

平成22年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19590204

研究課題名 (和文) 2光子光化学標識法を用いた膵内分泌機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of endocrine pancreas using two-photon excitation imaging

研究代表者

高橋 倫子 (TAKAHASHI NORIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：60332178

研究成果の概要 (和文)：

インスリンは血糖調節にかかわるホルモンであり、その分泌不全は糖尿病を引き起す原因の一つと考えられている。分泌の最終過程にあたる開口放出や分泌顆粒の動員機構にも、異常の存在する可能性が示唆されている。我々は分泌顆粒や光活性型蛍光蛋白の細胞内動態を測定するために、光活性型 GFP で標識した。また、膜融合の準備状態を検討するために、細胞膜に発現する SNARE 蛋白である SNAP25 に、二種類の GFP 変異蛋白を挿入した FRET プローブを作成し、SNAP25 の複合化と膜融合の潜時の関連や生化学的性質を検討した。

研究成果の概要 (英文)：

Regulated insulin secretion is a key step in glucose metabolism, and its dysfunction is one of the major factors of pathophysiology in type2 diabetes mellitus. From the studies of patients with type 2 diabetes or animal models, some defects were reported in the process of exocytosis. We constructed various kinds of cDNA expression vector carrying exocytic protein or granule protein labeled with photoactivatable GFPs. We transfected these cDNAs into the insulin-secreting cells, and analyzed the fluorescent properties. We also studied the mechanism of exocytosis, using FRET probe of SNAP25, one of the SNARE proteins expressed in plasma membrane, by fusing two kinds of GFP variants. We measured the conformational change of SNAP25 inside the intact pancreatic islets, and analyzed the correlation with quantal insulin exocytic events.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞生理学

## 1. 研究開始当初の背景

インスリンは糖代謝に深くかかわるホルモンである。日本人を含むアジア系人種の場合、欧米諸国の人種に比べ遺伝的にインスリン分泌の少ないことが知られている。

インスリン分泌の最終過程にあたる開口放出や、その前段階にあたる分泌顆粒の動員過程での異常が、糖尿病を発症する成因を構成する一要素となっている。特に、アジア系人種の場合、初期インスリン分泌能が発症前から低下する傾向が多くみられる。しかし、旧来、単一インスリン顆粒の動態や開口放出を定量化する有効な方法論が少なく、それらを調節する分子機構には不明な点が多く残っている。開口放出に関連する蛋白質群の生化学的解析や、欠損動物における分泌現象の解析も進められてきたが、これらの蛋白質の、実際の膜融合現象における機能は、いかなる分泌標本においても未解明の状況にある。

我々は組織深部の可視化に適した2光子励起断層画像法と、水溶性蛍光色素による組織還流法組み合わせ、膵島標本の内部でおこる生理的なインスリン開口放出の各中間過程を、実時間で可視化する手法を確立した (Takahashi et al. Science 297, 1349-1352, 2002)。本手法の同時多重染色性を応用して、開口放出に関連する分子と開口放出過程の関連の実時間解析が可能になりつつあった。

## 2. 研究の目的

2光子励起法による断層画像手法と光活性化手法を併用して、膵島におけるインスリン分泌の調節機構を、解析することを目指す。特に、膜融合の中核分子と考えられるSNARE蛋白質の構造変化を、開口放出現象と関連付けて調査する事を目指す。

## 3. 研究の方法

① インスリン顆粒の分泌を検出するためにマウス膵ランゲルハンス島を水溶性色素液 (SRB, Alexa) などで還流して、2光子励起顕微鏡で断層画像を取得した。励起には波長 830 nm の近赤外超短パルスレーザー光を用いた。一方、膵島に多数存在するシナプス小胞様顆粒の開口放出を検出するために、組織を膜染色性色素 (FM1-43) で還流した。そして、ケイジドカルシウム刺激を与え、分

