ての発光を捉えることができるため (Figure 2-2B)、細胞間隙に分泌タンパク質が拡散する様子を明確に観察することができる。さらに、発光イメージング法は、蛍光イメージングと異なり、励起光照射による光毒性がなく、生細胞における長時間の観察が可能である。このような背景から本研究では、GLaseと水冷式EM-CCDカメラ搭載顕微鏡を用いて、開口分泌イメージング解析を行った。

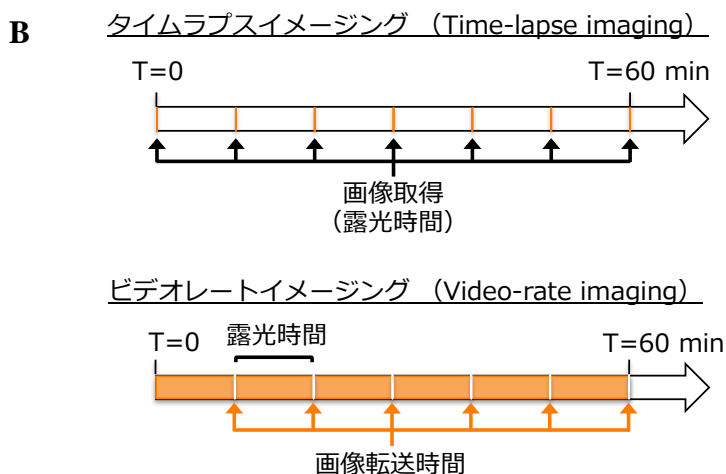
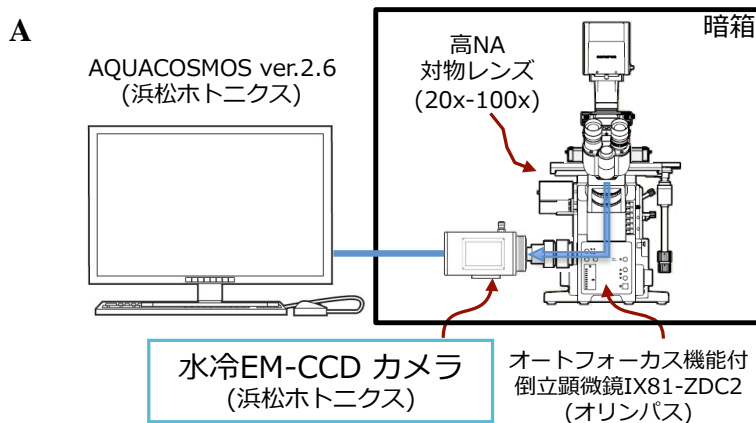


Figure 2-2. 生物発光イメージングの概略図。

A)発光イメージング装置模式図。簡易暗箱中に設置した水冷式EM-CCDカメラ搭載顕微鏡によって捉えた発光シグナルを画像解析ソフトAQUACOSMOSによって解析する。

B)タイムラプスイメージングとビデオレートイメージングの概略図。ビデオレートイメージングでは、露光時間を30～500 msec/frame に調節することができ、また転送時間による非露光時間が 1.712 msec/frame と極めて短いため、細胞の分泌により生じる発光をほぼ全て捉えることが可能である。

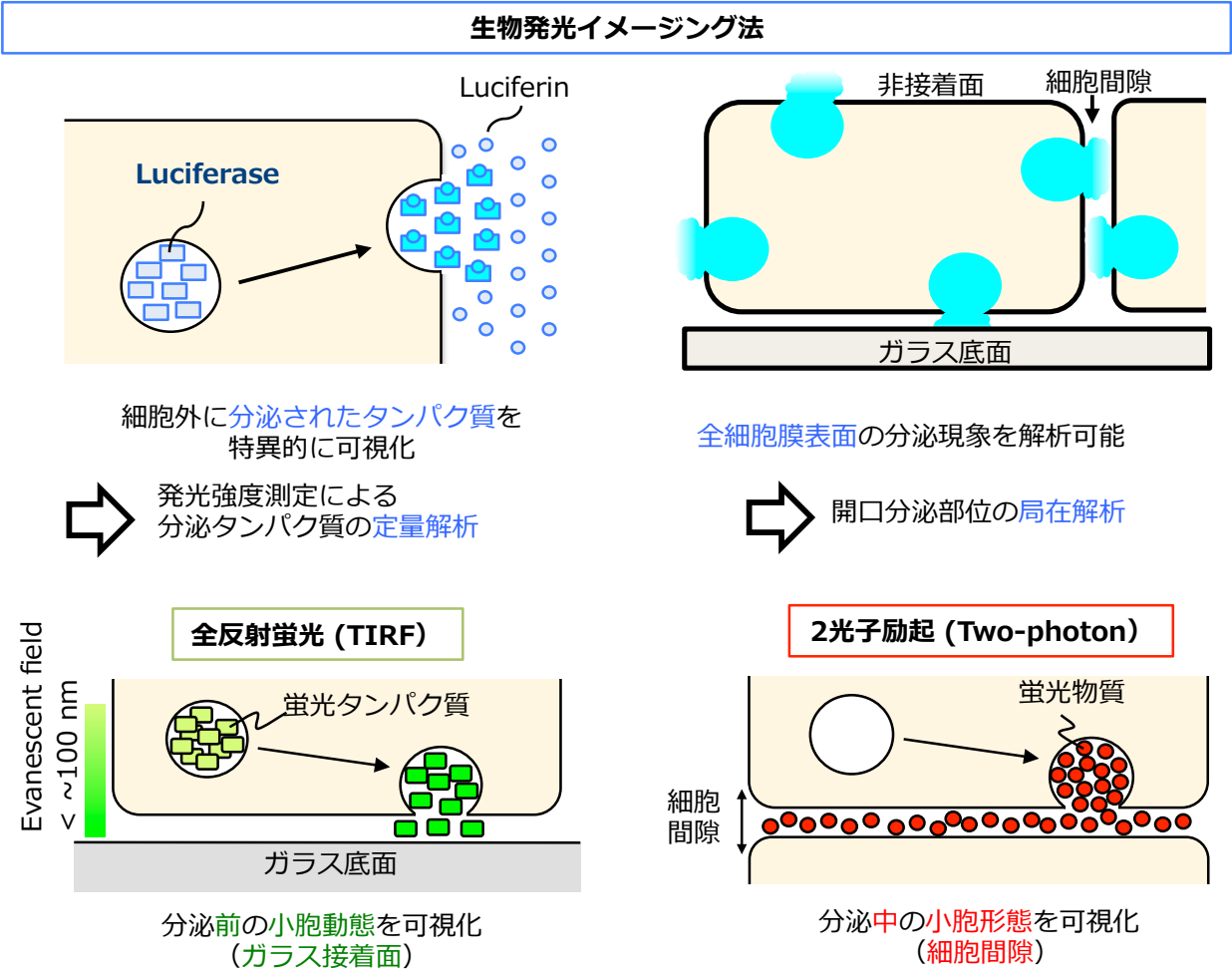


Figure 2-3. 開口分泌のイメージング法（生物発光イメージング法、全反射顕微鏡、2光子励起顕微鏡）の特徴。生物発光イメージング法は、分泌されたルシフェラーゼと培養液に加えたルシフェリンの酵素反応によって生じる発光を測定する。さらに、他のガラス接着面だけでなく、細胞間隙や非接着面の分泌現象を観察することが可能である。一方で、広く用いられている全反射顕微鏡では、開口分泌のみならず、ガラス接着部位において分泌前の小胞動態を観察することができる。また、2光子励起顕微鏡では、細胞外液に蛍光物質を添加することにより、細胞間隙における蛍光の観察ができるため、開口分泌に加えて分泌中の小胞形態を可視化することができる。

II-1-3. 生物発光イメージング法を用いたグルカゴンイメージング

本研究では、グルカゴンの分泌を可視化するため、「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」を用いて膵島 α 細胞から分泌されるプログルカゴン可視化した。

膵島 α 細胞のグルカゴン生成の詳細なメカニズムは明らかになっていないが、前駆体ペプチドであるプログルカゴンがトランスゴルジネットワークから分泌顆粒へ封入される際にカルボキシペプチダーゼEと結合することで顆粒内に封入され、さらに顆粒内でPC2によってプロセッシングを受けることにより生成されることが示唆されている [McGirr et al., 2013; Guizzetti et al., 2014]。そのため、グルカゴンとMPGFは同一顆粒内に封入されていると考えられる。グルカゴンのプロセッシング経路に影響を与えず、グルカゴンと同様の分泌挙動を示すレポータータンパク質としてプログルカゴンのC末にGLaseを付加した融合タンパク質

(PGCG-GLase) を発現させるベクターを作製した。このPGCG-GLase発現ベクターを α 細胞に導入し、PGCG-GLase融合タンパク質を顆粒内に封入させた。細胞外からの低グルコース・KCl脱分極刺激による細胞内シグナル伝達を介してグルカゴン顆粒の開口放出を促し、分泌された融合タンパク質に付加した発光酵素と培養液に加えた発光基質の酵素反応により生じる発光を測定することで、グルカゴン分泌の生物発光イメージングを試みた (Figure 2-4)。

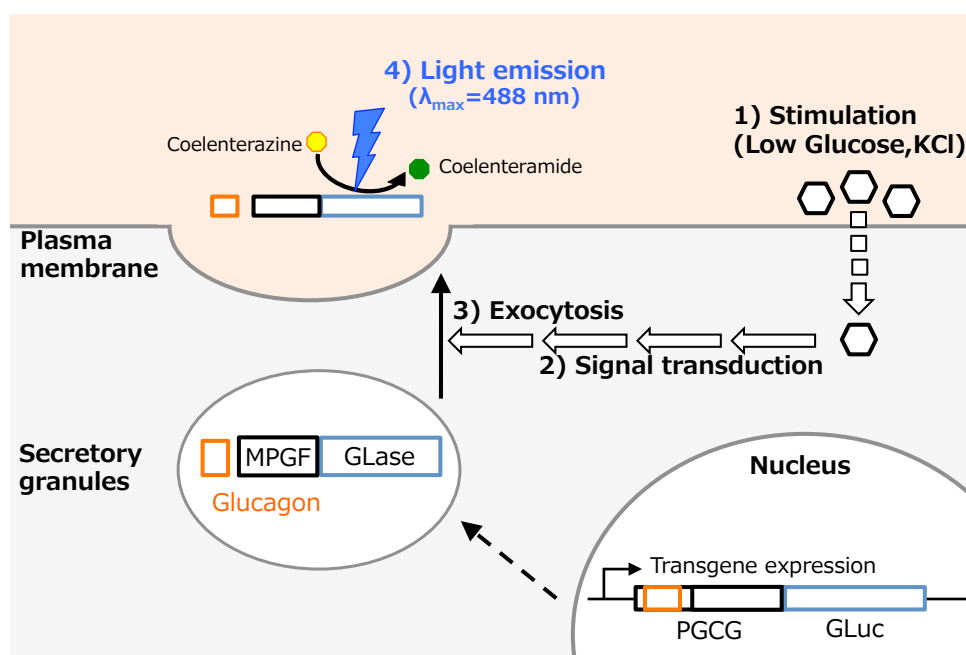


Figure 2-4. 生物発光イメージング法によるグルカゴン分泌の可視化。

PGCG-GLase融合タンパク質発現ベクターを α 細胞に導入し、融合タンパク質を発現させた。そして、細胞外からの刺激に伴う細胞内シグナル伝達を介して開口放出が行われ、細胞外に分泌されたプログルカゴンに付加した発光酵素と細胞外に添加された発光基質の酵素発光反応によって生じた光を捉えることでグルカゴン分泌の測定を試みた。

II-2. 材料と方法

II-2-1. 使用試薬

セレンテラジンは、JNCより購入した。

II-2-2. プラスミド作製

分泌シグナルペプチド (GLsp: GLase-signal peptide) とガウシアルシフェラーゼ (GLase: *Gaussia Luciferase*) を含むGLsp-GLaseを発現させるためにCMVプロモーターによって発現が調節されるプラスミドベクターに*Gaussia princeps*由来野生型GLase遺伝子 (*wGLuc*: wild type *GLuc*)、一般的に使用されているヒトコドン最適化GLase遺伝子 (*hGLuc*: human codon optimized *GLuc*; Prolume)、Preferred法を用いてヒトコドンに最適化したGLase遺伝子 (*pGLuc*: preferred human codon optimized *GLuc*) を挿入した3種のpcDNA3-*wGLuc*, pcDNA3-*hGLuc*, pcDNA3-*pGLuc*を用いた [Inouye et al., 2015]。

プログルカゴン (PGCG) のC末にガウシアルシフェラーゼを付加したPGCG-GLase融合タンパク質を発現させるため、以下の手順で4つのPGCG-GLase発現プラスミドベクターを作製した。

1) pcDNA3-*wPGCG-hGLuc*: ヒトプログルカゴン遺伝子 (Clone ID:3950435, DNAFORM) を購入し、KOD-Plus DNA Polymerase (Toyobo) と下記プライマーを用いてPCR (25サイクル、96°C15秒、55°C15秒、68°C45秒) により遺伝子を増幅した。*HindIII*と*BamHI*で制限酵素処理を行い、増幅した*wPGCG*断片をpcDNA3-*hGLuc-N*ベクターに組み込むことで、pcDNA3-*wPGCG-hGLuc*ベクターを得た。

wPGCG-HindIII-F (5' ccc AAGCTT GCCACC ATG AAA AGC ATT TAC TTT GTG GCT 3')

wPGCG-BamHI-R (5' tct GGATC CTT CCT GTC AGT GAT TTT GGT CTG 3')

2) pcDNA3-*wPGCG-pGLuc*: pcDNA3-*wPGCG-hGLuc* を*HindIII*と*BamHI*で制限酵素処理して*wPGCG* cDNA断片を得て、*HindIII*と*BamHI*で制限酵素処理したpcDNA3-*pGLuc-pN*ベクターに組み込むことで、pcDNA3-*wPGCG-pGLuc*ベクターを得た。

3) pcDNA3-*pPGCG-hGLuc*: Preferred法によるヒトプログルカゴン遺伝子 (*pPGCG*) の設計については、Sequence Manipulation SiteのSequence Analysis (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) とかずさDNA研究所のヒトコドン発現頻度分布表 (Table 2, 3, <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606&aa=1&style=GCG>) を用いてヒトプログルカゴンのアミノ酸配列から逆翻訳を行い遺伝子配列を決定した (Figure 3-5)。*pPGCG*の遺伝子配列にコザック配列 (GCCACC) と*HindIII*と*BamHI*を付加し、人工遺伝子合成 (Eurofins Genomics) を行った。*HindIII*と*BamHI*で制限酵素処理を行い、*pPGCG*断片をpcDNA3-*hGLuc-N*ベクターに組み込むことで、pcDNA3-*pPGCG-hGLuc*ベクターを得た。

4)pcDNA3-*pPGCG-pGLuc*: 人工合成した*pPGCG*について、*HindIII*と*BamHI*で制限酵素処理を行い、*pPGCG*断片をpcDNA3-*pGLuc-pN*ベクターに組み込むことで、pcDNA3-*pPGCG-pGLuc*ベクターを得た。

```

      M K S I Y F V A G L F V M L V Q G S W Q      (20)
wPGCG ATGAAAAGCATTACTTTGTGGCTGGATTATTTGTAATGCTGGTACAAGGCAGCTGGCAA
pPGCG ATGAAGAGCATCTACTTCGTGGCCGGCCTGTTCTGTGATGCTGGTGCAGGGCAGCTGGCAG
*****
      R S L Q D T E E K S R S F S A S Q A D P      (40)
wPGCG CGTTCCCTTCAAGACACAGAGGAGAAATCCAGATCATTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCA
pPGCG AGAAGCCTGCAGGACACCGAGGAGAAGAGCAGATCCTTCAGCGCCAGCCAGGCCGACCCC
      *      *** ** ***** ***** ***** ** ***** *****
      L S D P D Q M N E D K R H S Q G T F T S      (60)
wPGCG CTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACAAGCGCCATTCACAGGGCACATTCACCAGT
pPGCG CTGAGCGACCCCGACCAGATGAACGAGGACAAGAGACACAGCCAGGGCACCTTCACCAGC
** ** ** ** * ***** ***** * ** ***** *****
      D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N      (80)
wPGCG GACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAAGATTTTGTGAGTGGTTGATGAAT
pPGCG GACTACAGCAAGTACCTGGACAGCAGAAGAGCCCAGGACTTCGTGAGTGGCTGATGAAC
***** ***** *** * ***** ** ** ***** *****
      T K R N R N N I A K R H D E F E R H A E      (100)
wPGCG ACCAAGAGGAACAGGAATAACATTGCCAAACGTCACGATGAATTTGAGAGACATGCTGAA
pPGCG ACCAAGAGAAACAGAAACAACATCGCCAAGAGACACGACGAGTTCGAGAGACACGCCGAG
***** ***** ** ***** ***** * ***** ** ** ***** ** **
      G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I      (120)
wPGCG GGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATT
pPGCG GGCACCTTCACCAGCGACGTGAGCAGCTACCTGGAGGGCCAGGCCGCCAAGGAGTTCATC
** ***** ***** ** ** * ** ***** ***** ** ***** *****
      A W L V K G R G R R D F P E E V A I V E      (140)
wPGCG GCTTGGCTGGTGAAGGCCGAGGAAGGCCGAGATTTCCAGAAGAGGTGCCATGTTGAA
pPGCG GCCTGGCTGGTGAAGGCCAGAGGCAGAAGAGACTTCCCCGAGGAGGTGGCCATCGTGGAG
** ***** ***** ** ** * ** ***** ***** ** ***** ***** ** **
      E L G R R H A D G S F S D E M N T I L D      (160)
wPGCG GAACTTGGCCGAGACATGCTGATGGTTCTTTCTCTGATGAGATGAACACCATTCTTGAT
pPGCG GAGCTGGGCAGAAGACACGCCGACGGCAGCTTCAGCGACGAGATGAACACCATCCTGGAC
** ** *** * ***** ** ** * ** ***** ** ***** ***** ** **
      N L A A R D F I N W L I Q T K I T D R K      (180)
wPGCG AATCTTGCCGCCAGGGACTTTATAAACTGGTTGATTGAGACCAAATCACTGACAGGAAG
pPGCG AACCTGGCCGCCAGAGACTTCATCAACTGGCTGATCCAGACCAAGATCACCGACAGAAAG
** ** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** **

