

膵β細胞における VAMP ファミリータンパク質の機能

青柳 共太

1. はじめに

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での血中からの糖の取り込みを促進するとともに、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の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細胞において合成されたインスリンはインスリン顆粒と呼ばれる分泌小胞に貯蔵され、細胞内小胞輸送によって細胞膜近傍へと輸送される。そして食後の血糖値上昇に伴い、インスリン顆粒膜と細胞膜が融合する開口放出によりインスリンは細胞外へと分泌される。インスリンが合成されてから分泌されるまでの過程における細胞内小胞輸送や開口放出過程にはSNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) と呼ばれる一群のタンパク質が重要な役割を果たす。すなわち、輸送小胞膜上に局在するv-SNARE (vesicular SNARE) と輸送先となる標的膜に局在するt-SNARE (target SNARE) がSNARE複合体を形成することにより、輸送小胞と標的膜の特異的な融合を仲介している。本稿ではv-SNAREとして働くVAMP (vesicle-associated membrane protein) ファミリータンパク質の膵β細胞における役割について、筆者らの最近の研究結果を中心に概説する。

2. 膵β細胞からのインスリン分泌機構

血糖値が高まると、膵β細胞は糖輸送担体であるGLUT2を介して血中からグルコースを取り込み、糖代謝によってATPを産生する。このATP産生量の増加に反応してATP感受性K⁺チャネルが閉鎖することで膵β細胞の細胞膜の脱分極が起こる。すると電位依存性Ca²⁺チャネルが開き、Ca²⁺が細胞内へと流入することでインスリン顆粒の開口放出が惹起される。

他の興奮性分泌細胞とは異なり、膵β細胞からのグルコース刺激依存的なインスリン分泌は二相性を示す。すなわち、グルコース刺激直後に急峻で一過的な第1相インスリン分泌が観察された後、持続的な第2相インスリン分泌が観察される。2型糖尿病患者では、発症前より第1相インスリン分泌の選択的な減弱が観察されるとともに、発症に伴い第1相インスリン分泌の低下の進行と血糖値の上昇に相関が認められることから、血糖レベルの維持には第1相インスリン分泌が重要な役割を果たすことが知られている。一方、第2相インスリン分泌は2型糖尿病発症後しばらくの間は維持されるが、次第に減弱し消失することが知られている¹⁾。しかし、第2相インスリン分泌の生理的役割についてはいまだに明らかではない。

第1相インスリン分泌と第2相インスリン分泌では分泌機構が異なる。第1相インスリン分泌ではあらかじめ細胞膜にドッキングしたインスリン顆粒からのインスリン分泌が観察されるのに対し、第2相インスリン分泌では刺激後に細胞膜近傍へと輸送されたインスリン顆粒からインスリン分泌が観察される。さらに、細胞膜でt-SNAREとして働くSyntaxin1Aはインスリン顆粒のドッキングや第1相インスリン分泌で観察されるあらかじめドッキングしたインスリン顆粒からのインスリン分泌に選択的に関与するのに対し、第2相インスリン分泌には関与しないことが明らかになっている²⁾。他にもSNAP-23³⁾やMunc18-1⁴⁾などは第1相インスリン分泌の選択的な制御に関わる。

一方、第2相インスリン分泌の分子機構はほとんど明らかではない。現在、第2相インスリン分泌を制御する分子としてはR型電位依存性Ca²⁺チャネル、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ、Cdc42とその下流で働くPak1やRac1などが報告されているとともに⁵⁾、ミトコンドリア内腔のCa²⁺濃度が重要であることが報告されている⁶⁾。

杏林大学医学部生化学教室（〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2）

Functional roles of VAMP family proteins in pancreatic β-cells
 Kyoto Aoyagi (Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan)
 DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890247

© 2017 公益社団法人日本生化学会

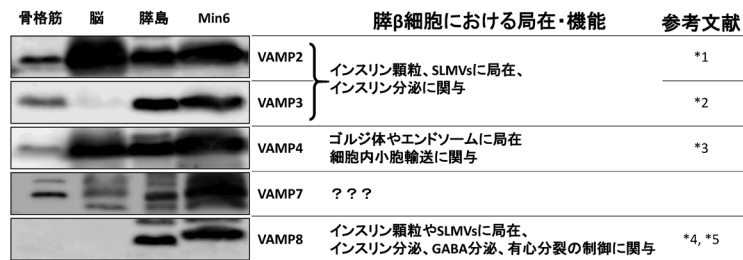


図1 膵島および膵β細胞由来Min6細胞におけるVAMPファミリータンパク質の発現

骨格筋、脳、膵島、Min6細胞から調製したサンプル各30μgを泳動し、特異抗体を用いて各VAMPファミリータンパク質をイムノブロット法により検出した。^{*1} Regazzi, R., *et al.* (1995) *EMBO J.*, **14**, 2723–2730, ^{*2} Regazzi, R., *et al.* (1996) *EMBO J.*, **15**, 6951–6959, ^{*3} Bogan, J.S., *et al.* (2012) *Traffic*, **13**, 1466–1480, ^{*4} Nagamatsu, S., *et al.* (2001) *J. Cell Sci.*, **114**, 219–227, ^{*5} Zhu, D., *et al.* (2012) *Cell Metab.*, **16**, 238–249.

