

# 研究報告書

2光子励起法で解析する開口放出関連蛋白質の  
作用機序と糖尿病の病態解明への応用

研究者氏名: 高橋 倫子

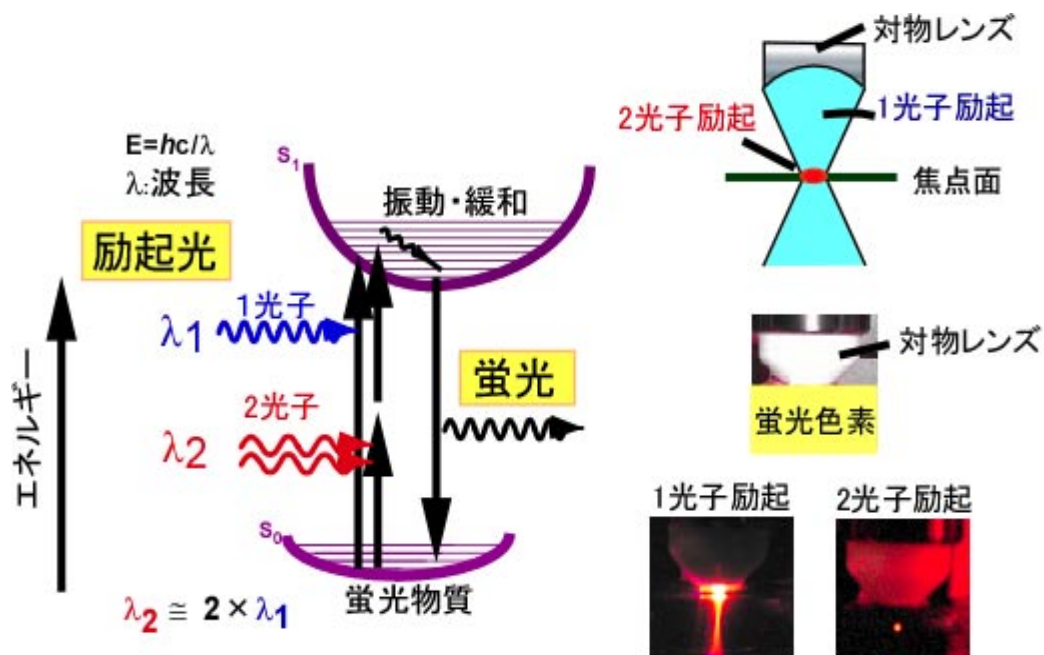
(研究期間: 平成 14 年 11 月 1 日 ~ 平成 18 年 3 月 31 日)

## 2 光子励起法で解析する開口放出関連蛋白質の作用機序と糖尿病の病態解明への応用

高橋 倫子

### 研究のねらい

膜融合への関連の示唆される蛋白質が、開口放出過程において如何に作用するかは、どの分泌標本においても不明である。さきがけ研究を開始する前に、2 光子励起断層画像法を用いて、膵島の内部でおこるインスリン分泌顆粒の開口放出現象を、定量的に可視化する実験系を確立した。そして、インスリン顆粒の融合細孔は他の細胞に比べ、より緩徐に開大することを見出し、細孔形成時期前後の解析に適した実験系を提供すると考えられた。そこで、当画像手法の同時多重染色性を利用して、SNARE に代表される関連蛋白質の動態と作用につき、開口放出の起こる部位において解析し、インスリン分泌異常をひとつの主因とする糖尿病の、病態解析と克服に向けた知見の獲得を目的とした。

