

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 25 年 4 月 23 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 准教授
 研究代表者 木村 俊秀
 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」 膵 B 細胞のエンドサイトーシスを可視化する手法の確立とその応用				
2. 共同研究目的	全反射顕微鏡によるエンドサイトーシスの可視化システムを最適化する。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 24 年 4 月 1 日 ~ 平成 25 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
(申請代表者)	木村 俊秀	37	大分大学医学部薬理学	准教授	研究の総括、顕微鏡を用いた解析
(分担研究者)	山岡 真美	29	大分大学医学部薬理学	大学院生	サンプル調製、顕微鏡を用いた解析
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。

(課題番号 11028)

6. 共同研究計画

1. エンドサイトーシスの可視化システムの最適化

エンドサイトーシスマーカーや蛍光標識タンパク質を細胞に発現させるタイミングや量を最適化する。さらに、グルコース刺激を行う条件の見直しを行う。具体的には、グルコース濃度、溶液の量、プレインキュベーションの時間に関して最適な組み合わせを探索する。

2. Rab27a の GDP-dependent effector とそれに関わる分子群の機能解析

各タンパク質のグルコースによる細胞内局在変化を全反射顕微鏡で詳細に解析する。さらに、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、各タンパク質がエンドサイトーシスのどのステップにどのように関与するのかを調べる。

7. 共同研究の成果

1. エンドサイトーシスの可視化システムの最適化

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エンドサイトーシス小胞を細胞膜からくびり切り取る GTPase である。前年度は、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が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。今年度は、各蛍光の挙動をリアルタイムで解析し定量化することで、エンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析を行うためにシステムの最適化を行った。特に、蛍光標識ダイナミンがエンドサイトーシスの可視化に有効であることを明らかにした。

2. Rab27a の GDP-dependent effector とそれに関わる分子群の機能解析

私たちは、グルコース刺激により GTP 型に変換された Cdc42 が IQGAP1 と結合することで、GDP 型 Rab27a や coronin3 などエンドサイトーシスに関わるタンパク質群を細胞膜近傍に集積させることを見いだした。さらに、PKC によるリン酸化が、この複合体を解離することを明らかにした。さらに、このタンパク質複合体の集積と解離のタイムコースを上記システムにより詳細に解析した結果、Cdc42 が GDP 型に再変換されることが複合体の解離を促すこと、PKC によるリン酸化は複合体の再集積を抑制することを明らかにした。

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、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。)

木村俊秀、山岡真美、岡本光弘、武井真大、石崎玲、泉哲郎、仁木一郎

IQGAP1 によるエンドサイトーシスの制御機構の解析。

第 86 回 日本薬理学会年会 (2013 年 3 月)