

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17081017  
 研究課題名（和文）トランスポートソーム小胞輸送における膜融合機構の多光子励起過程を用いた可視化解析

研究課題名（英文）Visualization and analysis of membrane fusion mechanism during vesicular transport of transportosome by using multi-photon excitation process

## 研究代表者

根本 知己（NEMOTO TOMOMI）  
 北海道大学・電子科学研究所・教授  
 研究者番号：50291084

研究成果の概要（和文）：膜輸送体の生理機能は小胞輸送と深く関連しているが、特に開口放出等の重要な生理機能の基盤となる膜融合の機構には不明の点が多く残っている。そこで、近赤外フェムト秒レーザーを励起光源として用い、生体組織中で非線型光学過程の一種である多光子励起過程を用いる蛍光顕微鏡法（2光子顕微鏡）を展開させた。他の顕微鏡法では観察不可能な、インタクトな組織深部の微細構造を可能する方法論を確立し、開口放出等の分子機構及び生理機能や病理について重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Physiological functions of membrane transporter are supposed to be closely related to vesicular transport. However, membrane fusion mechanism underlying vital functions including exocytosis remains unclear. In order to clarify the molecular basis, we have developed a new light microscopy, two-photon microscopy, which is realized by using non-linear optics, multi-photon excitation process. By using two-photon microscopy, we have established new methods, which enable us to visualize finer structures inside a living organ, and we have obtained new important insights on molecular mechanism of exocytosis, and on physiological and pathological roles of membrane fusion.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,700,000	0	6,700,000
2006年度	20,200,000	0	20,200,000
2007年度	13,100,000	0	13,100,000
2008年度	12,200,000	0	12,200,000
2009年度	7,700,000	0	7,700,000
総計	59,900,000	0	59,900,000

研究分野：細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学、高機能レーザー、生体分子、発生・分化、生物物理

## 1. 研究開始当初の背景

トランスポートソーム構成分子は、固有のプラットホームの膜分画に輸送小胞の膜融

合により挿入され複合体化し機能する。このような分画、細胞内小器官間の小胞輸送や開口放出など膜輸送系に必須の分子として、酵

母から哺乳動物まで広く進化上保存された SNARE 連関タンパク質群が同定されている。特に、輸送小胞膜と標的膜と融合の際には、融合細孔の形成に先立ち、対面する 2 膜に各々局在する SNARE コアタンパク質分子 (SNAP25, VAMP2, syntaxin) が SNARE コア複合体を形成することが必要であると報告されている (SNARE 仮説)。しかし、この分子複合体がどのように物理的な膜融合を引き起こすのか、その作用機序や生理的機能は未解明である。この問題の解決には生理的な環境下で SNARE コア複合体形成と融合細孔形成の因果関係や作用機序を解析し、明確化することが必須であった。

また、膜動態研究への 2 光子励起法の応用は、現在では徐々に国際的にも広がってきているが、研究代表者らは世界に先駆け関連技術の開発を成し遂げていた。特に、外分泌腺の分泌小胞が開口放出の際、逐次的に膜融合していく様子を初めて報告するなどの成果を上げていた。この新規的な様式の存在は内外から多くの細胞種で報告され始めている。さらに、研究代表者はケージドカルシウム試薬の光活性化による  $Ca^{2+}$  濃度ジャンプの併用にも成功していた。このような研究には、特殊な設備と技術力が必要な為、国内はもとより海外においても比肩しうる研究を推進することが可能な研究室は極めて少なかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、輸送小胞の膜融合過程の観点から、トランスポートソーム構成分子のプラットフォームへの集積の機序を明らかにすることを旨とする。申請者の開発してきた多光子励起法と遺伝子工学学的蛍光タグ化技術を発展させ、定量的に  $Ca^{2+}$  濃度上昇、SNARE コア複合体の形成、融合細孔形成の間の空間的・時間的な関係を明らかにする。さらに、薬理実験、分子機能阻害等を併用し、細胞骨格系や  $Ca^{2+}$  センサー分子など膜融合制御因子の関与の検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

