

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19525

研究課題名(和文) VAMP7による膵細胞からの第2相インスリン分泌制御機構

研究課題名(英文) A study to elucidate the role of VAMP7 in insulin secretion from pancreatic beta-cells.

研究代表者

青柳 共太 (Aoyagi, Kyota)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：50453527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：VAMPファミリータンパク質は膜融合を仲介するSNAREタンパク質である。膵細胞にはVAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP7、VAMP8が発現しているが、膵細胞におけるVAMP7の役割については明らかではなかった。本研究において私は膵細胞特異的VAMP7欠失マウスを用い、VAMP7がオートファジーを介したミトコンドリア品質管理に関与することを明らかにすると共に、膵細胞におけるミトコンドリア品質管理が糖尿病発症に関連する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：VAMP family proteins are SNARE proteins, which mediate fusions between intracellular vesicles and their target membranes. VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP7, VAMP8 are expressed in pancreatic beta-cells, but the physiological role of VAMP7 in insulin secretion from pancreatic beta-cells were remained to be elucidated. In this study, I found that VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic beta-cells. I also found that maintenance of mitochondrial homeostasis would play a critical role in pathology of type 2 diabetes mellitus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン分泌 糖尿病 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

インスリンは膵臓ランゲルハンス島(膵島)内の膵β細胞から血中グルコース濃度(血糖値)依存的に分泌される。分泌されたインスリンは脂肪や筋組織において血中からの糖の取り込みを促進すると共に、肝臓からの糖の放出を抑制することで血糖値の上昇を抑制する役割を果たす。したがって、膵β細胞からのインスリン分泌不全は慢性高血糖を主徴とする糖尿病の一因となる。日本では300万人以上が糖尿病に罹患しており、そのうちの大部分は肥満や運動不足などをきっかけとして発症する2型糖尿病に分類される。2型糖尿病の病因・病態を解明するためにも膵β細胞からのインスリン分泌機構を明らかにすることは重要な課題である。

膵β細胞からのインスリン分泌は血糖の上昇直後に観察される急峻で一過的な第1相分泌と、それに続く持続的な第2相分泌から構成される2相性を示す。先行研究により第1相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かった。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相分泌機構を明らかにすることは非常に重要な課題であった。

VAMP7は細胞内小胞膜に局在する膜タンパク質であり、細胞内小胞輸送に重要な役割を果たすいわゆるSNAREタンパク質である。VAMP1/Synaptobrevin1、VAMP2/Synaptobrevin-2、VAMP3/Cellbrevin、VAMP4、VAMP5、VAMP7/TI-VAMP、VAMP8/EndobrevinからなるVAMPファミリータンパク質のうち、膵β細胞にはVAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP7、VAMP8の発現が確認されていた。このうち、VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP8についてはそれぞれインスリン顆粒などに局在し、インスリン顆粒の開口放出に関わることや細胞内小胞輸送に関わるということが明らかにされていたが、VAMP7については膵β細胞における機能解析が行われていなかった。

我々は膵β細胞特異的VAMP7遺伝子欠失(VAMP7βKO)マウスを用いた予備実験においてVAMP7が第2相分泌の制御に関わることを見だしていた。すなわち、VAMP7βKOMausから単離した膵島では野生型マウスから単離した膵島に比べて、第2相分泌が選択的に減弱していた。しかしながらVAMP7がどのようにして第2相選択的にインスリン分泌を制御しているかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

膵β細胞におけるVAMP7の役割の解明を通して第2相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) インスリン分泌におけるVAMP7の役割
単離した膵島および分散培養膵β細胞を用い、グルコース刺激依存的なインスリン分泌、細胞内Ca²⁺濃度変化、細胞内ATP産生量について検討を行った。また、インスリン顆粒の細胞内局在について調べるために、膵β細胞を電子顕微鏡で観察し、細胞内インスリン顆粒密度、細胞膜からインスリン顆粒までの距離、細胞膜にドッキングしているインスリン顆粒の数について解析を行った。さらに細胞内におけるVAMP7の局在について調べるために、シヨ糖密度勾配遠心法による細胞小器官分画解析と免疫染色による解析を行った。

(2) オートファジーにおけるVAMP7の役割
オートファゴソーム形成量のマーカーであるLC3-IIの量をイムノプロット法により定量的に検出し、解析を行った。さらに、抗LC3抗体を用いた免疫染色を行うことにより細胞内に形成されたオートファゴソームの数について可視化解析を行った。

(3) VAMP7によるミトコンドリア品質管理の検討

ミトコンドリア活性について検討するために、膵島におけるROS産生量を生化学的に測定した。また、分散培養膵β細胞を用い、mitotracker Red CM-H₂XRos (MTR)を用いた機能的なミトコンドリアの染色を行った。さらに、オートファジーの基質に選択的に蓄積するp62のミトコンドリアにおける蓄積量を調べるために、単離膵島から遠心分離によりミトコンドリア濃縮画分を調製し、ミトコンドリア濃縮画分におけるp62の含量をイムノプロットにて解析した。最後に電子顕微鏡解析によりミトコンドリアの形態について検討した。

(4) VAMP7 KO膵β細胞におけるミトコンドリア機能の検討

ミトコンドリア膜電位感受性色素であるTMREを用い、グルコース刺激依存的なミトコンドリア機能亢進について可視化解析を行った。また、ミトコンドリア内にCa²⁺感受性蛍光タンパク質を発現させることにより、グルコース刺激依存的なミトコンドリア内Ca²⁺動態について可視化解析を行った。

(5) VAMP7 βKOマウスにおける耐糖能の検討

野生型およびVAMP7 βKOマウスを用いた経口糖負荷試験により耐糖能について検討を行った。また、生後5週令から高脂肪食を10週間与えて肥満を誘導した野生型およびVAMP7 βKOマウスにおいて経口糖負荷試験を行った。

4. 研究成果

(1) インスリン分泌におけるVAMP7の役割
VAMP7 βKO膵島をグルコースで刺激する

と、予備実験で確認した通り、第2相インスリン分泌の選択的な減弱が観察された。一方、グルコース刺激依存的な細胞内Ca²⁺動態に変化は観察できなかった。ATP産生量について調べたところ、グルコース刺激後5分の時点では変化がなかったが、第2相インスリン分泌に相当する刺激後20分後の時点では有意な減少が観察された。さらに、VAMP7 KO 膵β細胞の電子顕微鏡解析を行ったところ、インスリン顆粒の細胞内局在には全く違いが観察できなかった。VAMP7の細胞内局在について調べたところ、VAMP7はインスリン顆粒には局在せず、Rab11が局在するリサイクリングエンドソームに局在することを見いだした。

以上の結果から、VAMP7はインスリン顆粒の開口放出には直接関与せず、ATP産生能に影響を与えることによって第2相分泌を選択的に制御していると結論した。

(2) オートファジーにおけるVAMP7の役割

先行研究によりVAMP7がオートファゴソーム形成に關与する可能性が示唆されていたため、膵β細胞におけるオートファジーにVAMP7が關与する可能性について検討した。野生型およびVAMP7 βKOマウスから単離した膵島もしくは分散培養膵β細胞を飢餓刺激することによりオートファジーを惹起し、形成されたオートファゴソーム量について解析を行った。すると、VAMP7 KO 膵β細胞ではオートファゴソームの形成が抑制されていることを見いだした。さらに、VAMP7 KO 膵β細胞にVAMP7を発現させたところ、飢餓刺激依存的なオートファゴソーム形成が回復することを見いだした。

以上の結果から、VAMP7はオートファゴソーム形成に關与すると結論した。

(3) VAMP7によるミトコンドリア品質管理の検討

VAMP7 βKOマウスから単離した膵島においてグルコース刺激依存的なATP産生量の減少が観察されたこと、さらにVAMP7がオートファゴソーム形成に關与することから、VAMP7はオートファジーによる機能不全ミトコンドリア除去に關与する可能性について検討を行った。VAMP7 βKO単離膵島ではROS産生量の有意な増加が観察された。次に、分散培養膵β細胞における機能的なミトコンドリアをMTRにより染色したところ、VAMP7 KO 膵β細胞では機能的なミトコンドリアが減少していることを見いだした。また、オートファジーによって分解されるべき基質に選択的に蓄積するp62がVAMP7 βKO膵島から調製したミトコンドリア濃縮画分において有意に増加していることを見いだした。さらに、電子顕微鏡解析によりミトコンドリアの形態について電子顕微鏡解析を行ったところ、VAMP7 KO 膵β細胞では膨潤し、クリステ構造が乱れた形態異常ミトコンド

リアが多数観察された。

以上の結果から、VAMP7 KO 膵β細胞では機能不全となり、本来オートファジーで分解・除去されるべき機能不全ミトコンドリアが蓄積していることが明らかとなった。

(4) VAMP7 KO 膵β細胞におけるミトコンドリア機能の検討

機能不全ミトコンドリアが蓄積したVAMP7 KO 膵β細胞におけるミトコンドリア機能について解析するために、TMREを用いたミトコンドリア機能可視化解析を行った。すると、VAMP7 KO 膵β細胞ではグルコース刺激依存的なミトコンドリア機能の亢進が減弱していることが明らかとなった。先行研究においてグルコース刺激依存的なミトコンドリア内Ca²⁺濃度上昇が第2相分泌に重要であることが報告されていたことから、ミトコンドリア内Ca²⁺動態について解析を行った。すると、VAMP7 KO 膵β細胞ではグルコース刺激依存的なミトコンドリア内Ca²⁺濃度上昇が抑制されていることを見いだした。

以上の結果から、VAMP7 KO 膵β細胞では機能不全ミトコンドリアが蓄積することによりグルコース刺激依存的なミトコンドリア機能亢進および第2相分泌に重要な役割を果たすミトコンドリア内Ca²⁺濃度上昇が共に減弱していることが明らかとなった。

(5) VAMP7 βKOマウスにおける耐糖能の検討

経口糖負荷試験により第2相分泌が選択的に減弱するVAMP7 βKOマウスの耐糖能について検討を行ったが、VAMP7 βKOマウスでは耐糖能異常は観察されなかった。これは血糖維持に重要な役割を果たす第1相分泌がVAMP7 βKOマウスでは減弱していないことに起因すると考えられた。一方、高脂肪食飼育により肥満を誘導したVAMP7 βKOマウスは経口糖負荷試験において耐糖能の増悪を示した。高脂肪食飼育したVAMP7 βKOマウスから膵島を単離し、インスリン分泌について調べたところ、第1相および第2相分泌が共に減弱していることを見いだした。また、高脂肪食飼育したVAMP7 βKOマウスの膵島では機能不全ミトコンドリアのマーカーとなるParkinが顕著に蓄積していたことから、VAMP7欠失により機能不全ミトコンドリアが過剰に蓄積することを見いだした。興味深いことに、高脂肪食飼育した野生型マウスや糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスの膵島では機能不全ミトコンドリアの分解・除去に關わるVAMP7の発現が増大していることを見いだした。

以上の結果から、VAMP7を介した機能不全ミトコンドリアの除去機構は肥満状態における膵β細胞からのインスリン分泌を維持する上で重要な役割を果たしていることと結論した。

(6) まとめ

本研究により、膵β細胞において VAMP7 はオートファゴソーム形成を制御することにより機能不全ミトコンドリアの除去に関与することが明らかとなった。そのため、VAMP7 KO膵β細胞では機能不全ミトコンドリアが蓄積することでミトコンドリアの機能が低下し、第2相分泌に重要な役割を果たすグルコース刺激依存的なミトコンドリア内 Ca²⁺動態が低下することで、第2相分泌が選択的に減弱することが明らかとなった。

