

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 2光子励起法を用いた生体膜融合分子機能の顕微解析とシステム化

2 研究者氏名: 根本 知己

3 研究の狙い:

開口放出や細胞分画間の小胞輸送における生体膜融合過程は、広く進化上保存されている可溶性 N-エチルマレミド感受性因子 (NSF) 結合タンパク質受容体 (SNARE) 関連タンパク質群によって引き起こされると考えられている。特に、開口放出の初期に形成される融合細孔の形成に先立ち、小胞膜の v-SNARE (VAMP2) と細胞膜の t-SNARE (SNAP23, syntaxin2) が安定な 4 重ヘリックス構造を形成し、複合体を形成することが必要であると生化学・分子生物学的には提唱されている (SNARE 仮説)。しかし、生体組織においてこの SNARE 仮説は真に成立し得るかといった点を含め、この超分子複合体がどのように物理的な脂質 2 重膜間の融合を引き起こすのか、その作用機序や生理的機能を含め未解明である。そこで、本課題では、先端的光学技術と遺伝子工学を組み合わせ、SNARE 分子及びその関連する分子の *in vivo* リアルタイム可視化を実現し、Ca<sup>2+</sup>依存性開口放出やその制御機構を解明することを目指した。

4 研究の成果:

本研究で用いた膵臓外分泌腺細胞は、極めて強い極性を持ち、基底膜上にはアゴニスト受容体、腺腔膜側には消化酵素源を濃縮貯蔵した直径 1µm もの分泌小胞が集積する。それ故、生合成、調節性開口放出等のモデルとして広く用いられてきた。アゴニスト刺激は細胞内カルシウム濃度 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を惹起し、開口放出を引き起こす。本研究者は 2 光子顕微鏡を用いて構造として融合細孔形成と Ca<sup>2+</sup> 波動の同時可視化に成功していた。さらに腺腔膜上で開口放出を起こした分泌小胞の膜が腺腔膜と融合し完全に平坦化する前に、隣の標的膜として供され、2 次的な開口放出が生じることを世界にさがけて明らかにしていた (逐次開口放出)。

### 膵臓外分泌腺初代培養法の確立

細胞の極性を損なうことなく真の開口放出現象を可視化する必要があるため、蛍光タンパク質と標的タンパク質の融合タンパク質の発現の為に、組織的な構造を保持し生理機能を維持できる初代培養細胞系を確立することが必須であった。しかし、既存の手法では、極めて短期間で形態変化からネクローシスを至る。そこで、極性を維持するためコラーゲン・ゲルでチェンバーをコーティングすることや、様々な培養条件を検討した結果、Waymouth's medium をベースにした培養液を用いることで、問題を解決した。さらに、プラスミドをコートした金粒子の高速打込やアデノウィルスを用いて旧来のインジェクション法よりも効率的に外来性遺伝子を発現することに成功した。

### SNARE 仮説と逐次開口放出分子モデルの検証

t-SNARE 分子は組織化学的には腺腔膜に局在することが示唆されていたため、SNARE 仮説が成立することを前提とした逐次開口放出の分子的なモデルを提出していた。即ち、syntaxin and/or SNAP23 が、連続化した小胞膜を側方拡散し、深部顆粒上の VAMP2 と SNARE 複合体を形成し、2 次的な開口放出を起こすと想定した。

そこで、2 光子断層イメージングの色収差が無く、かつスペクトルの広い同時多重染色性を活用し、蛍光デキストランにより細胞構造と他の蛍光分子の空間関係とを、高精度で判断することを可能とした。蛍光抗体法により syntaxin-2 が腺腔膜に局在することを確認した。さらに SNAP23 をクローニング、EGFP-SNAP23 発現用アデノウィルスを研究協力者に作成依頼した。この発現により SNAP23 の局在性を初めて示した。

さらに、SNARE 仮説の検証を行うために、遺伝子工学的に SNARE コアタンパク質の機能阻害を導入した。対照群 (野生型 syntaxin-2 を過剰発現) では盛んに逐次開口放出が観察された一方で、安定なコア複合体が形成できない syntaxin-2 変異体を過剰発現させた細胞では、構造発生が完全に阻害された。また、開口放出を起こした顆粒膜へ SNAP23 が拡散することを可視化することに成功した。逐次開口放出には融合した小胞膜への SNAP23 の側方拡散が重要である。