```

Figure 2-5. 野生型ヒトプログルカゴン遺伝子 (*wPGCG*) とPreferred法で作成したプログルカゴン遺伝子 (*pPGCG*) の相同性。*wPGCG*と*pPGCG*は76%の相同性であった。下線部はPreferred法による遺伝子最適化によってHindIII配列 (AGAAGC TTC) となったため、同程度の発現頻度をもつTTCに置換した。

Table 2. 動物種によるコドン発現頻度の比較。最も発現頻度の高いコドンを青で示した。本研究では、Humanのコドン発現頻度に合わせることで発現頻度の低い（レアコドン）を避けて遺伝子配列を決定した。

amino acid	codon	1000コドンに含まれるコドン数			amino acid	codon	1000コドンに含まれるコドン数		
		mouse	rat	human			mouse	rat	human
G	GGC	21.20	21.86	22.22	T	ACC	18.96	19.72	18.89
	GGG	15.17	15.56	16.47		ACA	15.96	15.26	15.11
	GGA	16.77	16.61	16.47		ACT	13.66	12.95	13.12
	GGT	11.43	11.38	10.75		ACG	5.63	6.19	6.05
A	GCC	26.00	27.15	27.73	C	TGC	12.28	11.85	12.62
	GCT	20.02	19.69	18.45		TGT	11.40	9.80	10.58
	GCA	15.84	15.64	15.82	Y	TAC	16.06	17.07	15.31
	GCG	6.40	6.86	7.37		TAT	12.17	11.60	12.19
V	GTG	28.38	30.00	28.12	N	AAC	20.35	21.71	19.10
	GTC	15.40	16.21	14.46		AAT	15.58	15.07	16.96
	GTT	10.70	10.35	11.03	Q	CAG	34.09	33.77	34.23
	GTA	7.45	7.17	7.08		CAA	11.96	11.08	12.34
L	CTG	39.52	41.06	39.64	D	GAC	26.03	28.01	25.10
	CTC	20.18	20.35	19.59		GAT	20.99	20.94	21.78
	CTT	13.44	12.51	13.19	E	GAG	39.37	41.30	39.59
	TTG	13.44	12.78	12.93		GAA	26.96	26.90	28.96
	TTA	6.73	5.94	7.67	K	AAG	33.64	35.13	31.86
	CTA	8.07	7.59	7.15		AAA	21.92	21.49	24.44
I	ATC	22.51	24.37	20.82	R	AGA	12.11	11.17	12.17
	ATT	15.40	15.29	16.00		AGG	12.21	11.80	11.96
	ATA	7.36	6.91	7.49		CGG	10.22	10.90	11.42
M	ATG	22.82	23.14	22.04		CGC	9.36	9.81	10.42
	TTC	21.82	23.14	20.28		CGA	6.58	6.76	6.17
F	TTT	17.21	16.54	17.57		CGT	4.68	4.98	4.54
	TGG	12.50	13.17	13.17	H	CAC	15.31	14.90	15.09
P	CCC	18.21	18.00	19.80		CAT	10.62	9.55	10.86
	CCT	18.37	17.38	17.50	STOP	TGA	1.64	1.17	1.60
	CCA	17.27	16.10	16.90		TAA	0.95	0.64	1.00
	CCG	6.18	6.26	6.90		TAG	0.78	0.52	0.80
S	AGC	19.69	19.19	19.46					
	TCC	18.10	17.80	17.68					
	TCT	16.23	14.78	15.22					
	TCA	11.81	10.95	12.21					
	AGT	12.69	11.84	12.13					
	TCG	4.23	4.36	4.41					

Table 3. コドンの発現頻度と Proglucagon (*w, p*)、*Gaussia* Luciferase (*w, h, p*) 遺伝子に含まれるコドン数。Preferred法で作成した遺伝子は、灰色で示したコドンを使用した。

Amino acid	Codon	Human codon usage		Proglucagon (PGCG)		<i>Gaussia</i> luciferase (GLase)		
		(/1000)	ratio	w	p	w	h	p
G	GGC	22.2	0.337	5	9	2	9	16
	GGA	16.5	0.250	2	0	9	2	0
	GGG	16.5	0.250	1	0	1	4	0
	GGT	10.8	0.163	1	0	5	9	1
A	GCC	27.7	0.400	6	13	6	10	17
	GCT	18.5	0.266	6	0	9	3	1
	GCA	15.8	0.228	1	0	3	2	0
	GCG	7.4	0.106	0	0	0	3	0
V	GTG	28.1	0.463	3	8	4	7	0
	GTC	14.5	0.238	1	0	0	3	11
	GTT	11.0	0.182	1	0	3	1	0
	GTA	7.1	0.117	3	0	4	0	0
L	CTG	39.6	0.396	3	12	3	9	16
	CTC	19.6	0.196	1	0	4	4	0
	CTT	13.2	0.132	4	0	4	1	0
	TTG	12.9	0.129	3	0	2	2	0
	TTA	7.7	0.077	1	0	2	0	0
	CTA	7.2	0.071	0	0	1	0	0
I	ATC	20.8	0.470	10	8	2	10	13
	ATT	16.0	0.361	6	0	8	2	0
	ATA	7.5	0.169	1	0	3	1	0
M	ATG	22.0	1.000	5	5	4	4	4
F	TTC	20.3	0.536	5	11	2	5	7
	TTT	17.6	0.464	6	0	5	2	0
W	TGG	13.2	1.000	4	4	1	1	1
P	CCC	19.8	0.324	0	3	3	4	9
	CCT	17.5	0.287	1	0	2	2	0
	CCA	16.9	0.277	2	0	4	1	0
	CCG	6.9	0.113	0	0	0	2	0
S	AGC	19.5	0.240	3	16	2	2	4
	TCC	17.7	0.218	4	1	0	2	0
	TCT	15.2	0.188	3	0	1	1	0
	TCA	12.2	0.151	3	0	1	0	0
	TCG	12.1	0.054	0	0	0	0	0
	AGT	4.4	0.150	4	0	1	0	1
T	ACC	18.9	0.355	6	9	1	5	9
	ACA	15.1	0.284	2	0	3	1	0
	ACT	13.1	0.247	1	0	4	1	0
	ACG	6.1	0.114	0	0	1	2	0
C	TGC	12.6	0.544	0	0	5	7	11
	TGT	10.6	0.456	0	0	6	4	0
Y	TAC	15.3	0.557	2	4	0	1	1
	TAT	12.2	0.443	2	0	1	0	0
N	AAC	19.1	0.530	5	8	3	5	6
	AAT	17.0	0.470	3	0	3	1	0
Q	CAG	34.2	0.735	5	10	1	6	7
	CAA	12.3	0.265	5	0	6	1	0
D	GAC	25.1	0.535	7	16	6	9	12
	GAT	21.8	0.465	9	0	6	3	0
E	GAG	39.6	0.578	6	13	3	9	12
	GAA	29.0	0.422	7	0	9	3	0
K	AAG	31.9	0.566	5	10	6	14	19
	AAA	24.4	0.434	5	0	13	5	0
R	AGA	12.2	0.215	3	16	2	0	5
	AGG	12.0	0.211	6	0	2	1	0
	CGG	11.4	0.201	0	0	0	1	0
	CGC	10.4	0.184	2	0	0	3	0
	CGA	6.2	0.109	2	0	0	0	0
	CGT	4.5	0.080	3	0	1	0	0
H	CAC	15.1	0.582	1	4	2	2	2
	CAT	10.9	0.418	3	0	0	0	0
*	TGA	1.6	0.467	0	0	0	0	0
	TAA	1.0	0.296	0	0	0	1	1
	TAG	0.8	0.237	0	0	0	0	0
		Total a.a		181	181	185	185	185
		GC contents		46.7	59.8	43.6	58.9	64.1

II-2-3. 細胞培養と遺伝子導入

マウス膵島 α 細胞モデルとして α TC1.6細胞をAmerican Type Culture Collection (ATCC) より購入した。細胞は、10%のFBS (Gibco) と100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えた25 mM グルコース含有ダルベッコ改変D-MEM培地 (Gibco) を用いて37 °C、5% CO₂存在下で培養した。遺伝子導入は、Lipofectamine LTXとPlus試薬 (Invitrogen) を用いて行った。PGCG-GLase安定発現 α TC1.6細胞は、pcDNA3-pPGCG -pGLuc遺伝子を導入し、G418 (0.4 mg/ml) で薬剤選択することにより樹立した。培養上清に含まれる発光活性量が高く、2.8 mM グルコースへの応答性がある細胞を選択することで α TC1.6^{PGCG-GLase}細胞 (clone No. 7) を樹立した。

II-2-4. GLaseとPGCG-GLase の発光活性測定

一過性にsiRNA及びPGCG-GLuc遺伝子を α TC1.6細胞に導入した際の発光活性変化は以下の手順で測定した。ポリ-D-リジンコート処理を施した24ウェルプレート (BD Bioscience) に α TC1.6細胞 (1×10^5 細胞/well) を播種し、48時間培養後に培地交換を行い0.5 μ g PGCG-GLase発現ベクターを導入した。遺伝子導入48時間後に培養上清を300 \times g、4°C、5分間遠心し細胞を除去した。5 μ g/ml セレンテラジン (50 μ l) に得られた上清 (1 μ l) を加えた際に得られた最大発光強度は、光電子倍增管 (R4220P; Hamamatsu Photonics) を搭載したルミノメーター (AB2200; ATTO) で測定した。

PGCG-GLaseの発光活性は以下の手順で測定した。ポリ-D-リジンコート処理を施した24ウェルプレートに α TC1.6^{PGCG-GLase}細胞 (1×10^5 細胞/well) で播種し、48時間培養した。細胞を20 mM グルコースを含むKRHB緩衝液で2回洗浄し、2.8 mM (低グルコース条件) または20 mMグルコース (高グルコース条件) を含むKRHB緩衝液に置換して37°Cで1時間静置した。KClによる脱分極刺激は、洗浄後に75.3 mM NaCl、50 mM KCl、20 mMグルコースを含むKRHB緩衝液に置換して37°Cで1時間静置した。得られた培養上清の発光活性測定は、上記の通り行った。

II-2-5. 免疫染色法

マトリゲルコートをしたFalcon 4 -well chamber slide (BD Bioscience) に α TC1.6^{PGCG-GLase}安定発現細胞 (5×10^4 細胞/well) を播種し48時間培養した。細胞を4%パラホルムアルデヒド/PBSで1時間固定処理を行い、0.1% Triton X-100/PBSで30分間可溶化処理を行った後、1% BSA/PBSで30分間ブロッキング処理を行い、一次抗体溶液を加え4°Cで一晩静置した。翌日、一次抗体を認識する二次抗体溶液を用いて3時間室温静置をおこなった。Alexa Fluor 488、546の蛍光シグナルは、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM-710 Meta; Carl Zeiss Microscopy) とZen software (Carl Zeiss Microscopy) を用いて検出した。

一次抗体の希釈率

Rabbit anti GLase polyclonal antibody (#401, Prolume) 1:1000

Mouse anti Glucagon monoclonal antibody (C-11, Santa Cruz) 1:200

二次抗体の希釈率

Alexa Fluor 488 標識 Goat anti mouse IgG antibody (A11008, Invitrogen) 1:2000

Alexa Fluor 546 標識 Goat anti rabbit IgG antibody (A11030, Invitrogen) 1:2000

II-2-6. ウェスタンブロッティング法

α TC1.6^{PGCG-GLase}安定発現細胞に発現するPGCG-GLaseを検出するため、ウェスタンブロッティングによるタンパク質検出を以下の手順で行った。ポリ-D-リジンコートをした6ウェルプレート (BD Bioscience) に 1×10^6 細胞/ウェルで播種し、48時間培養した。20 mMグルコースを含むKRHBで3回洗浄後、2.8 mM グルコースを含む500 μ l KRHBで1時間培養した。培養上清に含まれる融合タンパク質を検出するため、培地上清を全て回収後300 \times g、5分間4°Cで遠心し、細胞除去を行い4 \times LDS Buffer (Invitrogen) を添加して分泌サンプルとした。

細胞に含まれる融合タンパク質を検出するため、細胞をPBSで3回洗浄し、100 μ lのPassive Lysis buffer (Promega) を加え氷上で30分間静置した。さらに、15,000 \times g、10分間遠心し、BCA法によるタンパク定量を行い、4 \times LDS Bufferを加えて細胞サンプルとした。分泌、細胞サンプルを70°C、10分間加熱し、うち13 μ l を加えてSDS-PAGE (4-12% Bis-Tris gel, NuPAGE, Invitrogen) により分離し、PVDF膜 (Bio-rad) に転写した。PVDF膜は、5%スキムミルク/PBSで1時間ブロッキングした後、目的タンパク質に対する一次抗体中で4°C、一晚浸透した。抗体溶液を捨てた後、PVDF膜を0.1% Tween/PBSで洗浄した (10分間2回)。一次抗体に対するHRP標識する二次抗体溶液中で浸透した (3時間)。抗体溶液を捨てた後、PVDF膜を0.1% Tween/PBSで洗浄した (10分間2回)。Western chemiluminescence kit (Luminata Forte, Millipore) により目的タンパク質のシグナルをLAS-4000mini (Fujifilm) を用いて検出した。データはImage Gauge (Fujifilm) とImage Jを用いて解析した。

一次抗体の希釈率

Rabbit anti GLase polyclonal antibody (#401, Prolume) 1:1000

Mouse anti Glucagon monoclonal antibody (C-11, Santa Cruz) 1:200

二次抗体の希釈率

HRP 標識 Goat anti rabbit IgG antibody (NA9340V, GE Healthcare) 1:5000

HRP 標識 Goat anti mouse IgG antibody (NA9310V, GE Healthcare) 1:5000

II-2-7. 生物発光イメージング法の実施

生物発光イメージング法を用いた分泌タンパク質の可視化解析を行った。生物発光シグナルは、簡易暗箱中に組み立てられた顕微鏡ステージ自動温度制御システム (Tokai hit) と水冷式EM-CCDカメラ (ImagEM 1K, C9100-14モデル, 1024 \times 1024 pixels, pixel size = 13 μ m, Hamamatsu photonics) を搭載したIX81-ZDC2顕微鏡 (Olympus) で検出した。IX-81-ZDC2電動顕微鏡とEM-CCDカメラの接続部位 (C-マウントアダプター) には、電動制御用内部赤外光ランプを遮断するため赤外線除去フィルターを組み込み、対物レンズは、UPLSAPO 20 \times ドライレンズ (NA 0.75, Olympus) を用いて pixel size が650 nm \times 650 nmの条件で撮影を行った。発光活性シグナルデータは、AQUACOSMOSソフトウェア Ver.2.6 (Hamamatasuphotonics) を用いて露光時間 500 msec/frame、転送時間は1.712 msec/imageの条件下で取得した。発光強度の経時変化解析は、AQUACOSMOSソフトウェアを用いて解析した。

生物発光イメージング法による α TC6^{PGCG-GLase}細胞からのPGCG-GLase分泌の可視化は以下の手順で行った。 α TC6^{PGCG-GLase}細胞 (1×10^5 細胞 / dish) をポリ-D-リジンコートをした35-mmガラスボトムディッシュ (Mat-Tek) に播種し、20 mMグルコースを含むKRHBで3回洗浄し、

3 $\mu\text{g/ml}$ セレンテラジンと20 mMグルコースを含むKRHB 1 mlを加え顕微鏡のステージにセットした。焦点面を細胞とガラスの接着部位から2 μm の位置に合わせ、3分間連続撮影を行った。続いて、終濃度50 mM KClになるようにKRHBを加えKCl脱分極刺激を行った。

II-2-8. 統計処理

得られたデータは、平均 \pm 標準偏差で示した。KaleidaGraphを用いてOne way Anovaによる有意差検定を Bonferroni's multiple comparison testまたはunpaired t-testで行った。