高脂肪食飼育することにより肥満を誘導すると、膵島において機能不全ミトコンドリアが緩やかに蓄積する一方、機能不全ミトコンドリアの分解に関与する VAMP7 の発現が増強した。高脂肪食飼育した VAMP7 βKO マウスではインスリン分泌の低下と耐糖能の増悪が観察されたことから、VAMP7 によるオートファジーを介した機能不全ミトコンドリアの分解は肥満状態におけるインスリン分泌を維持する上で重要な役割を果たしていると結論した。

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)

1. Kunii M, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Kobayashi M, Kawakami R, Kondoh Y, Shimizu T, Simizu S, Lin B, Nunomura K, Aoyagi K, Ohno M, Ohmuraya M, Sato T, Yoshimura SI, Sato K, Harada R, Kim YJ, Osada H, Nemoto T, Kasai H, Kitamura T, Nagamatsu S, Harada A. Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells. *J Cell Biol*, vol.215: 121-138 (2016) doi: 10.1083/jcb.201604030 査読あり
2. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Itakura M, Torii S, Akimoto Y, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Kishimoto T, Kawakami H, Harada A, Takahashi M, Nagamatsu S. VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic β-cells. *Diabetes*, vol.65: 1648-1659 (2016) doi: 10.2337/db15-1207 査読あり
3. Aoyagi K, Rossignol E, Hamdan FF, Mulcahy B, Xie L, Nagamatsu S, Rouleau GA, Zhen M, Michaud JL. A gain-of-mutation in NALCN in a child with intellectual disability, ataxia, and arthrogryposis. *Hum Mutat*, vol.36: 753-757 (2015) doi: 10.1002/humu.22797 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 青柳共太 膵細胞における VAMP7 を介したオートファジー制御機構とその

生理作用 第 10 回オートファジー研究会 2016 年 11 月 14 日~2016 年 11 月 15 日 新潟県・南魚沼郡

2. 青柳共太, 西脇知世乃, 中道洋子, 岸本拓磨, 鳥居征司, 今泉美佳 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic β-cells. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25 日~2016 年 9 月 27 日 宮城県・仙台市
3. 今泉美佳, 青柳共太, 吉田昌史, 飛田耶馬人, 岸本拓磨, 中道洋子, 西脇知世乃, 崎村建司, 大塚稔久, 加計正文, 永松信哉 インスリン開口分泌におけるアクティブゾーン構成タンパク質 ELKS の役割 第 59 回日本糖尿病学会年次集会 京都府・京都市
4. 今泉美佳, 青柳共太, 飛田耶馬人, 崎村建司, 大塚稔久 インスリン開口分泌におけるアクティブゾーン構成タンパク質の役割 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年 3 月 28 日~2016 年 3 月 30 日 福島県・郡山市
5. 青柳共太, 今泉美佳, 板倉誠, 鳥居征司, 秋元義弘, 西脇知世乃, 中道洋子, 岸本拓磨, 原田彰宏, 高橋正身, 永松信哉 VAMP7 はオートファジーを制御してミトコンドリアの恒常性維持と第 2 相インスリン分泌を調節する 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日 兵庫県・神戸市
6. 青柳共太, 今泉美佳, 西脇知世乃, 中道洋子, 岸本拓磨, 永松信哉 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control second phase insulin secretion in pancreatic β-cells. 第 58 回日本神経化学会大会 2015 年 9 月 11 日~2015 年 9 月 13 日 埼玉県・大宮市
7. 青柳共太, 今泉美佳, 板倉誠, 鳥居征司, 岸本拓磨, 西脇知世乃, 中道洋子, 秋元義弘, 原田彰宏, 高橋正身, 永松信哉 VAMP7 はオートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構を介して膵β細胞からの第 2 相インスリン分泌を制御する 第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日~2015 年 7 月 2 日 東京・江戸川区

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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・講師

研究者番号 : 50453527