

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460290

研究課題名(和文) 2光子励起蛍光寿命画像法を用いた膜融合関連蛋白の構造と機能解析

研究課題名(英文) Analysis of structure and function of proteins involved in membrane fusion using two-photon fluorescence lifetime 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(医学部)・講師

研究者番号：60332178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜融合は伝達物質の放出やホルモン分泌をはじめとする生理機能に深くかかわる現象である。今回は2光子励起蛍光寿命画像法と遺伝子工学的な蛋白蛍光標識法を併用し、膜融合にかかわる蛋白質 SNARE の複合化を生きた細胞内で定量し、融合過程に伴う構造変化をとらえた。大脳シナプス前終末では強い複合化が認められ、SNAP25 のリンカーを介したSNARE複合体のオリゴマー化が超高速の放出を裏付けると考えられた。また、複合化率は放出確率に関連することが示唆された。一方、安静時の膵内分泌細胞では複合化はほとんどおきておらず、カルシウムをはじめとする分泌刺激が到来後してはじめて複合化するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Membrane fusion is involved in neurotransmitter release and hormone secretion. Using two-photon fluorescence lifetime imaging and fluorescence labeling techniques of proteins, we measured assembly of proteins involved in membrane fusion, and detected the conformational change during the exocytosis. We detected the significant assembly of SNARE molecules in the presynaptic terminals, and oligomerization with the linker of SNAP25 was required for the ultrafast exocytosis. Moreover, such assembly was considered to be related with release probability. However, in the resting conditions in pancreatic beta cells, seldom assembly was detected, indicating that stimulants those increase cytosolic calcium concentration is necessary for assembling SNARE molecules.

研究分野：生理学

キーワード：神経伝達 蛋白質 蛍光 2光子励起 開口放出 膜融合

### 1. 研究開始当初の背景

インスリンは糖代謝や生体の成長に必須のホルモンで、その分泌異常は2型糖尿病の成因に深くかかわる。したがって、開口放出過程を含めた分泌機構の全貌の解明は、医科学の重要な課題である。インスリンは、膵臓に散在する膵島の細胞から調節性に分泌される。従来の研究では、神経細胞のシナプスで想定されている分泌モデルが外挿されているケースが多くみられ、膵臓を初めとする内分泌細胞の分泌過程の理解に混迷を与えてきた。そこで、膵内分泌組織とシナプス前終末の違いにつき、最先端の技術(蛍光プローブ、蛍光寿命測定法、2光子励起顕微鏡)を活用し、膜融合前の準備状態を生体標本で定量し、両者の違いの有無を検出できるか検討した。また、蛍光寿命画像法と分子間FRET実験により示される「複合化率」の意味する実体の解釈を図った。

### 2. 研究の目的

開口放出は一般に、真核細胞の生存や機能に広くかかわる重要な生理現象である。SNARE蛋白質群は、細胞膜と顆粒膜の融合を担う中核蛋白であり、その複合化の様式と膜融合の関連を調査することを目的とした。分子の複合化は、2光子励起蛍光寿命画像法を活用して計測し、同時に膜融合は電気生理学的手法(シナプス伝達の計測)や画像法(インスリン分泌像の検出)により行った。神経と膵内分泌組織を同一実験系で測定することにより、複合化の起こり方の違いを直接的に比較することを目指した。両者のCa<sup>2+</sup>依存性膜融合の時定数を比べると、小胞では1ms、内分泌標本では10-1000sを呈し、速度に大きな隔りがある。この違いにSNARE分子の複合化様式がいかに関わるかを検証を試みた。