II-3. 結果および考察

II-3-1. Preferred法による発光量変化

本研究で用いる「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」は、微弱な発光を検出するためルシフェラーゼの発光量が多い方がイメージングに有利である。そのため、ルシフェラーゼの発現量の増加を期待して遺伝子を構成するコドンに着目した。

ある生物において出現頻度が高いコドンは、出現頻度が低いコドン（レアコドン）に対して細胞内にアミノアシルtRNAが多く存在すると考えられ、レアコドンの出現率が低く、使用頻度の高いコドンで構成される遺伝子（cDNA）は、その生物において発現量が高くなることが知られている。一般的に哺乳類細胞における効率的な遺伝子発現を目指して人工遺伝子合成を行う際には、コドンの発現頻度に加えて、GC%、ATリッチ配列、リピート配列、翻訳後のmRNAの二次構造などを考慮した企業・研究室ごとの独自アルゴリズムによってコドン最適化を行い、遺伝子配列を決定している。しかし、これらのコドン最適化法の有効性については検証されておらず不明である。これに対して、出現頻度が高いコドン（codon usage table: <http://www.kazusa.or.jp/codon>, Table 2,3)のみを使用して遺伝子配列を決定する簡便なコドン最適化法であるPreferred human codon optimized method（Preferred法）が報告されている [Inouye et al. 2015, 2016]。コドンの発現頻度は動物種を越えてほぼ同一であり、ヒトにおいて出現頻度の高いコドンは、マウスやラットでも同様に高い発現頻度を示すことから、ヒトのコドン発現頻度を元に目的遺伝子を作成した。また、ヒトにおいて出現頻度が高いコドンは、3塩基目がGCであることが多く、Preferred法によるコドン最適化ではGC%が高くなり、発現に不利となるATリッチ配列は自動的に回避しながらレアコドンを含まない遺伝子をデザインすることができる。本実験では、レポータータンパク質についてPreferred法でコドン最適化した人工遺伝子合成を行い、その有効性について検証を行った。

はじめに、本研究で使用するルシフェラーゼレポータータンパク質*Gussia Luciferase*について、 α TC1.6細胞におけるコドン最適化を検討した。*Gussia princeps*由来の野生型ガウシアルシフェラーゼ遺伝子 (*wGLuc*: wild *GLuc*) [Byan et al., 1999] と市販の汎用ヒト最適化ガウシアルシフェラーゼ遺伝子 (*hGLuc*: human codon optimized *GLuc*) [Tannous et al., 2005]、Preferred法で作製したヒト最適化ガウシアルシフェラーゼ遺伝子 (*pGLuc*: preferred human codon optimized *GLuc*) [Inouye et al., 2015] の3種の遺伝子を α TC1.6細胞に一過性に導入し、その発光活性量を測定した [Byan et al., 1999; Tannous et al., 2005; Inouye et al., 2015]。その結果、*wGLuc*の発光量 (0.88×10^7 rlu / well) と比較して *pGLuc*の発光量 (30.60×10^7 rlu / well, *wGLuc*の34.8倍, $p = 0.0016$) は有意に増大し、*hGLuc*の発光量 (32.40×10^7 rlu / well, *wGLuc*の36.8倍, $p = 0.0011$) と同程度の値を示した (Figure 2-6C)。

次に、PGCG-GLase融合タンパク質の発現におけるPreferred法によるコドン最適化遺伝子の有効性について、検討を行った。ヒト野生型PGCG遺伝子 (*wPGCG*: wild type human PGCG) に対してPreferred法で作製したPGCG遺伝子 (*pPGCG*: preferred human codon optimized PGCG) と *hGLuc*、*pGLuc*を組み合わせることで、*wPGCG-hGLuc*、*wPGCG-pGLuc*、*pPGCG-hGLuc*、*pPGCG-pGLuc*遺伝子の4種の遺伝子を作製した。これらの遺伝子を α TC1.6細胞に一過性に導入して発光量を比較した。GLaseのみを発現させた場合と比較して、融合タンパク質を発現させた場合は発光量が減少しており、翻訳負荷によるタンパク質の発現量の減少によるものと考えられる。PGCG-GLase融合タンパク質間の発光量を比較すると *wPGCG-hGLuc*で 4.16×10^7 rlu / well、*wPGCG-pGLuc*で 6.28×10^7 rlu / well、*pPGCG-hGLuc*で 6.27×10^7 rlu / well、*pPGCG-pGLuc*で 9.16×10^7 rlu / wellとなり、PGCGとGLaseの両者をPreferred法で作製した *pPGCG-pGLuc*遺伝子による発光活性量が最も高く、*wPGCG-hGLuc*遺伝子と比較して2.2倍の

有意な発光活性量の増大を示した ($p=0.007$, Figure 2-6D)。これらの結果より、Preferred法によりコドン最適化を行った人工合成遺伝子pPGCG-pGLucを用いることで、 α TC1.6細胞株におけるPGCG-GLaseの発現量が増大することが明らかとなった。これまで、COS-1、293、HeLa、ヒト歯肉線維芽細胞 (Gin-1) などの細胞株でhGLucに対してpGLucが最大2倍程度、発現量を増大させることが示されている [Inouye et al., 2015]。蛍光を用いたイメージング法では、レーザーの出力によって蛍光強度を変化させることが可能であるが、発光を用いた生物発光イメージング法では、可視化に必要な発光量はルシフェラーゼの発現量に依存する。Preferred法を用いることで融合タンパク質の発現量が約2倍に増大することにより、生物発光イメージング法で従来観察できなかった分泌現象の微細な変化をより明確に捉えることが可能になると考えられる。本研究の結果は、ヒト由来の遺伝子とGLaseの融合タンパク質の発現において、Preferred法が有効であることを初めて示したものであり、今後Preferred法が各種細胞への効率的なタンパク質発現にPreferred法を用いることができると期待される。また、Preferred法によるコドン最適によるタンパク質発現量増大の機序は、コドンごとの細胞内アミノアシルtRNA量に違いがあるためと考えられるが、詳細は不明であり、今後の研究によって明らかになることが期待される。

II-3-2. 細胞外からの刺激によるPGCG-GLase分泌

グルカゴンは、先に述べたようにGLP-1やGLP-2とのアミノ酸の相同性が高いため、グルカゴンを定量化するためには、グルカゴンのN末、C末をそれぞれ認識する抗体を用いたサンドイッチ法によるELISA法が必要である [Wewer et al., 2014]。しかし、ELISA法はサンプル取得から定量結果を出すまでに半日ほどかかり、高価なキットを必要とする。さらに、グルカゴンはプロテアーゼによる分解を受けやすいため (生体内での半減期は5分未満)、サンプルの調製も非常に困難であり、再現性を得るためには高い手技能力が必要となる。一方で、ルシフェラーゼをレポータータンパク質とした発光解析では、必要な機器は汎用機器であるルミノメーターを用いることで可能であり、発光基質を購入するだけでアッセイが可能である。解析に必要な経費はELISA法と比較して安価で、解析に必要な時間は十数分以内であり、シングルチューブを用いたアッセイではサンプルの培養上清1 μ lを発光基質溶液に添加して数秒で測定でき、実験手技が容易である。そのため、膵島 β 細胞からのインスリン分泌などの薬物スクリーニング [Suzuki et al., 2011a; Burns et al., 2015; Kalwat et al., 2016] にも用いられており、インスリン分泌に関する研究に貢献している。同様にグルカゴンの分泌をルシフェラーゼによって測定できるようになれば、膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌に関する研究のみならず、膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌抑制を対象とした糖尿病治療薬の薬物スクリーニングへの応用も期待でき、糖尿病治療薬の研究に大きく貢献できると考えられる。

PGCG-GLase融合タンパク質をレポーターに用いた発光活性測定が、細胞外からの刺激によるグルカゴン分泌量の相対的定量解析に利用可能か検討を行った。膵島 α 細胞のグルカゴン分泌の制御は以下の機構で行われることが知られている。高グルコース条件下では細胞外のグルコースがGLUT2を介して α 細胞内に移行し、細胞内で糖代謝を受ける。細胞内でのグルコース代謝に伴い細胞内ATP/ADP比が増大し、細胞膜においてATP感受性K (K_{ATP}) チャネルの閉口 [MacDonald et al., 2007] に続いて、電位依存性 Na^+ チャネルの不活化することで活動電位幅が減少し、P/Q型電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性が低下するため、グルカゴン顆粒の分泌は抑制される (Figure 2-7)。一方で、低グルコース条件下では、GLUT2を介して細胞内に移行するグルコース量が減少することでATP/ADP比が低下して、 K_{ATP} チャネルの低活性により適度に脱分極することで、電位依存性 Na^+ チャネルの活性化に続いてP/Q型電位依存性

Ca²⁺チャネルが活性化し、グルカゴン顆粒の分泌は促進されると考えられる。従って、高濃度KCl脱分極刺激は、α細胞の膜電位の脱分極を強制的に引き起こすことでグルカゴン分泌を上昇させると考えられる [Zhang et al., 2013]。そこで、αTC1.6細胞にpPGCG-pGLuc遺伝子を一過性に導入し、グルカゴン分泌抑制条件である20 mM 高グルコース刺激、またはグルカゴン分泌刺激条件である2.8 mMグルコースと50 mM KCl脱分極刺激を37°Cで一時間行い、培養上清1 μlから発光量を測定した。その結果、20 mMグルコース (58.56 × 10⁶ rlu / well) と比較して、2.8 mMグルコース (125.05 × 10⁶ rlu / well) と50 mM KCl (127.16 × 10⁶ rlu / well) 条件下の発光量はそれぞれ2.12倍 (p=0.017)、2.19倍 (p=0.014) と有意に増加した (Figure 2-8)。これは、同条件で行われたELISA法によるグルカゴン分泌の増加 [Nakamura et al., 2014] と同程度であった。

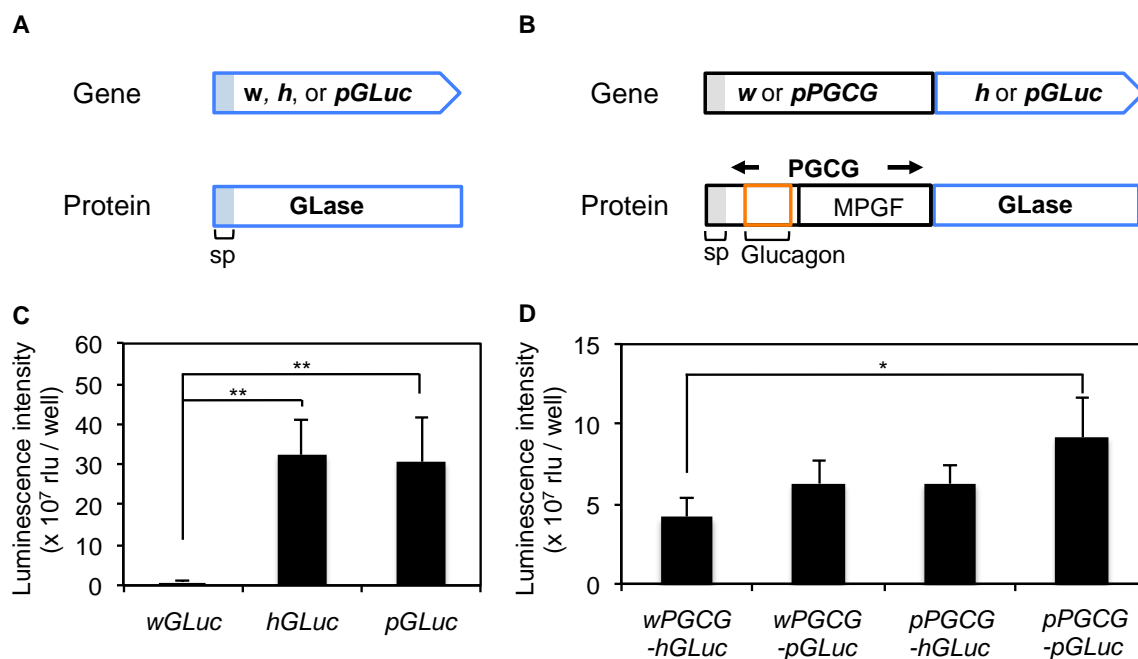


Figure 3-6. Preferred法による発光活性量の変化。

(A) GLuc遺伝子模式図。(B) PGCG-GLuc遺伝子の組み合わせ模式図。(C) 導入GLucによる発光活性量の違い。(D) 各遺伝子の組み合わせによるPGCG-GLase発光活性量の変化。n=4、mean ± SD、*p<0.05 (vs. hPGCG-hGLuc)、**p<0.01 (vs. wGLuc)

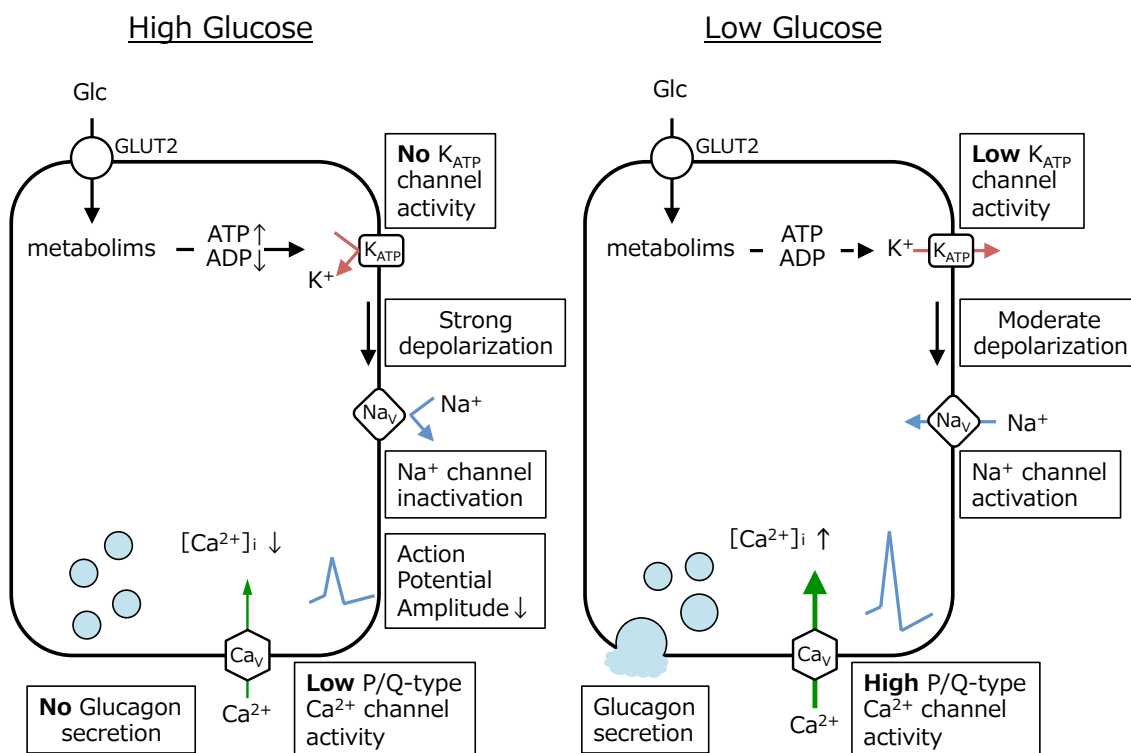


Figure 2-7. グルコース刺激による膵島α細胞グルカゴン分泌機構の模式図。高グルコース条件下では細胞外のグルコースがGLUT2を介してα細胞内に移行し、細胞内で糖代謝を受ける。細胞内でのグルコース代謝に伴い細胞内ATP/ADP比が増大し、細胞膜においてATP感受性K (K_{ATP}) チャンネルの閉口に続いて、電位依存性Na⁺チャンネルの不活化することで活動電位幅が減少し、P/Q型電位依存性Ca²⁺チャンネルの活性が低下するため、グルカゴン顆粒の分泌は抑制される。低グルコース条件下では、GLUT2を介して細胞内に移行するグルコース量が減少することでATP/ADP比が低下して、K_{ATP}チャンネルの低活性により適度に脱分極することで、電位依存性Na⁺チャンネルの活性化に続いてP/Q型電位依存性Ca²⁺チャンネルが活性化し、グルカゴン顆粒の分泌は促進され则认为られる。高濃度KCl脱分極刺激は、α細胞の膜電位の脱分極を強制的に引き起こすことでグルカゴン分泌を上昇させると考えられる [Zhang et al., 2013]。

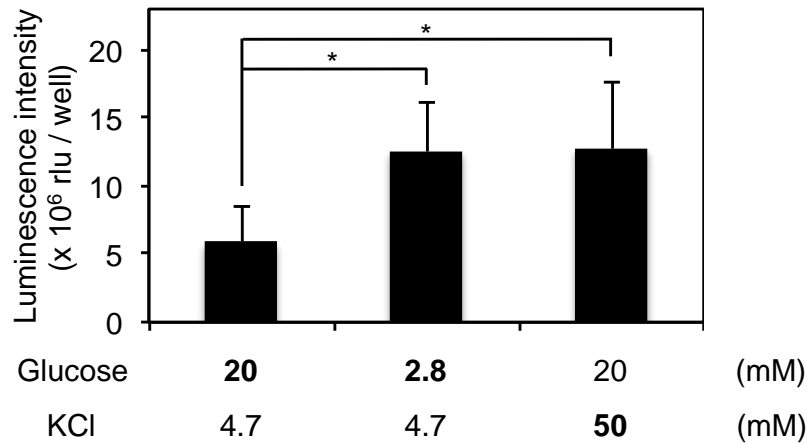


Figure 2-8. PGCG-GLase融合タンパク質を用いたグルカゴン分泌測定。低グルコース刺激およびKCl刺激により培養上清に含まれる発光活性量が増加することが示された。n=5、*p<0.05, mean ± SD

II-3-3. PGCG-GLase安定発現α細胞における融合タンパク質の細胞内局在・分泌

PGCG-GLase融合タンパク質がグルカゴンレポーターとして有用であることが示唆されたため、レポータータンパク質の効率的な発現が期待できるpPGCG-pGLuc遺伝子を用いてPGCG-GLaseを定常的に高発現するαTC6^{PGCG-GLase}細胞株を樹立した。そこで、グルカゴン抗体とガウシアルシフェラーゼ抗体を用いて蛍光抗体染色法とウェスタンブロッティング法を行い、PGCG-GLaseの細胞内分布と分泌される融合タンパク質の状態を解析した。その結果、ウェスタンブロッティング法では、αTC6^{PGCG-GLase}細胞のセルライセートと培養上清のそれぞれに含まれるPGCG-GLase融合タンパク質のプロセッシング産物であるMPGF-GLaseをメインバンドとして検出し、またα細胞でわずかに産生されるGLP-1のプロセッシング産物 [Whalley et al., 2011] と考えられるΔMPGF-GLase (Figure 2-9A) をマイナーバンドとして検出した。これらの結果から、PGCG-GLaseは正しくプロセッシングを受けて、主にMPGF-GLaseとして分泌されていることが示された。この時、グルカゴン本体となる3.5 kDaのバンドがいずれも検出されていないが、グルカゴン抗体サプライヤーのデータシート上でも検出されていないことから、低分子量のためPVDF膜を透過している可能性または変性グルカゴンポリペプチドに対する抗体の親和性が低い可能性が考えられた。現段階で、成熟グルカゴン本体をウェスタンブロットで明確に検出した市販品が無く、成熟グルカゴンを特異的に検出したグルカゴン分泌の解析は、今後の検討課題である。また、蛍光抗体染色法によりαTC6^{PGCG-GLase}細胞に発現するPGCG-GLase融合タンパク質は、グルカゴン抗体（緑色）とガウシアルシフェラーゼ抗体（赤色）と共局在（黄色、相関係数：0.86 ± 0.04）している様子が観察されたことから、翻訳後グルカゴン顆粒内に封入されることが示唆された (Figure 2-9B, C)。以上の結果と先に示した分泌量の比較結果と合わせて、PGCG-GLase融合タンパク質は、グルカゴン分泌のレポーターとして有用であると考えられた。

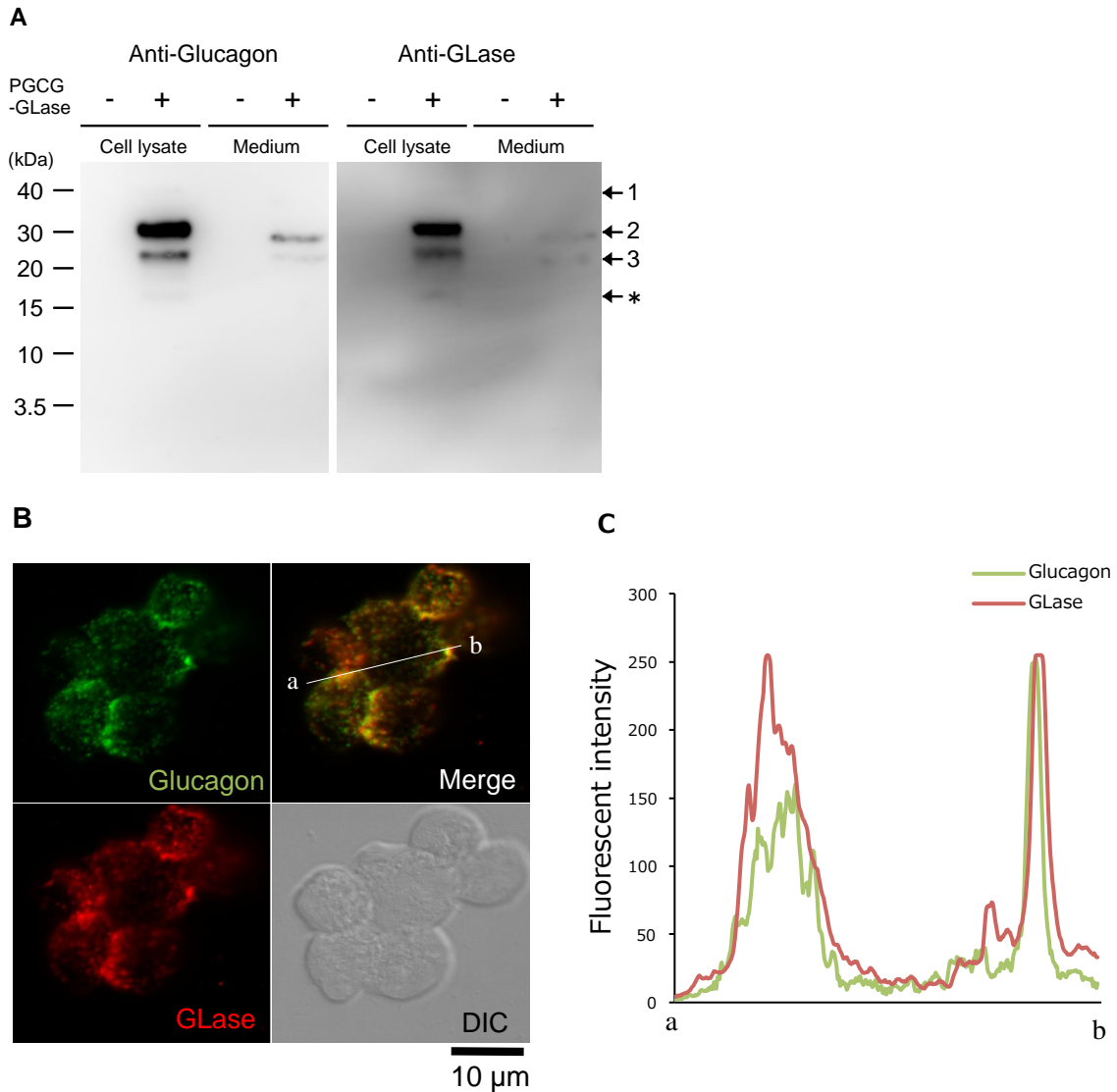


Figure 2-9. PGCG-GLase融合タンパク質安定発現細胞の特徴。

(A) ウェスタンブロット解析では、セルライゼートと培養上清のそれぞれで融合タンパク質とそのプロセッシング産物を検出した。

1.PGCG-GLase 2.MPGF-GLase 3. Δ MPGF-GLase *.プロセッシング産物

(B) PGCG-GLase発現細胞を用いた蛍光免疫染色画像。

(C) BのMerge画像のaからbの蛍光強度を定量化したものの。PGCG-GLase融合タンパク質のプロセッシング産物がグルカゴン顆粒に封入されている様子が観察された。

II-3-4. 生物発光イメージング法によるPGCG-GLase分泌の観察

個体または細胞集団において膵島β細胞からのインスリン分泌は、低グルコース濃度条件で抑制され、高グルコース濃度条件で促進される。一方で、インスリンと拮抗する作用を有するグルカゴンの分泌抑制・促進条件は未だ完全に明らかになっていないが、グルコースまたはインスリンによって分泌が制御されると考えられている。そのため、低グルコース濃度時のインスリン分泌抑制時にグルカゴン分泌が促進され、高グルコース濃度ではインスリン分泌が促進されるため、グルカゴン分泌は抑制されると考えられている [Bansal et al., 2008; Unger et al., 2012]。また、膵島α細胞からのグルカゴン分泌を可視化した例はなく、リアルタイムでの膵島α細胞の分泌局在や分泌パターンに関しては未だ明らかになっていない。このような研究背景に対して、本研究では「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」を用いることで、 α TC1.6^{PGCG-GLase}細胞の活性化に伴うグルカゴン分泌の可視化を行い、膵島α細胞からのグルカゴン分泌の局在や頻度の解析を試みた。

グルカゴン分泌における細胞間接着を明らかにするため、 α TC1.6^{PGCG-GLase}細胞を2日間培養し、細胞集団の形成を促した (Figure 2-10A)。発光イメージングは、発光基質Coelenterazine (3 μ g/ml) と20 mMグルコースを含むKRHB溶液中で3分間撮影を行った後、50 mM KClを添加し撮影を行った。脱分極刺激に伴い細胞間隙から活発な分泌発光を捉え、グルカゴン分泌の可視化に成功した (Figure 2-10B)。発光シグナル (シアン) を明視野画像に重ねたビデオ画像を作成することにより (Figure 2-10B, 上段パネル)、KCl刺激に伴い活発な分泌が細胞間隙に拡散していく様子が示された。

本手法による分泌タンパク質のビデオイメージングでは、ビデオ画像におけるピクセルごとに全フレームにおける発光最大値を合成した画像を作成し、明視野画像に重ねることで、細胞集団における開口分泌部位の局在を示すことができる (Figure 2-10C :Suzuki et al., 2011a, 2014)。KCl刺激後の発光ビデオ画像から発光最大値の合成画像を作成し、明視野画像に重ねた結果、細胞が密集した細胞間接着領域にグルカゴン分泌部位が局在していることが示された。

発光基質Coelenterazineは、細胞に添加して数分経過すると細胞内に取り込まれ、長い露光時間で発光画像を撮影すると、細胞内のGLaseの微弱な光が積算されて可視化される [Suzuki et al., 2007]。これに対して、フレーム毎の露光時間が短い (500 ms/frame 以内) ときには、細胞内のPGCG-GLase由来の微弱光はバックグラウンドに近く、分泌由来の強い発光シグナルが特異的に可視化される [Suzuki et al., 2011a, 2011b, 2014]。今回、発光ビデオ画像の全フレームの発光平均値を合成した画像を作成したところ、細胞内および分泌されたPGCG-GLase発光量が積算された形となり、細胞内の発光シグナルが明確に強調されて可視化された (Figure 2-10D)。これによりすべての細胞において核以外の細胞内にPGCG-GLaseの発光シグナルが観察されたことから、 α TC1.6^{PGCG-GLase}細胞はクローン化された細胞として、PGCG-GLaseをすべての細胞が発現していることが確認され、細胞が密集した場所の細胞間接着領域に分泌部位が局在することが明確となった。

また、微小領域に注目し発光シグナルを解析したところ、発光は異なる時間の同一部位で繰り返し行われている様子が観察された (Figure 2-10E)。さらに、発光ビデオ画像の視野全体の平均発光強度の経時変化をグラフ化することにより、KCl脱分極刺激によるグルカゴン分泌の増大を比較することができた (Figure 2-10F)。また、刺激に伴う細胞間接着部位での分泌の集積と比較して、刺激前の散発的な分泌は細胞間接着部位以外でも分泌する様子が観察されていることから、恒常的な分泌部位と刺激に伴う分泌部位は異なることが示唆された。

これらの結果より、刺激に伴うグルカゴン分泌は、細胞間接着領域に局在し、特定の微小部位から繰り返し分泌が行われることが示唆された (Figure 2-10G)。グルカゴン分泌の細胞間接着部位における分泌部位の局在性は、「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」で可視化された膵島β細胞株からのインスリン分泌と類似しており [Suzuki et al., 2011a]、また、膵島β細胞は膵島内において静脈を中心に細胞がロゼッタ様構造を形成し、β細胞細胞間の接着部位では、局所的にE-cadherin、EphA/EphrinA、GLUT2、電位依存性Ca²⁺チャネル (Ca_v1.3)、SNAP25が集積してインスリン分泌機能の発現と膵島構造の形成に重要な役割を担っている [Erez et al., 2015]。膵島α細胞のグルカゴン分泌部位の形成とグルカゴン分泌量の増大に対しても細胞間接着部位の形成が深く関与していると考えられている。本研究では、グルカゴン分泌はインスリン分泌が比較的細胞密度の低い細胞からも分泌が観察されるのに対して [Suzuki et al., 2011a]、細胞間接着部位により限局していたことから、インスリン分泌に対してグルカゴン分泌はより細胞間接着が重要である可能性が考えられる。これらの相互作用に対する接着分子の寄与を明らかにするため、CADM1をはじめとした接着分子を対象として、細胞の分泌局在との関連性をイメージンなどの手法を用いて解明する必要がある。

一般的に、β細胞株のインスリン分泌は細胞同士の同調性が高く、周期性があることが示されている。膵島α細胞のグルカゴン分泌は、インスリンの影響を強く受けるため、今後は、初代培養膵島細胞へのPGCG-GLuc遺伝子の導入や膵島β細胞と膵島αTC1.6^{PGCG-GLase}細胞の共存培養系による擬似膵島を作製し、より詳細に膵島におけるグルカゴン分泌挙動を解析する必要性が考えられ、本手法と研究成果は、単離膵島や疑似膵島を用いたグルカゴン分泌制御の解析に有効に利用されることが期待できる。

生体内の細胞は、多くの細胞集団を形成し組織・臓器として機能する。そのため、膵島細胞のような分泌細胞では、生体内の環境に近い細胞同士が密接に接着した細胞集団や細胞外基質との接着面でより生理条件に近い分泌現象が行われると考えられる。「生物発光イメージング法」では、既存のイメージング法では解析することが困難であった膵島細胞のような三次元の細胞集団における細胞間接着部位や細胞外マトリックスとの接着面の開口分泌部位の局在部位解析に非常に有用であると考えられる。

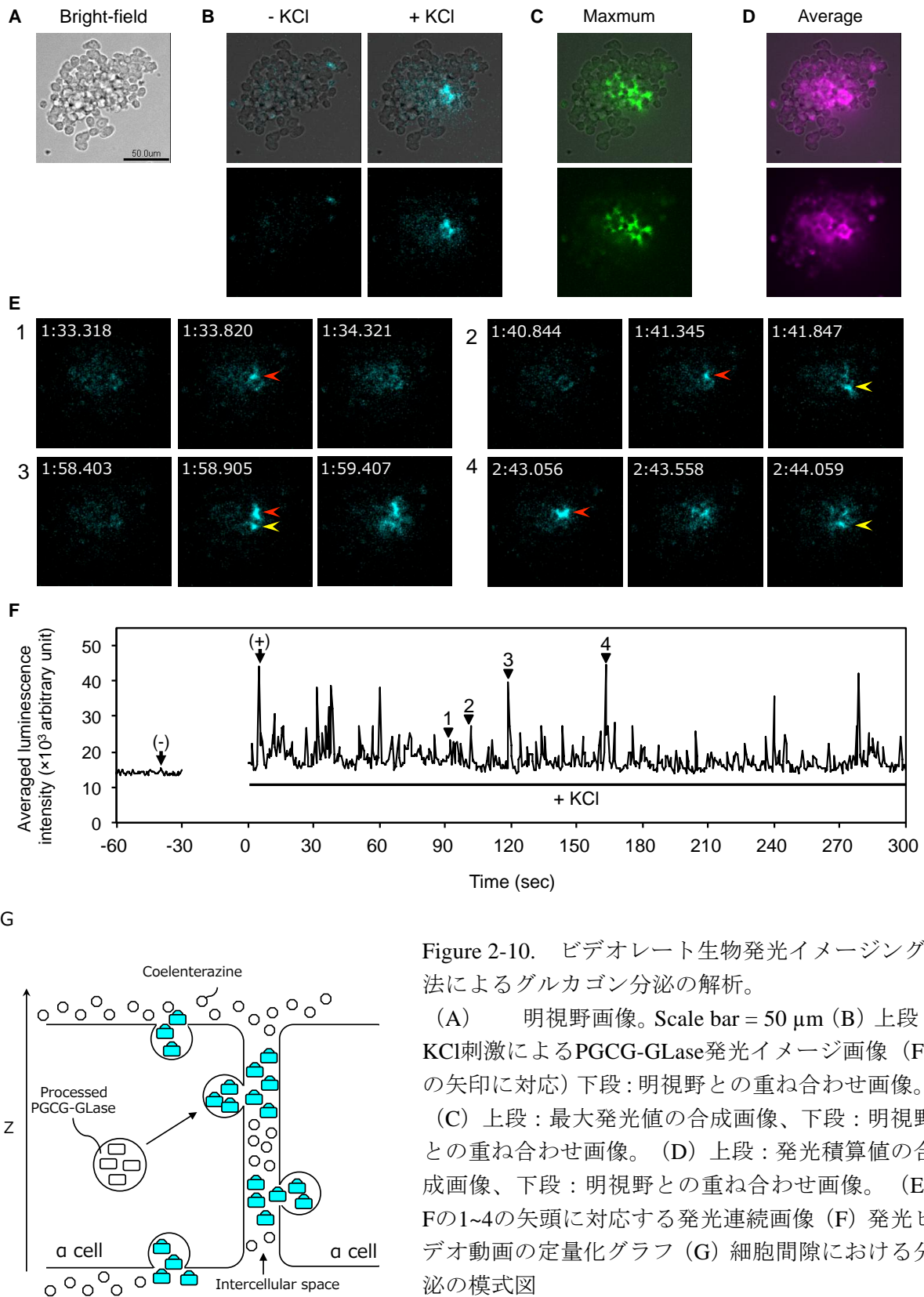


Figure 2-10. ビデオレート生物発光イメージング法によるグルカゴン分泌の解析。

(A) 明視野画像。Scale bar = 50 μ m (B) 上段：KCl刺激によるPGCG-Glucase発光イメージ画像 (Fの矢印に対応) 下段：明視野との重ね合わせ画像。

