

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860756

研究課題名(和文) 膵細胞における第2相インスリン分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of the glucose-induced second phase insulin secretion in pancreatic beta-cells

研究代表者

青柳 共太 (Kyota, Aoyagi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：50453527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵細胞からの第2相インスリン分泌の分子機構を明らかにすることを目的とし、小胞局在タンパク質VAMP7とモータータンパク質MyosinVaの第2相インスリン分泌における役割について検討を行ったものである。MyosinVaを発現しない、もしくは発現量が著しく減少した自然発生変異体マウスおよびラットを用いた研究から、MyosinVaは第2相インスリン分泌の制御に関与しないことを見いだした。一方、膵細胞特異的VAMP7遺伝子欠失マウスを用いた研究から、VAMP7はインスリン顆粒以外の小胞に局在し、間接的にインスリン分泌を制御することで第2相分泌を選択的に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular mechanism underlying the glucose-induced second phase insulin secretion in pancreatic beta-cells. To this end, I studied the roles of VAMP7, a member of v-SNARE proteins localized in some types of vesicles, and a motor protein, MyosinVa, on the second phase insulin secretion. Using MyosinVa spontaneous mutant mice and rats in which the MyosinVa expression level is severely reduced, I found that MyosinVa was not involved in the regulation of the second phase insulin secretion. On the other hand, mice genetically eliminating VAMP7 specifically in pancreatic beta-cells (VAMP7 bKO) showed selective reduction of the second phase insulin secretion. Because VAMP7 was not localized in insulin granules, and the morphology and intracellular distribution of insulin granules in VAMP7 bKO beta-cells were not altered, I speculated that VAMP7 would regulate the second phase insulin secretion by an indirect mechanism.

研究分野：インスリン分泌

キーワード：インスリン分泌 膵細胞 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

インスリンは血糖上昇に応じて急峻で一過的な第1相分泌と持続的な第2相分泌からなる2相性分泌により膵細胞から分泌される。先行研究により第1相インスリン分泌の制御機構が明らかになりつつある一方、第2相分泌の制御機構はほとんど明らかにされていない。インスリン分泌不全を成因とする2型糖尿病の発症・進展に伴い、第2相分泌は代償的な亢進とその後の減弱・消失を示すことから、2型糖尿病の病態を解明する上で第2相分泌を制御する分子機構を明らかにすることは非常に重要な課題である。しかしながら2型糖尿病の発症・進展と第2相分泌の変容の関連は全く不明である。

全反射型蛍光顕微鏡を用いたインスリン分泌可視化解析から、第2相分泌に関わるインスリン顆粒の分泌と神経シナプスで観察される刺激非依存的な分泌(構成性分泌)との共通点が示唆されていた。すなわち、膵β細胞における第2相分泌に関わるインスリン顆粒からの分泌と同様、神経シナプスの構成性分泌は低Ca²⁺感受性であり、Syntaxin1A/SNAP25/VAMP2非依存的である(*Curr Opin Neurobiol*, 2011)。また膵β細胞における構成性分泌と第2相分泌に関わるインスリン顆粒は非常に類似した挙動を示すことから、これら2つの分泌が共通の機構により制御されている可能性が示唆されていた。さらに近年、神経シナプスにおける構成性分泌が分泌小胞に局在するVAMP7依存的であることが報告されたことから(*Neuron*, 2011)、第2相分泌の制御にVAMP7が関与する可能性が示唆されていた。

また申請者は先行研究においてPI3K-Akt経路を急性的に阻害するとインスリン顆粒の細胞内動態が活性化され、第2相分泌が選択的に増強されることを報告していた(*Biochem J*, 2010; *PLoS One*, 2012)。モータータンパク質であるMyosinVaがAktの基質となりうることが先行研究により示されていたことから(*Mol Cell Biol*, 2007)、第2相分泌に関わるインスリン顆粒の挙動制御にAktによるMyosinVaのリン酸化が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

第2相インスリン分泌におけるVAMP7とAkt-MyosinVa経路の役割を解明し、2相性インスリン分泌の制御機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

1) Aktによる第2相インスリン分泌増強機構にMyosinVaが関与するか検討するために、MyosinVa遺伝子発現量が著しく減弱したラット(*Myo5a^{dop}*)およびMyosinVa遺伝子欠損マウス(*Myo5a^{dn}*)から単離した膵島においてAkt阻害剤処理による増強作用を観察できるか検討した。また、Akt阻害剤処理により