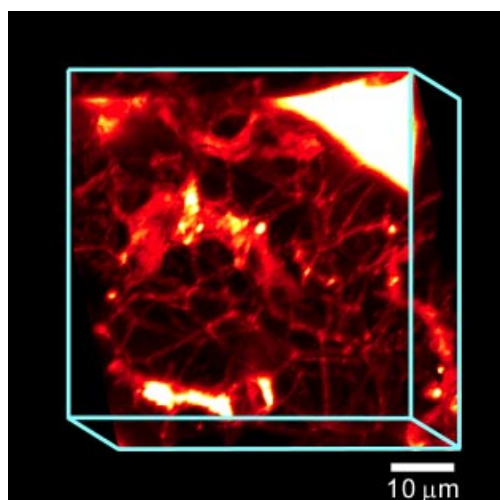


**2 光子励起の原理図。** 1 光子励起に必要な励起光にくらべ 2 倍の波長を持つ光で起こる。実現確率が小さいため、対物レンズで集光した場合には、焦点面のみで断層的に起こる。近赤外超短パルスレーザーの実用化により、1990 年代以降生物標本観察への応用が可能になってきた。

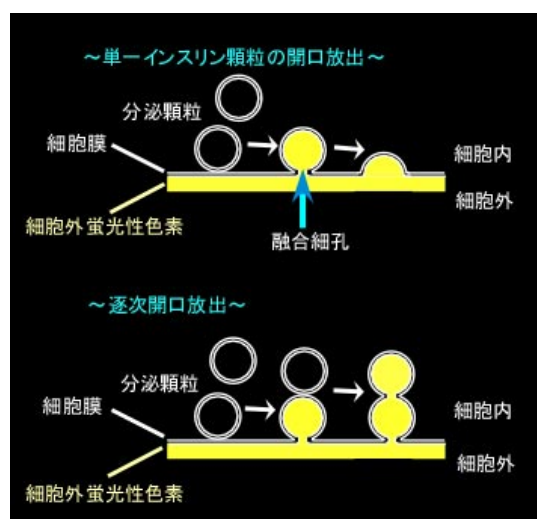
## 研究成果

### (1) 開口放出の様式と細胞膜性 SNARE 蛋白質

研究を進める上で、膵島では開口放出の様式が特異であり、複合型開口放出の抑制されている特徴をもつことを同定した(文献1)。複合型開口放出様式とは、複数の分泌顆粒が一つの融合細孔を共有する様式であり、①細胞膜と融合した分泌顆粒の膜に、深部の顆粒が膜融合する逐次開口放出と、②複数の顆粒が細胞内で予め融合した後に細胞膜と融合する multigranular exocytosis の2型に分類される。我々が選択している分泌の可視化法は、水溶性蛍光色素液で組織を還流しながら組織深部を観察する手法であるが(Two-photon Extracellular Polar-tracer imaging, TEP 法, Takahashi N., et al. *Science*, 297, 1349, 2002, 文献2-4)、この実験は、内部遮蔽効果の回避される2光子励起法を利用することによって初めて可能となった。本法により、血球系・外分泌系・内分泌系など、他の多くの分泌組織において、複合型開口放出が主に起こっていることがはじめて確定的になった(Nemoto T. et al., *Nat. Cell Biol.* 3,253,2001, 文献 3, 9)。複合型の分泌様式は、大量かつ局所的な分泌を可能とし、各種組織の機能を最適化する上で合目的と考えられる側面がある。



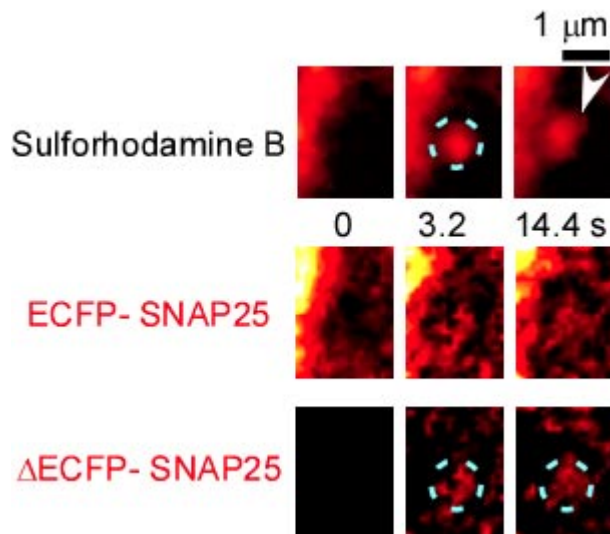
水溶性蛍光色素液(Sulforhodamine B 液)で還流したマウス膵島の三次元再構築2光子励起画像(TEP 画像)。



