

膵β細胞における第2相インスリン分泌制御機構の解明

青柳 共太

杏林大学医学部生化学教室

日本における糖尿病患者の多くは膵臓からのインスリン分泌不全を成因としている。インスリンは血糖上昇に応じて膵β細胞から分泌される。この膵β細胞をグルコースで刺激すると刺激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相分泌が観察される。当研究室などによる先行研究により、第1相分泌に関わる分子やその制御機構などが解明されつつあり、インスリン分泌不全を成因とする2型糖尿病との関連が明らかにされている。一方、第2相分泌については関わる分子やその制御機構など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を示した後、徐々に減弱・消失することから、2型糖尿病の病態を明らかにする上で第2相分泌の生理的意義およびその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。本研究は第2相インスリン分泌機構を明らかにすることを目的として行った。

① PI3K-Akt経路による第2相分泌選択的制御に MyosinVa は関与しない

私は先行研究において、膵β細胞をPI3K, PDK1, Aktの阻害剤で急性処理するとグルコース刺激依存的な第2相分泌が選択的に増強することを報告している (Aoyagi, et al, PLoS One, 2012)。また、Aktの基質となり得ることが報告されているMyosinVaの優性阻害変異体を強制発現させた膵β細胞ではAkt阻害剤処理による第2相分泌の増強効果が観察されないことを見いだしていた。これらの結果からAktの下流でMyosinVaを介した経路が第2相分泌を制御している可能性を考え、本研究ではMyosinVaのタンパク質発現量が1/100程度に減弱する自然発生変異マウス (Myo5a^{dn}) とMyosinVa遺伝子を欠失した自然発生変異ラット (Myo5a^{dop}) を用い、Akt阻害剤処理による第2相選択的な増強にMyosinVaを介した

経路が関与する可能性について検討を行った。

図1Aに示すように、Myo5a^{dn}マウス膵島およびMyo5a^{dop}ラット膵島においてMyosinVaの顕著な減弱および消失が認められた。次にMyo5a^{dn}マウス膵島およびMyo5a^{dop}ラット膵島におけるインスリン分泌について検討を行った。16mMグルコースで30分間刺激すると、野

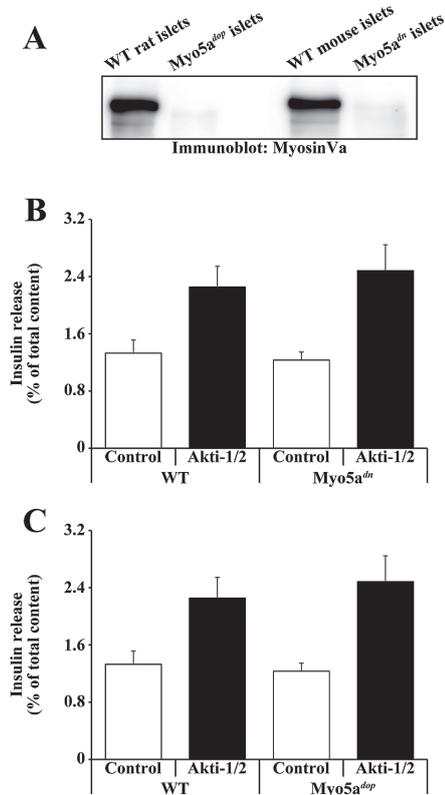


図1

(A) DOPラットおよびdnマウス膵島におけるMyosinVaの発現。(B) 野生型およびdnマウス膵島からのインスリン分泌におけるAkt阻害剤 (Akti-1/2) の影響。(C) 野生型およびDOPラット膵島からのインスリン分泌におけるAkt阻害剤の影響