尚、この新規的な様式「逐次開口放出」は、本研究者の研究グループはもとより内外からも、膵臓細胞、副腎髄質クロマフィン細胞、PC12細胞など他の分泌細胞においても報告されつつあり、細胞生物学的に一般的で基本的な様式である可能性が出てきた。

#### 融合細孔形成の制御因子

##### -1. アクチン＝バリア説の検証と急性膵炎の病因

細胞膜直下のアクチン被覆は、膜融合の物理的障壁となっているのではないかどうか(アクチンバリア説)は長年の議論の的であった。EGFP-アクチンと開口放出を同時可視化することに成功し、アクチンは開口放出を起こした顆粒膜で急激に重合することを初めて明らかにした。この被覆形成を阻害すると、構造は不安定化し、病理的な空胞形成が生じ、急性膵炎へと導かれていくことから、アクチン被覆は細胞極性の破壊を防ぎ、生理的な開口放出の進行に重要であることが判った。さらに、ケージドカルシウムの閃光活性化が可能なシステムを新たに構築することにより、開口放出の速度を定量的に計測した結果、腺腔膜直下のアクチンも顆粒膜のものも、開口放出の速度を遅くしているが、分泌可能顆粒のプールサイズには影響を与えなかった。ここで、開口放出への準備状態は最外層でも内部でもほぼ等しいことから、逐次開口放出のモデルでは、SNARE複合体の形成は刺激後に起きることを予言する。従って、アクチン被覆はt-SNAREの側方拡散係数を下げることを通じ、SNAREコア複合体形成に要する時間を長くするものの、複合体形成自体は阻害せず、被覆は十分に粗であることが示唆された。このように、古典的なアクチンの「バリア機能」を新たに再定義することに成功した。尚、本成果の図像は米国膵臓学権威の執筆する消化器学の標準的テキストに掲載を依頼された。

またアクチンは一過的に基底膜に斑点状に集積することを初めて可視化した。この集積はジアチルグリセロールより下流のシグナルによって惹起された。即ち異なる膜分画毎にそれぞれ固有のアクチン重合の動態を持っていた。意外なことに、異なる膜分画でも、small GTPase rhoに媒介されていた。さらに、PIP<sub>2</sub>がRho活性化に寄与している可能性が示唆されつつある。

##### -2. Rab3 エフェクターNoc2のCa<sup>2+</sup>依存性開口放出への関与

分泌顆粒の融合準備状態に関与するrab3タンパク質のエフェクターであるNoc2をノックアウトしたマウスを用い、Ca<sup>2+</sup>依存性開口放出への寄与を検討した。このマウスでは全身の多くの分泌細胞で調節性分泌の抑制が生化学的に認められた。しかし、Ca<sup>2+</sup>と開口放出の同時イメージングを行ったところ、意外なことに、ノックアウトマウスでは、Ca<sup>2+</sup>濃度自身が著しく抑制されていた。そこでケージドカルシウムにより人工的なCa<sup>2+</sup>濃度を与えたところ、開口放出数は70%以上回復した。以上から、Noc2は、アゴニスト刺激時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に必須であった。さらに、アゴニストによらず同様の結果を得たので、共通経路であるGqからIP<sub>3</sub>受容体までの経路において機能していた。

#### 蛍光シグナルの相関と融合細孔系の測定法

APDにより高効率で2光子励起蛍光光子を検出し、自己相関・相互相関の計測する系を確立し、蛍光分子濃度や拡散定数の解析系を確立した。また、様々な蛍光デキストランで細胞外を多重染色し、構造の蛍光シグナルの相互相関関数から、融合細孔直径を高精度で計測する解析手法を確立した。融合細孔は漸次拡張するが、20nmを越えることは無く極めて安定な構造体であることが示唆された。また、膵臓細胞の開口放出時の融合細孔形成過程を詳細に解析し、融合細孔は脂質によって形成されていることが強く示唆された。

