

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 29 年 4 月 27 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 講師
研究代表者 青柳 共太

下記のとおり平成28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	オートファジーや細胞内小胞輸送に関与する VAMP7 の膵 β 細胞における細胞内局在を明らかにする。			
3. 共同研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 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	講師	実験・解析の実施	
(分担研究者) 今泉美佳	杏林大学医学部生化学	研究教授	実験・解析の実施	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	内分泌制御分野	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。回収した各画分における VAMP7 およびオートファジー関連分子をイムノブロット法により検出する。次に、VAMP7 および様々なオートファジー関連分子に対する特異抗体を用いた蛍光免疫染色法により初代培養膵 β 細胞を染色した後、共焦点顕微鏡を用いた観察を行って 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 と隔離膜、オートファジー関連分子の挙動を観察することにより VAMP7 がオートファジーを形成する素過程のうち、どの段階にかかわるか明らかにする。

7. 共同研究の成果

VAMP7 の細胞内局在について明らかにするために、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い、各画分に回収されたオルガネラマーカ分子および VAMP7 の量をイムノブロット法により検出した。その結果、VAMP7 は Recycling endosome のマーカである Rab11 と同じ分画に回収されることが明らかとなった。一方、Early endosome のマーカである EEA-1 やリソソームのマーカである LAMP-1、Late endosome および TGN のマーカである Syntaxin6 とは回収パターンが異なることを見いだした。次に、HA-VAMP7 を発現させた Min6 細胞および初代培養膵 β 細胞において抗 HA-tag 抗体および各種オルガネラマーカ分子に対する特異抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、Min6 細胞および初代培養膵 β 細胞のいずれにおいても HA-VAMP7 は Rab11 と共局在を示すことを見いだした。以上の結果から、VAMP7 は膵 β 細胞において Recycling endosome に局在すると結論した。

次に、オートファゴソーム形成過程において VAMP7 がどの素過程に関与するかを確かめるために、野生型および VAMP7 遺伝子欠失(VAMP7 KO)膵 β 細胞における Atg16L1 の挙動について観察を行った。野生型膵 β 細胞では飢餓刺激によってドット状の Atg16L1 シグナルが多数観察されるのに対し、VAMP7 KO 膵 β 細胞では飢餓刺激依存的に形成されるドット状の Atg16L1 シグナルの数が有意に減少していることを見いだした。一方、HA-VAMP7 を発現させた膵 β 細胞において、HA-VAMP7 と Atg16L1 の局在を免疫染色法で調べたところ、HA-VAMP7 と Atg16L1 はほとんど共局在を示さないことを見いだした。

これらの結果より、VAMP7 は Recycling endosome からの小胞輸送を制御することにより Atg16L1 が関与する素過程よりも上流の素過程に関与することでオートファゴソーム形成を制御している可能性が明らかとなった。

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

なし

学会発表

1. 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、仙台
2. 青柳共太
膵 β 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、新潟