MyosinVaのリン酸化状態に変化が観察できるか検討した。

2) VAMP7が第2相インスリン分泌に関与するか検討するため、膵β細胞特異的VAMP7遺伝子欠失(VAMP7βKO)マウスから単離した膵島をグルコース溶液で灌流刺激し、2相性インスリン分泌におけるVAMP7の役割について検討した。また、インスリン顆粒の動態制御におけるVAMP7の関与について検討を行った。

4. 研究成果

1) *Myo5a^{dop}*ラットおよび*Myo5a^{dn}*マウスから膵島を単離し、抗MyosinVa抗体(Cell Signaling Technology社)を用いたウエスタンブロットにより、先行研究と同様、MyosinVa発現量の顕著な減少を確認した。次に、*Myo5a^{dop}*ラットおよび*Myo5a^{dn}*マウスから単離した膵島におけるインスリン分泌能を調べるために各膵島を16mMグルコースで30分間刺激して外液中に分泌されるインスリン量を定量した。すると*Myo5a^{dop}*から単離した膵島では野生型ラットから単離した膵島に比べ、インスリン分泌能が45%減少していた(野生型: 2.2 ± 0.2 、*Myo5a^{dop}*: 1.2 ± 0.1 % of total insulin content)。一方、20μM Akti-1/2処理により野生型および*Myo5a^{dop}*から単離した膵島で同程度のインスリン分泌の増強が観察された(野生型: 2.5 ± 0.2 、*Myo5a^{dop}*: 1.8 ± 0.2 % of total insulin content)。*Myo5a^{dn}*から単離した膵島においても野生型マウスから単離した膵島に比べ、インスリン分泌能の減少は観察されたが(野生型: 0.7 ± 0.2 、*Myo5a^{dn}*: 0.3 ± 0.1 % of total insulin content)、20μM Akti-1/2処理により野生型、*Myo5a^{dn}*から単離した膵島において同程度のインスリン分泌の増強が観察された(野生型: 0.9 ± 0.2 、*Myo5a^{dn}*: 0.6 ± 0.1 % of total insulin content)。次に先行研究が示すようにMyosinVaがAktの基質となり得るかどうかについて検討を行った。まず野生型マウス膵島から抗MyosinVa抗体を用いてMyosinVaを免疫沈降して得たサンプルを用いて抗リン酸化Akt基質抗体(Cell Signaling Technology社)を用いてウエスタンブロットを行った。しかしながらMyosinVaに相当するリン酸化シグナルは検出できなかった。次に、20μM Akti-1/2存在下もしくは非存在下で22mMグルコース刺激した単離膵島を用い、抗MyosinVa抗体を用いた免疫沈降および抗リン酸化Akt基質抗体を用いたウエスタンブロットを同様に行った。しかしながらMyosinVaに由来する抗リン酸化Akt基質抗体のシグナルは検出できなかった。以上の結果よりAkt阻害剤処理による膵島からのインスリン分泌増強作用にMyosinVaは関与していないと結論した。

2) 膵β細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するRIP-CreマウスとVAMP7 floxマウスを交配し、VAMP7βKOマウスを作出した。VAMP7βKOマウスより単離した膵島を用い、

抗 VAMP7 抗体(Abcam 社)を用いてウエスタンブロットを行い、VAMP7 β KO 膵島では野生型膵島に比べて VAMP7 発現量が約 70%減少していることを確認した。また各種特異抗体を用いたウエスタンブロットにより VAMP1、VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP8 の発現は野生型膵島と VAMP7 β KO 膵島で変化がないことを確認した。次に VAMP7 β KO マウスより単離した膵島を用いてインスリン分泌能について検討を行った。16mM グルコース溶液で 30 分間刺激し、細胞外へ分泌されたインスリン量を定量したところ、野生型マウスより単離した膵島に比べて VAMP7 β KO 膵島では分泌能が約 60%減少することを見いだした(野生型: 2.2 ± 0.2 、VAMP7 β KO: 0.9 ± 0.1 % of total insulin content)。ところが 40mM KCl で 10 分間刺激下場合には VAMP7 β KO 膵島におけるインスリン分泌能は野生型膵島と同等であった(野生型: 0.6 ± 0.1 、VAMP7 β KO: 0.6 ± 0.1 % of total insulin content)。一方、VAMP7 β KO 膵島におけるインスリン含量は野生型膵島と同等であった(野生型: 83.4 ± 10.5 、VAMP7 β KO: 95.3 ± 7.7 ng insulin/islet)。これらの結果から、VAMP7 β KO 膵島では第 2 相インスリン分泌が選択的に減少していることが示唆された。そこで次に VAMP7 β KO 膵島を 22mM グルコース溶液で灌流刺激し、分泌されたインスリンを経時的に測定した。その結果、野生型膵島に比べて VAMP7 β KO 膵島は刺激開始から 10 分の間に観察される第 1 相分泌には全く影響がなかったのに対し、刺激開始から 10 分以降に観察される第 2 相分泌が選択的に減少していることが明らかとなった。 Ca^{2+} 濃度指示薬である Fura-2 を用い、VAMP7 β KO マウスから調製した膵 β 細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態解析を行ったところ、グルコース刺激による Ca^{2+} 動態は VAMP7 β KO β 細胞と野生型 β 細胞において差が認められなかった。これらの結果から、VAMP7 はグルコース刺激依存的な Ca^{2+} 流入以降のステップを制御することにより第 2 相分泌を選択的に制御していることが示唆された。