開口放出過程の画像化。細胞外蛍光色素が融合細孔を逆流して分泌顆粒内を染め出す過程と、それ以降に起こる現象(post-fusional event)を観察できる。

膵島で複合型開口放出の頻度を測定した結果、逐次開口放出の出現頻度は全現象の 1-5 % にきわめて強く抑制されている事実を見出した。multigranular exocytosis も殆ど検知されなかったため、その分子基盤につき、検討を進めた。逐次開口放出を起こすためには、膜融合した第一の顆粒の膜に細胞膜由来の融合因子が供給されることが必須であると、推察されたが、膵島で細

胞膜性 SNARE 蛋白質の一つ; SNAP25 分子を蛍光標識して、顆粒膜への側方拡散を検討したところ、拡散例では逐次開口放出を起こす頻度が 10 倍高く、かつ、膵島標本ではこうした拡散自体が 2% に抑制されている事実が判明し、SNARE 分子の拡散と、逐次開口放出の間には関連のあることが示唆された(文献1)。他に、逐次的な放出抑制につながりうる、 $\Omega$ 構造の不安定性や、顆粒密度の低さなどは膵島には該当しない。膵島に特徴的な複合型開口放出の抑制は、インスリンの急激かつ大量の分泌を起こりにくくし、生体を低血糖から守りうる生理的意義をもつ。また、顆粒の細胞膜直下への物理的な輸送が、分泌に必須となるため、この輸送過程が分泌調節の一つの標的になりうる構造を示す(文献5)。なお、今回行った逐次開口放出の解析からは、顆粒膜に細胞膜性 SNARE 蛋白質が供給されてから平均 16 秒で次の開口放出が逐次的に誘発される事実も提供され、細胞膜性 SNARE と顆粒膜性 SNARE 間の複合化は予め起こっているのではなく、膜融合の比較的直前で起こりうる仮説が呈示された。



蛍光標識した SNAP25 を発現させた膵島を、sulfurhodamine B 液で還流。20mM グルコースで分泌を刺激し、逐次開口放出現象を検出した例(矢頭)。第一に融合した顆粒の領域(点線内)にて、SNAP25 のシグナル増強が認められる(文献1)。

## (2)インスリン開口放出現象における SNARE 蛋白質の動態および構造変化

次により典型的な単一インスリン顆粒の開口放出過程における SNARE 蛋白質の動態・構造変化を検出するために、SNAP25 の分子内 FRET プローブを作製した。当分子が他の SNARE 蛋白(VAMP2, Syntaxin 1)と複合化する際には(文献6)、4 本の  $\alpha$ ヘリックスがねじり合わさる構造をとることが結晶解析から示されており、複合化すると近づくことが予想される SNAP25 内の 2 箇所、二種類の GFP 変異蛋白質(CFP, Venus)を結合させた。このプローブは文献的に SNAP25 の構造変化のみならず、SNARE 蛋白質の複合化をモニターできることが報告されている。アデノベクター

を介して、当プローブの cDNA をマウス膵島に遺伝子導入し、発現させた。水溶性蛍光色素液内でグルコースによりインスリン分泌を刺激し、開口放出の出現部位(約  $0.5 \mu\text{m}^2$ )における FRET 効率の変化を、同時三重染色により経時的に測定した。その結果、開口放出現象の約半数において、Alexa594(分子直径 1.7 nm)の顆粒内流入開始時点に平均 3 秒先行して、分子内 FRET シグナルが検出された。FRET の持続時間は 平均 2 秒であった。