(C) 上段：最大発光値の合成画像、下段：明視野との重ね合わせ画像。(D) 上段：発光積算値の合成画像、下段：明視野との重ね合わせ画像。(E) Fの1~4の矢頭に対応する発光連続画像 (F) 発光ビデオ動画の定量化グラフ (G) 細胞間隙における分泌の模式図

II-4. 小括

Preferred 法でコドン最適化した遺伝子を用いることで PGCG-GLase 融合タンパク質の発現量が増大した。

PGCG-GLase 融合タンパク質を用いることでグルカゴン分泌量の変化を相対定量的に解析することができた。

PGCG-GLase 融合タンパク質を定常的に高発現する膵島 α 細胞を樹立した。

生物発光イメージング法により、グルカゴン分泌の可視化に成功した。

- 細胞集団でのグルカゴン分泌動態を定量的に可視化した。
- 細胞間接着部位で積極的な分泌が行われている様子が観察された。

第三章 接着分子CADM1による膵島 α 細胞内顆粒動態制御機構の解明

III-1. 緒言

膵島 α 細胞のグルカゴン分泌において、細胞接着分子を介した膵島細胞間相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、膵島 β 細胞同士の研究と比較して、膵島 α 細胞同士の相互作用に関する研究は未だ乏しい。CADM1は膵島 α 細胞に発現し膵島 α 細胞間や神経細胞との接着に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌に及ぼす影響は十分に明らかになっておらず、その分子機構は不明である。本研究では、はじめに接着分子CADM1がグルカゴン分泌と膵島 α 細胞の細胞内顆粒動態に及ぼす影響を調べた。

III-1-1. 膵島 α 細胞に発現する接着分子と機能

膵島機能の発現には、接着分子を介した細胞間接着により形成される膵島構造が重要な役割を果たすと考えられている [Borden et al., 2013; Geron et al., 2015]。膵島細胞には、神経に発現する Neurexin/Neurologin-2 や Neural cell adhesion molecule (N-CAM)、Connexin 36、Ephrin 5A、E-cadherinが発現していることが明らかになっている [Ravier et al., 2005; Konstantinova et al., 2007; Jaques et al., 2008; Olofsson et al., 2009; Suckow et al., 2008, 2012]。しかし、膵島細胞の接着分子に関する研究は、膵島 β 細胞同士に焦点を当てたものがほとんどであり、膵島 α 細胞間の相互作用に関する接着分子の研究は断片的である。そのため、膵島の細胞に発現する接着分子の体系的な理解は進んでいない (Figure 3-1) [Ito et al., 2008; Olofsson et al., 2009; Wang et al., 2005]。

III-1-2. 膵島細胞の開口放出機構

開口放出では、Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 機構を介して細胞膜と細胞内顆粒膜の融合が行われ、この機構は様々なタイプの細胞で保存されている。膵島細胞の開口放出の分子機構に関する研究は β 細胞を中心に行われており、Syntaxin-1A、SNAP-23/25、VAMP-8、Munc18-1、Munc18-2などのSNAREタンパク質に加えて [Mandic et al., 2011; Zhu et al., 2012] 細胞骨格タンパク質 (アクチン、微小管) [Meng et al., 1997; Kalwat et al., 2013] がインスリン分泌を制御することが報告されている。膵島 β 細胞のインスリン顆粒動態に関する研究は生細胞を用いて盛んに行われており、細胞膜へのインスリン顆粒の移行は、インスリンの開口放出に必須であることが分かっている [Varadi et al., 2002; Heaslip et al., 2014; Hoboth et al., 2015]。

一方、膵島 α 細胞では、SNAREタンパク質としてSyntaxin 1、SNAP-25、VAMP2、Synaptotagmin-7、Munc13-1、Munc18aが発現していることは報告されている [Xia et al., 2007; Gustavsson et al., 2009; Andersson et al., 2011] が、グルカゴン顆粒動態に関する研究は行われていない。

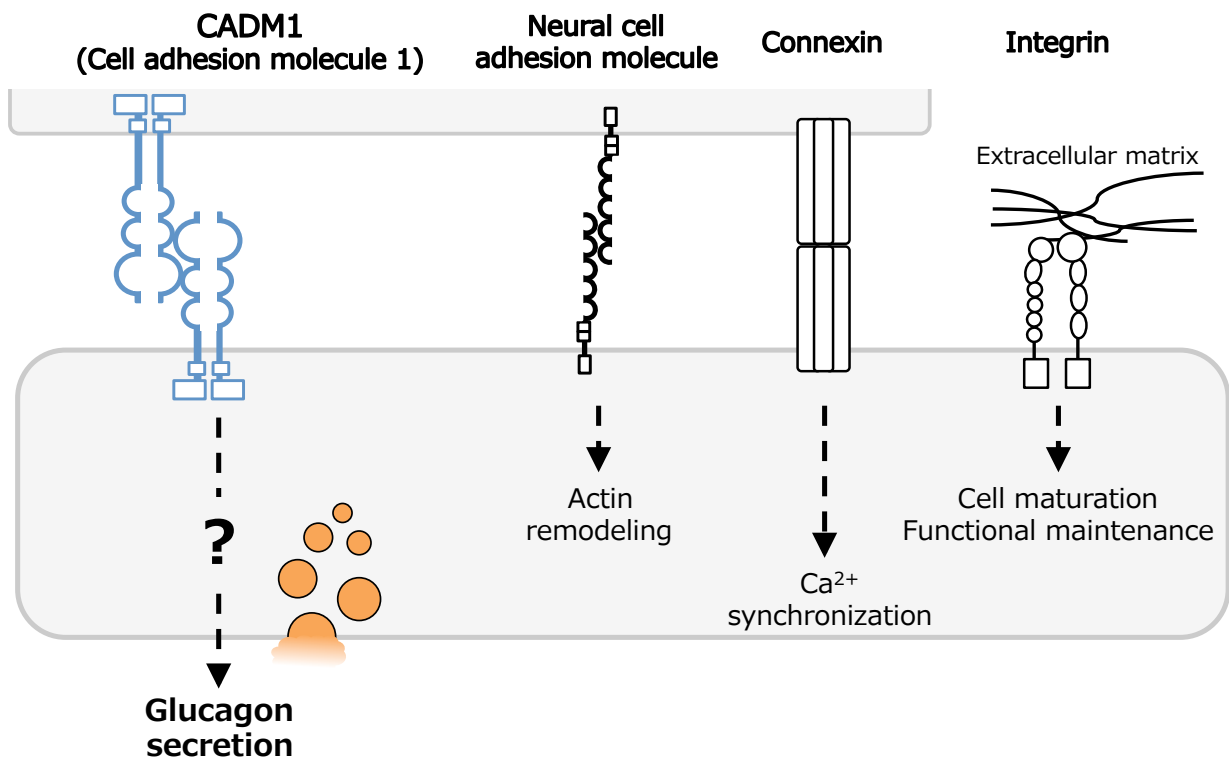


Figure 3-1. 膵島 α 細胞間に発現する接着分子の機能。
 CADM1はグルカゴン分泌、Neural cell adhesion moleculeはアクチンのリモデング、コネキシンは細胞間のCa²⁺の同調性、インテグリンは細胞外マトリックスとの作用を介して細胞の成熟や機能的に維持にそれぞれ関与すると考えられている。

III-2. 材料と方法

III-2-1. 使用試薬

G418とサイトカラシン D、ノコダゾール、quinacrineは、Wakoから購入した。

III-2-2. 細胞培養

マウスグルカゴノーマ由来膵島 α 細胞株 (α TC6細胞) は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Gibco) に非動化处理を行ったウシ血清アルブミン (Gibco) を10%加えたものを用いて、37°C、5% CO₂存在下で培養した。 α TC6^{siRNA-CADM1}細胞とネガティブコントロール細胞株 (α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞) は、近畿大学医学部病理学講座 伊藤彰彦教授より提供されたものを用いた。簡単に樹立法を記す [Koma et al., 2012]。pSilencer 3.1-H1 neoベクター (Ambion) に制限酵素BamHIとHindIIIサイトを用いて二本鎖siRNAを組み込んだ。siRNAの遺伝子配列は、Ambionのthe siRNA Target Finder program (<http://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/invitrogen/ambion.html>) を用いて作成した。Negative control用のベクターは哺乳類遺伝子に影響を及ぼさない21塩基をスクランブルしたもの (Ambion) を用いた。 α TC6細胞にリポフェクション試薬 FuGENE 6 (Roche Diagnostics) を用いて遺伝子導入を行い、0.4 mg/ml G418 (Wako) でセレクションを行った。

shRNA-CADM1遺伝子配列

Sense : 5'-gatccgtaagagtgcgactcagtggtcaagagactgagtcgctactcttttttgaaa-3'
Anti-sense: 5'-agcttttccaaaaataagagtgcgactcagtgctctctgaactgagtcgctactcttacg-3',

III-2-3. GLaseとPGCG-GLase の発光活性測定

一過性にpPGCG-pGLuc遺伝子と5 nMのsiRNA-CADM1 (下記) またはsiRNA-Negative control (Silencer negative control No.1, AM4611, Thermo Fisher) を α TC1.6細胞に導入した際の発光活性変化は以下の手順で測定した。ポリ-D-リジンコート処理を施した24ウェルプレート (BD Bioscience) に α TC6細胞 (1×10^5 細胞/well) を播種し、48時間培養後に培地交換を行い、0.5 μ g pPGCG-pGLuc遺伝子とsiRNA-CADM1またはsiRNA-Negative controlを導入した。遺伝子導入48時間後に培養上清を300 \times g、4°C、5分間遠心し細胞を除去した。得られた培養上清の発光活性測定は、II-2-4に示した通り行った。

siRNA-CADM1遺伝子配列

Sense : 5'-uaagagugacgacucaguggt-3'
Anti-sense: 5'-cacugagucgucacuuatt-3'

III-2-4. ウェスタンブロット法

α TC6細胞、 α TC6^{siRNA-CADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞をポリ-D-リジンコート処理を施した6ウェルプレート (MatTek) に 1×10^6 細胞/wellで播種し、48時間培養した。氷冷したPBSで3回洗浄後、100 μ lのLysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.1% NP-40, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, and 10% glycerol) を加えて溶解させた。15,000 rpm、10分間遠心して上清を回収し、4 \times Laemmli sample bufferを加えて75°C、10分間加熱しサンプルとした。サンプル中のタンパク質濃度は、BCA法により決定した。タンパク量10 μ g/laneとなるよう12% ゲルに加えたSDS-PAGEによって分離して、PVDF膜 (Bio-rad) に80 mA、1時間の条件で転写した。PVDF膜は、5%スキムミルク

ク/PBSで1時間ブロッキングした後、目的タンパク質に対する一次抗体中で4°C、一晚浸透した。抗体溶液を取り除いた後、PVDF膜を0.1% Tween/PBSで洗浄した（10分間2回）。HRP標識した二次抗体溶液中で浸透した（3時間）。抗体溶液を取り除いた後、PVDF膜を0.1% Tween/PBSで洗浄した（10分間2回）。ECL（GE Healthcare）により目的タンパク質のシグナルをLAS-3000mini（Fujifilm）を用いて検出した。データはImage Gauge（Fujifilm）とImage J（NIH）を用いて解析した。

一次抗体の希釈率

Rabbit anti CADM1 antibody（S4945, Sigma-Aldrich） 1:1000

Mouse anti GAPDH antibody（3H12, MBL） 1:5000

二次抗体の希釈率

HRP 標識 Goat anti rabbit IgG antibody（sc-2006, Santa Cruz） 1:2000

HRP 標識 Goat anti mouse IgG antibody（sc-2005, Santa Cruz） 1:2000

III-2-5. 免疫染色法

マトリゲルコートをした4ウェルガラスプレート（Millicell EZ slide, Merck Millipore）に細胞を播種し、一晚培養した。細胞を5 μ M ノコダゾールまたは2 μ M サイトカラシンDを含むKRHB溶液で30分間処理した。その後、細胞を4%パラホルムアルデヒド/PBSで1時間固定処理を行い、0.1% Triton X-100/PBSで30分間可溶化処理を行った後、0.2% BSA/PBSで30分間ブロッキング処理を行った。微小管チューブリンを標識するため、一次抗体としてmouse anti α -tubulin antibody（Sigma-Aldrich, 1:1000）溶液を用いて4°C、一晚静置した。翌日、二次抗体 Alexa Fluor 488 標識 Goat anti mouse IgG（Invitrogen, 1:2000）溶液とアクチンを標識するため、13.2 nM ローダミンX結合ファロイジンを用いて3時間室温静置を行った。Alexa Fluor 488とローダミンシグナルは、共焦点レーザー走査顕微鏡（LSM-710 Meta; Carl Zeiss Microscopy）を用いて検出した。

III-2-6. 顆粒動態観察

マトリゲルコート処理したガラスボトムディッシュ（Matsunami glass）に α TC6細胞を 5×10^4 細胞/dishで播種し、48時間培養した。細胞を5 μ M ノコダゾールまたは2 μ M サイトカラシンDを含むKRHB溶液で30分間処理した。観察30分前に3 μ M quinacrine で15分間染色し、KRHB緩衝液（10 mM HEPES, pH 7.4, 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.5 mM グルコース, 0.2% BSA, pH 7.4）で3回洗浄した。染色した細胞は、ニポウディスク方式共焦点レーザー走査ユニット（CSU-W1; Yokogawa Electric）を搭載した倒立型顕微鏡（IX81-ZDC2; Olympus）を用いて500 msec/frameで5分間連続撮影した。対物レンズは、ApoN 60 \times OTIRF 油浸レンズ（NA 1.49, Olympus）を用いてpixel sizeが266.7 nm \times 266.7 nmの条件で撮影を行った。488 nm ダイオード励起固定レーザー（Sapphire 488 LP; Coherent）でquinacrineを励起し、発せられた蛍光は、エミッションフィルター（FF01-520/35; Rochester）を通して水冷式EM-CCDカメラ（ImagEM X2, 16 μ m \times 16 μ m, 512 \times 512 pixel; Hamamatsu photonics）で検出した。データは、Image J Plug-in Manual Trackingを用いて10秒間に移動する細胞内顆粒を追跡し、得られたX,Y座標から顆粒移動速度を算出した。また、同様にX,Y座標を以下の公式を用いて計算することで平均二乗変位（MSD）を算出した。

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2]$$

Nは全フレーム数、nはフレーム数、 Δt はフレーム間の時間、時間iにおける顆粒座標を (X_i, Y_i) とした。得られたMSD値と時間を対数化したグラフ化し、その際に得られる直線の傾き (α 値) を算出し、顆粒の運動パターンの指標とした。

III-2-7. 統計処理

得られたデータは、平均 \pm 標準偏差で示した。KaleidaGraph (Synergy software) を用いて One way anovaによる有意差検定を Bonferroni's multiple comparison testにより行った。

III-3. 結果および考察

III-3-1. 接着分子CADM1によるPGCG-GLase分泌への影響

CADM1によるグルカゴン分泌への影響を明らかにするため、siRNA-CADM1またはsiRNA-Negative ControlとpPGCG-pGLuc遺伝子を α TC1.6細胞に一過性に導入し、生理条件下(5.5 mM グルコース条件)におけるPGCG-GLase分泌への影響をルミノメーターで測定した。その結果、CADM1発現抑制によりPGCG-GLase発光量の減少が観察された ($p=0.017$, Figure 3-2)。顆粒内に貯蔵されたホルモン、神経伝達物質、化学伝達物質は顆粒膜と細胞膜が融合することで開口放出される。この開口放出は、細胞膜付近への顆粒輸送、顆粒の繫留/接着、プライミング、膜融合の段階を経て行われる。本研究では、顆粒輸送に焦点を当て、生理条件下における接着分子CADM1の膵島 α 細胞内顆粒動態に及ぼす影響を追究した。接着分子と開口放出に関する研究の多くは、細胞膜直下でのアクチン骨格の調節を介した顆粒動態制御やSNAREタンパク質複合体の集積に関するものであり、接着分子による細胞内部の顆粒動態への影響は未だ明らかになっていない。接着分子CADM1は、膵島 α 細胞のグルカゴン分泌に影響を及ぼすことが示唆されているものの、その詳細なメカニズムは未だに不明である。そこで、膵島 α 細胞における接着分子CADM1の発現が細胞内顆粒動態に及ぼす影響について詳細に検討を行った。

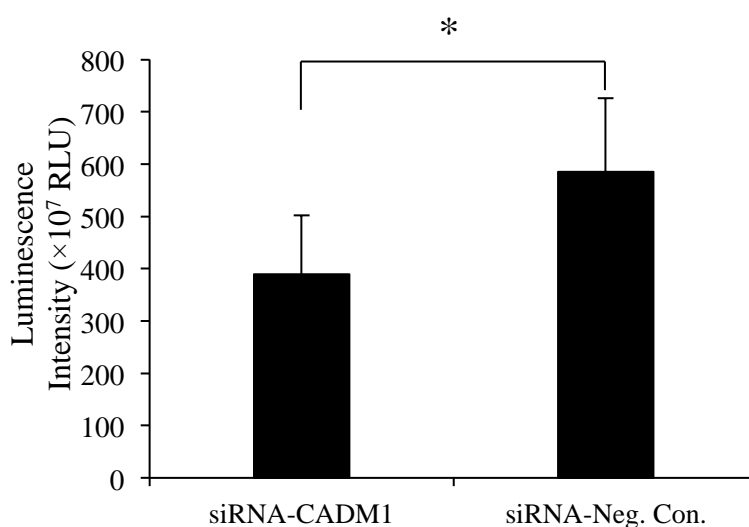


Figure 3-2.