#### 予期していない新たな技術や科学的知見 溶液輸送・ミトコンドリア活性状態

まず、水溶性蛍光色素を用いた細胞形態のイメージングからインタクトな鼻粘膜上皮腺における溶液輸送現象を実時間同時可視化する方法を確立でき、生体防御機能としてCa<sup>2+</sup>依存性な鼻粘膜液の産生機構の可視化解析が可能となった。アセチルコリンによる一方向性のCa<sup>2+</sup>波動の発生、溶液輸送、逐次開口放出が初めて同時可視化され、これらの時間的秩序関係が定量的に捉えることに成功し、この秩序関係が効率的な防御機能発現が実現されていた。また、同様の同時多重可視化は、唾液腺外分泌腺においても成功し、今後は様々な分泌腺組織の機能アッセイ法として用いられていくであろう。

次に、2光子励起自家蛍光像を検討することにより、ミトコンドリアに集積するNADHの集積状態の可視化に成功し、個々のミトコンドリアの活性状態の解析へつながった。中枢神経培養細胞に適用、電気化学的な呼吸状態の同時測定により、ミトコンドリアを介したCa<sup>2+</sup>依存性の迅速な

酸素代謝を初めて実証することに成功した。

#### 5 自己評価:

当初設定目標のうち、2光子励起法の、ケージド試薬閃光活性化法、FRET、FLIM、FCSへの適用による新たな定量解析系の確立と、遺伝子工学的手法による膵臓外分泌腺組織標本でのSNARE 連関分子の可視化はほぼ計画通り達成し、その結果、SNARE 仮説の検証、融合細孔動態の可視化解析、アクチン細胞骨格による制御に関して新たな知見を得、公表することができた。また、当初の計画の予想を超え、水分泌、ミトコンドリア活性状態の新たな可視化解析法を生み出し、また、Noc2 という新規分子の思いがけない寄与も明らかにした。以上の成果は、急性膵炎、アレルギー性鼻炎などの臨床研究や創薬への展開も期待している。しかし、融合細孔形成に伴うSNARE 分子の拡散の可視化には成功したが、その時の真の SNARE 複合体形成の瞬間を、リアルタイム可視化するという目標は到達したとは言えない。現在も継続して実験を進めているので、今後の進展を見守っていただきたく、お願い申し上げる次第である。

SNARE 連関タンパク質は、その機能の一般性にもかかわらず、この数年でやっと生化学的・分子生物学的な概観の見えてきた段階であり、モータータンパク質のような機能を有する超分子複合体として研究対象となりつつある。本研究によりその潮流の一端を先駆的に担うことができたと思う。本研究者の明らかにしてきた逐次開口放出現象、提出した開口放出の分子モデルや細胞骨格による制御過程などは内外の他研究者によってその一般性が追認されつつある。また、開発してきた技術は、2光子励起顕微鏡法自身がレーザー光源の扱いが難しいために安易には使えないことや、ケージド試薬、FLIM、FCS の利用には更に高度な顕微鏡の改造が必要であることから、現在、どこの研究室でも行えるというものではないかもしれない。しかし、生の生物の試料の観察には、標本自身の改良を伴う多くの試行錯誤を要し、その標本を扱う研究者によって独自に進められるべきものであろう。本領域における研究終了後も生体膜融合連関分子の可視化解析を着実に進めており、将来へ向かって本研究を展開していきたい。