遺伝子導入の容易なインスリン分泌細胞株: INS-1 細胞においても類似の検討を行った。シグナルの増幅をはかるため、siRNA 処理により内因性の非標識 SNAP25 の発現をあらかじめ抑制したうえで、siRNA 耐性プローブとケイジドカルシウム試薬を用いて検討を行った。10  $\mu\text{M}$  以上の細胞内カルシウム濃度上昇を瞬時(1ms 以内)に細胞全体に与えると、一連のインスリン開口分泌が同期して誘発されるが、そのうち遅れて誘起される開口放出部位においては、一過性 FRET を約 4 割で検出することが判明した。

以前、単離膵  $\beta$  細胞にアンペロメトリー法とケイジド刺激法を用いて、カルシウム依存的開口放出機構を検討する機会をもち、インスリン開口放出路には時定数が 1 秒と 10 秒の二種類の経路があることを見出した(Takahashi N. et al. PNAS, 96,760,1999)。特に、前者の早い成分が、細胞内 ATP と cAMP に強い依存性をしめすことを報告したが、この成分が生理的なグルコ

ース刺激によるインスリン分泌増強作用にも深く関与し、インスリンの初期分泌の形成に重要であることをこのたび報告した(文献7)。そこで、ケイジド刺激による単離細胞の早期分泌成分と、グルコース刺激による膵島の初期分泌成分には類似点があると見ており、いずれも開口放出の起こる部位で SNAP25 の folding が先行しておこっている仮説を持っている。

なお、インスリン分泌を阻害するボツリヌス毒素の作用部位は、SNAP25 の C 末端にあり、切断することが知られている。そこで、SNAP25C 末端欠損体に関しても検討を進めた。9 アミノ酸欠損体 (A 型毒素処理 SNAP25 に相当)における FRET シグナルには正常体と優位差はなく、26 アミノ酸欠損体(E 型毒素処理 SNAP25 相当)発現系においては、開口放出自体が誘起されなかった。末端26アミノ酸残基内には、カルシウムセンサーであるシナプトタグミンとの結合部位が含まれており、当該部位の重要性が改めて示唆された。FRET のシグナルの時間経過と空間的な広がりについては、とくに、FRET シグナル出現前後から細孔形成までの過程につき他の関連分子の動態を調べる必要があり、その検討にむけて現在も準備を進めている。

## 今後の展開

開口放出過程における SNARE 分子の画像解析は、シグナルが小さく困難を極めているが、融合細孔の形成にあたり実際に機能を発揮する分子数の少なさが主因であると推察し、光学系を中心に条件の最適化を進める。現在分子間 FRET を含めた複数種類の実験系で、類似した時間

経過を示す変化が検出されるので、シグナルをつかめていると判断している。さらに、その時間経過と空間的な広がりには、あらたな仮説の存在を示唆する事実があり、現在検討を進めている。糖尿病に関連する病態解析にあたっては、内因性の SNARE 分子の動態・機能につき、量的・質的な違いを検討する必要がある、最適と評価されるプローブが確認された時点で knock-in マウスの作製をはじめ、遺伝子工学的に動物個体レベルで操作する必要性を感じている。

