

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成28年 3月29日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 杏林大学
職 名 助教
研究代表者 青柳 共太

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号: 15010)

1. 共同研究課題名	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た膵 β 細胞からの第2相インスリン分泌制御機構		
2. 共同研究目的	オートファジーおよび細胞内小胞輸送に関する VAMP7 の膵 β 細胞における細胞内局在を明らかにすること		
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担
(研究代表者) 青柳共太	杏林大学医学部生化学	助教	実験・解析の実施、研究の総括
(分担研究者) 永松信哉 今泉美佳	杏林大学医学部生化学 杏林大学医学部生化学	教授 教授	糖尿病解析実験 組織化学実験、可視化解析
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	分泌制御分野	氏 名 鳥居征司

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

マウス膵 β 細胞由来の株化細胞である Min6 細胞を用い、シヨ糖密度勾配遠心法による細胞成分分画実験を行う。回収した各分画における VAMP7 および細胞内小器官のマーカー分子をイムノブロット法により検出する。次に VAMP7 および様々な細胞内小器官のマーカー分子に対する特異抗体を用いた免疫染色法により初代培養膵 β 細胞を染色した後、共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察を行い、VAMP7 の細胞内局在について明らかにする。

飢餓刺激によりオートファジーを誘導した初代培養膵 β 細胞において VAMP7 およびオートファジーの隔離膜を蛍光免疫染色法により可視化し、共焦点蛍光顕微鏡で観察することにより VAMP7 がオートファジーの隔離膜に局在し、隔離膜形成に関与するか否か明らかにする。

7. 共同研究の成果

Min6 細胞を用いてシヨ糖密度勾配遠心法により細胞成分分画実験を行った。その結果、インスリン顆粒のマーカーである Phogrin が回収された分画に VAMP7 は回収されないことが明らかとなった。一方、Lysosome や endosome などが回収される分画に VAMP7 は主に回収された。VAMP7 に HA-tag を付与した HA-VAMP7 を発現させた膵 β 細胞を免疫染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、HA-VAMP7 はインスリンと共局在しないことが明らかとなった。一方、HA-VAMP7 は Lysosome の一部と共局在することが明らかになった。これらの結果から VAMP7 はインスリン顆粒膜上には存在せず、Lysosome へと至る細胞内小胞輸送を担うことが明らかとなった。

HA-VAMP7 を発現させた膵 β 細胞において飢餓刺激によりオートファジーを惹起したのち、免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。するとオートファゴソームのマーカーである LC3 のシグナルが顕著に増加すると共に HA-VAMP7 の一部が LC3 のシグナルと共局在する様子が観察できた。これらの結果から VAMP7 がオートファゴソーム形成を制御することによりオートファジーに関与することが明らかとなった。

以上の結果は研究論文として Diabetes 誌に投稿し、2016 年 3 月に受理された。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

原著論文

1. 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, in press

学会発表

2. 青柳共太、今泉美佳、板倉誠、鳥居征司、西脇知世乃、中道洋子、岸本拓磨、原田彰宏、秋元義弘、高橋正身、永松信哉
VAMP7 による第2相インスリン分泌の制御
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、下関
3. 青柳共太、今泉美佳、板倉誠、鳥居征司、西脇知世乃、中道洋子、岸本拓磨、原田彰宏、秋元義弘、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、東京
4. 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、神戸