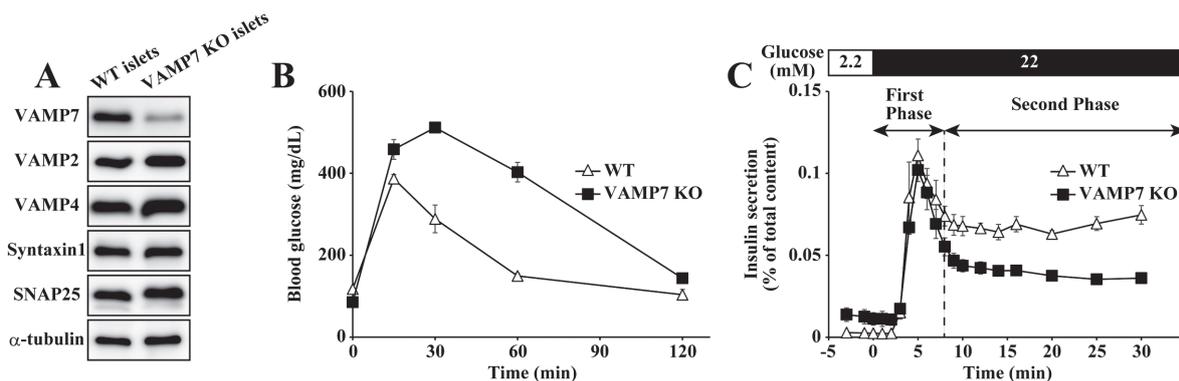


図2

(A) VAMP7 KOマウス膵島におけるSNAREタンパク質の発現。(B) 野生型およびVAMP7 KOマウスにおける経口糖負荷試験。(C) 野生型およびVAMP7 KOマウスから単離した膵島を用いたグルコース灌流刺激実験。

生型マウス膵島に比べ、Myo5a^{dn}膵島ではインスリン分泌能の若干の低下が観察された(図1B)。一方、Myo5a^{dop}膵島におけるグルコース刺激依存的なインスリン分泌は野生型ラット膵島に比べて有意に低下していることを見いだした。次にMyo5a^{dn}膵島およびMyo5a^{dop}膵島からのインスリン分泌におけるAkt阻害剤処理感受性について検討を行った。するとMyo5a^{dn}膵島およびMyo5a^{dop}膵島においてAkt阻害剤処理によりインスリン分泌の増強が認められた。これらの結果より、MyosinVaはAkt阻害剤処理による第2相分泌選択的な増強に関与していないと結論した。

②VAMP7は第2相インスリン分泌を制御する

当研究室の先行研究により、第1相分泌と第2相分泌ではCa²⁺感受性が異なっており(Ohara-Imaizumi, et al, BBRC, 2009)、また関与するSNAREタンパク質アイソフォームも異なることが明らかになっている(Ohara-Imaizumi, et al, JCB, 2007)。一方、神経細胞のシナプスにおいて観察される刺激非依存的な分泌(構成性分泌)は第2相インスリン分泌と共通した特徴が報告されている。すなわち、神経シナプスの構成性分泌は第2相インスリン分泌と同様、低Ca²⁺感受性であり、Syntaxin1やVAMP2などの刺激依存的な分泌に必要なSNAREタンパク質アイソフォーム非依存的であることが知られている(Ramirez, et al, Curr Opin Neurobiol, 2011)。従ってこれら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る。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(Hua et al, Neuron, 2011)。膵β細胞においてもVAMP7の発現は認められ、また膵β細胞由来の株化細胞においてVAMP7依存的な分泌成分の存在が報告されていることから、VAMP7が第2相分泌の制御に関与する可能性が考えられた。そこで本研究において膵β細胞特異的なVAMP7遺伝子欠失マウスを用い、第2相分泌におけるVAMP7の役割について解析を行った。

膵β細胞特異的VAMP7遺伝子欠失(VAMP7 KO)マウスより膵島を単離し、タンパク質の発現を調べると図2Aに示すようにVAMP7のみ顕著な減少が観察された。次にVAMP7 KOマウスにおいて経口糖負荷試験を行った。すると、VAMP7 KOマウスにおいて血糖値の有意な増悪が観察された(図2B)。さらにVAMP7 KOマウスより単離した膵島を22mMグルコースで灌流刺激を行い単位時間あたりのインスリン分泌能を経時的に調べたところ、VAMP7 KO膵島では第1相分泌は野生型マウス膵島と同等のインスリン分泌能を有していたのに対し、第2相分泌は野生型マウス膵島に比べてインスリン分泌能が有意に減弱していることを見いだした。これらの結果から、VAMP7は第2相インスリン分泌を選択的に制御するSNARE分子である可能性が考えられた。今後は膵β細胞におけるVAMP7の機能解明を通して第2相インスリン分泌機構の解明へとつなげていく予定である。

List of publications

1. Ando K, Kudo Y, Aoyagi K, Ishikawa R, Igarashi M, Takahashi M. Brain Res, vol. 1535: 1-13
2. 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. PNAS, vol. 110: 19420-5
3. Xie L, Gao S, Alcaire SM, Aoyagi K, Wang Y, Griffin JK, Stajlar I, Nagamatsu S, Zhen M. Neuron, vol. 77: 1069-82
4. Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nagamatsu S. Neuromethods, vol. 83: 55-74

講演記録

1. Beta Cell Workshop 2013 京都. 平成25年4月23-26日
2. 細胞内ロジスティクス・シンポジウム 兵庫 平成25年9月17-18日
3. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 平成25年9月11-13日
4. 第65回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 平成25年6月19-21日