本研究では、様々な小胞膜融合現象のうち、膜融合を人工的にトリガーすることが可能であることを実証済みの、 $Ca^{2+}$  依存性開口放出現象を対象として採用した。この開口放出は膜容量測定など電気生理学的により、また SNARE 連関分子の局在は組織化学的に、その概形が推定されてきた。しかし、SNARE 仮説自身を始め、複合体形成から機能発現へと至る本質的なレベルの証明は欠落していた。さらに、既存の多くの実験法は細胞単離が不可避であるため、膜タンパク質の成分構成や細胞極性が損なわれ

ている可能性が高く、生理的条件との乖離が問題になっていた。一方、研究代表者は、多光子励起過程の特徴：A) 生組織への低侵襲性、B) 高い組織浸透性、C) 高い同時多重励起可能性等が細胞機能アッセイに非常に有効であることを実証してきた。本研究は、これらの特徴を十分に活用して新規的な解析法を確立し、この難問に挑戦しようとした。この成果の発展から、SNARE による膜分画の認識機構の一般的妥当性やその機構の解明が期待された。

## 4. 研究成果

### (1) "in vivo" 2 光子顕微鏡法の展開

新たな 2 光子顕微鏡による新規的な分子細胞機能アッセイの確立に成功した。特に世界で最も深い部位の生体断層蛍光イメージングに成功した。これは、波面収差を動的に制御するレーザービーム補正システムを活用し、生体深部での深さ依存的な補正量等の光学的要件を網羅的に検索したことによる。また、顕微鏡用の超短光パルス幅を計測するオ一群速度補正装置を用いて、光機能性分子の光活性化や断層イメージングの実施に最適な波長、チャージ量等の光学的な要件も検索した。その結果、70 フェムト秒というパルス幅をほぼ発振可能な全域において実現することに成功した。このような最適化された条件では侵襲性が最も低くなり、世界最深部の 1mm を記録すると共に、必要とするレーザーパワーを 50mW 以下に抑えることに成功した。

### (2) カルシウム依存性開口放出における膜融合の分子機構と生理機能

膵臓外分泌腺において提唱した逐次開口放出という新しい分泌様式が副腎髄質クロマフィン標本や神経分泌モデル細胞 PC12 で用いられることを報告した。特に、前者においては、新しい「バキューオール型」逐次開口放出であることを発見し報告している。また、副腎髄質クロマフィン標本、PC12 標本、膵外分泌腺、膵  $\beta$  細胞における逐次開口放出の比較検討から、膜融合を引き起こすと想定される SNARE 分子の動態について、古典的なモデルが単純には適応できない例が存在することが新たに判り、小胞動態や融合細孔の形成過程の間に多様な道筋が存在することが示唆された。

また新たに、広島大学歯学部兼松隆教授作成のノックアウトマウスを対象に 2 光子断層イメージングを用いた細胞内遊離カルシウムイオン濃度と開口放出の同時可視による定量的な解析を実施し、イノシトール三リン酸 IP3 結合分子 PRIP I,II の小胞輸送における機能について新たな知見を得ることに成功した。特に高インシュリン血症を呈する表現型の

原因がカルシウム依存性の開口放出の第2層における促進にあるらしいことが示唆された。

また、京都大学農学部高橋信之博士との共同研究から、グルコース輸送体 GLUT4 の小胞輸送による活性制御機構に関する実験を開始した。蛍光タンパク質タグを付与した GLUT4 分子を脂肪細胞モデルで発現されることを成功し、インシュリン刺激下で細胞膜への移行を示唆する結果を得た。

### (3) 水・電解質輸送の分子機構—アクアポリンチャンネルの生理と病理

膵臓外分泌腺細胞ではカルシウム依存性の電解質輸送が生理的な逐次開口放出に重要であることと、その生理機能実現のためには分泌顆粒膜上の水・イオンチャンネルアクアポリン12 (AQP12) 分子が必須であることが示唆された。この際に用いた AQP12 のホモ・ノックマウスは、A03 内田班 (東京医科歯科大・腎臓内科) において作成されたものであり、研究領域内の共同実験の成果である。