### 3. 研究の方法

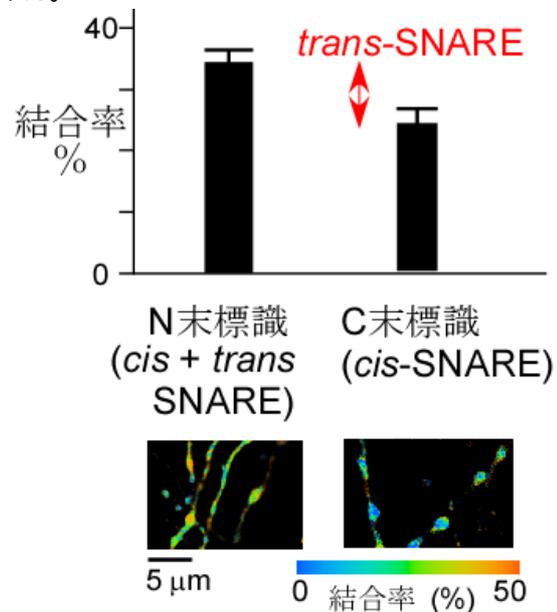
(1)前半では、健常マウスの膵島や大脳皮質シナプス前終末に、遺伝子工学的に蛍光標識したSNARE蛋白のプローブを発現させ、2光子励起蛍光寿命画像法を用いて分子間FRETを測定し、分子同士の結合率を測定した。シナプス前終末におけるSNARE複合化率が、放出確率やシナプス後構造と如何に関連するか、シナプス後電流に伴うカルシウム変動や画像情報をもとに、相関解析した。

(2)また、SNAP25欠損マウスを活用し、蛍光標識SNAP25FRETプローブが膜融合を起こしうるか、検証も行った。顆粒膜と細胞膜の間の融合はパッチクランプによるシナプス後電流記録によって行う。アクティブゾーンでは、SNAP25の二つのαヘリックス間をつなぐリンカー部分を介して、超分子構造・オリゴマーが形成されている仮説(domain swapping model)を、種々の

変異体プローブを導入することで検証した。

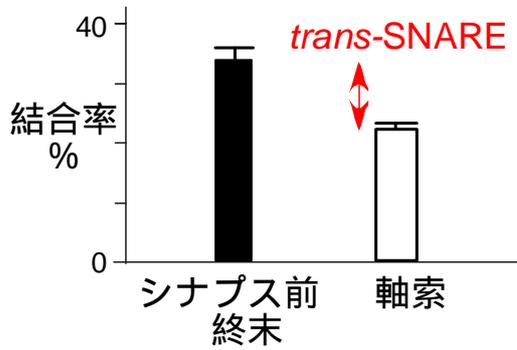
### 4. 研究成果

(1)生体標本でtrans-SNAREとcis-SNAREを区別して定量化する方法を、初めて確立し論文報告した(Nature Commun.2015 Takahashi et al.). SDラットの大脳皮質単離培養標本を用い、Syntaxin1のC末(細胞外領域)とVAMP2のC末(顆粒内領域)に、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を起こす組合せの色素(mturquoiseとVenus)を結合させ、蛍光寿命計測系を用いて分子間複合化率を測定すると、膜融合後に形成されるcis-SNARE複合化率を選択的に検出することができ、神経終末で約20%と推定された。一方、両分子のN末(共に細胞質領域)を色素で標識し、FRETを計測すると、cis-SNAREとtrans-SNARE双方の形成量が反映され、シナプス前終末において約30%の複合化率が示された。この差にあたる10%こそが膜融合の準備過程を形成するtrans-SNAREの形成率を反映すると考えられた。このtrans-SNARE複合化率の測定法を差分法(subtraction method)と名付けた。

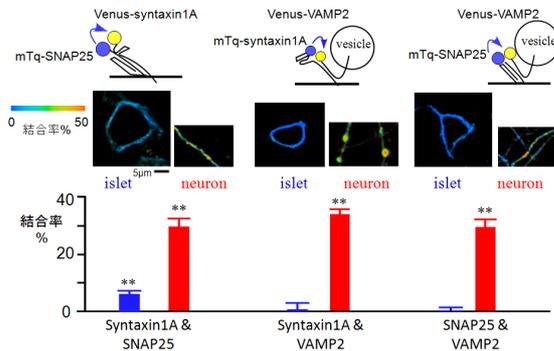


(2)一方、軸索と神経終末の間のシグナルを比べると、C末標識の際(cis-SNARE複合化の検出)には両者に差がなく、N末標識時には10%の差があったことから、cis-SNAREはブートンで形成された後、素早く軸索に拡散することが予想され、Sucrose刺激時にその動態を確認した。TTX(テトロドトキシン)処理により神経活動を止めると、軸索の複合化率が処理時間依存的に減り、trans-SNAREの形成量は不変であることが示された。以上より、軸索と神経終末のFRETシグナルの差からtrans-SNARE形成量を割り出すことが可能となり、勾配法(gradient method)と名付けた。