CADM1発現抑制によるPGCG-GLase分泌への影響。

CADM1発現を抑制することで上清含まれるPGCG-GLaseの発光活性量が低下した。

n=6, mean \pm SD, * $p<0.05$

III-3-2. α TC6細胞におけるCADM1の発現

本研究では、マウス腓島 α 細胞に接着分子CADM1が発現していることから、マウス腓島 α 細胞株である α TC6細胞と α TC6^{siRNA-CADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞の3種の細胞を用いて研究を行った。始めに、ウェスタンブロット法を用いてCADM1発現量を調べた。CADM1は、442アミノ酸残基から成る48.3 kDaのタンパク質であるが、細胞外領域の免疫グロブリン様ループはN-, O-結合型糖鎖修飾を受けるため、100 kDa付近にバンドが検出される。ローディングコントロールであるGAPDHによって補正したCADM1発現量を比較した (Figure 3-3) ところ、 α TC6細胞と比較してその発現量は、 α TC6^{siRNA-CADM1}細胞で $10 \pm 3.3\%$ 、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞で $74 \pm 4.2\%$ であった。これらの細胞は、培養すると細胞同士が接着したまま増殖するため、立体的なコロニーを形成するが (Figure 3-4)、3種のコロニー形態に大きな差は認められなかった。

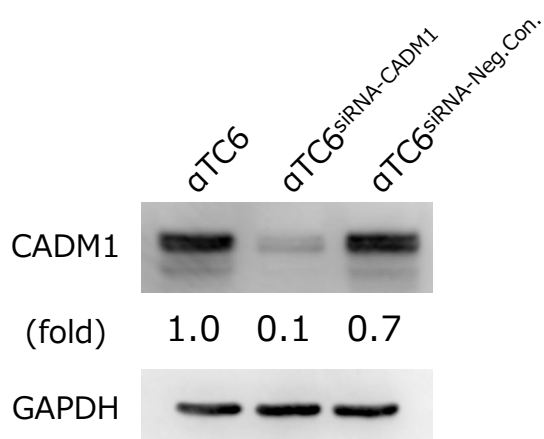


Figure 3-3.

ウェスタンブロット法による α TC6細胞と α TC6^{siRNA-CADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞のCADM1発現量の比較。GAPDHにより補正したCADM1の発現量を比較すると α TC6^{siRNA-CADM1}細胞の発現量は α TC6細胞の $10 \pm 3.3\%$ となり、発現抑制されていることが確認できた。

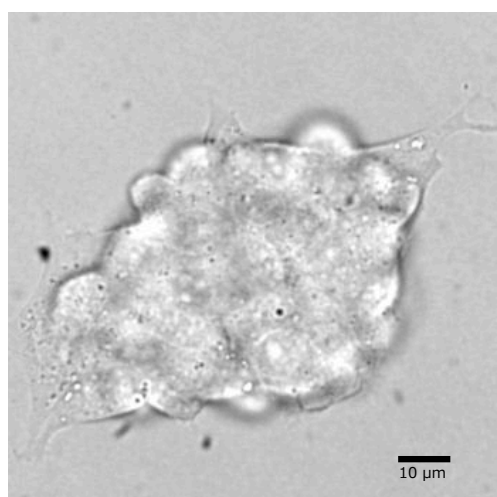


Figure 3-4.

α TC6細胞を48時間培養した際の明視野画像。

III-3-3. α 細胞内顆粒動態の測定

細胞内顆粒動態に関する研究は、全反射蛍光（TIRF: Total internal reflection fluorescence）顕微鏡を用いた細胞膜およびその直下の限定された領域における顆粒動態解析が中心であり、細胞内部での顆粒動態研究はほとんど行われていない。しかし、トランス-ゴルジネットワークで形成された顆粒小胞は、微小管上を移動することで細胞膜直下まで移行して開口放出に至るため、細胞内顆粒動態の研究は開口放出の研究を行う上で欠かすことができない。

共焦点レーザー走査顕微鏡は、細胞内のタンパク質の分布や動態を解析する手法として広く用いられる。画像取得の方式からガルバノミラー方式とニポウディスク方式に大別することができる。ガルバノミラー方式では、ガルバノミラーの移動が1フレーム分の画像の取得時間となるため、固定標本の観察には適しているものの生細胞の動態観察には不向きとされる。ニポウディスク方式では、画像取得速度はディスクの回転速度に依存しているため、高速に画像取得を行うことが可能な一方で、取得する蛍光シグナルが弱いデメリットがある。

本研究では、水冷式EM-CCDカメラを用いることで微弱な蛍光シグナルを高感度で取得することによりニポウディスク方式共焦点レーザー走査顕微鏡のデメリットを補い、細胞内顆粒動態に適した動態イメージングを行った。膵島 α 細胞のグルカゴンを含む分泌顆粒も酸性であると考えられる[Paroutis et al., 2004]。膵島 α 細胞のグルカゴン顆粒動態を測定するため、酸性顆粒に集積し、プログルカゴンとmCherryの融合タンパク質を含む顆粒とほぼ局在が一致する（相関係数： 0.78 ± 0.04 ）蛍光色素 Quinacrine を用いて細胞を染色し、その顆粒動態をEM-CCDカメラ搭載ニポウディスク方式共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて500 msec/frameで5分間測定した。得られたデータをImage J: Plug-in manual trackingを用いて30秒間に移動する顆粒のX,Y座標から顆粒の軌跡解析を行い、60顆粒の平均移動速度を算出した。その結果を野生型 α TC6細胞株（ $0.236 \pm 0.010 \mu\text{m/s}$ ）、 α TC6^{siRNA-CADM1}細胞（ $0.190 \pm 0.016 \mu\text{m/s}$ ）、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞（ $0.200 \pm 0.013 \mu\text{m/s}$ ）で比較したところ、顆粒移動速度に有意な差は認められなかった（Figure 3-5）。

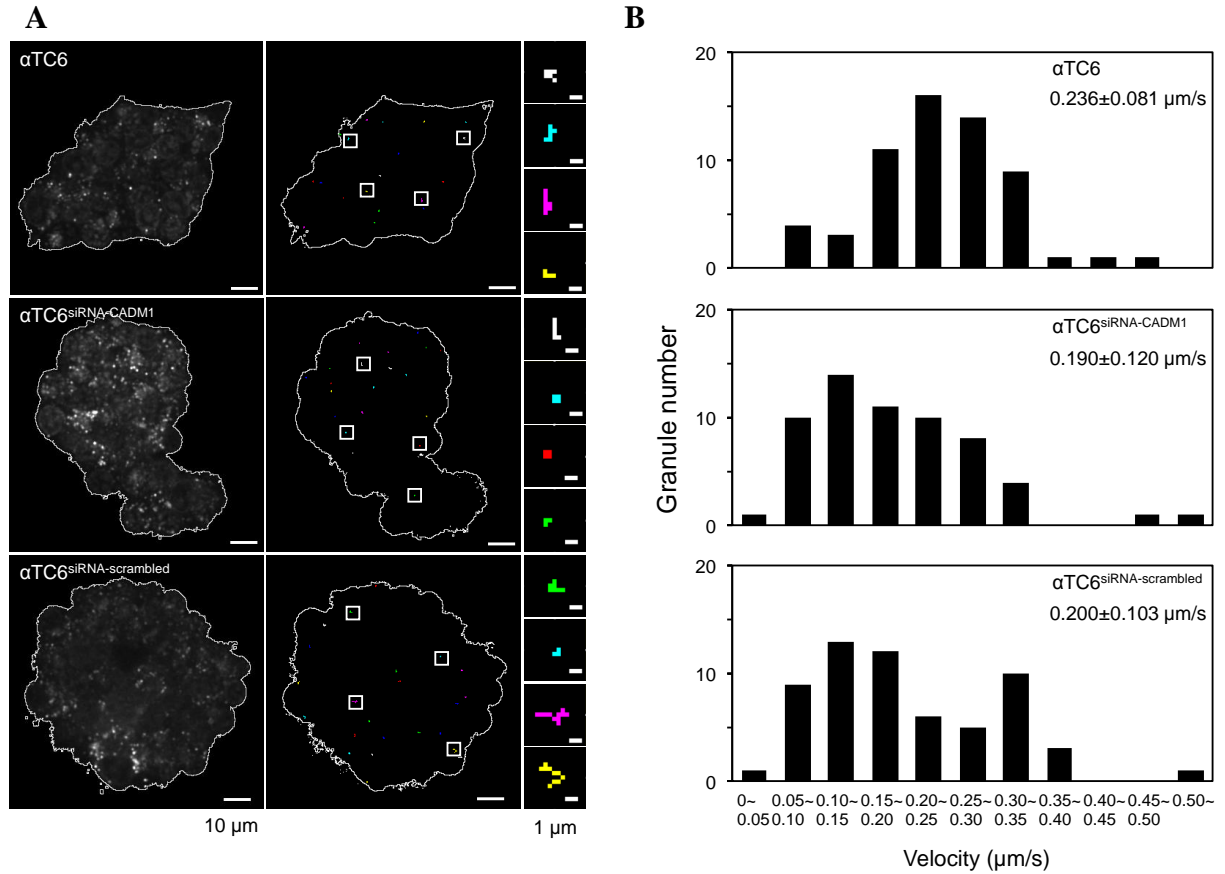


Figure 3-5. α TC6細胞と α TC6^{siRNA-ADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞の細胞内顆粒動態。

A) 各細胞の代表的な細胞内顆粒動態のトレース図。(左パネル) Quinacrine染色画像。細胞集団において顆粒が標識されている様子が確認できる。(中パネル) 30秒間に移動する顆粒の軌跡を示した。(右パネル) 中パネルの白枠を拡大した。B) 各細胞の細胞内顆粒速度分布図。(Mean \pm SD, n=60)

III-3-4. α 細胞内骨格タンパク質の比較

膵島 α 細胞からのグルカゴン分泌に関する分子機構は未だ多くが不明であるが、膵島 β 細胞からのインスリン分泌機構に関する研究は活発に行われている。膵島 β 細胞では、インスリン含有顆粒の輸送に微小管がレールとして働くことやキネシンがATP依存的に微小管上を駆動することが報告されており、微小管の破損やキネシンの不活化は、分泌刺激によるインスリン分泌不全となる。一方で、グルコース刺激を受けた β 細胞内の顆粒の輸送は、微小管によって抑制されており、チューブリン重合阻害薬であるノコダゾール処理によってインスリン顆粒の細胞膜融合とインスリン分泌が促進されるとの報告 [Zhu et al., 2015] もあり、細胞骨格が顆粒動態を制御することが示されている。これらの知見から、CADM1が細胞骨格タンパク質である微小管やアクチン骨格へ及ぼす影響を観察した。その結果、蛍光染色画像からは α TC6細胞と α TC6^{siRNA-CADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞間で細胞内のチューブリンとアクチン骨格タンパク質の発現量と局在に大きな差は見られなかった (Figure 3-6)。

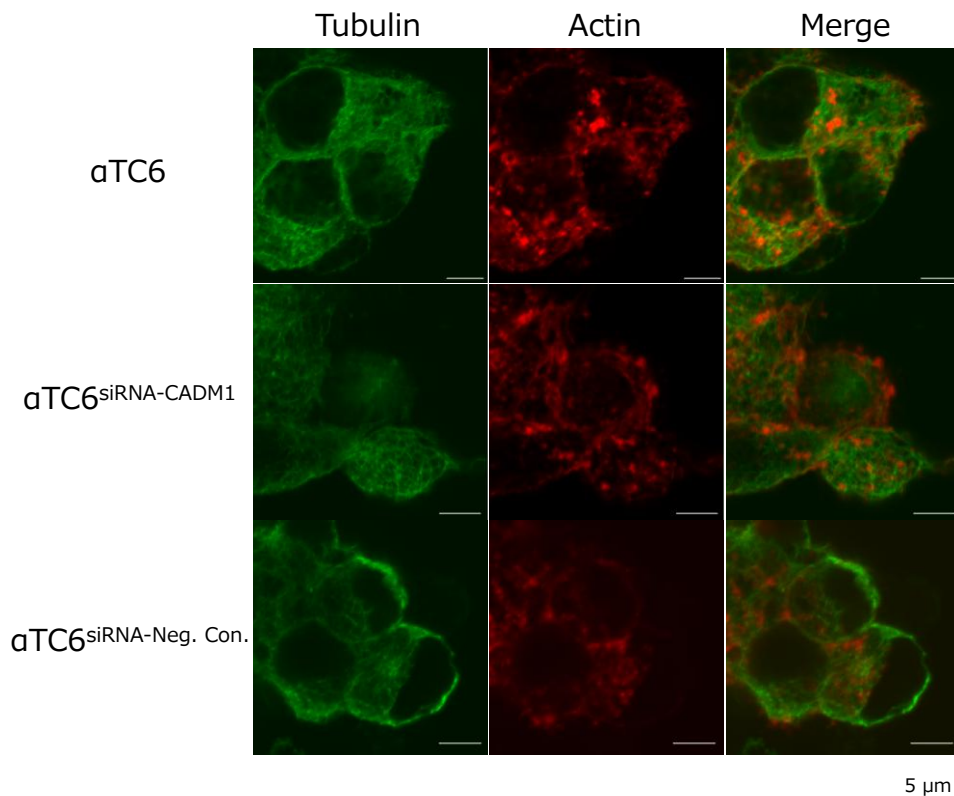


Figure 3-6. α TC6細胞と α TC6^{siRNA-CADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞の細胞内骨格タンパク質（微小管チューブリン、アクチン）の構造。各細胞間で細胞内骨格タンパク質の局在や発現量に大きな差はみられなかった。

III-3-5. 細胞骨格阻害薬添加時の細胞内骨格タンパク質の変化

CADM1の発現は、細胞骨格（アクチン・微小管）ネットワークに影響を及ぼさないことが示されたが、一般的に細胞内の顆粒は微小管に沿って動いていると考えられる。そこで、ノコダゾールとアクチン重合阻害薬であるサイトカラシンDを用いて細胞骨格タンパク質を阻害した際の細胞内顆粒動態への影響を追究することを試みた。ノコダゾールは、遊離チューブリンに結合して微小管の脱重合を促進する。また、サイトカラシンDは、アクチン線維の+端に高い結合性と単量体や二量体アクチンにも微弱ながら結合するためアクチンの脱重合を促進する。その結果、ノコダゾール処理によって細胞内にチューブリンが拡散している様子が観察された。ノコダゾール処理により、アクチン線維の構造が非処理のものと比較して減少している様子が観察された。ノコダゾール処理によって微小管重合が阻害されることで細胞全体の細胞骨格が変化することにより、アクチン線維に影響を及ぼしたものと考えられる。サイトカラシンD処理では、細胞内のアクチンフィラメント構造が消失している様子が観察された (Figure 3-7)。

