

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：23903
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770181
 研究課題名（和文）細胞サイズのプロテオリポソームを用いた人工分泌細胞の刺激－分泌連関
 研究課題名（英文）Stimulation-secretion coupling of artificial secretory cells using cell-sized proteoliposomes
 研究代表者
 田所 哲（TADOKORO SATOSHI）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：20389109

研究成果の概要（和文）：アレルギー担当細胞であるマスト細胞は、アレルギー原因物質を分泌する。したがって、この分泌過程の分子機構の詳細を明らかにすることは、新規抗アレルギー薬の開発に向けて重要である。本研究では、これまでに明らかにされていなかった、マスト細胞からの分泌過程におけるカルシウムイオンの具体的な役割を明らかにした。またこの分泌過程には、タンパク質やカルシウムイオンのみならず、細胞膜の成分も重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mast cells are involved in allergic responses. Antigen stimulation causes elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, which triggers exocytotic release of inflammatory mediators. Therefore, it is important for the development of new anti-allergic drugs to elucidate the mechanism of exocytosis. In this study, we found that in addition to Ca²⁺, synaptotagmin2, which is a Ca²⁺ sensor for mast cell exocytosis enhanced exocytotic membrane fusion mediated by phosphatidylserine. These results indicated that not only proteins and Ca²⁺ but phospholipid are involved in mast cell exocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生体膜・受容体・チャネル

キーワード：SNARE、開口放出、人工細胞、リポソーム

1. 研究開始当初の背景

我々は、開口放出の機構について、アレルギー担当細胞であるマスト細胞を用いて研究を行ってきた。その研究の過程で、SNARE (soluble N-ethylmaleimide -sensitive factor attachment protein receptor) と呼

ばれるタンパク質群が、分泌小胞と細胞膜に存在し、それらが相互作用して分泌小胞膜と細胞膜が融合し、小胞内容物を放出することを明らかにしてきた。しかしながら、開口放出の詳細な機構を解明するには、実験条件が

厳密にコントロールできる、より単純な開口放出系での研究が必要となってきた。そこで、分泌小胞にある SNARE タンパク質を組み込んだ微小リポソームと、細胞膜にある SNARE タンパク質を組み込んだ微小リポソーム間の膜融合を、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）によって評価する系を構築し、開口放出様の膜融合のモデルとして解析を行った。しかしながら、この系は分泌小胞と細胞膜に相当する 2 種類の微小リポソームから成る系であり、小胞の曲率が実際の細胞膜とは異なるものである。そこで我々は、細胞サイズの巨大リポソームに微小リポソームを含有させた分泌細胞様のモデルを作り、さらに巨大リポソーム内にカルシウムイオノフォアによってカルシウムイオンを流入させることで、微小リポソームと巨大リポソーム膜が融合して、微小リポソーム内の水溶性蛍光色素が分泌されるタンパク質フリーの人工開口放出系を構築することに成功した。しかしながらこの系も、タンパク質を含まない系であるため、実在の分泌細胞の開口放出とは異なるものである。また、開口放出におけるカルシウムイオンの具体的な役割については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、開口放出におけるカルシウムイオンの役割について明らかにするとともに、構築した人工開口放出系に、開口放出に関与するいくつかのタンパク質を導入することで、より実際の分泌細胞に近い人工系を構築し、その刺激-分泌連関を明らかにして、開口放出の分子機構の解明に資することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、開口放出におけるカルシウムイオンの具体的な役割を明らかにして、より実際の

分泌細胞に近い人工開口放出系を構築するために、以下の方法を用いて研究を行った。

(1) マスト細胞の分泌小胞には VAMP8 と呼ばれる SNARE が存在し、細胞膜には SNAP23 と syntaxin3 と呼ばれる SNARE が存在する。これら 3 つの SNARE タンパク質で開口放出の膜融合が引き起こされる。そこでこれらの SNARE タンパク質を大腸菌にタグ付きタンパク質として発現させ、アフィニティカラムで精製した。