#### 6 研究総括の見解:

2光子励起顕微鏡による可視化技術を開発し、生体分子機能研究に応用して、逐次開口放出分泌機構の可視化に世界にさきがけて成功した。この分泌機能の異常が急性膵炎やアレルギー性鼻炎に結びつくメカニズムも解明し、米国消化器学の教科書にも採用された。物理学の深い理解に根ざした高い技術力とやわらかい生理現象への洞察力があいまって達成された成果である。本領域の機能研究における高い成果と評価できる。残る複合体形成のリアルタイム可視化を是非成功させたい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. "Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands", Akihiro Oshima, Tatsuya Kojima, Kenji Dejima, Yasuo Hisa, Haruo Kasai, and Tomomi Nemoto, **Cell Ca.** (2005, *in press*) (Corresponding author)
2. "Rapid  $Ca^{2+}$ -dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons", Yasuyuki Hayakawa, Tomomi Nemoto, Masamitsu Iino, Haruo Kasai, **Cell Ca.** (2005, *in press*)
3. "Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini", Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruhiko Bito and Haruo Kasai, **J. Biol. Chem.**, vol.279 pp. 37544-37550 (2004) (Corresponding author)
4. "Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet", Norkiko Takahashi, Takuya Kishimoto, Tomomi Nemoto, Takashi Kadowaki, Haruo Kasai., **Science**, vol. 297, pp. 1349-52 (2002)
5. "Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the  $\beta$ -cell model of mitochondrial diabetes: Characteristics of  $\beta$ HC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription", Mitsuhiko Noda, Shigeo Yamashita, Noriko Takahashi, Kazuhiro Eto, Linming Shen, Kazuo Izumi, Samira Daniel, Yoshiharu Tsubamoto, Tomomi Nemoto,

- Masamitsu Iino, Haruo Kasai, Geoffrey W.G. Sharp, and Takashi Kadowaki, *J. Biol. Chem.*, vol. 277(44), pp. 41817-26 (2002)
6. "Two-photon excitation imaging of pancreatic islet with various fluorescent probes.", Noriko Takahashi, Tomomi Nemoto, Ryoichi Kimura, Akira Tachikawa, Akiko Miwa, Haruo Okado, Yasushi Miyashita, Masamitsu Iino, Takashi Kadowaki and Haruo Kasai., *Diabetes*, vol. Suppl.1, S25-8 (2002).
  7. "Dynamic actin reorganization in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini mediated by Rho", Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruo Kasai, *Mol. Biol. Cell*, vol. 14 (Suppl.), p.355a (2003).
  8. "Two-photon imaging of insulin exocytosis in the pancreatic islets", Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kasai, H., *J. Pharmacolog. Sci.*, vol. 91, pp. 32P-32P (Suppl.), (2003).

#### 出版物

1. 畠山裕康、高橋倫子、根本知己、河西春郎、「インスリン分泌」第1章「インシュリン開口放出現象の可視化から何がわかるか」pp.39-42、文光堂、東京、2004年5月
2. 根本知己「ナノテクノロジー大辞典」第8章「2光子顕微鏡」pp. 781-785、工業調査会出版部、東京、2003年12月。
3. 河西春郎、根本知己、松崎政紀、早川泰之、「2光子励起法による神経機能研究」生物物理、vol. 42, No.2, 91-94 (2002).

#### 招待講演

1. Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima and Haruo Kasai, "Dynamic role of actin in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini", **Gordon Research Conferences, Salivary Glands & Exocrine Secretion**, Feb 2-7, 2003, Holiday Inn Ventura, CA, USA. 招待ポスター. Co-chair 兼 judge for poster session として招聘を受け会議運営に参加。
2. 根本知己「多光子励起過程を用いた開口放出・分泌現象の可視化解析」日本分析化学会第66回分析化学討論会、2005年5月14, 15日、北見工科大学、北見(予定)。
3. 根本知己「2光子励起法による開口放出の可視化」基礎生物学会「生体シグナルの可視化を目指して」、2004年12月2, 3日、岡崎カンファレンスセンター、岡崎
4. 根本知己「多光子励起過程を用いた開口放出の解析法の開発と応用」基礎生物学会「光生物学の課題と光技術の展望」、2004年11月25, 26日、自然科学研究機構・基礎生物学研究所、岡崎
5. 根本知己「2光子顕微鏡によるCa<sup>2+</sup>依存性開口放出の解析」日本生物物理学会第41回年会シンポジウム、2003年9月23-25日、新潟。

#### 学会発表等

1. Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruo Kasai, "Dynamic Actin Reorganization in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini mediated by Rho", **43<sup>rd</sup> annual meeting, the American society of cell biology**, Dec. 13-17, 2003, San Francisco, CA, USA.
- 他8件