3. 膵β細胞におけるVAMPファミリータンパク質の役割

VAMPファミリータンパク質は小胞膜に局在し、v-SNAREとして働く膜1回貫通型の膜タンパク質である。分子のC末端側に膜貫通領域を一つ持ち、C末端側が小胞の内腔側、N末端側が細胞質側に向くように配向している。細胞質側にあるSNAREモチーフを介してt-SNAREとして働くSyntaxinファミリータンパク質やSNAP25ファミリータンパク質とSNARE複合体を形成する。哺乳類において、VAMPファミリータンパク質はVAMP1/Synaptobrevin1, VAMP2/Synaptobrevin2, VAMP3/Cellubrevin, VAMP4, VAMP5, VAMP7/TI-VAMP, VAMP8/Endobrevinの七つが報告されている。他にも類似タンパク質としてSec22b, Ykt6, GS15, Bet1などが報告されているが、これらはVAMPファミリーと呼べるほど相同性は高くない。

図1に示すように膵島および膵β細胞由来の株化細胞であるMin6細胞では、VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP7, VAMP8の発現が認められる。このうち、VAMP2とVAMP3はインスリン顆粒とGABAを内包するsynaptic-like microvesicle (SLMV) に局在し、インスリン顆粒の開口放出において重要な役割を果たすことがRegazziらによって報告されている。VAMP4はゴルジ体やエンドソームに局在し、他の細胞と同様、細胞内小胞輸送に関与することが示唆されている。VAMP8はインスリン顆粒やSLMVなどに局在し、インスリンやGABAの分泌に関与している。また、VAMP8遺伝子欠失マウスを用いた研究から、VAMP8は膵β細胞における有糸分裂の制御にも関わることが報告されている。

一方、図1に示すように膵β細胞にはVAMP7の発現が認められるが、その生理的な役割については明らかではなかった。さまざまな細胞において、VAMP7はエンドソームやリソソームに局在し、細胞内小胞輸送の制御に関与することが知られている。また、一部の神経細胞ではシナプス小胞に局在し、シナプス部位へのシナプス小胞の輸

送や、神経伝達物質の開口放出を制御することが報告されている⁷⁾。さらに近年では、VAMP7がオートファジーに関与することが複数の研究室により報告されている^{8, 9)}。また、VAMP7遺伝子欠失マウスを用いた近年の研究において、VAMP7は1) T細胞においてT細胞受容体のアダプタータンパク質であるLat (linker for activation of T-cells)を含む小胞の細胞内輸送を制御し、T細胞の活性化に関与する¹⁰⁾、2) 感覚神経細胞において冷受容体として働くTRPM8の細胞膜への輸送を制御する¹¹⁾、3) 樹状細胞内におけるIL-12含有小胞の細胞内輸送と、開口放出を制御する¹²⁾ことが明らかとなっている。しかしながら膵β細胞におけるVAMP7の生理的な役割については不明であったため、我々は膵β細胞特異的なVAMP7遺伝子欠失(VAMP7βKO)マウスを用い、膵β細胞におけるVAMP7の生理的な役割について検討を行った¹³⁾。

4. 膵β細胞におけるVAMP7の生理的役割

まず膵β細胞由来株化細胞であるMin6細胞を用いた生化学的な解析や膵β細胞の免疫染色による解析から、VAMP7はインスリン顆粒に局在しないことを見いだした。一方、膵β細胞特異的にVAMP7を欠失させたVAMP7βKOマウスの解析から、単離した膵島ではグルコース刺激依存的な第2相インスリン分泌が選択的に減弱することを見いだした。すなわち、VAMP7はインスリン顆粒の細胞内小胞輸送や開口放出には関与しないにも関わらず、第2相インスリン分泌を選択的に制御していることが明らかとなった。

