

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 30 年 4 月 12 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29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 17025 )

1. 共同研究課題名	VAMP7 によるミトコンドリア品質管理機構の解析		
2. 共同研究目的	オートファジーを介したミトコンドリア品質管理に関わる VAMP7 およびオートファジー関連タンパク質の細胞内局在の解析、ならびにオートファジー誘導時における細胞内挙動の解析。		
3. 共同研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 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・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・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

本共同研究開始の時点において、膵β細胞におけるVAMP7は一部のエンドソームマーカーと共局在することが免疫染色により明らかになっていった。そこで本共同研究では、Min6細胞を用いてショ糖密度勾配遠心法により細胞成分分画実験を行い、VAMP7を含むエンドソームの分離・精製を行う。精製したエンドソームに局在するタンパク質を網羅的に解析し、オートファジー関連タンパク質を同定する。また、特異抗体を用いた免疫沈降実験を行い、VAMP7が結合するSNAREタンパク質やVAMP7と結合するオートファジー関連タンパク質を明らかにする。最後に、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、蛍光タンパク質を用いてVAMP7と隔離膜、オートファジー関連タンパク質の挙動を可視化し、顕微鏡観察することにより、VAMP7がオートファジーの素過程のうち、どの段階に関わるかを明らかにする。

#### 7. 共同研究の成果

VAMP7によるオートファゴソーム形成機構について明らかにするために、VAMP7と同様、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Atg9aに着目し、解析を行った。Min6細胞を用いたショ糖密度勾配遠心法による細胞成分分画実験ではAtg9aはVAMP7と同じリサイクリングエンドソームに回収された。初代培養膵β細胞を用いた免疫染色実験から、Atg9aの一部はVAMP7と共局在することが明らかとなった。さらに、マイクロソーム画分から免疫沈降法を用いてVAMP7濃縮小胞画分を調製したところ、Atg9aがVAMP7濃縮小胞画分に回収されることを見いだした。これらの結果から、VAMP7はリサイクリングエンドソームにおいてAtg9aと同じ小胞上に局在すると結論した。

次に、VAMP7と結合し、VAMP7依存的なオートファゴソーム形成に関わる分子として、Hrbを同定した。また、HrbはVAMP7とAtg9aを細胞膜からリサイクリングエンドソームへ輸送する過程に関与することを見いだした。さらに、VAMP7依存的なオートファゴソーム形成に関わるSNAREタンパク質として、Syntaxin16およびSNAP-47を同定した。

Hrb、Syntaxin16およびSNAP-47をノックダウンしたMin6細胞を解析したところ、これらのタンパク質をノックダウンしたMin6細胞では機能不全ミトコンドリアの蓄積が観察され、グルコース刺激依存的なインスリン分泌の減弱が観察された。

これらの結果から、VAMP7はHrb依存的にAtg9aと共にリサイクリングエンドソームへと局在した後、Syntaxin16やSNAP-47と共にSNARE複合体を形成することによってオートファゴソームを形成し、機能不全ミトコンドリアの除去に関与していると結論した。

#### 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のある論文、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。)

##### ①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

なし(投稿中)

##### ②この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし