

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09845

研究課題名(和文) VAMP7を介した膵細胞のミトコンドリア品質管理と糖尿病発症機序の解明

研究課題名(英文) A study to elucidate the role of VAMP7 in mitochondrial quality control in beta-cells and in pathogenesis of type 2 diabetes

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膜融合を仲介するSNAREタンパク質であるVAMP7は膵細胞においてオートファゴソーム形成に関与し、機能不全となったミトコンドリアの分解に関与することを以前報告していた。しかしながらVAMP7によるオートファゴソーム形成機構は不明であった。本研究において私はVAMP7がAtg9aの機能を助けることによりオートファゴソーム形成に関与することを明らかにした。また、糖尿病モデルマウスにおいてミトコンドリアを基質としたオートファジー(マイトファジー)が増強していることを見だし、マイトファジーによるミトコンドリア品質管理が糖尿病発症に関与する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前の研究により、VAMP7遺伝子欠失マウスの膵細胞には機能不全となったミトコンドリアが蓄積しており、また同マウスを高脂肪食飼育すると耐糖能が悪化し、糖尿病状態となることが明らかになっていた。しかしながらVAMP7がオートファゴソーム形成に関与する分子機構は明らかではなかった。本研究によってオートファゴソーム形成におけるVAMP7の役割が明らかになったことは、VAMP7を標的として機能不全となったミトコンドリアの分解を促進することにより2型糖尿病の発症を抑制する新規治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, I reported that VAMP7, a member of SNARE proteins that mediate membrane fusions, is involved in autophagosome formation and degradation of dysfunctional mitochondria in pancreatic beta-cells. However, the role of VAMP7 in autophagosome formation was unclear. In this study, I found that VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a, a protein essential for autophagosome formation. I also found that mitophagy (selective degradation of mitochondria by autophagy) was facilitated in pancreatic beta-cells of diabetic model mice, suggesting a possibility that maintenance of mitochondrial homeostasis by mitophagy would play a critical role in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：VAMP7 オートファジー ミトコンドリア 膵細胞 インスリン分泌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インスリンは膵臓のランゲルハンス島(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細胞や筋細胞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。一方、肥満などにより脂肪細胞や筋細胞におけるインスリン作用が減弱し、インスリン依存的な糖の取り込みが減弱することが知られている(インスリン抵抗性)。このインスリン抵抗性が増大すると血糖値は上昇するが、膵β細胞は血糖値を維持するために代償的にインスリンを過剰分泌して血糖値の上昇を抑制する(代償性インスリン過剰分泌)。しかしながら慢性的なインスリン過剰分泌は『膵β細胞の疲弊』を招き、膵β細胞からのインスリン分泌量が徐々に減弱していき、最終的にはインスリン分泌不全による高血糖状態へと至る。この2型糖尿病の発症過程において、『代償性インスリン過剰分泌』状態を維持し、『膵β細胞の疲弊』を抑制することが2型糖尿病発症の抑制に重要であるが、その分子機構は明らかではなかった。

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/Synaptobrevin2、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、VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP7、VAMP8が膵β細胞に発現している。このうち、VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP8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与することや細胞内小胞輸送に関与することが明らかにされていた。

本研究開始以前に我々は膵β細胞特異的VAMP7遺伝子欠失(VAMP7βKO)マウスを高脂肪食で飼育することで肥満状態を誘導しても代償性インスリン過剰分泌は観察されず、耐糖能が悪化することを見いだしていた。また、VAMP7KO膵β細胞を解析したところ、他のVAMPファミリータンパクとは異なり、VAMP7は開口放出には関与しないことを見いだしていた。さらにVAMP7KO膵β細胞はオートファゴソーム形成不全を示し、本来オートファジーによって分解されるべき機能不全となった不良ミトコンドリアが細胞内に蓄積することで細胞全体のミトコンドリア品質が低下し、ATP産生能およびインスリン分泌能が低下することを明らかにしていた。これらの結果は、VAMP7を介した不良ミトコンドリアの分解・除去が『インスリン過剰分泌状態』を維持し、『膵β細胞の疲弊』から膵β細胞を保護する上で重要な役割を果たすことを示唆していた。しかしながらVAMP7によるオートファゴソーム形成制御の分子機構や不良ミトコンドリアの蓄積と糖尿病発症の関係は明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