(2) 精製した SNARE タンパク質は、界面活性剤を用いて可溶化した後、透析法によってリポソームに組み込んだ。組み込まれた SNARE タンパク質は、CBB 染色により確認を行った。

(3) 微小リポソーム間の膜融合の評価方法としては、蛍光標識脂質間の FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）の解消を指標に行った。

(4) 巨大リポソームへの組み込みは、Pautot らによって開発された油中水滴法を改良した方法で行った。SNARE タンパク質のリポソーム膜への組み込みは、ウエスタンブロットや蛍光色素標識した SNARE タンパク質を利用することで、画像解析により確認を行った。

4. 研究成果

(1) 開口放出におけるカルシウムセンサー分子 synaptotagmin2 の機能解析
開口放出過程においてカルシウムイオンは極めて重要な役割を果たしている。そこで既に構築している微小リポソームの系を用いて、マスト細胞の開口放出のカルシウムセンサー分子と考えられる synaptotagmin2 の機能解析を行った。

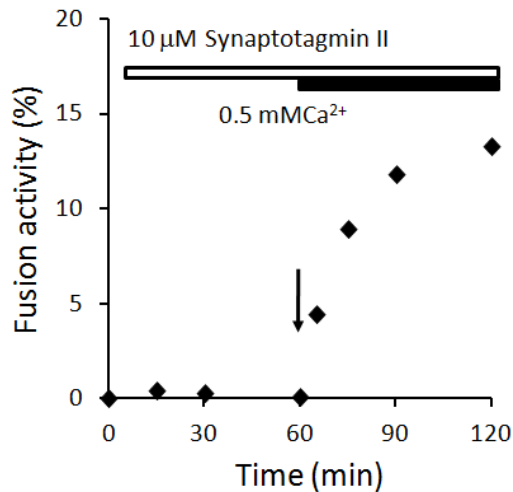


図1 SNARE を介した膜融合における synaptoagmin2/Ca²⁺の役割

その結果、synaptotagmin2 そのものは SNARE に結合することで開口放出の膜融合を抑制するが、カルシウムイオンを感知した synaptotagmin2 は、リポソーム膜の構成成分であるホスファチジルセリンと結合することで、開口放出の膜融合を著しく促進することを明らかにした (図1)。

(2) 巨大 SNARE リポソームの構築

マスト細胞の分泌小胞には VAMP8 と呼ばれる SNARE が存在し、細胞膜には SNAP23 と syntaxin3 と呼ばれる SNARE が存在する。これら3つの SNARE タンパク質で開口放出の膜融合が引き起こされる。我々は既に、VAMP8 が組み込まれた微小リポソームの作製に成功している。そこで SNAP23 と syntaxin3 が組み込まれた、巨大リポソームの作製を試みた。SNARE タンパク質のリポソーム膜への組み込みは、ウエスタンブロットや蛍光標識した SNARE タンパク質を用いた画像解析により確認を行った。その結果、SNAP23/syntaxin3 が膜上に組み込まれた巨大プロテオリポソームを作製することができた (図2)。

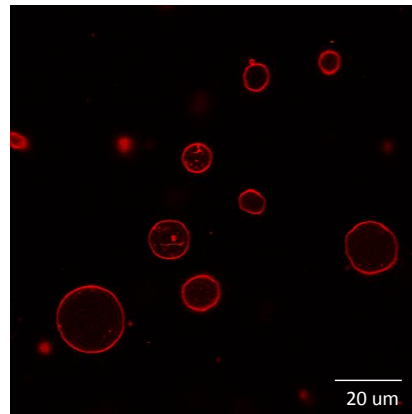


図2 巨大リポソームにおける TAMRA-syntaxin3 の分布

また、巨大リポソームに組み込まれた syntaxin3 の配向性を調べたところ、約 34% が内向きに組み込まれていることが明らかとなった。また同様に、SNAP23 の配向性について調べたところ、約 9% が内向きに組み込まれていることが明らかとなった (図3)。