泌を同期的に誘発し、経時的に断層画像を撮ることにより開口放出像を検出した。

### ② 光活性化ベクターの作製

波長 720 nm の光で2光子励起を行うと、光活性化される GFP 変異体

(PA-venus, PAGFP) をもちいて、開口放出関連蛋白質や分泌顆粒に発現する蛋白質の標識を試みた。細胞膜に発現する SNAP25 や Syntaxin1A などの SNARE 蛋白質、顆粒膜に発現する VAMP2 や Phogrin、インスリン顆粒内に発現する Insulin や NPY を PAGFP で標識し、哺乳類細胞への発現ベクターに組み入れた。

### ③ FRET ベクターの生化学的性質

細胞膜性の SNARE 蛋白質である SNAP25 のコンフォメーション変化を実時間で検出するため、二種類の GFP 変異蛋白質 (ECFP と venus) を、SNAP25 の N 末端と第二  $\alpha$  helix 直前に組み入れた。この新規分子内 FRET プローブを SLIM と名付けた。本プローブは電子顕微鏡による結晶構造解析の結果、他の SNARE 蛋白質と複合化すると、CFP と venus が接近し、FRET (蛍光エネルギー移動) を起こすことが予想された。2004年に報告された FRET プローブ (SCORE) に類似した構造を持つが、既報の SCORE では開口放出に関連したシグナルを検出できていない。

我々の新規プローブ SLIM の光学的・生化学的特徴を明らかにするために、cDNA を大腸菌あるいは CHO 細胞に lipofection 法にて導入し、蛋白質を精製・抽出した。また、生体内で SNAP25 と結合することが知られている他の SNARE 蛋白質 (Syntaxin 1A や VAMP2) の SNARE モチーフ領域 ( $\alpha$  ヘリックス) も、同様に大腸菌や CHO 細胞に発現させ蛋白質を抽出した。

精製蛋白質の蛍光スペクトルを、1光子励起 (433nm) で検討した。SLIM 単体の場合と他の SNARE 蛋白質の SNARE モチーフ存在下において、蛍光特性を比較検討した。

また、2光子励起顕微鏡においても *in vitro* で venus (510-560 nm) と CFP (400-490nm) の蛍光強度の比を計測した。

さらに、*in vitro* における SLIM と他の SNARE 蛋白質の結合を検討するために、免疫沈降法を用いた実験を施行した。

#### 4. 研究成果

①グルコース依存的なインスリン開口放出は、直径約 300nm の点状蛍光 (SRB) の出現像として検出される。細胞内 cAMP 濃度を増強する forskolin を投与すると、カルシウム依存的・グルコース依存的なインスリン分泌の増強することが、RIA 同様、我々の実験系でも確かめられた。また、この増強は水溶性 PKA (A-kinase) の阻害剤によっても阻害を受けることが見出された。

一方、膵島 B 細胞に多数存在するシナプス小胞様顆粒(直径 80 nm) のカルシウム依存的分泌反応を、膜染色性色素 FM 1-43 とケイジドカルシウム刺激を使用して検討した。カルシウム刺激により、約 4500 のシナプス小胞様顆粒が一つの  $\beta$  細胞から分泌される。そして、この分泌反応も forskolin によって増強することが確認された。しかし、インスリン顆粒の場合と異なり、水溶性 PKA 阻害剤 (Rp-cAMP, PKI) によって阻害を受けなかった。

そこで、PKA 以外の cAMP の重要な標的分子である EPAC2 に注目した。EPAC2 の刺激剤である 8-CPT-2'-O-Me-cAMP によってもシナプス小胞様顆粒の分泌は forskolin 同様に増強作用を示した。この事実から、cAMP 依存的なシナプス小胞様顆粒の増強機構は EPAC2 を介している可能性が示唆された。(J.Physiol. Hatakeyama H. et al. 2007, 582, 1087-1098)

さらに、cAMP が分泌増強作用を発揮する時間的経過にも、インスリン顆粒とシナプス小胞様顆粒の間には違いがあることを見出した。グルコース刺激を与えながら、ケイジド cAMP 試薬 (caged-cAMP) を用いて分泌増強作用が発現する潜時を検討した。インスリン顆粒の場合は作用発現までに 5 秒かかり、PKA によるリン酸化過程を反映すると解釈した。他方シナプス小胞様顆粒の分泌増強にかかる時間は 0.3 秒と判定され、増強作用が速やかに発現する事実が示された。

(J.Physiol. Hatakeyama H. et al. 2007, 582, 1087-1098)

②光活性型 GFP 標識蛋白を発現させた細胞の一部を、720nm のフェムト秒レーザーで照射し、AOM を用いた局所的な光活性化を試みた。910 nm 波長光 で画像取得中、PAGFP-SNAP25 の発現細胞の場合は、照射部位において限局的に蛍光強度が増強する事実を確認できた。拡散動態とその動態に影響する因子につき解析を継続している。なお、顆粒膜に発現する PAGFP- VAMP2,

PAvenus-VAMP2 の場合も同様に限局的な光活性化系が確立できた。

しかし、インスリン顆粒内部を修飾した場合 (NPY, Insulin) には、蛍光の発現が弱かった。また光活性化後にも蛍光強度の増強が認められないことが判明した。

③SNAP25 の分子内 FRET プローブ(SLIM) はキューベット実験において syntaxin と複合体を形成した場合、高い FRET 効率(+30%) を示した。1 光子励起(励起波長 433nm) で蛍光スペクトルを調べた結果、複合化により CFP の蛍光減弱と Venus の蛍光増強が認められた。しかし、更に VAMP2 と複合化させても FRET 効率は変化しなかった。また、SLIM 単独体と VAMP2 も in vitro での結合が確認できたが、VAMP2 との複合化は FRET 効率を増強させなかった。これらの事実から、SLIM は SNAP25 の syntaxin との複合化によるコンフォメーション変化を選択的に検出すると考えられた。SLIM は、SNAP25 の siRNA による開口放出の抑制を救済したので、開口放出を誘発できる SNAP25 の変異体であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Takahashi N. and Kasai H.

Exocytic Process Analyzed with Two-photon Excitation Imaging in Endocrine Pancreas. Endocrine J., 査読無, Vol 54, 2007, p337-346

②Hatakeyama H., Takahashi N.,

Kishimoto T., Nemoto T. and Kasai H. Two cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in b-cells. J. Physiol. 査読有, Vol 582, 2007, p1087-1098

[学会発表] (計 2 件)

①NanoBio-Seoul 2008

Korea, Seoul, Yonsei University  
2008年10月30日  
Protein dynamics during insulin

secretion analyzed with two-photon  
imaging  
Noriko Takahashi

- ②第 52 回日本顕微鏡学会シンポジウム  
千葉 千葉大学 2008 年 10 月 18 日  
インスリン分泌現象の 2 光子励起解析  
高橋倫子

[図書] (計 5 件)

- ①高橋倫子、河西春郎  
cAMP によるインスリン分泌増強機構  
「新時代の糖尿病学(1)」  
2008 年 66 巻増刊号 3 p164-168

- ②Takahashi N. and Kasai H.  
Two-photon excitation imaging of insulin  
exocytosis. Pancreatic beta cell in health  
and disease. 2007, Springer Verlag  
p195-211

- ③畠山裕康、高橋倫子、河西春郎  
インスリン分泌における開口分泌機構・  
2 光子励起画像法による検出  
「カラー版 糖尿病学 ―基礎と臨床―」  
2007 年 p112-115

- ④高橋倫子、河西春郎  
膵島における開口放出のイメージング  
「BIOCLINICA」  
2007 年 22 巻 6 号 p86-91

- ⑤高橋倫子、河西春郎  
インスリン開口放出の評価法  
「内分泌・糖尿病科」  
2007 年 25 巻 3 号 p213-218

[その他]

ホームページ等

<http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 倫子 (TAKAHASHI NORIKO)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任講師  
研究者番号：60332178

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

河西 春郎 (KASAI HARUO)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60224375