

課題番号	LS032
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	先端的光技術によるインスリン開口放出機構の可視化と制御
研究機関・ 部局・職名	東京大学・大学院医学系研究科・講師
氏名	高橋 倫子

1. 当該年度の研究目的

前年度までに、分泌に関連する蛋白質群や分泌顆粒内部の多種蛍光色素による標識をすすめた。また、それらをインスリン分泌細胞や神経に導入するための、ウィルスベクター化を行った。さらに、異分子間の複合化を生体内で定量しうる蛍光寿命測定法の立ち上げを行った。その結果、インスリン分泌組織では関連蛋白質の複合化が弱く起こるのに対し、神経では強い複合体を形成し、超分子構造をとっていることが示唆された。そこで、今年度は、遺伝子欠損マウスを併用し、蛍光プローブが主に生体内で作用する環境をととのえ、超分子構造の実態解明を進める。

2. 研究の実施状況

- ①SNAP25欠損胎児マウスより腓島標本と大脳皮質細胞を初代培養する手法と、胎児の遺伝子型を迅速に判定する方法を確立し、SNARE蛋白質の蛍光標識プローブを組織に遺伝子導入した。欠損マウスの神経細胞は、外因性 SNAP25を補充する事により生存し、神経突起を伸ばすことを確認した。2光子励起法と蛍光寿命画像法を組み合わせ、生きた腓島細胞膜や神経軸索終末におけるSNARE蛋白の複合化を蛍光エネルギー共鳴移動(FRET)にて測定し、両者の間に著しい差異が有ることを確認した。このような複合化を定量化する指標として、ドナー分子の結合率を算定する方法を検討した。さらに、SNARE蛋白の特異的な切断酵素を共発現や、蛋白変異体の蛍光標識物の発現を行い、SNARE複合体の超分子構造の解明をすすめている。
- ②パッチクランプ法と電気刺激法を併用し、神経伝達物質の放出をサブミリ秒単位で計測する実験系を共同研究者と立ち上げた。SNAP25欠損マウスの神経伝達物質放出機能を、種々のSNAP25変異体でレスキューする際、放出のキネティクスと量が変化することを見出した。さまざまな様式の電気刺激を与え、放出の速さを調節するメカニズムとSNARE複合体の関連について、詳細に検討をすすめている。
- ③SNARE蛋白の複合化と開口放出の関連が把握できるよう、蛍光寿命の変化を経時的に把握できるツールの測定系および解析系の開発に取り組んだ。神経細胞における複合化は、高浸透圧やPKC活性化剤で変化する事を見出し、また、腓島においてはグルコースや細胞内 cAMP濃度増強剤で変化する事を確認した。時間的・空間的な分布につき検討をすすめている。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 Kimura Y., Momotake A., Takahashi N., Kasai H., Arai T. Polarity-dependent photophysical properties of hemicyanine dyes and their application in 2-photon microscopy biological imaging. <i>Chemistry Letters</i> 2012, 41(5) 528-30.</p> <p>Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H. Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. <i>Physiol Rev</i> 2012, 92, 1915-64.</p> <p>Shojima N., Hara K., Fujita H., Horikoshi M. Takahashi N., Takamoto I., Ohsugi M., Aburatani, H., Noda M., Kubota, N., Yamauchi T., Ueki K., Kadowaki, T. Depletion of homeodomain-interacting protein kinase 3 impairs insulin secretion and glucose tolerance in mice. <i>Diabetologia</i> 2012, 55 (12), 3318-30,</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件 高橋倫子 河西春郎 2012 年  膝島におけるインスリン開口放出の分子機構 「Diabetes Journal」 Vol40 No1 p1-6</p> <p>高橋倫子、大野光代、河西春郎 2012 年  膝島におけるインスリン開口分泌機構の可視化 「最新臨床糖尿病学(上)」70 巻増刊号(通巻 1020 号)p99-103</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 6 件</p>	<p>専門家向け 計 5 件</p> <p>高橋倫子、大野光代、澤田和可子、渡辺恵、河西春郎、 「膝島と神経における膜融合関連蛋白の複合化」、 横浜 パシフィコ横浜、2012 年 5 月 17 日、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会</p> <p>高橋倫子、 「分泌の準備過程における膜融合関連蛋白の構造」、東京 泉ガーデン、2012 年 5 月 27 日 The 4 th Brainstorming Medical Conference</p> <p>高橋倫子、 「膝島と神経における開口放出関連蛋白質の複合化」、東京 都市センターホテル、2012 年 7 月 27 日、 第 12 回 Islet Biology 研究会</p> <p>Takahashi N., Ohno M., Watanabe S., Sawada W, Kasai H. 「Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE-dependent exocytosis」、米国 New Orleans 、2012 年 10 月 15 日、北米神経科学会</p> <p>Takahashi N., Watanabe S., Sawada W, Ohno M., Kasai H. 「Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE-dependent exocytosis」、東京 船堀タワー、2013 年 3 月 27 日、 第 90 回日本生理学会大会</p> <p>一般向け 計 1 件 東京大学 吉川雅英氏、山内敏正氏、慶應大学 竹田秀氏とともに、医学部 4 年生の協力を得て自ら企画。 高橋倫子、「代謝と脳のはたらきを新しい光でみる」東京 東京大学医学部鉄門記念講堂、平成 24 年 5 月 20 日、若手による駅伝講演会</p>

様式19 別紙1

図書 計0件	該当なし
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 構造生理学部門 高橋研究グループ <a href="http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/takahashi/">http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/takahashi/</a>
国民との科 学・技術対話 の実施状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>・「代謝と脳のはたらきを新しい光でみる」平成24年5月20日、東京大学医学部鉄門記念講堂、小・中学生・高校生・大学生・社会人、74名、最先端・次世代研究開発支援プログラムの研究代表4名で、一般向け講演会を企画し、東京大学五月祭で行った。</li> <li>・「未来からの招待状」平成24年8月24日—30日、東京大学医学部附属病院外来ロビー、来院者・勤務者など、約200人、Q&amp;A 様式を取り入れた研究内容一般紹介を行った。</li> <li>・「未来からの招待状」平成25年1月16—17日 文京シビックセンター B2 区民ひろば、文京区民ほか、約100人、Q&amp;A 様式を取り入れた研究内容一般紹介を行った。</li> </ul>
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	該当なし
その他	該当なし

4. その他特記事項

該当なし

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	72,000,000	34,070,000	18,465,000	19,465,000	0
間接経費	21,600,000	10,221,000	5,539,500	5,839,500	0
合計	93,600,000	44,291,000	24,004,500	25,304,500	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	6,681,297	18,465,000	0	25,146,297	23,563,762	1,582,535	0
間接経費	5,767,200	5,539,500	0	11,306,700	8,537,700	2,769,000	0
合計	12,448,497	24,004,500	0	36,452,997	32,101,462	4,351,535	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	13,368,720	蛍光寿命イメージング装置、実験試薬、マウス、実験器具、計測装置用部品等
旅費	87,420	情報収集、研究成果発表旅費(日本内科学会講演会、日本糖尿病学会等)
謝金・人件費等	9,626,686	実験補助員人件費
その他	480,936	実験機器(マニピュレータ等)修理費、学会参加費等
直接経費計	23,563,762	
間接経費計	8,537,700	
合計	32,101,462	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
LSMアップグレードキット (蛍光寿命イメージング装置)	独国PicoQuant社	1	5,953,500	5,953,500	2013/2/14	東京大学
				0		
				0		