

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 24 年 3 月 22 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 大分大学 医学部 薬理学教室

職名 教授

研究代表者 仁木 一郎

勤務先所在地 〒879-5593

大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1-1

電話番号 097-586-5722

ファックス番号 097-586-5729

E-メール t-kimura@oita-u.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

(課題番号 11028)

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	代謝シグナル機能研究プロジェクト インスリン顆粒膜のエンドサイトーシスを可視・定量化する手法の開発			
2. 共同研究目的	全反射顕微鏡(TIRFM)と共に焦点レーザー顕微鏡を組み合わせることにより、インスリン分泌後の顆粒膜の可視化と取り込みの定量化を試みる。さらに、この手法を用いてエンドサイトーシス実行の要となる GDP 型 Rab27a に結合する分子群の機能解析を行う。			
3. 共同研究期間	平成 23 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 仁木 一郎	54	大分大学医学部薬理学	教授	研究の総括
(分担研究者) 木村 俊秀 山岡 真美	36 28	大分大学医学部薬理学 大分大学医学部薬理学	准教授 大学院生	顕微鏡を用いた解析 サンプル調製、細胞培養
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	遺伝生化学分野	氏名	泉 哲郎

※ 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

1. エンドサイトーシスの可視化

インスリン顆粒膜に局在する膜貫通型タンパク質 phogrin の GFP 融合タンパク質を脾 B 細胞株に発現させ、膜直下と細胞内の蛍光強度をそれぞれ全反射顕微鏡と共に焦点レーザー顕微鏡で測定する。Phogrin-GFP の他に、phogrin の内腔ドメインを認識する抗体やエンドサイトスマーカー FM4-64、蛍光標識トランスフェリンの細胞内への取り込みを解析し、エンドサイトーシスの定量を試みる。

2. GDP-dependent effector 群の機能解析

GDP-dependent effector 候補分子の変異体や siRNA を発現した細胞のエンドサイトーシスを可視化し、各 effector がエンドサイトーシスを構成する複数のステップのどこに関与しているのかを調べる。

7. 共同研究の成果

1. エンドサイトーシスの可視化

Phogrin-GFP や FM4-64、トランスフェリンを脾 B 細胞株 MIN6 にトランスフェクションまたはインキュベーションを行い、エンドサイトーシスの可視化を試みた。しかしながら、蛍光の強度や寿命の問題から、リアルタイムで解析することが困難である結果を得た。

そこでわたしたちは、エンドサイトーシスの可視化を行うためのツールとして、蛍光タンパク質と融合したクラスリンやダイナミンを発現するプラスミドを作製した。クラスリンとダイナミンはそれぞれ、エンドサイトーシス小胞の裏打ちとして働く被覆タンパク質とこのクラスリン被覆ピットを切断する GTPase である。全反射顕微鏡を用いた解析より、クラスリンとダイナミンは、エンドサイトーシスを引き起こすグルコース刺激により、細胞膜直下に集積した後に細胞質内に取り込まれる様がリアルタイムで観察された。

本研究成果により、脾 B 細胞のエンドサイトーシスを定性的に扱うことが可能となった。現在は、エンドサイトーシスを定量的に扱うために、システムの最適化を試みている。

2. GDP-dependent effector 群の機能解析

クラスリンやダイナミンを発現した MIN6 細胞に GDP-dependent Rab27a effector とその制御タンパク質をトランスフェクションし、エンドサイトーシスに関わる分子群の集積と解離のタイムコースを解析した。その結果、GDP-Rab27a effector のひとつで、エンドサイトーシスの足場タンパク質として働く IQGAP1 の複合体形成と解離が、ある種の低分子量 G タンパク質とリン酸化酵素によって制御されていることが明らかになった。

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。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

本研究成果は、現在投稿準備中である。