オートファジー不全となるAtg7遺伝子欠失マウスはインスリン分泌不全を示すこと¹⁴⁾、VAMP7がオートファジーの制御に関与することから⁸⁾、次にVAMP7 KO膵β細胞におけるオートファジーについて検討した。すると、VAMP7βKO膵島では飢餓刺激依存的なオートファゴソーム形成の減弱によるオートファジー不全が観察されることを見いだした。さらにVAMP7によるオートファジーの制

御とインスリン分泌の関連について明らかにするために、オートファジーによるミトコンドリア品質管理機構に着目した。ミトコンドリアは自身の呼吸反応に伴って産生される活性酸素種に常にさらされているため、ミトコンドリアには機能不全となったタンパク質や脂質が徐々に蓄積し、ミトコンドリアとしての機能が低下していくことが知られている。これに対し、ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、機能不全となったミトコンドリアの部品を機能不全ミトコンドリアとして分離し、オートファジーによって分解することでミトコンドリアの品質を維持している¹⁵⁾。すなわち、VAMP7 KO 膵β細胞では本来オートファジーで除去されるべき機能不全ミトコンドリアが蓄積したために、ATP産生能が低下し、インスリン分泌が減弱していると考えた。実際に、VAMP7 KO 膵β細胞では機能不全ミトコンドリアの蓄積が観察され、第2相インスリン分泌との関連が指摘されているミトコンドリア内Ca²⁺動態の減弱が観察された。さらに第2相インスリン分泌期に相当するグルコース刺激から20分以降において、細胞内ATP量が減少することを見いだした。したがってVAMP7はオートファジーを制御し、ミトコンドリア品質を維持することで第2相インスリン分泌に関与すると結論した(図2)。

さらに我々はVAMP7 βKOマウスで観察されるインスリン分泌不全と糖尿病の関連について検討を行った。VAMP7 βKOマウスは経口糖負荷試験において耐糖能異常を示さなかった。これは食後の血糖レベルの維持には第1相インスリン分泌が重要な役割を果たしていることから、第1相インスリン分泌が正常に保たれているVAMP7 βKOマウスでは耐糖能異常が観察されなかったと考えられる。一方、高脂肪食飼育により肥満状態を誘導したマウスの膵β細胞では細胞内恒常性維持のためにオートファジーが亢進することが報告されている¹⁴⁾。そこで膵β細胞においてオートファジー不全を示すVAMP7 βKOマウスを高脂肪食飼育し、インスリン分泌について検討を行った。すると、高脂肪食飼育したVAMP7 βKOマウスは経口糖負荷試験において耐糖能の増悪が観察された。また高脂肪食飼育したVAMP7 βKOマウスの膵島ではATP産生能のさらなる減弱により第2相インスリン分泌のみならず、第1相インスリン分泌の減弱も観察された。さらに、機能不全ミトコンドリアに選択的に蓄積するParkinの蓄積が高脂肪食飼育した野生型マウスの膵島に比べて顕著に増加していることを見いだした。これらの結果は高脂肪食飼育によりオートファジーで分解しきれない量の機能不全ミトコンドリアが蓄積したことにより、インスリン分泌能がさらに低下し、耐糖能異常につながったことを示唆している。

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*マウスの膵島においてVAMP7の発現が上昇していた。VAMP7はオートファジーによる

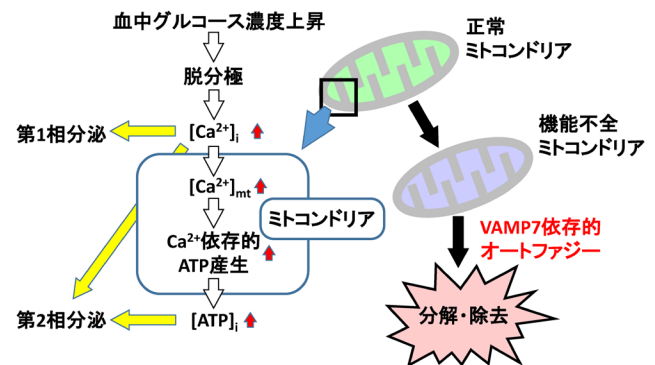


図2 VAMP7によるミトコンドリア品質管理を介した第2相インスリン分泌制御機構

血糖値の上昇に伴い、正常ミトコンドリア内ではCa²⁺依存的ATP産生が上昇し、第2相インスリン分泌に必要なATPが産生される。一方、VAMP7欠失膵β細胞ではオートファジーによる機能不全ミトコンドリアの除去が行われなかったために、機能不全ミトコンドリアが蓄積する。するとミトコンドリア内Ca²⁺濃度の上昇、および第2相インスリン分泌に必要なATP産生の活性化が阻害されることにより、第2相インスリン分泌が選択的に減少する。[Ca²⁺]_i: 細胞質Ca²⁺濃度, [Ca²⁺]_{mt}: ミトコンドリア内Ca²⁺濃度, [ATP]_i: 細胞質ATP濃度。