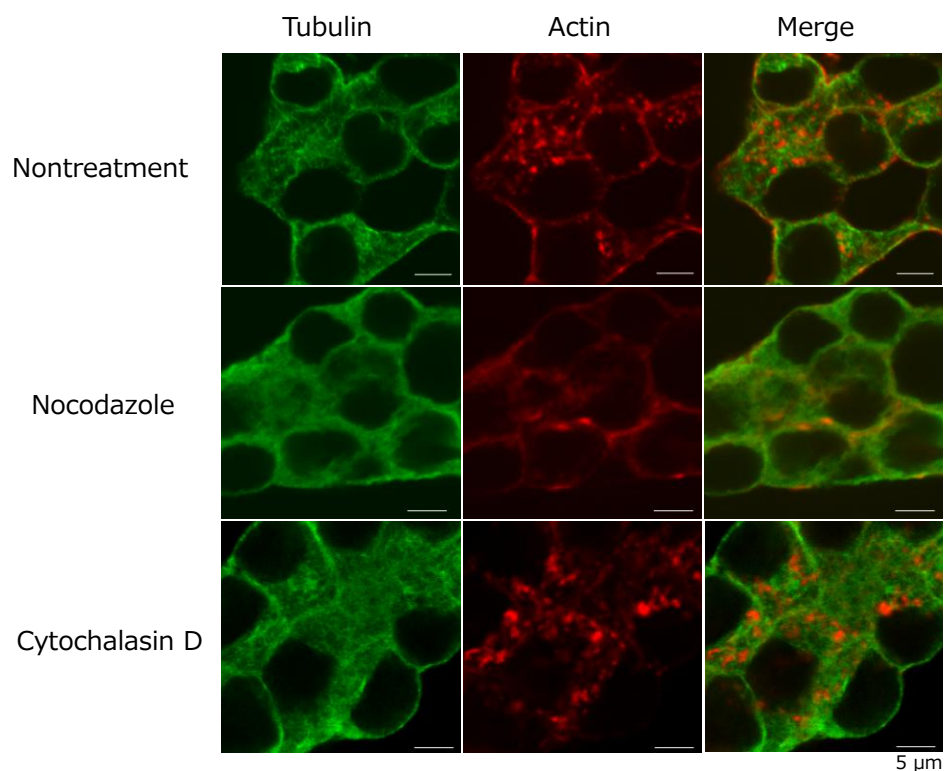


Figure 3-7. 細胞骨格阻害薬（ノコダゾール、サイトカラシンD）処理による α TC6細胞の細胞内骨格タンパク質の構造変化。ノコダゾール処理により微小管チューブリンが細胞内に拡散し、サイトカラシンD処理によりアクチンフィラメント構造が消失している様子が観察された。

III-3-6. 細胞骨格タンパク質阻害薬処理時の α 細胞内顆粒動態変化

次に、細胞骨格阻害薬で処理を行った際の α 細胞内顆粒動態を測定した。ノコダゾール処理により、細胞内顆粒の移動速度は3種の細胞全てで抑制され (Figure 3-8A)、平均顆粒速度は α TC6細胞で $0.111 \pm 0.010 \mu\text{m/s}$ (阻害薬非処理群 $0.258 \pm 0.163 \mu\text{m/s}$, $p < 0.0001$)、 α TC6^{siRNA-CADMI}細胞で $0.102 \pm 0.009 \mu\text{m/s}$ (阻害剤非処理群 $0.180 \pm 0.089 \mu\text{m/s}$, $p < 0.0001$)、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞で $0.095 \pm 0.009 \mu\text{m/s}$ (阻害薬非処理群 $0.232 \pm 0.120 \mu\text{m/s}$, $p < 0.0001$) となった。このように、ノコダゾール処理によって、3種の細胞の平均顆粒移動速度は $0.1 \mu\text{m/s}$ 程度に一様に低下した。コルヒチンによる微小管重合阻害の結果でも平均顆粒速度は $0.177 \pm 0.10 \mu\text{m/s}$ と低下しており、微小管の重合阻害によって細胞内顆粒動態は低下することが示された。サイトカラシンD処理では、 α TC6細胞で $0.267 \pm 0.017 \mu\text{m/s}$ であり、抑制されなかった (Figure 3-8B)。これらのことから、細胞内顆粒速度は、アクチンよりも微小管により制御されると考えられた。

III-3-7. ノコダゾール処理による細胞内顆粒運動の変化

さらに顆粒動態を詳細に追究するため、顆粒の運動パターンに着目した。顆粒の運動パターンは、顆粒軌跡から平均二乗変位を算出し、時間と平均二乗変位値のプロットの傾きから α 値を算出することで求めることができる。 α 値は、値が0に近いほど静止運動に近づき、1付近では拡散運動、2に近づくと直線運動を示す [Saxton, 1997]。3種の細胞の顆粒運動パターンを示す α 値は、静止運動から拡散運動が多くその分布に差はなかった。ノコダゾール処理を行うと、3種の細胞とも静止運動が増加するのが示された (Figure 3-9)。

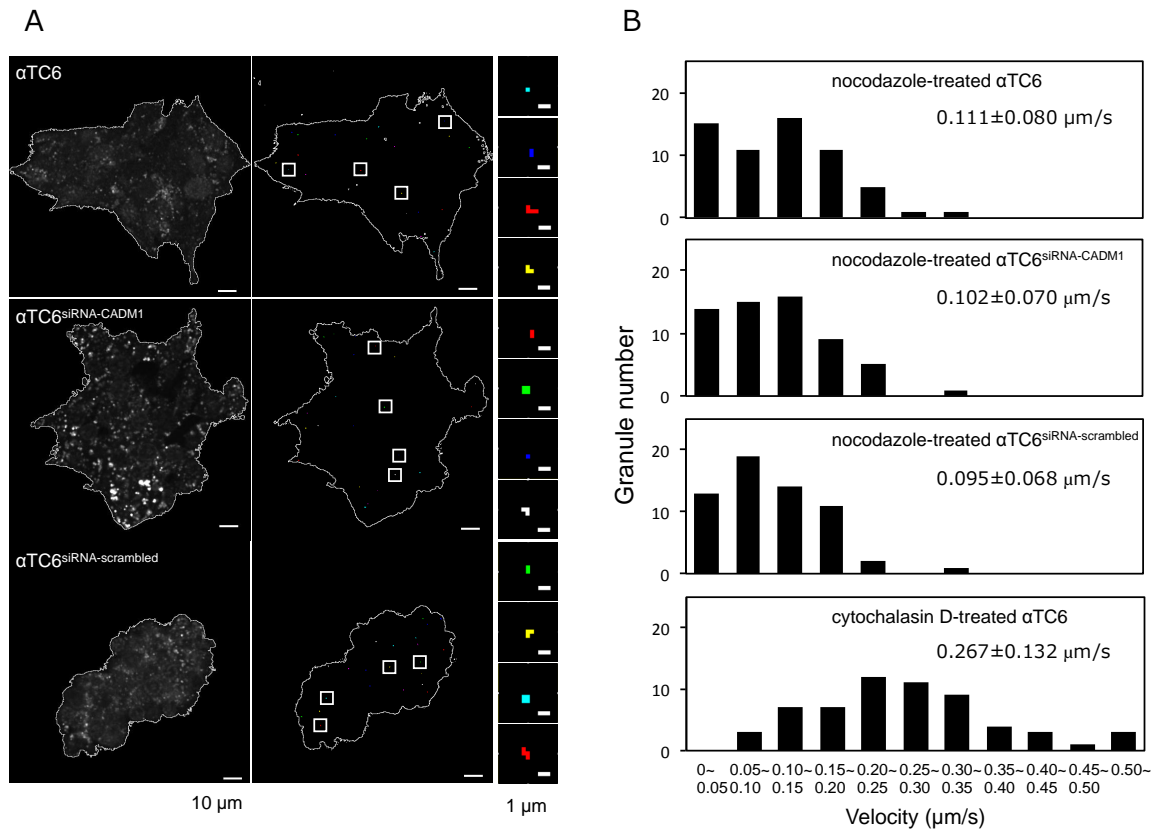


Figure 3-8. 細胞骨格阻害薬処理による α TC6細胞と α TC6^{siRNA-CADM1}細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.}細胞の細胞内顆粒動態。

A) ノコダゾール処理による各細胞の代表的な細胞内顆粒動態のトレース図

(左パネル) 各細胞のQuinacrine染色画像。(中パネル) 30秒間に移動する顆粒の軌跡を示した。(右パネル) 中パネルの白枠を拡大した。

B) 細胞骨格阻害薬処理による各細胞の細胞内顆粒速度分布図 (Mean ± SD, n=60)

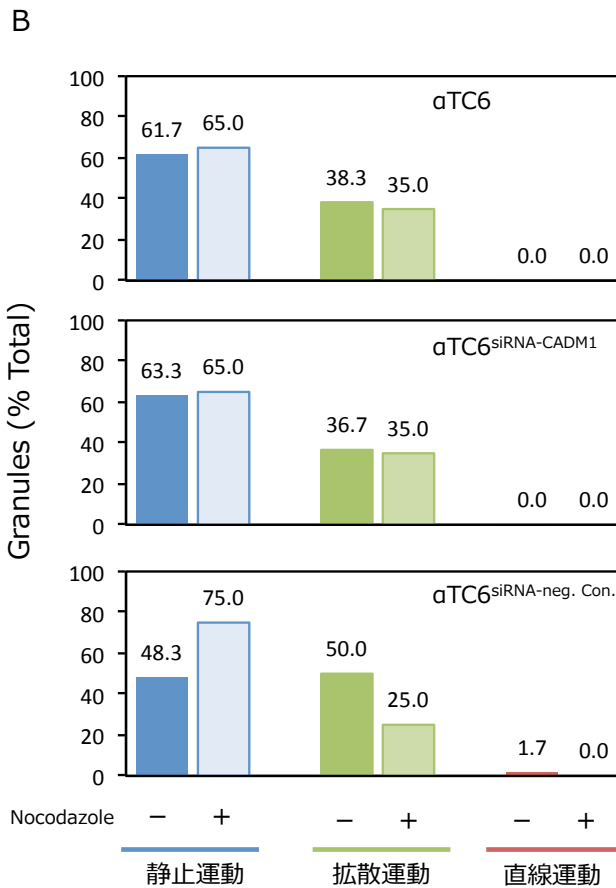
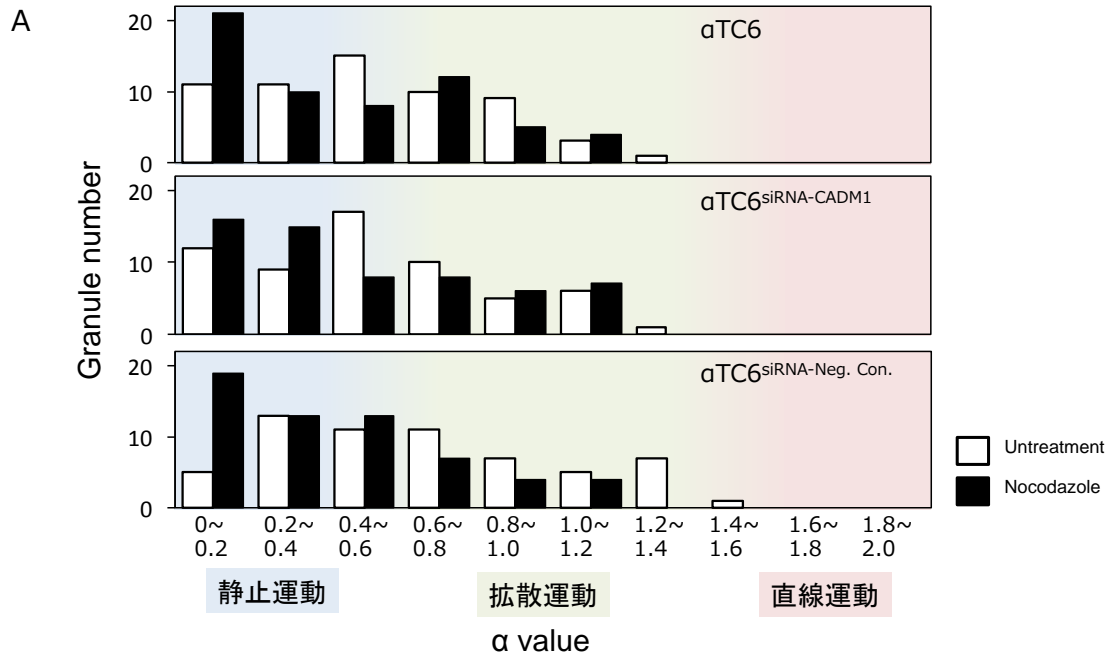


Figure 3-9. 細胞骨格阻害薬処理による α 値分布。(A) 阻害薬非処理時(白カラム)では細胞内顆粒運動パターンは三種の細胞ともに静止から拡散運動が多く、ノコダゾール処理時(黒カラム)は静止運動が増加した。(B) ノコダゾール処理・非処理群の顆粒運動パターンの変化。顆粒の運動パターンは、 α 値がそれぞれ静止運動は <0.6 、拡散運動は $0.6\sim 1.4$ 、直線運動は $1.4<$ とした。n=60

II-3-8. CADM1による α 細胞内顆粒動態の解明

先行研究では、CADM1の発現抑制によってアルギニンや低グルコース刺激に伴う α 細胞からのグルカゴン分泌は有意に増加することが報告されており [Ito et al., 2012]、CADM1はギャップジャンクションを介した細胞間相互作用によりグルカゴンの過剰な分泌を抑制していると考えられている。本研究では、CADM1の発現抑制により、生理条件下でのグルカゴン分泌の抑制が示された。これらの知見から、CADM1は細胞間相互作用を介して細胞から細胞へのシグナル伝播を制御することで α 細胞からのグルカゴン分泌を厳密に制御していると考えられる。

接着分子は、細胞外では他の接着分子や細胞外マトリックスと結合する役割、細胞膜を介してその情報を細胞内に伝達する役割、細胞内では細胞骨格タンパク質を利用して接着構造をより安定なものにする役割を担っていると考えられる。この考えに立脚すれば、CADM1がシグナル伝播だけでなく、細胞骨格タンパク質を介して細胞内の分泌顆粒の動態にも影響を及ぼしているのではないかと考え、研究を進めてきた。その結果、CADM1は生理条件下（非刺激時）における微小管に沿った顆粒動態には関与していないと考えられた。そのため、CADM1は、細胞膜直下でのアクチン構造の制御、またはSNAREタンパク質を介した膜融合の制御に関与することが考えられる。現時点では、これらの理由を検討するには至っておらず、今後の研究の研究でCADM1とグルカゴン分泌の関係を明らかにしていく必要がある。

また、細胞の活性化に伴う分泌顆粒動態の変化も大変興味深い研究課題である。本研究では、未刺激の細胞を対象とした測定しかできなかったが、刺激後の時間経過に伴って、顆粒動態がどのように変化するのか、その変化に3種類の細胞でどのような違いが見られるのかを解析する必要がある。この結果が、グルカゴン分泌に対するCADM1の役割を明らかにする上で、重要な知見になることが期待される。さらに、顆粒の動きの方向性に関する検討も重要である。本研究で用いた α 細胞コロニーでは、CADM1は α 細胞の接着部位に集積し、細胞膜にほぼ均一に分布している。一方、接着面が小さい場合（例えば、神経突起との接着やビーズとの接着など）には、細胞膜のCADM1は接着部位に集積することが知られている [Ito et al., 2012]。このような場合に、分泌顆粒はCADM1の集積部位に向かって動くといったような方向性が見られるのかは、 α 細胞におけるCADM1の機能を研究する上で、重要な情報になるものと考えられる。

最後に、本研究では、顆粒の染色にquinacrineを用いてきた。Quinacrineは酸性顆粒を染色すると言われており、quinacrine染色顆粒が全てグルカゴン含有する顆粒であるかどうかは確証がない。そこで、プログルカゴンと赤色蛍光タンパク質 mCherry の融合タンパク質 (PGCG-mCherry) を α 細胞に発現させることを試みたが、全ての細胞に均等に発現させることは難しかった。そこで、Quinacrine 染色顆粒と PGCG-mCherry 発現顆粒の共局在を調べたところ、ほぼ一致していると判断された（相関係数： 0.78 ± 0.04 ）ため、本研究では顆粒の染色に quinacrine を用いた。今後は、PGCG-mCherryの安定発現 α 細胞を作製して、解析する顆粒の選択性を向上させる必要があると考えている。

このように、本研究で得られた結果は、今後のさらなる研究の足掛かりになるものと考えている。これまで述べてきたような研究をさらに展開して、 α 細胞のグルカゴン分泌における接着分子CADM1の役割を明らかにしていきたい。

Ⅲ-4. 小括

- 接着分子CADM1は、生理条件下でのPGCG-GLase分泌量を正に制御することが示された。
- CADM1 は、膵島 α 細胞の微小管に沿った顆粒動態とその運動パターンに影響を及ぼさないことから、細胞膜直下において制御を受けている可能性が示唆された。

第IV章 総括

新規作用機序の糖尿病治療薬の開発や糖尿病の早期発見・早期治療によって糖尿病の治療は一定の効果を上げている。しかし、国内外のⅡ型糖尿病の患者数は増加の一途を辿っており、2040年には成人の10人に1人が糖尿病に罹患するとされる。糖尿病は自覚症状が乏しく、自覚症状が得られた際には重度の症状に陥ることが多いためサイレントキラーとも呼ばれる。治療には、食事療法や運動療法を継続して行う必要があるが、症状の改善が分かりにくいため治療コンプライアンスが悪く、薬物療法も併用されることが多い。糖尿病の薬物治療をより効果的により安全に行うためには、血糖を制御に関わる組織・細胞の細胞機能の解明が必要不可欠である。

本研究により、Preferred法を用いて発現量を増加させたPGCG-GLase安定発現 α TC6^{PGCG-GLase}細胞を用いた「生物発光イメージング法」により、刺激に伴い、接着部位でグルカゴンの分泌量が増大することが明らかになった。また、接着分子CADM1の発現抑制によってPGCG-GLaseの分泌量が低下することが示された。CADM1は、細胞内のグルカゴン分泌顆粒の移動速度と運動パターンに影響を及ぼさないことが示唆されたことから、細胞膜直下でのCADM1機能を詳細に追究し、グルカゴン分泌への影響を明らかにする必要があると考えられる。これらのイメージング解析法は、より詳細な膵島 α 細胞のグルカゴン分泌機構を解明するための有用なツールになると考えられる。そして、既存の糖尿病治療薬によるグルカゴン分泌への影響の評価や接着分子CADM1を標的とした新規糖尿病治療薬へ開発の一助になることが期待される。

第V章 謝辞

本研究を遂行するに際し、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科生体超分子システム解析学分野 平嶋 尚英 教授に深甚な謝意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言および御校閲を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 肥田 重明 教授、服部 光治 教授、山村 寿男 准教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益な御指導、御助言を賜りました愛知学院大学薬学部 古野 忠秀 教授、伊納 義和 講師、愛知学院大学歯学部 金森 孝雄 教授、鈴木 崇弘 准教授、JNC 株式会社 横浜研究所 井上 敏 主任企画員、名古屋市立大学大学院薬学研究科 田中 正彦 准教授、鈴木 亮 講師に深謝致します。

α TC6 細胞と α TC6^{siRNA-CADM1} 細胞、 α TC6^{siRNA-Neg. Con.} 細胞をご供与いただきました近畿大学医学部病理学講座 伊藤 彰彦 教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、御協力頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科生体超分子システム解析学分野の卒業生および教室員諸氏に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、各種申請書類の作成や学生生活にお力添えを頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科事務室の皆様、川村 美由紀様に感謝致します。

最後に、常日頃から支えてくれた友人、家族に深く感謝いたします。

第VI章 参考文献

- Abu Sayeed M, Mahtab H, Akter Khanam P, Abul Ahsan K, Banu A, Rashid AN, Azad Khan AK. (2014). Diabetes and Impaired Fasting Glycemia in the Tribes of Khagrachari Hill Tracts of Bangladesh. *Diabetes Care* **27**: 1054-1059.
- Andersson SA, Pedersen MG, Vikman J, Eliasson L. (2011). Glucose-dependent docking and SNARE protein-mediated exocytosis in mouse pancreatic α cell. *Pflügers Arch* **462**: 443-454.
- Balczon R, Overstreet KA, Zinkowski RP, Haynes A, Appel M. (1992). The identification, purification, and characterization of a pancreatic β cell form of the microtubule adenosine triphosphatase kinesin. *Endocrinology* **13**: 331-336.
- Bankir L, Bouby N, Blondeau B, Crambert G. (2016). Glucagon actions on the kidney revisited: possible role in potassium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**: 469-486.
- Bansal P, Wang Q. (2008) Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295** :751-761.
- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* **12**: 141-146.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* **297**: 1525-1531.
- Borden P, Houtz J, Leach SD, Kuruvilla R. (2013). Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Rep* **4**: 287-301.
- Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, Giovannoni L, Parnaud G, Berney T. (2010). Unique arrangement of α - and β - cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* **59**: 1202-1210.
- Bryan BJ, Sent-Gyorgyi CS. (1999). Luciferases, fluorescent proteins, nucleic acids encoding the luciferases and fluorescent proteins and the use thereof in diagnostics, high throughput screening and novelty items. International Pub. No. WO 99/49019.
- Burns SM, Vetere A, Walpita D, Dančik V, Khodier C, Perez J, Clemons PA, Wagner BK, Altshuler D. (2015). High-throughput luminescent reporter of insulin secretion for discovering regulators of pancreatic β cell function. *Cell Metab* **21**: 126-137.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2334-2339.
- Caicedo A. (2013). Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye. *Semin Cell Dev Biol* **24**: 11-21.
- Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. (2012). Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* **24**: 246-251.
- Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. (2011). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes Mellitus present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* **8**: 228-236.

- Cornell S. (2015). Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Ther Clin Risk Manag* **11**: 621-632.
- Drucker DJ. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab* **3**: 153-65.
- Erez Geron, Sigalit Boura-Halfon, Eyal D. Schejter, Ben-Zion Shilo. (2015). The Edges of Pancreatic Islet β Cells Constitute Adhesive and Signaling Microdomains. *Cell Rep.* **10** : 317-325.
- Gaisano HY, Macdonald PE, Vranic M. (2012). Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol* **3**: 349.
- Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. (2007). α cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* **28**: 84-116.
- Guizzetti L, McGirr R, Dhanvantari S. (2014). Two dipolar α -helices within hormone-encoding regions of proglucagon are sorting signals to the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* **289**: 14968-14980.
- Gustavsson N, Wei SH, Hoang DN, Lao Y, Zhang Q, Radda GK, Rorsman P, Südhof TC, Han W. (2009). Synaptotagmin-7 is a principal Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -induced glucagon exocytosis in pancreas. *J Physiol* **587**: 1169-1178.
- Hancock AS, Du A, Liu J, Miller M, May CL. (2010). Glucagon Deficiency Reduces Hepatic Glucose Production and Improves Glucose Tolerance In Adult Mice. *Mol Endocrinol* **24**: 1605-1614.
- Heaslip AT, Nelson SR, Lombardo AT, Beck Previs S, Armstrong J, Warshaw DM. (2014). Cytoskeletal dependence of insulin granule movement dynamics in INS-1 β cells in response to glucose. *PLoS One* **9**: e109082.
- Hoboth P, Müller A, Ivanova A, Mziaut H, Dehghany J, Sönmez A, Lachnit M, Meyer-Hermann M, Kalaidzidis Y, Solimena M. (2015). Aged insulin granules display reduced microtubule-dependent mobility and are disposed within actin-positive multigranular bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E667-676.
- Inouye S, Ohmiya Y, Toya Y, Tsuji FI. (1992). Imaging of luciferase secretion from transformed Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9584-9587.
- Inouye S, Sahara Y. (2008). Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps*. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 96-101.
- Inouye S, Sahara-Miura Y, Sato J, Suzuki T. (2015). Codon optimization of genes for efficient protein expression in mammalian cells by selection of only preferred human codons. *Protein Expr Purif* **109**: 47-54.
- Inouye S, Suzuki T. (2016). Protein expression of preferred human codon-optimized *Gaussia* luciferase genes with an artificial open-reading frame in mammalian and bacterial cells. *Protein Expr Purif* **128**: 93-100.
- International diabetes federation. (2015) IDF diabetes atlas 7th edition.
- Ito A, Ichiyangi N, Ikeda Y, Hagiyaama M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, Murakami Y. (2012). Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet α -cells and prevents their excessive secretion of glucagon. *Islets* **4**: 49-55.

- Jaques F, Jousset H, Tomas A, Prost AL, Wollheim CB, Irminger JC, Demaurex N, Halban PA. (2008). Dual effect of cell-cell contact disruption on cytosolic calcium and insulin secretion. *Endocrinology* **149**: 2494-2505.
- Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* **383**: 1068-1083.
- Kalwat MA, Thurmond DC. (2013). Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet β cells. *Exp Mol Med* **45**: e37.
- Kalwat MA, Wichaidit C, Nava Garcia AY, McCoy MK, McGlynn K, Hwang IH, MacMillan JB, Posner BA, Cobb MH. (2016). Insulin promoter-driven *Gaussia* luciferase-based insulin secretion biosensor assay for discovery of β -cell glucose-sensing pathways. *ACS Sens* **1**: 1208-1212.
- Kimball CP, Murlin JR. (1923). Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem* **58**: 337-346.
- Kobat D, Horton NG, Xu C. (2011). In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex. *J Biomed Opt* **16**: 106014.
- Koma Y, Furuno T, Hagiwara M, Hamaguchi K, Nakanishi M, Masuda M, Hirota S, Yokozaki H, Ito A. (2008). Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions. *Gastroenterology* **134**: 1544-1554.
- Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, Meda P, Kucera T, Zarbalis K, Wurst W, Nagamatsu S, Lammert E. (2007). EphA-Ephrin-A-mediated β cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* **129**: 359-370.
- Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. (2001). TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* **27**: 427-430.
- Lee Y, Wang MY, Du XQ, Charron MJ, Unger RH. (2011). Glucagon Receptor Knockout Prevents Insulin-Deficient Type 1 Diabetes in Mice. *Diabetes* **60**: 391-397.
- MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P. (2007). A K_{ATP} channel-dependent pathway within α cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol* **5**: e143.
- Mandic SA, Skelin M, Johansson JU, Rupnik MS, Berggren PO, Bark C. (2011). Munc18-1 and Munc18-2 proteins modulate β -cell Ca^{2+} sensitivity and kinetics of insulin exocytosis differently. *J Biol Chem* **286**: 28026-28040.
- McGirr R, Ejbick CE, Carter DE, Andrews JD, Nie Y, Friedman TC, Dhanvantari S. (2005). Glucose dependence of the regulated secretory pathway in α TC1.6 cells. *Endocrinology* **146**: 4514-4523.
- McGirr R, Guizzetti L, Dhanvantari S. (2013). The sorting of proglucagon to secretory granules is mediated by carboxypeptidase E and intrinsic sorting signals. *J Endocrinol* **217**: 229-240.
- Meng YX, Wilson GW, Avery MC, Varden CH, Balczon R. (1997). Suppression of the expression of a pancreatic β -cell form of the kinesin heavy chain by antisense oligonucleotides inhibits insulin secretion from primary cultures of mouse β -cells. *Endocrinology* **138**: 1979-1987.

- Moiseeva EP, Straatman KR, Leyland ML, Bradding P. (2014). CADM1 controls actin cytoskeleton assembly and regulates extracellular matrix adhesion in human mast cells. *PLoS One* **9**: e85980.
- Murakami S, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. (2014). Trans-homophilic interaction of CADM1 activates PI3K by forming a complex with MAGuK-family proteins MPP3 and Dlg. *PLoS ONE* **9**: e82894.
- Nakamura T, Yoshikawa T, Naganuma F, Mohsen A, Iida T, Miura Y, Sugawara A, Yanai K. (2014). Role of histamine H₃ receptor in glucagon-secreting α TC1.6 cells. *FEBS Open Bio* **5**: 36-41.
- Olofsson CS, Håkansson J, Salehi A, Bengtsson M, Galvanovskis J, Partridge C, SörhedeWinzell M, Xian X, Eliasson L, Lundquist I, Semb H, Rorsman P. (2009). Impaired insulin exocytosis in neural cell adhesion molecule^{-/-} mice due to defective reorganization of the submembrane F-actin network. *Endocrinology* **150**: 3067-3075.
- Paroutis P, Touret N, Grinstein S. (2004) The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation, *Physiology* **19**, 207-215.
- Ravier MA, Güldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Söhl G, Wollheim CB, Willecke K, Henquin JC, Meda P. (2005). Loss of connexin36 channels alters β -cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release., *Diabetes* **54**: 1798-1807.
- Rikitake Y, Mandai K, Takai Y. (2012). The role of nectins in different types of cell-cell Adhesion. *J Cell Sci* **125**: 3713–3722.
- Rouillé Y, Bianchi M, Irminger JC, Halban PA. (1997). Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. *FEBS Lett* **413**: 119-123.
- Rouillé Y, Kantengwa S, Irminger JC, Halban PA. (1997). Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J Biol Chem* **272**: 32810-32816.
- Saxton MJ. (1997). Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. *Biophys J* **72**: 1744-1753.
- Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, Satoh K, Takeuchi M, Imai T, Monden M, Takai Y. (2003). Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem* **278**: 35421-35427.
- Spijker HS, Song H, Ellenbroek JH, Roefs MM, Engelse MA, Bos E, Koster AJ, Rabelink TJ, Hansen BC, Clark A, Carlotti F, de Koning EJ. (2015). Loss of β -Cell Identity Occurs in Type 2 Diabetes and Is Associated With Islet Amyloid Deposits. *Diabetes* **64**: 2928-2938.
- Suckow AT, Comoletti D, Waldrop MA, Mosedale M, Egodage S, Taylor P, Chessler SD. (2008). Expression of neurexin, neuroligin, and their cytoplasmic binding partners in the pancreatic β -cells and the involvement of neuroligin in insulin secretion. *Endocrinology* **149**: 6006-6017.
- Suckow AT, Zhang C, Egodage S, Comoletti D, Taylor P, Miller MT, Sweet IR, Chessler SD. (2012). Transcellular neuroligin-2 interactions enhance insulin secretion and are integral to pancreatic β cell function. *J Biol Chem* **287**: 19816-19826.

- Sutherland EW, de Duve C. (1948). Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J Biol Chem* **175**, 663-674.
- Suzuki T, Inouye S. (2014). Video-rate bioluminescence imaging of protein secretion from a living cell. *Methods Mol Biol* **1098**: 71-83
- Suzuki T, Kondo C, Kanamori T, Inouye S. (2011a). Video rate bioluminescence imaging of secretory proteins in living cells: localization, secretory frequency, and quantification. *Anal Biochem* **415**: 182-189.
- Suzuki T, Kondo C, Kanamori T, Inouye S. (2011b). Video-rate bioluminescence imaging of matrix metalloproteinase-2 secreted from a migrating cell. *PLoS One* **6**: e25243.
- Suzuki T, Usuda S, Ichinose H, Inouye S. (2007). Real-time bioluminescence imaging of a protein secretory pathway in living mammalian cells using *Gaussia* luciferase. *FEBS Lett* **581**:4551-4556.
- Suzuki T, Kanamori T, Inouye S. (2017) Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.
- Taleb N, Haidar A, Messier V, Gingras V, Legault L, Rabasa-Lhoret R. (2017). Glucagon in artificial pancreas systems: Potential benefits and safety profile of future chronic use. *Diabetes Obes Metab* **19**: 13-23.
- Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. (2005). Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* **11**: 435-443.
- Unger RH, Cherrington AD. (2012). Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* **122**: 4-12.
- Unger RH, Orci L. (1976). Physiology and pathophysiology of glucagon. *Physiol Rev* **56**: 778-826.
- Urase K, Soyama A, Fujita E, Momoi T. (2001). Expression of RA175 mRNA, a new member of the immunoglobulin superfamily, in developing mouse brain. *Neuroreport* **12**: 3217-3221.
- Varadi A, Ainscow EK, Allan VJ, Rutter GA. (2002). Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic β cells. *J Cell Sci* **115**: 4177-4189.
- Vieira E, Salehi A, Gylfe E. (2007). Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic α cells. *Diabetologia* **50**: 370-379.
- Wakayama T, Ohashi K, Mizuno K, Iseki S. (2001). Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells. *Mol Reprod Dev* **60**: 158-164.
- Wang R, Li J, Lyte K, Yashpal NK, Fellows F, Goodyer CG. (2005). Role for β 1 integrin and its associated α 3, α 5, and α 6 subunits in development of the human fetal pancreas. *Diabetes* **54**: 2080-2089.
- Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Veedfald S, Windeløv JA, Plamboeck A, Bojsen-Møller KN, Idorn T, Feldt-Rasmussen B, Knop FK, Vilsbøll T, Madsbad S, Deacon CF, Holst JJ. (2014). Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels? *Diabetologia* **57**: 1919-1926.
- Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ. (2016). The biology of glucagon and the consequences of hyperglucagonemia. *Biomark Med* **10**: 1141-1151.

- Whalley NM, Pritchard LE, Smith DM, White A. (2011). Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic α cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on β -cells ? *J Endocrinol* **211**: 99-106.
- Xia F, Leung YM, Gaisano G, Gao X, Chen Y, Fox JE, Bhattacharjee A, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG. (2007). Targeting of voltage-gated K^+ and Ca^{2+} channels and soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins to cholesterol-rich lipid rafts in pancreatic α -cells: effects on glucagon stimulus-secretion coupling. *Endocrinology* **148**: 2157-2167.
- Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler MB, Braun M, Wang Q. (2006). Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABA_A receptor system. *Cell Metab* **3**: 47-58.
- Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. (2002). Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* **62**: 5129–5133.
- Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* **19**: 429-38.
- Zhang Q, Ramracheya R, Lahmann C, Tarasov A, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Brereton M, Collins S, Galvanovskis J, Gonzalez A, Groschner LN, Rorsman NJ, Salehi A, Travers ME, Walker JN, Gloyn AL, Gribble F, Johnson PR, Reimann F, Ashcroft FM, Rorsman P. (2013). Role of K_{ATP} channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metab* **18**: 871-882.
- Zhu D, Zhang Y, Lam PP, Dolai S, Liu Y, Cai EP, Choi D, Schroer SA, Kang Y, Allister EM, Qin T, Wheeler MB, Wang CC, Hong WJ, Woo M, Gaisano HY. (2012). Dual role of VAMP8 in regulating insulin exocytosis and islet β cell growth. *Cell Metab* **16**: 238-249.
- Zhu X, Hu R, Brissova M, Stein RW, Powers AC, Gu G, Kaverina I. (2015). Microtubules negatively regulate insulin secretion in pancreatic β cells. *Dev Cell* **34**: 656-668.
- 一般社会法人 日本糖尿病学会. (2014) 糖尿病治療ガイド 2014-2015. 文光堂