## 研究成果リスト

### 論文(原著論文)発表

1. N. Takahashi, H. Hatakeyama, H. Okado, A. Miwa, T. Kishimoto, T. Kojima, T. Abe, H. Kasai:  
Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25.  
*J. Cell Biol.* 165: 255–262, 2004
2. H. Kasai H., H. Hatakeyama, T. Kishimoto, T.-T. Liu., T. Nemoto, N. Takahashi:  
A new quantitative (TEPIQ) analysis for diameters of exocytic vesicles and its application to pancreatic islets.  
*J. Physiol.* 568: 891–903, 2005
3. T. Kishimoto, T.-T. Liu, H. Hatakeyama, T. Nemoto, N. Takahashi, H. Kasai:  
Sequential compound exocytosis of large dense-core vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ analysis.  
*J. Physiol.* 568: 905–915, 2005
4. T.-T., Liu, T. Kishimoto, H. Hatakeyama, T. Nemoto, N. Takahashi, H. Kasai:  
Exocytosis and endocytosis of small vesicle in PC12 cells studied with TEPIQ analysis.  
*J. Physiol.* 568: 917–929, 2005
5. K. Kasai, M. Ohara-Imaizumi, N. Takahashi, S. Mizutani, S. Zhao, T. Kikuta, H. Kasai, S. Nagamatsu, H. Gomi, T. Izumi: Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation.  
*J. Clin. Invest.* 115: 388–396, 2005
6. K. Fukui, Q. Yang, Y. Cao, N. Takahashi, H. Hatakeyama, H. Wang, J. Wada, Y. Zhang, L. Marselli, T. Nammo, K. Yoneda, M. Onishi, S. Higashiyama, Y. Matsuzawa, F.J. Gonzalez, G.C. Weir, H. Kasai, I. Shimomura, J. Miyagawa, C.B. Wollheim, K. Yamagata:  
The HNF-1 target Collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation.  
*Cell Metab.* 2: 373–84, 2005
7. H. Hatakeyama, T. Kishimoto, T. Nemoto, H. Kasai, N. Takahashi:

Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in pancreatic islets.

*J. Physiol.* 570: 271–82, 2006.

8. Miura A., Yamagata K., Kakei M., Hatakeyama H., Takahashi N., Fukui K., Nammo T., Yoneda K., Inoue Y., Sladek F.M., Magnuson M.A., Kasai H., Miyagawa J., Gonzalez F.J., Shimomura I.: Hepatocyte nuclear factor-4  $\alpha$  is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells.

*J. Biol. Chem.* 281: 5246–57, 2006.

9. Kishimoto T., Kimura R., Liu T.T., Nemoto T., Takahashi N., Kasai H:

Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla.

*EMBO J.* 25: 673–682, 2006.

特許出願: 0 件

受賞 日本生理学会奨励賞 (平成 16 年度)「インスリン開口放出機構の解析」

学会発表

1. 高橋倫子、岸本拓哉、根本知己、河西春郎: 2光子励起法によるインスリン分泌過程の解析。  
第 76 回 日本生理・薬理学会合同大会シンポジウム 福岡 (2003)
2. 高橋倫子、河西春郎: インスリン開口放出制御機構の2光子励起解析。  
第 46 回 日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 富山(2003)
3. 高橋倫子、河西春郎: インスリン開口放出様式と SNARE 蛋白の動態。  
第 77 回 日本内分泌学会学術総会 京都 (2004)
4. Noriko Takahashi, Hiroyasu Hatakeyama, Haruo Kasai.  
Sequential insulin exocytosis and redistribution of SNAP25 analyzed with two-photon imaging.  
40 th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Munich (2004)

総説

1. 高橋倫子、河西春郎: 2光子励起法を用いた分泌現象の可視化。  
「細胞」35 巻 5 号: 39–42, 2003
2. 高橋倫子、河西春郎: インスリン開口放出を起こす融合細孔の動態と分子組成。  
「糖尿病 2003」: 32–4, 2003
3. 高橋倫子: インスリン分泌の分子機構。「Annual Review 内分泌代謝 2004」: 39–43, 2004

4. 高橋倫子、畠山裕康、河西春郎：インスリン顆粒の可視化。「分子糖尿病学の進歩 2005」:  
15-19, 2005

学術ビデオ

河西春郎、高橋倫子、門脇 孝：「インスリン開口放出の謎を追う」 2003 年  
企画：バイエル薬品 製作：メディカルトリビューン・イオス  
(第 45 回科学技術映像祭 文部科学大臣賞受賞作品)