機能不全ミトコンドリアの除去に関与していることを考えると、高脂肪食飼育などにより機能不全ミトコンドリアが増加すると、それを効率よく除去するためにVAMP7の発現が代償的に増加したと考えられる。

5. おわりに

本研究により、膵β細胞におけるVAMP7はオートファジーを制御することによりミトコンドリア品質の維持に関与していることが明らかとなった。高脂肪食飼育により肥満およびインスリン過剰分泌状態を誘導した野生型マウスの膵島でVAMP7の発現が増加したのに対し、VAMP7 βKOマウスではインスリン過剰分泌状態が誘導されずに耐糖能異常を示したことは、糖尿病の発症においてVAMP7によるミトコンドリア品質管理機構が重要な役割を果たしていることを強く示唆している。今後はVAMP7によるオートファジー制御の分子機構を明らかにするとともに、ミトコンドリア品質管理機構の破綻と糖尿病発症の関連について明らかにしていきたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究は、杏林大学医学部生化学教室で行われたものであり、永松信哉特任教授、今泉美佳教授のご指導、また教員の皆様に感謝いたします。また共同研究者である板倉誠准教授・高橋正身教授(北里大学)、鳥居征司准教授(群馬大学生体調節研究所)、秋元義弘教授・川上速人教授(杏林大学)、原田彰宏教授(大阪大学)に

感謝いたします。

文 献

- 1) Utzschneider, K.M. & Kahn, S.E. (2004) International textbook of Diabetes Mellitus, pp. 375–388, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- 2) Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., & Nagamatsu, S. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 695–705.
- 3) 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., Ohmura, M., Sato, T., Yoshimura, S.I., Sato, K., Harada, R., Kim, Y.J., Osada, H., Nemoto, T., Kasai, H., Kitamura, T., Nagamatsu, S., & Harada, A. (2016) *J. Cell Biol.*, **215**, 121–138.
- 4) Oh, E., Kalwat, M.A., Kim, M.J., Verhage, M., & Thurmond, D.C. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 25821–25833.
- 5) Aoyagi, K., Ohara-Imaizumi, M., & Nagamatsu, S. (2011) *Front. Biosci.*, **16**, 1197–1210.
- 6) Wiederkehr, A., Szanda, G., Akhmedov, D., Makita, C., Heizmann, C.W., Schoonjans, K., Pozzan, T., Spat, A., & Wollheim, C.B. (2011) *Cell Metab.*, **13**, 601–611.
- 7) Chaineau, M., Danglot, L., & Galli, T. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 3817–3826.
- 8) Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., & Rubinsztein, D.C. (2011) *Cell*, **146**, 303–317.
- 9) Fader, C.M., Aguilera, M.O., & Colombo, M.I. (2012) *Autophagy*, **8**, 1741–1756.
- 10) Larghi, P., Williamson, D.J., Carpier, J.M., Dogniaux, J.M., Chemin, K., Bohineust, A., Danglot, L., Gaus, K., Galli, T., & Hivroz, C. (2013) *Nat. Immunol.*, **14**, 723–731.
- 11) Ghosh, D., Pinto, S., Danglot, L., Vandewauw, I., Segal, A., Van Ranst, N., Benoit, M., Janssens, A., Vennekens, R., Vanden Berghe, P., Galli, T., Vriens, J., & Voet, T. (2016) *Nat. Commun.*, **7**, 10489.
- 12) Chiaruttini, G., Piperno, G.M., Jouve, M., De Nardi, F., Larghi, P., Peden, A.A., Muller, S., Valitutti, S., Galli, T., & Benvenuti, F. (2016) *Cell Reports*, **14**, 2624–2636.
- 13) 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. (2016) *Diabetes*, **65**, 1648–1659.
- 14) Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., & Watada, H. (2008) *Cell Metab.*, **8**, 325–332.
- 15) Liesa, M. & Shirihai, O.S. (2013) *Cell Metab.*, **17**, 491–506.

著者寸描

●青柳 共太 (あおやぎ きょうた)

杏林大学医学部生化学教室講師。博士 (学術)。

■略歴 1976年東京に生る。99年東京工業大学生命理工学部卒業。2004年東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了。04～05年北里大学医学部特別研究員, 05～07年トロント・マウントサイナイ病院ポスドク, 07年杏林大学医学部助教, 16年より現職。

■研究テーマと抱負 分泌制御の分子機構。

■ウェブサイト www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/insulin/

■趣味 誰も通りそうもない道を探してツーリングすること。