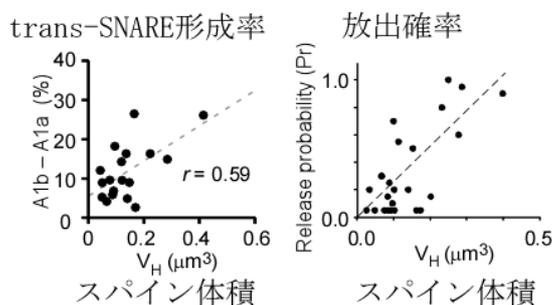
### mturquoise-Syntaxin1A & Venus-VAMP2



(3) 脾島では、細胞膜に発現する t-SNARE 同士の複合化は、安静時細胞膜において、5% 認められ、検定により有意性が確かめられた。しかし、顆粒膜に発現する VAMP2 を巻き込むような複合体の形成率には 0 との有意差が認められず (Wilcoxon 検定)、有意には形成されていないことが判明し、神経シナプス前終末とは対照的な結果が示された。類似の結果は副腎髄質の腫瘍株である PC12 でも確認された。



(4) シナプス前終末における trans-SNARE 複合化率が、放出確率に正の相関を示すことが示された。



ポストシナプス細胞を蛍光標識し、プレシナプスに相対するスパインの大きさを測定した。スパインの大きさが大きいほど、プレシナプスでの結合率は高く、また、ポストにおけるカルシウムシグナルで定量した結果、プレの放出確率も高いことがわかった。したがって、シナプス前終末における trans-SNARE 形成率と放出確率には正の相関があると推測される。

(5) SNAP25 のオリゴマー化がマウス神経細胞における超高速の伝達物質放出に重要であることを、2 系統の SNAP25 変異体を用いて証明した。実験では SNAP25 欠損マウスから単離培養した大脳皮質神経細胞を用いた。FRET プロブとして、ドナー色素を N 末に結合させた mturquoise(mtq)-SNAP25 と、アクセプター色素を第二ヘリックスの直前に挿入した SN1-Venus(Ven)-SN2 の二種を基本形とした。両者の FRET は、2 光子励起蛍光寿命画像法を用い、軸索終末領域で計測した。通常は約 15% の結合率を示し、免疫組織染色で、シナプス前終末分子: Basoon と共局在した。

第一に SNAP25 の C 末欠損体でプロブを作成した。7 残基欠損体では結合率に変化は見られず、9 残基欠損体では結合率が有意に減弱した。この際、20Hz 電気刺激を与えてシナプス伝達 (IPSC) を計測すると、9 変異体では第一刺激による伝達が見られず、刺激を反復させると遅れた伝達を検出された。また、刺激後伝達までの潜時は 9 で有意に延長した。以上より、SNAP25 の C 末は SNAP25 のオリゴマー化 (domain-swapping 構造形成) に必要で、速い伝達物質放出に関与することが示唆された。

第二に、SNAP25 の二つのヘリックスを連結するリンカーの延長変異体を作成した。12 残基 ~ 20 残基延長体のいずれも、結合率は対照と同等だった。しかし、IPSC は、10 残基以上の延長で有意な遅れが検出された。また、第一回刺激における IPSC の振幅も、10 残基以上の延長で有意に減弱した。以上より、リンカーを延長させてもドメイン構造は構成されるが、適切なリンカー長が速い放出を起こすのに必須で、それは融合細孔を取り巻く SNARE 複合体間 (SNAP25 リンカー領域) の張力に反映されると考察された。(論文準備中)

### 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)

- Qin T, Liang T, Zhu D, Kang Y, Xie L, Dolai S, Sugita S, Takahashi N, Ostenson CG, Banks K, Gaisano HY: Munc18b increases insulin granule fusion, restoring deficient insulin secretion in type-2 diabetes human and Goto-Kakizaki rat islets with improvement in glucose homeostasis. **EBioMedicine**, Vol. 16, pp. 262-274, 2017. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.01.030 査読あり
- Noguchi J, Hayama T, Watanabe S,

Ucar H, Yagishita S, Takahashi N, Kasai H. State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. **Sci Rep**. Vol. 6, 32897, 2016. DOI: 10.1038/srep32897. 査読あり