VAMP7 は小胞に局在する SNARE タンパク質であるため、VAMP7 がインスリン顆粒に存在し、第 2 相分泌に関わるインスリン顆粒の動態を選択的に制御している可能性について検討を行った。まず HA-VAMP7 を発現させた膵 β 細胞を抗インスリン抗体(Sigma 社)と抗 HA 抗体(Cell Signaling Technology 社)を用いて免疫染色したところ、VAMP7 とインスリン顆粒の共局在は観察されなかった。次に膵 細胞由来の株化細胞である Min6 細胞を用いてショ糖濃度勾配超遠心分画法によりインスリン顆粒画分を回収し、抗 VAMP7 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、VAMP7 はインスリン顆粒画分には回収されないことが明らかとなった。さらに VAMP7 β KO 膵島を固定し、電子顕微鏡解析を行った。すると野生型膵 β 細胞に比べ、

VAMP7 β KO 膵 β 細胞ではインスリン顆粒の大きさ、細胞膜にドッキングしているインスリン顆粒の数、および細胞内におけるインスリン顆粒の分布に変化は観察されなかった。以上の結果より、VAMP7 はインスリン顆粒以外の小胞に局在し、間接的な制御によりグルコース刺激依存的な第 2 相分泌を選択的に制御していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Ando K, Kudo Y, Aoyagi K, Ishikawa R, Igaraashi M, Takahashi M. Calmodulin-dependnet regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res*, vol.1535: 1-13 (2013) 査読あり

Xie L, Gao S, Alcaire SM, Aoyagi K, Wang Y, Griffin JK, Stajlar I, Nagamatsu S, Zhen M. NLF-1 delivers a sodium leak channel to regulate neuronal excitability and modulate rhythmic locomotion. *Neuron*, vol.77: 1069-1082 (2013) 査読あり

Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS, Nagamatsu S. Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol.110: 19420-19425 (2013) 査読あり

[学会発表](計 8 件)

今泉美佳, 青柳共太, 岸本拓磨, 永松信哉 ノックアウトマウスを用いたインスリン開口分泌のイメージング解析, 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 京都, 2015 年 2 月 13 ~ 14 日

今泉美佳, 青柳共太, 岸本拓磨, 永松信哉 有芯顆粒を介したインスリン分泌動態の可視化, 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会合同年会, 奈良, 2014 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日

今泉美佳, 青柳共太, 岡村匡史, 中道洋子, 西脇知世乃, 永松信哉 CDKAL1 欠損マウスでは妊娠期の代償性インスリン分泌亢進機能が低下している, 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 22 ~ 24 日

青柳共太, 今泉美佳, Zhen M, 永松信哉 膵 β 細胞からのインスリン分泌における NALCN/mNLF-1 の役割, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M,

Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS, Nagamatsu S. Serotonin regulates glucose stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy. The 73rd Scientific Session of American Diabetes Association, Chicago, USA, 2013年6月21~25日

青柳共太, 今泉美佳, 西脇知世乃, 中道洋子, 永松信哉 Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates glucose-induced insulin secretion through MyosinVa pathway in pancreatic beta-cells. 第65回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2013年6月19~21日

Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS, Nagamatsu S. Serotonin regulates glucose stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy. Beta Cell Workshop 2013, 京都, 2013年4月23~26日

Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S. Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates glucose-induced insulin secretion through myosinVa pathway in pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013, 京都, 2013年4月23~26日

〔図書〕(計1件)

Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nagamatsu S. Imaging of Insulin Exocytosis from Pancreatic Beta Cells. Neuromethods (eds; Thorn, P), Springer, pp.55-74

〔その他〕

ホームページ等

www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/insulin/

6. 研究組織

(1)研究代表者

青柳 共太 (AOYAGI, Kyota)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：50453527