

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 23 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

開口放出関連蛋白質の複合化状態を、生きた組織で実時間解析する。そのために、各種 SNARE 分子やその複合化調節因子の蛍光標識プローブを多種試作する。インスリン分泌細胞や大脳皮質初代培養細胞にプローブを遺伝子導入し、安静時における複合化状態を2光子励起顕微鏡で検討する。最適と考えられるプローブに対しては、豚島への導入のために、ウィルスベクターを作製する。顆粒動態解析のために、インスリン顆粒に発現する分子の蛍光標識プローブも試作する。SNARE 複合化調節因子の蛍光標識も試みる

2. 研究の実施状況

膜融合の中核となる SNARE 分子三種の蛍光標識プローブを多数作製した。初代培養神経標本に遺伝子導入し、神経軸索における発現を確認した後、一部を豚島導入用にウィルスベクター化した。近赤外超短パルスレーザー (80MHz) を光源とする 2 光子励起顕微鏡に蛍光寿命測定法を応用し、異分子間の複合化測定に有効な蛍光寿命画像の獲得に成功した。解析の結果、神経細胞の軸索終末において、SNARE 分子間の複合化が強度に確認され、一部の薬剤刺激によりさらに増強することが認められた。高複合化領域には、軸索終末マーカーが共局在する事を、免疫染色により確認した。一方、機能との関連を将来調べるために、神経における開口放出検出系の立ち上げを行った。神経小胞内分子を pH 感受性 GFP で標識し、分泌刺激をあたえ、刺激依存的に軸索終末にて開口放出が検出されることを確認した。また、膜染色性色素 FM 4-64 の利用も行った。

一方、内分泌標本で同様の分子間 FRET 解析を行った結果、豚島内部の細胞膜において、複合化が相対的に弱い事が見出された。また弱いながらも、局所的な勾配の存在が示唆された。

旧来解析に用いてきた、SNAP25 の分子内 FRET プローブ (SLIM) のシグナルも、生細胞を対象とした蛍光寿命測定系で再度検討した。軸索終末において、内分泌細胞では認められないような高い複合化シグナルが同定された。in vitro でもこのような複合化シグナルが検出されるか、蛋白精製実験を並行して行っている。

インスリン顆粒の蛍光標識も可能となるプローブの作製に成功し、ウィルスベクター化した。顆粒動態・SNARE 複合化・膜融合の時間的関連の調査に有効であると考えられる。

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 2 件 Cai T, Hirai H, Zhang G, Zhang M, <u>Takahashi N</u>, Kasai H, Satin LS, Leapman RD, Notkins AL. Deletion of Ia-2 and/or Ia-2β in mice decreases insulin secretion by reducing the number of dense core vesicles. <i>Diabetologia</i> 2011, 54(9), 2347-57, ISSN 0012-186X</p> <p><u>Takahashi N</u> Two-photon imaging of insulin exocytosis in the pancreatic islets. <i>Diabetology International</i> 2011, 2, 112-121</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 3 件 高橋倫子、河西春郎 2011 年 膵内分泌における分子と機能の可視化 「最新医学 分子イメージングの最先端」66 巻 10 号 p 2336-2341,最新医学社</p> <p><u>高橋倫子</u> 2011 年 インスリン分泌過程の可視化解析 「Islet Equality」メディカルレビュー社 No.9, p15-18</p> <p><u>高橋倫子</u> 2011 年 膵島におけるインスリン開口放出機構の可視化解析 「糖尿病」 54 巻 11 号 p835-836</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 4 件</p>	<p>専門家向け 計 4 件</p> <p>第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 <u>高橋倫子</u> 膵島におけるインスリン開口分泌機構の可視化解析 札幌 ニトリホール、2011 年 5 月 19 日-21 日、日本糖尿病学会</p> <p>第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム <u>Noriko Takahashi</u>, Mitsuyo Ohno, Haruo Kasai SNARE conformation and insulin exocytosis. 札幌 ロイトンホテル、2011 年 5 月 19 日-21 日、日本糖尿病学会</p> <p>第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 大野光代、<u>高橋倫子</u>、河西春郎 SNARE 蛋白の膜拡散によるインスリン分泌調節の 2 光子顕微鏡による解析 札幌 札幌プリンスホテル、2011 年 5 月 19 日-21 日、日本糖尿病学会</p> <p>第 89 回日本生理学会大会 <u>Noriko Takahashi</u>, Satoshi Watanabe, Mitsuyo Ohno, Wakako Sawada, Haruo Kasai FRET imaging of SNARE assembly for exocytosis in neurons and beta cells.</p>

様式19 別紙1

	<p>松本 松本文化会館、2012年3月29-31日、日本生理学会</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書</p> <p>計2件</p>	<p>高橋倫子、畠山裕康、大野光代、河西春郎 「糖尿病学 2011」 SNARE の構造変化とインスリン分泌 p26-32、 診断と治療社、2011年、総ページ数 146</p> <p>高橋倫子、河西春郎 「高効率二光子吸収材料の開発と応用」 2光子励起によるインスリン分泌現象の可視化 p54-60 シーエムシー出版、2011年、総ページ数 200</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<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>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2011年に研究室ホームページを作成し、公開を開始し、研究内容や発表文献の発信を行った。 連絡先を記載し、メールによる対話が可能な環境を作った。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	<p>該当なし</p>
<p>その他</p>	<p>該当なし</p>

4. その他特記事項

受賞

日本糖尿病学会賞リリー賞 2011年5月19日 札幌

膝島におけるインスリン開口分泌機構の可視化解析

日本医師会医学研究奨励賞 2011年11月1日 東京

膵β細胞の分泌準備分子機構の可視化解析:神経終末との対比

実施状況報告書(平成23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	34,070,000	0	37,930,000	0
間接経費	21,600,000	10,221,000	0	11,379,000	0
合計	93,600,000	44,291,000	0	49,309,000	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	25,995,030	0	0	25,995,030	19,313,733	6,681,297	0
間接経費	10,221,000	0	0	10,221,000	4,453,800	5,767,200	0
合計	36,216,030	0	0	36,216,030	23,767,533	12,448,497	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	8,825,369	実験試薬、マウス、実験器具、計測装置用部品等
旅費	136,520	研究成果発表旅費(日本糖尿病学会・日本生理学会、等)
謝金・人件費等	9,976,845	実験補助員人件費
その他	374,999	実験機器(マンピュレータ等)修理費、学会参加費等
直接経費計	19,313,733	
間接経費計	4,453,800	
合計	23,767,533	

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
				0		
				0		
				0		