『代償性インスリン過剰分泌』状態から『膵β細胞の疲弊』を経てインスリン分泌不全に至る過程におけるミトコンドリア品質管理機構について、VAMP7がどのように関与しているのか明らかにするために、VAMP7によるオートファゴソーム形成制御の分子機構を明らかにする。また、糖尿病モデルマウスの膵β細胞におけるオートファジーを介したミトコンドリア品質管理の状態について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵β細胞におけるVAMP7の局在

膵β細胞由来の株化細胞であるMin6細胞を用い、VAMP7の細胞内局在について調べるために、シヨ糖密度勾配遠心法と免疫染色法による解析を行った。

#### (2) VAMP7含有小胞の単離・解析

VAMP7を含有する細胞内小胞を単離するために、HA-tagを付加したVAMP7(HA-VAMP7)を発現させたMin6細胞を界面活性剤非存在下で破砕し、遠心処理によりマイクロソーム画分を調製した後、抗HA-tag抗体を用いて免疫沈降を行った。得られたサンプルに含まれるタンパク質について各種特異抗体を用いたイムノプロット法により解析を行った。

#### (3) オートファジーヒエラルキー解析によるVAMP7作用過程の解析

GFP-Atg13、GFP-FIP200、GFP-WIP12を発現させた野生型もしくはVAMP7KO膵β細胞をリソソーム阻害剤であるChloroquine(CQ)存在下で飢餓刺激し、点状局在を示したGFPシグナルの数を計数した。Atg16L1についてはCQ存在下で飢餓刺激した野生型もしくはVAMP7KO膵β細胞を抗Atg16L1抗体で免疫染色し、点状局在を示したシグナルの数を計数した。

#### (4) VAMP7変異体を用いたVAMP7KO膵β細胞におけるオートファゴソーム形成能回復実験

LC3は形成されたオートファゴソームに局在する。そこで、Longinドメイン(LD)もしくはSNAREモチーフを欠失させたVAMP7変異体を発現させたVAMP7KO膵β細胞を飢餓刺激した後、抗LC3抗体で免疫染色を行い、点状局在を示したLC3のシグナルの数を計数した。

#### (5) Hrb、SNAP-47、Syntaxin16ノックダウン実験

Hrb、SNAP-47、Syntaxin16 に対する shRNA を発現させる組換えアデノウイルスを作成した。Hrb、SNAP-47、Syntaxin16 に対する shRNA を発現させた膵 β 細胞を飢餓刺激した後、抗 LC3 抗体で免疫染色を行い、点状局在を示す LC3 のシグナルの数を計数した。また、Hrb、SNAP-47、Syntaxin16 に対する shRNA を発現させた Min6 細胞における ROS 産生能を ROS-Glo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay キットを用いて測定した。また、機能不全ミトコンドリア量を測定するために、Hrb、SNAP-47、Syntaxin16 に対する shRNA を発現させた膵 β 細胞における機能的なミトコンドリアを Mitotracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos で、全ミトコンドリアを抗 Tom20 抗体でそれぞれ染色し、全ミトコンドリアに対する機能的なミトコンドリアの比率を求めた。

#### (6) オートファジーによるミトコンドリア分解可視化マウスの作出

ミトコンドリア局在シグナルに mCherry と EGFP をタンデムに繋いだ配列 (MTS プローブ) の両端に flox 配列を挿入した配列を Rosa26 にノックインしたマウスと膵 β 細胞特異的に Cre recombinase を発現する RIP-Cre マウスを交配することにより膵 β 細胞特異的に MTS プローブを発現するマウスを作出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 膵 β 細胞における VAMP7 の局在

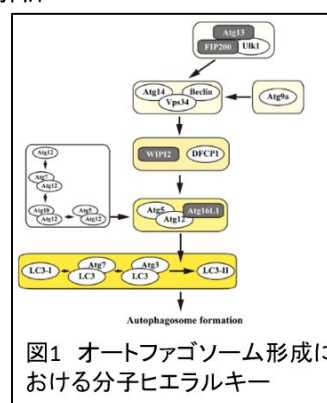
膵 β 細胞由来の株化細胞である Min6 細胞から回収したマイクロソームをショ糖密度勾配遠心法により分離すると、VAMP7 はリサイクリングエンドソームに局在する Rab11 と同じ画分に回収された。また、オートファゴソーム形成に必須な分子である Atg9a も VAMP7、Rab11 と同じ画分に回収された。さらに初代培養膵 β 細胞を抗 Rab11 抗体、抗 Atg9a 抗体で免疫染色すると、VAMP7 と Rab11、Atg9a が部分的に共同局在する様子が観察された。

#### (2) VAMP7 含有小胞の単離・解析

VAMP7 が膜タンパク質である Atg9a やリサイクリングエンドソームに局在する Rab11 と共同局在したことから、VAMP7 が Atg9a や Rab11 と共にリサイクリングエンドソームに局在することを確かめるために、HA-VAMP7 を発現させた Min6 細胞から抗 HA-tag 抗体を用いて HA-VAMP7 を含む小胞を単離し、その含有タンパク質をイムノプロット法により解析した。すると、HA-VAMP7 含有小胞画分において Atg9a は検出されたが、オートファゴソーム形成に関わる別のタンパク質である Atg16L1 は検出されなかった。さらに HA-VAMP7 含有小胞画分には Atg9a と共にリサイクリングエンドソームに局在することが報告されていた TBC1D14 は検出されたが、インスリン顆粒に局在する Phogrin は検出されなかった。以上の結果から、VAMP7 は Atg9a と共にリサイクリングエンドソームに局在すると結論した。

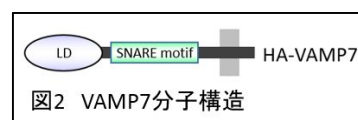
#### (3) オートファジーヒエラルキー解析による VAMP7 作用過程の解析

オートファゴソームは図 1 に示すように、一連のタンパク質が決まった順序でオートファゴソーム形成部位へ集積することで形成される。そこで、一連のオートファゴソーム形成過程において VAMP7 が関与する素過程を明らかにするために、野生型および VAMP7 KO 膵 β 細胞においてオートファゴソーム形成部位への Atg13、FIP200、WIP12、Atg16L1 の集積について検討を行った。すると、Atg13、FIP200 は VAMP7 KO による影響が観察されなかったが、WIP12 や Atg16L1 は VAMP7 KO によりオートファゴソーム形成部位への集積が有意に阻害された。以上の結果は、一連のオートファゴソーム形成過程において、VAMP7 は WIP12 や Atg16L1 よりも上流かつ Atg13 や FIP200 よりも下流の過程、つまり Atg9a がはたらく過程において作用していることを示唆していた。



#### (4) オートファゴソーム形成に関わる VAMP7 のドメイン解析

VAMP7 は N 末端側にいくつかのタンパク質と結合するのに重要な Longin ドメイン (LD) を持ち、分子中央に他の SNARE タンパク質との結合に必要な SNARE モチーフを持つ (図 2)。VAMP7 がどのようにしてオートファゴソーム形成に関わるか



明らかにするために、LD もしくは SNARE モチーフを欠失した VAMP7 変異体を作成し、VAMP7 KO 膵 β 細胞を用いてオートファゴソーム形成能の回復実験を行った。その結果、LD と SNARE モチーフの両方が VAMP7 によるオートファゴソーム形成能に必要であることが明らかになった。LD を欠いた VAMP7 変異体は細胞膜近傍に蓄積し、リサイクリングエンドソームに局在できない一方、SNARE モチーフを欠く VAMP7 変異体はリサイクリングエンドソームに局在を示した。これらの結果から、VAMP7 によるオートファゴソーム形成には LD と SNARE モチーフの両方が必要だが、LD は VAMP7 のリサイクリングエンドソームへの局在に重要である一方、SNARE モチーフは VAMP7 がリサイクリングエンドソームへ局在した後の過程において機能す

ることが明らかとなった。

#### (5) オートファゴソーム形成に関わる LD および SNARE モチーフ結合タンパク質の探索

LD および SNARE モチーフに結合する分子でオートファゴソーム形成に関わる分子の探索を行った。その結果、LD に結合する Hrb および SNARE モチーフに結合する SNAP-47 と Syntaxin16 がオートファゴソーム形成に関与することを見いだした。すなわち、shRNA を用いて Hrb、SNAP-47 および Syntaxin16 をノックダウンすると、形成されたオートファゴソームへ集積する LC3-II の量が減少することを見いだした。さらに、Hrb、SNAP-47、Syntaxin16 をノックダウンした Min6 細胞および膵  $\beta$  細胞では不良ミトコンドリア蓄積によって増加する ROS の産生量が増加し、機能不全となったミトコンドリアの割合が増加していることを明らかにした。また、Hrb、SNAP-47、Syntaxin16 をノックダウンした Min6 細胞では VAMP7 KO 膵  $\beta$  細胞と同様、グルコース刺激依存的なインスリン分泌が減少することを明らかにした。以上の結果から、VAMP7 は LD で Hrb と結合し、SNARE モチーフを介して SNAP-47 および Syntaxin16 と複合体を形成することによりオートファゴソーム形成に関与すると結論した。

