

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25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、蛍光寿命エネルギー移動(FRET)を利用し、分泌に関連する蛋白質群の複合化を生きた細胞組織で実時間観察する実験系を樹立した。その結果、関連分子の構造には、インスリン分泌細胞と神経細胞シナプス前終末の間に大きな違いが有ることが判明した。さらに、遺伝子欠損マウスからの隣島・神経標本の調整と、蛍光標識蛋白のウィルスベクターによる導入に成功した。今年度は、今までに蓄積された知見の発表に向けてデータを蓄積するとともに、遺伝子欠損マウスを用いた詳細な検討を行う。また、分泌の制御に関し、高い 2 光子吸収を持つ光活性化試薬を新規に細胞に応用する。

2. 研究の実施状況

①インスリン分泌細胞における開口放出に伴う SNARE 構造変化の同定。
細胞膜と顆粒膜に発現する SNARE の蛍光標識プローブ群を隣島に導入し、分泌を刺激し、開口放出現象と SNARE 複合化を経時的に同時測定する実験系を開発した。膜融合に数秒間先行した FRET の増強 (Ternary-SNARE 複合体形成)を検出することに成功し、同期して顆粒の開口放出部位への接近過程を検出した。

②開口放出における trans-SNARE から cis-SNARE からへの変換の検出。
シナプス前終末に、cis-SNARE 形成を選択的に反映する FRET プローブを遺伝子導入した。安静時に一定の複合化を示し、分泌刺激にてその増強を認めた。一方、ternary SNARE 形成を反映するプローブは安静時より 約 35 % の複合化を示し、刺激中著変はなかった。後者から前者のシグナルを差し引いた成分が trans-SNARE 複合体を反映するため、trans から cis への構造変化が検出された。

③SNARE 複合体の超分子構造の解明。
SNAP25 欠損マウスの神経に、当分子の種々の変異体の蛍光標識体を遺伝子導入した。レスキューされた神経細胞の伝達物質放出過程を電気生理学的手法で計測した。SNAP25 間の複合化は、FRET を応用し、2 光子励起蛍光寿命測定法で計測した。SNAP25 内部のリンカー領域を延長させると、放出のキネティクスが変化した。このリンカーを介して複数の SNARE 複合体が超分子構造を形成しているモデルが示唆され、融合細孔近傍の複合体の密度が開口放出の速度に関連すると考えられた。

様式19 別紙1

④光を用いた開口放出刺激法。

2光子吸収の高いケイジド Ca 試薬が広島大 安倍博士のグループで合成され、細胞への導入・応用を進めた。光活性化後、IPSC の検出にて機能計測を行った。③をカルシウム流入量の多寡に寄らずに検証することが可能となった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件</p> <p>Lam PP, Ohno M, Dolai S, He Y, Qin T, Liang T, Zhu D, Kang Y, Liu Y, Kauppi M, Xie L, Wan WC, Bin NR, Sugita S, Olkkonen VM, Takahashi N, Kasai H, Gaisano HY. Munc18b is a major mediator of insulin exocytosis in rat pancreatic β-cells. <i>Diabetes</i> 2013, 62(7): 2416-2428,2013, ISSN: 0012-1797</p> <p>Hayama T, Noguchi J, Watanabe S, Takahashi N, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Matsuzaki M, Kasai H: GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca^{2+} signaling. <i>Nat. Neurosci.</i> 2013, 16 (10): 1409-1416, ISSN: 1097-6256</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <p>高橋倫子、河西春郎 2013 年 2光子励起法によるインスリン開口放出の可視化 「The Lipid」24 巻 2 号 p4-9</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>NorikoTakahashi, Distinct SNARE complex formation between beta-cell and presynaptic terminal. Kyoto, 2013.4.23-26, "the 8th Beta Cell Workshop 2013 Kyoto" organizing committee,</p> <p>高橋倫子, SNARE assembly in pancreatic endocrine cells and presynaptic terminals. Otsu, 2013.8.3-4, "Diabetes Leading-edge Conference" organizing committee,</p> <p>Takahashi N, Sawada W, Watanabe S, Ohno M, Kasai H, Two-photon FRET/FLIM imaging of SNARE-dependent exocytosis. 鹿児島, 2014.3.14-16, 第 91 回日本生理学会大会実行委員会(日本生理学会)</p>

様式19 別紙1

	<p>Sawada W, Takahashi N, Watanabe S, Ohno M, Kasai H, Domain-swapped oligomerization of SNAP25 for ultrafast exocytosis at presynaptic terminals. 鹿児島, 2014.3.14-16, 第91回日本生理学会大会実行委員会(日本生理学会)</p> <p>Watanabe S, Takahashi N, Noguchi J, Kasai H, Direct mechanical regulation of presynaptic functions by enlargement of dendritic spines in CA1 pyramidal neurons. 鹿児島, 2014.3.14-16, 第91回日本生理学会大会実行委員会(日本生理学会)</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>高橋倫子, 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(ポスター発表), 東京, 2014.2.28-3.1, FIRST シンポジウム「科学技術が拓く2030年」へのシナリオ実行委員会</p>
図書 計0件	該当なし
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p>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</p> <p>http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/takahashi/</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>「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」平成26年2月28日 東京都新宿区(ベルサール新宿グランド)、研究者・報道関係者、約300人、 FIRST シンポジウム「科学技術が拓く2030年」へのシナリオにて研究内容ポスター発表。</p> <p>「インスリンが分泌されるしくみをタンパク質のレベルで解明」平成26年3月13日-8月10日、 東京都文京区(健康と医学の博物館)、一般の方(大学生・高校生・医療機関関係者・通院者を含む)、 約10,923人(見込み)、企画展「糖尿病の真実」にて研究内容展示。</p>
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

脳科学事典(査読制度付きオンライン百科事典)「FM1-43」解説担当、掲載開始(2013年8月12日)
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/FM1-43>

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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	52,535,000	19,465,000	0	0
間接経費	21,600,000	15,760,500	5,839,500	0	0
合計	93,600,000	68,295,500	25,304,500	0	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	1,582,535	19,465,000	0	21,047,535	21,047,535	0	0
間接経費	2,769,000	5,839,500	0	8,608,500	8,608,500	0	0
合計	4,351,535	25,304,500	0	29,656,035	29,656,035	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	9,777,556	実験試薬、実験機器、炭酸ガスなど
旅費	128,180	研究成果発表旅費
謝金・人件費等	7,386,481	技術補佐員人件費
その他	3,755,318	遺伝子塩基配列決定費・実験機器修理費など
直接経費計	21,047,535	
間接経費計	8,608,500	
合計	29,656,035	

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
CO2インキュベータ	パナソニック・ MCO-18AC	1	780,549	780,549	2013/6/13	東京大学
ラック型チラー	米国スペクトラ・ フィジックス イン コーポレイテッド・ Chiller Rack KE- FE	1	626,115	626,115	2014/1/15	東京大学