### (4) ナノ・イメージング法による生理機能解析

生理機能を担っている多くの輸送小胞のサイズは、光学顕微鏡においてレーリー卿の定義する光学分解能と比して小さいことから、その動態に関する情報は不十分にしか得られていなかった。そこで、我々は2光子顕微鏡の同時多重染色性を活用することで、細胞内の微小な小胞の大きさを判定する新しい方法論 TEPIQ 法を完成させ提案した。これによりエキソサイトーシス・エンドサイトーシス小胞の多様性と生理機能に関する知見を得ることができた。特に膵臓β細胞におけるシナプス様小胞の動態と機能に関する知見を得、報告した。即ち、膵臓ランゲルハンス島標本、膵β細胞に蛍光タンパク質による蛍光タグ化法や TEPIQ 法を適用し、回折限界以下のシナプス小胞様の分泌小胞の動態を捉えることに成功した。さらに薬理学的実験による大型有芯小胞との動態の比較により、その小胞動態の分子基盤に関する知見を得た。これらの成果は、電子顕微鏡を用いた既存の方法論では達成できなかったものであるという特徴を持つ。

しかし、本 TEPIQ 法は形態的な意味での空間分解能を向上させたわけではないのが欠点であった。そこでこの点を改善すべく、新たな方法論の開発に着手した。その結果、光の回折限界以下のサイズの蛍光ビーズの一つ一つを区別して画像化することに成功し、今後有用な研究手法の完成への手がかりを得た。

### (5) *in vivo* イメージングの応用

本課題の研究遂行過程に於いて2光子顕微鏡法を生理活性研究への応用可能性を広げること成功した。特に、生体肝組織や皮膚組織、リンパ系組織への適用により *in vivo* FRAP 法の開発や第2高調波発生による結合組織の非侵襲的可視化に成功した (特許出願済)。また、世界で最も開口波長の短い新たな群青色蛍光タンパク質を用いたタグ化技術を用いることで、2光子断層イメージングにおいて1波長励起で4つの蛍光波長成分を完全同時可視化する方法論の開発に世界で初めて成功した。

以上のように、本研究課題では非線形光学過程を用いた定量的可視化解析を可能とする方法論を確立することにより、生体膜輸送体の持つ生理的な機能、及びその破綻による病理的な現象について、輸送小胞や膜融合の分子細胞生理学的な立場から、その基礎的な知見を得ることができた。さらに、これら光学顕微鏡と蛍光タンパク質を用いた可視化解析法は、ナノ・イメージングなどへの展開が期待される成果を得たことから、多様な臓器、細胞機能の解明に適応可能である可能性が拓けてきた。

### 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 27 件)

- ① Yukihiro Ebisuno, Koko Katagiri, Tomoya Katakai, Yoshihiro Ueda, Tomomi Nemoto, Hiroyuki Inada, Junichi Nabekura, Takaharu Okada, Reiji Kannagi, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Nancy Hogg, \* Tatsuo Kinashi, "Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in a RAP1-dependent and -independent manner.", *Blood*, 115(4):804-14 (2010) 査読有
- ② \*根本知己, 「レーザーを用いた開口放出や細胞膜機能・形態の新規的な可視化手法」、*膜*. Vol. 35 pp. 57-62 (2010) 査読無
- ③ Eriko Ohta, Tomohiro Itoh, Tomomi Nemoto, Jiro Kumagai, Shigeru B. H. Ko, Kenichi Ishibashi, Mayuko Ohno, Keiko Uchida, Akihito Ohta, Eisei Sohara, Shinichi Uchida, Sei Sasaki, \*Tatemitsu Rai, "Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute

pancreatitis”, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 297(6):C1368-78 (2009).

査読有

- ④ Wataru Tomosugi, Tomoki Matsuda, Tomomi Tani, Ippei Kotera, Kenta Saito, Kazuki Horikagwa, Tomomi Nemoto, and \*Takeharu Nagai, “An ultramarine fluorescent protein with high photostability and pH insensitivity”, Nature Methods, vol.6, pp.351-353 (2009) 査読有
- ⑤ \*Tomomi Nemoto, “Living cell functions and morphology revealed by two-photon microscopy in intact neural and secretory organs”, Mol. Cells, vol.26, pp.113-120 (2008) 査読有
- ⑥ Hiroyasu Hatakeyama, Noriko Takahashi, Takuya Kishimoto, Tomomi Nemoto and \*Haruo Kasai, “Two cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in beta cells”, J. Physiol., vol.582, pp.1087-98 (2007) 査読有
- ⑦ Takuya Kishimoto, Ryoichi Kimura, Ting-Ting Liu, Tomomi Nemoto, Noriko Takahashi and \*Haruo Kasai, “Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla”, EMBO J., vol.25, pp.673-82 (2006) 査読有
- ⑧ Akihiro Oshima, Tatsuya Kojima, Kenji Dejima, Yasuo Hisa, Haruo Kasai, and \*Tomomi Nemoto, “Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands”, Cell Calcium, vol.37, pp.349-357 (2005) 査読有

他、19件。

[学会発表] (計 77件)

- ① T. Hibi, Y Kozawa, A. Sato, H. Yokoyama, S. Sato, T. Nemoto, “Enhancement of lateral resolution of confocal and two-photon laser scanning microscopy by using higher-order radially polarized laser beams”, Focus on Microscopy 2010, March 28-31, 2010, Shanghai, China
- ② 根本知己, 「多光子顕微鏡を用いた生きた個体内部での細胞機能・活性の in vivo

可視化解析」、第83回日本薬理学会年会、大阪国際会議場、2010年3月16-18日

- ③ 根本知己, 「インビボイメージングにおける2光子顕微鏡。非線形光学顕微鏡の特徴と可能性」第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市、2009年12月12日発表、2009年12月9-12日
- ④ 根本知己, 「2光子顕微鏡による生体計測」、第7回医用分光学研究会、東邦大学医療センター大橋病院、東京都、2009年11月7日
- ⑤ 根本知己, 「多光子顕微鏡による深部組織の in vivo(生きたまま)イメージングの技術」、レーザー学会東京支部秋セミナー、慶応義塾大学理工学部、横浜市、2009年10月30日
- ⑥ Tomomi Nemoto, “Neural and secretory activities revealed by two-photon microscopy”, The 6th Asian Biophysical Association (ABA) Symposium, Hong Kong University of Science and Technology, Hong-Kong, China, Jan11-14, 2009
- ⑦ Tomomi Nemoto, “In vivo functional imaging for secretion and neural activities by two-photon microscopy”, The 9th International Congress of Cell Biology and KSMBM, Seoul, Korea, Oct 11, 2008
- ⑧ 根本知己, 「2光子顕微鏡による神経・分泌機能の可視化技術の展開」、第85回生理学会大会、京王プラザホテル、東京、2008年3月25-27日
- ⑨ Tomomi Nemoto “Two-photon microscopy for in vivo analysis of neural and secretory activities”, Third Annual Conference of the American Academy of Nanomedicine (AANM), San Diego, United States, September 7-9, 2007
- ⑩ Tomomi Nemoto “Two-photon functional imaging of neurons and secretory gland cells”, EABS & BSJ 2006, Okinawa, Japan. Nov 13-16, 2006

他、67件。

[図書] (計3件)

- ① \*Tomomi Nemoto, Artech House, Inc., Nanomedicine Science and Engineering (ed. M. J. Schulz), Ch.20:Two Photon Microscopy for in vivo Analysis of Neural and Secretory Activities, 2010 (印刷中)
- ② \*根本知己, (株) オーム社, ナノメディ

シンナーナノテクの医療応用(宇理須恒雄  
(編))：2光子顕微鏡を用いた生体組  
織細胞機能の非侵襲的な可視化解析法，  
2008，25-38

- ③ \*根本知己，(株)化学同人，分子イメージ  
ング最前線-蛍光プローブが拓くライフ  
サイエンスの未来(化学同人編集部編)，  
第4章：2光子顕微鏡による in vivo  
可視化技術，2007，77-82

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：生体内特定代謝物の迅速測定法と装置

発明者：岸本拓哉，大西通博，根本知己，鍋倉  
淳一

権利者：ソニー株式会社、自然科学研究機構

種類：2009286695(特許番号)

出願年月日：2009年12月17日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/mcb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

根本 知己 (NEMOTO TOMOMI)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：50291084

### (2) 連携研究者

兼松 隆 (KANEMATSU TAKASHI) (平成 21, 22  
年度)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10264053

高橋 信之 (TAKAHASHI NOBUYUKI) (平成  
20, 21, 22 年度)

京都大学・大学院農学系研究科・助教

研究者番号：50370135