3. Kunii M, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Kobayashi M, Kawakami R, Kondoh Y, Shimizu T, Shimizu S, Lin BZ, Nunomura K, Aoyagi K, Ohno M, Ohmuraya M, Sato T, Yoshimura S, Sato K, Harada R, Kim YJ, Osada H, Nemoto T, Kasai H, Kitamura T, Nagamatsu S and Harada A. Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells. **J Cell Biol** Vol. 214, pp. 121-138, 2016. DOI: 10.1083/jcb.201604030 査読あり

4. Jakkampudi S, Abe M, Komori N, Takagi R, Furukawa K, Katan C, Sawada W, Takahashi N, Kasai H. Design and Synthesis of a 4- Nitrobromobenzene Derivative Bearing an Ethylene Glycol Tetraacetic Acid Unit for a New Generation of Caged Calcium Compounds with Two- Photon Absorption Properties in the Near-IR Region, and Their Application In Vivo. **ACS Omega** 1, pp. 193–201, 2016. DOI: 10.1021/acsomega.6b00119 査読あり

5. Komori N, Jakkampudi S, Motoishi R, Abe M, Kamada K, Furukawa K, Katan C, Sawada W, Takahashi N, Kasai H, Xue B, Kobayashi T. Design and synthesis of a new chromophore, 2-(4-nitrophenyl) benzofuran, for two-photon uncaging using near-IR light. **Chem Commun (Camb)**. Vol. 52, pp. 331-4, 2016. DOI: 10.1039/c5cc07664a. 査読あり

6. Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Watanabe S, Ucar H, Hayashi-Takagi A,

Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H, Kasai H. Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and  $\beta$  cells. **Nature Commun**. Vol. 6, 8531, 1-15, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9531. 査読あり

7. Takahashi N. Imaging Analysis of Insulin secretion with two-photon microscopy. **Biol. Pharm. Bull.** Vol. 38, pp. 656-62, 2015. DOI: 10.1248/bpb.b14-00880. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. Takahashi N, Sawada W, Watanabe S, Kasai H. Configuration of SNAP25 at the exocytic sites analyzed with 2-photon excitation FLIM. 第94回日本生理学会大会 2017年3月29日 アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

2. Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Hasan U, Watanabe S, Kasai H. Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes. 第39回日本神経科学学会大会 2016年7月22日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

3. 高橋 倫子, 澤田和可子, 野口潤, 河西春郎, 舘内内分泌腺の開口放出機構, 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016年3月28日, ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市)

4. Noguchi J, Watanabe S, Takahashi N, Hasan U, Kasai H. Presynaptic probe for reporting synaptic plasticity in hippocampal cultured slices. 第37回日本神経科学学会 2014年9月11日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

5. Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Watanabe S, Kasai H. SNARE configuration at presynaptic terminals analyzed with 2-photon excitation FLIM. 第38回日本神経科学大会, 2015年7月29日,

神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6.高橋倫子, 澤田和可子, 渡辺恵, 河西春郎. 2光子励起画像法による蛋白質複合化の評価,第34回表面科学学術講演会,2014年11月7日,くにびきメッセ(島根県・松江市)

7.Takahashi N, Sawada W, Watanabe S, Noguchi J, Ohno M, Kasai H. 2-photon FLIM analysis of SNARE assembly in neuron and endocrine cells. 第92回日本生理学会・第120回日本解剖学会総会 合同大会,2015年3月22日,神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

8. 國井政孝, 高橋倫子, 小林雅樹, 川上良介, 佐藤隆史,吉村信一郎, 佐藤健, 根本知己, 河西春郎, 北村忠弘, 原田彰宏、Function of a t-SNARE protein SNAP23 in exocrine and endocrine pancreas, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会,2015年3月21日,神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 2件)

1. 高橋倫子、医師薬出版「生理学実習を担当して」, 糖尿病医療を志す 先達から若き人へ贈る言葉 129、p138 139(全275頁)
2. 高橋倫子、門脇孝、分光堂、「ケトン・ケトン体分画(血液および尿)」, 臨床検査ガイド2015年改訂版、p266 268(全1154頁)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

研究成果発表のプレスリリース(東京大学医学部 AMED)

[http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release\\_20151006.pdf](http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20151006.pdf)

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・講師  
研究者番号:60332178

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし

(4)研究協力者  
渡辺 恵 (WATANABE, Satoshi )  
野口 潤 (NOGUCHI, Jun )  
澤田 和可子 (SAWADA, Wakako )  
ハサン ウチャル (HASAN, Ucar )  
河西 春郎 (KASAI, Haruo )