#### (6) オートファジーによるミトコンドリア分解可視化マウスの作出・解析

膵  $\beta$  細胞におけるオートファジーを介した不良ミトコンドリアの分解活性を調べるために、分解中のミトコンドリアを可視化するプロンプ (MTS プロンプ) を膵  $\beta$  細胞特異的に発現するマウスを新潟大医歯学総合研究科の山下俊一先生、神吉智宏先生との共同研究において作出した。オートファジーでは分解基質は酸性度の高いリソソームへと輸送され、分解される。蛍光タンパク質である GFP と mCherry は pH 感受性が異なり、酸性環境下において GFP は素早く消光するのに対し、mCherry は消光しない。そこで、ミトコンドリア局在配列に GFP と mCherry をタンデムに繋げた MTS プロンプを膵  $\beta$  細胞特異的に発現するマウス (MTS マウス) を作出した。MTS マウスを高脂肪食で 10 週間飼育し、肥満・高血糖状態を誘導すると、膵  $\beta$  細胞においてオートファジーによるミトコンドリアの分解活性の上昇が観察された。また、MTS マウスと糖尿病モデルマウスである db/db マウスを交配させ、db/db の遺伝的背景を持つ MTS マウスを作出したところ、膵  $\beta$  細胞においてオートファジーによるミトコンドリア分解活性の顕著な増加が観察された。以上の結果から、糖尿病状態の膵  $\beta$  細胞では機能不全となった不良ミトコンドリアを積極的に分解していることが明らかとなった。

#### (7) まとめ

本研究により、膵  $\beta$  細胞において VAMP7 は Atg9a と共にリサイクリングエンドソームに局在し、オートファゴソーム形成を制御することが明らかとなった。VAMP7 は LD を介して Hrb と複合体を形成することにより Atg9a と共にリサイクリングエンドソームに局在した後、SNARE モチーフを介して SNAP-47、Syntaxin16 と複合体を形成することでオートファゴソーム形成に関与することが明らかとなった。さらに糖尿病モデルマウスの膵  $\beta$  細胞では機能不全となったミトコンドリアを活発に分解していることを可視化解析によって初めて明らかにした。これらの結果は『インスリン過剰分泌状態』から『膵  $\beta$  細胞の疲弊』を経てインスリン分泌不全へと至る過程において膵  $\beta$  細胞におけるオートファジーを介したミトコンドリア品質管理状態の変化が重要な役割を果たす可能性を示唆していると結論した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoyagi K, Itakura M, Fukutomi T, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Torii S, Makiyama T, Harada A, Ohara-Imaizumi M	4. 巻 159
2. 論文標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic beta-cells from male mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3674-3688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Yamauchi H, Mori MX, Hida Y, Tran HN, Ohkura M, Abe M, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Hara K, Sakimura K, Nagamatsu S, Mori Y, Nakai J, Kakei M, Ohtsuka T	4. 巻 29
2. 論文標題 ELKS/Voltage-dependent Ca <sup>2+</sup> channel-beta subunit module regulates polarized Ca <sup>2+</sup> influx in pancreatic beta cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1213-1226.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.12.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Krishnankutty A, Kimura T, Saito T, Aoyagi K, Asada A, Takahashi SI, Ando K, Ohara-Imaizumi M, Ishiguro K, Hisanaga SI.	4. 巻 7
2. 論文標題 In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 activity in neurons and brains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-09239-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Ohtsuka T	4. 巻 27S
2. 論文標題 Role of the active zone protein, ELKS, in insulin secretion from pancreatic beta-cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 S81-S91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2019.06.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳共太、板倉誠、福富俊之、西脇知世乃、中道洋子、鳥居征司、牧山智彦、原田彰宏、今泉美佳
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic beta-cells.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyota Aoyagi
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic $\beta$ -cells
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青柳共太、西脇知世乃、中道洋子、福富俊之、鳥居征司、牧山智彦、櫻井裕之、板倉誠、今泉美佳
2. 発表標題 膵細胞におけるVAMP7によるオートファゴソーム形成の制御機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青柳共太、板倉誠、牧山智彦、西脇知世乃、中道洋子、今泉美佳
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a function in pancreatic beta-cells
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----