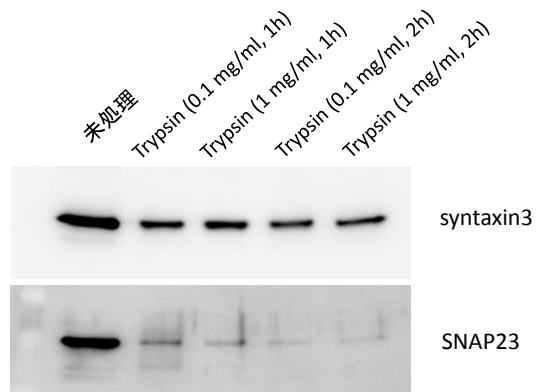


図3 巨大リポソームに組み込まれた SNAP23/syntaxin3 の配向性の決定

(3) 人工分泌細胞の構築

上述の結果をふまえて、SNARE タンパク質 (SNAP23, syntaxin3, VAMP8) と synaptotagmin2 導入した人工分泌細胞の構築を試みた。しかしながら、微小リポソームを内包する巨大リポソームを作製する過程で、水層に懸濁した微小リポソームが油層と接触することで崩壊してしまい、微小リポソームと巨大リポソーム間で引き起こされる

SNARE 依存的な膜融合を評価するまでには至らなかった。今後、微小リポソームの膜表面の親水性を高めることで、微小リポソームと油層の接触を妨げる等の工夫が必要になるものと考えられる。

本研究により、マスト細胞の開口放出におけるカルシウムイオンの詳細な役割を明らかにすることができた。またマスト細胞の開口放出には、SNARE 関連タンパク質やカルシウムイオンのみならず、脂質分子も極めて重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。これらの結果は、系を単純化したりポソームを用いた系だからこそ明らかにできたものであり、開口放出の分子機構の解明に寄与するものと考えられる。

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 7 件)

(1) 平嶋 尚英、田所 哲

巨大リポソームによるエンド／絵くそサイトシス系のモデル開発
生物物理 53, 98-100 (2013) 査読無

(2) Yoko Nishimura, Satoshi Tadokoro, Masahiko Tanaka, and Naohide Hirashima

Detection of asymmetric distribution of phospholipids by fluorescence
Biochem Biophys Res Commun 420 926-930 (2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.106.

(3) Kohei Tahara, Satoshi Tadokoro, Yoshiaki Kawashima, and Naohide Hirashima

Endocytosis-like uptake of surface-modified drug nanocarriers into giant unilamellar vesicles

Langmuir 28, 7114-7118 (2012) 査読有
DOI: 10.1021/la300902z

(4) Kohei Tahara, Satoshi Tadokoro, Hiroaki Yamamoto, Yoshiaki Kawashima, and Naohide Hirashima

The suppression of IgE-mediated histamine release from mast cells following exocytotic exclusion of biodegradable polymeric nanoparticles.

Biomaterials 33, 343-51 (2012) 査読有
DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.09.043.

(5) Yumiko Nagai, Satoshi Tadokoro, Hiroki Sakiyama, and Naohide Hirashima

Effects of synaptotagmin 2 on membrane fusion between liposomes that contain SNAREs involved in exocytosis in mast cells.
Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes 1808, 2435-9 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbmem.2011.07.003.

[学会発表] (計 8 件)

① Satoshi Tadokoro

Enhancement effect of synaptotagmin II on SNARE mediated membrane fusion requires Ca²⁺ and phosphatidylserine.
2012 The American Society for Cell Biology Annual Meeting. 2012 年 12 月 16 日 (米国 サンフランシスコ)

② 田所 哲

マスト細胞の開口放出様の膜融合におけるカルシウムの役割
第 50 回日本生物物理学会 2012 年 9 月

24 日 (名古屋)

③ Satoshi Tadokoro

Effects of synaptotagmin II on
membrane fusion of liposomes
containing SNARE proteins involved in
exocytosis in mast cells

第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月
23 日 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 哲 (Tadokoro Satoshi)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：20389109

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし