

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30年 4月 27日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 埼玉医科大学医学部  
職 名 講師  
研究代表者 荒木 智之

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 17023 )

1. 共同研究課題名	RhoA 遺伝子改変 Min6 細胞を樹立しグルコース応答における機能を解析する。			
2. 共同研究目的	低分子量 G タンパク質 RhoA の阻害はグルコース依存的なインシュリン放出を促進すること、また2型糖尿病モデルマウスの $\beta$ 細胞では RhoA の活性が上昇していることが知られている。しかしグルコース依存的な RhoA 活性制御機構や標的は明らかでない。本研究では GTP 加水分解能やリン酸化修飾に異常が起こる RhoA 変異を Min6 細胞に導入し RhoA が $\beta$ 細胞の増殖能及びインシュリン放出に与える影響を解析する。			
3. 共同研究期間	平成29年4月1日 ~ 平成30年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 荒木智之	埼玉医科大学医学部	講師	ヒト RhoA 変異体の作成と解析	
(分担研究者) 吉田知史 松永耕一	群馬大学生体調節研究所 群馬大学生体調節研究所	准教授 助教	RhoA 変異体の生化学的解析	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	細胞シグナル分野	氏 名	吉田知史

※ 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

まずヒト RhoA の GTP 結合型、GDP 結合型あるいはリン酸化されうる箇所の変異体を作成しヒトの培養細胞でその発現による影響を観察する。RhoA の直接破壊株は細胞生存に深刻な影響を与えるため初めに変異型 RhoA を発現させた細胞から内在性野生型 RhoA を RNAi により欠乏させインシュリン放出能あるいは形態変化等に顕著な表現系が出たもののみ CRISPER/Cas9 を用いて Min6 細胞の RhoA 遺伝子を改変し詳細な表現系を解析する。細胞の作出、解析は主に荒木が担当する。

遺伝子改変細胞確立後は細胞内での RhoA の局在、GTP 結合状態、下流シグナルの活性状態を細胞シグナル分野の設備を利用しながら吉田・荒木が共同して担当する。

基本的な細胞の性質が理解された後、インシュリンの放出実験は吉田と遺伝生化学分野の松永が協力して進めていく。

## 7. 共同研究の成果

各種 RhoA 変異体の発現ベクターを作成し Swiss 3T3 細胞で発現を確認したところ GTP 結合型の RhoA-G14V だけでなく Akt によるリン酸化予想サイトである RhoA-S73D 変異の発現で細胞形態の異常および RhoA の局在異常が観察されたためまず RhoA-S73 およびその他のリン酸化が実際に細胞内で起こっているかどうかを優先して確認することとした。RhoA-S73A 変異体と RhoA-S73D 変異体は SDS-PAGE に置いてリン酸化特有の泳動度シフトが検出されたものの質量分析によるリン酸化サイトのマッピングではまだ T73 に起こるリン酸化は検出できていない。したがって現在はホスファターゼ阻害剤処理や細胞にグルコース刺激を加えるなど RhoA のリン酸化シグナルが検出しやすくなる条件を検討中である。

RhoA 過剰発現の結果から RhoA-G14V, RhoA-S73A, RhoA-S73D 変異が RhoA シグナル伝達に異常をきたすことが明らかになったのでこれらの特異的な変異を Min6 細胞に導入すべく引き続き共同研究を継続している最中である。

## 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のある論文, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお, 論文の場合は, 別刷りを1部提出してください。)

### ① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

なし

### ② この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし