

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光子励起を用いた開口放出分子機構の解析法の開発と応用

研究者 根本 知己
生理学研究所

本課題は、先端的な光学技術や遺伝子工学を応用した新しい測定法の開発を通じて、真核生物の種を越えて保存されている SNARE タンパク質が引き起こす開口放出や生体膜融合のメカニズムを明らかにすることを目的として実施しているものである。

1 はじめに

シナプス前終末における神経分泌はもとより、大型有芯小胞の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、共通のメカニズム-酵母から哺乳動物まで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) 連関タンパク質群-によって引き起こされると考えられている。特に、開口放出の初期に小胞膜と細胞膜を結ぶ融合細孔が形成されるが、この融合細孔形成には、対面する2膜に存在する SNARE タンパク質分子 (小胞膜: v-SNARE (VAMP2), 細胞膜: t-SNARE (SNAP25, syntaxin)) が熱力学的に安定な4重 α ヘリックス構造を形成し、SNARE コア複合体となることが必要かつ十分であると提唱されている(SNARE 仮説)(図1)。しかし、この超分子構造がどのように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。従って、この問題の解決には生理的な環境下で SNARE 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、明確化することが重要であると考えた。

本研究者は、先端的な光学技術の生物学への応用を目指し、近赤外フェムト秒パルスレーザーによる2光子励起過程を用いた顕微鏡法の確立に従事して来た。生体組織中での空間

分解能や高い定量性、同時多重染色性の向上や、蛍光色素の内部遮蔽効果の回避などを活用し、大型有芯小胞の開口放出の素過程の可視化に初めて成功した(*Nature Cellbiol.* 2001)。そこで、本課題では、開口放出過程の中間状態の解析法の確立することで、SNARE 複合体による Ca^{2+} 依存性開口放出現象やその制御機構の解明を目標として、新規的な光学的解析法に遺伝子工学を組み合わせ、分子複合体の新しい機能アッセイ法の確立を目指した。

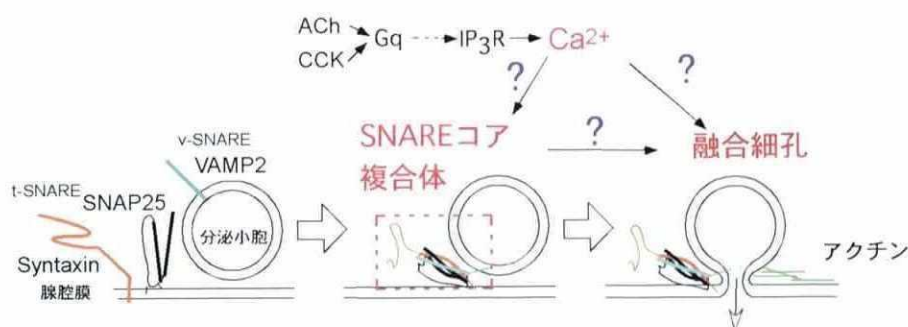


図1: SNARE タンパク質による Ca^{2+} 依存性開口放出

2 膵臓外分泌腺の「逐次開口放出」の分子機構

膵臓外分泌腺細胞は、極めて強い極性を持ち、基底膜（血管側）上にはアゴニスト受容体、腺腔膜側（膵管側）には消化酵素源を濃縮貯蔵した直径 $1\mu\text{m}$ もの分泌小胞が集積する。この為、生合成、小胞輸送、調節性開口放出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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を惹起し、開口放出を引き起こす。2光子励起断層画像法は、 $10\mu\text{M}$ を越える Ca^{2+} 波が腺腔側から生じ、開口放出は腺腔膜側で選択的に生じることを明らかにした。さらに、我々は、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次的な開口放出が実際の細胞中で生じることを初めて明らかにした。この Ca^{2+} 波による2次的開口放出の逐次的進展の調節が、細胞深部の小胞の分泌動員を制御し、刺激—分泌連関機構の本質である。この新規的な様式「逐次開口放出」は、我々はもとより、内外からも、膵臓 β 細胞(Leung 2002)、副腎髄質クロマフィン細胞(投稿中)、PC12 細胞(論文準備中)など他の分泌細胞においても報告されつつあり、一般的な様式である可能性が出てきた。

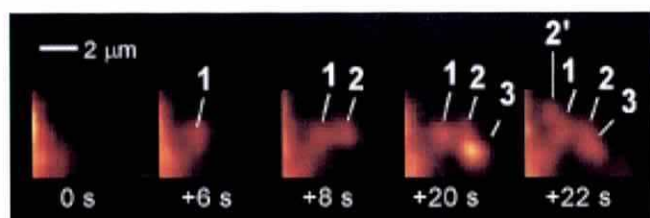


図2：逐次開口放出

我々は、t-SNARE 分子は腺腔膜に局在することから、SNARE 仮説に基づき、逐次開口放出の分子的なモデルを立てた。即ち、syntaxin-2 が、連続化した小胞膜を側方拡散し、隣接した小胞の近くに来ることで、その小胞膜の VAMP2 が SNARE 複合体を形成され2次的な開口放出を起こすと考えた。そこで、遺伝子工学的に SNARE コアタンパク質の機能阻害を導入し、この作業仮説の妥当性を検証しようと考えた。しかし、既存の手法では短期間で形態変化を起こし、細胞死へと至ることが多かった為、安定した膵臓外分泌腺の初代培養系を確立することが急務であった。先ず、我々はゲルによるコーティングや、さらにウエイマウス培養液に基づく培養液を用いることで、遺伝子工学的な操作が可能な安定した系を確立した。

この初代培養標本に、アデノウィルスによって、安定な4重 α ヘリックス構造の形成に必要な226残基目のグルタミンをアラニンに変えた syntaxin-2 変異体を強制発現させた。対照群として野生型を過剰発現した細胞では盛んに逐次開口放出が観察されたが、変異体の過剰発現は、 Ω 構造発生を完全に阻害したことから、SNARE 複合体形成が逐次開口放出に必須であることが確認された。さらに、逐次開口放出には融合した小胞膜への SNAP25 の側方拡散が必須であることを、我々の研究室の高橋倫子博士が中心となり膵臓 β 細胞を用いて示した。

3 逐次開口放出制御する分子機構

多くの生理的な細胞機能はシステムとして実現されているので、1個の分子を欠損させた実験が成功としたとしても、単純な表現型のアッセイからは、その機能を司る機構の本質に言及が及んでいない可能性を否定することは、原理的に不可能である。それ故、分泌・開口放出の制御について検討する際、生化学的な分泌量が減少する現象が見られたとしても、SNARE 複合体の形成や機能発現の段階

と、分泌小胞が膜融合能力を獲得する段階と分離して議論することが重要になる。以下にそれぞれの段階での制御因子を検討した例を示す。

① “アクチン=バリア” 説と急性膵炎の発症機構

外分泌腺では、開口放出が選択的に生じるその腺腔膜直下に、アクチンの厚い層が構成性に存在する。一方で、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）は長年の議論的であった。GFPβ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小胞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、Ω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分泌小胞膜のものも、開口放出の速度を遅くしているが、分泌可能小胞群の大きさには影響を与えなかった。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 の側方拡散係数の低下を介して、SNARE コア複合体形成に要する時間を長くするものの形成自体は阻害せず、密度は十分に粗であることが示唆された。このように、我々は、古典的“アクチンバリア”説を、分子論的な新しい形で記述することに成功した(*J. Biol. Chem.* 2004)。

またアクチンはアゴニスト刺激の間にも一過的に基底膜に斑点状に集積することが初めて判った。この集積はケージドカルシウムでは引き起こすことが出来なかったことから、ジアシルグリセロールより下流のシグナルによって惹起されると考えられる。つまりこの上皮細胞では、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ることが判った。意外なことに、これらは全て、C3 エクソエンザイムを用いた実験から、低分子量 GTP 加水分解酵素 rho に媒介されることが判明した。

② Rab3 エフェクター Noc2 の Ca²⁺依存性開口放出への関与

GTP 関連タンパク質の分泌への関与は網羅的に分子生物学的に調べられている。我々は分泌の準備状態に関与すると言われる 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、Ca²⁺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ていた。ノックアウトマウスに生理的なアゴニスト刺激(100 pM CCK)を与えた際の最大 Ca²⁺濃度は 20%にまで減弱され、この時の開口放出数は 15%以下に抑えられていた。そこでケージドカルシウムにより 10 μM を越える人工的な Ca²⁺濃度を与えたところ、開口放出数は約 70%まで回復した。この時、Ca²⁺濃度上昇から細胞膜直下での Ω 構造の出現までに要する時間を計測すると、ノックアウトマウスでは倍以上延びていた。よって、Noc2 欠損は融合可能小胞群の準備状態を

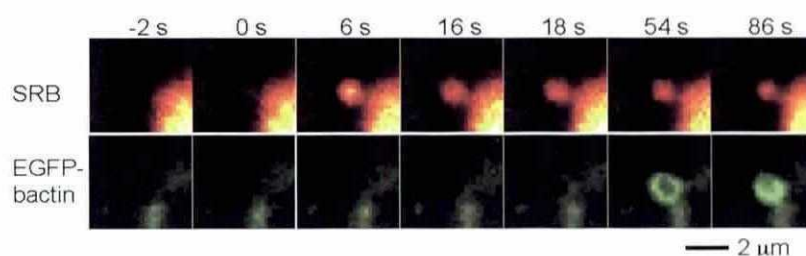


図3 開口放出した小胞に生じるアクチン皮膜

悪化していた。以上から、Noc2 は、(I) アゴニスト刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と (II) 分泌顆粒の融合可能準備状態の形成・維持の 2つの作用がある可能性が示唆された。さらに、ACh 刺激実験を行ったところ、上記と同様の結果を得たので、様々な受容体刺激の共通経路である Gq から IP_3 受容体までの経路が阻害されていることが考えられる。つまり、Noc2 は、PLC β の活性に関与し産生される IP_3 濃度に影響を与えているか、 IP_3 受容体の感受性に影響を与える可能性があると考えられる。

4 融合細孔動態のナノメトリー

2光子励起法の特徴である同時多重染色性増大を活用し、異なる蛍光波長と分子量の蛍光デキストランで細胞外を多重染色し、 Ω 構造の蛍光シグナルの相互相関関数から、融合細孔の直径を高い精度で計測する解析手法を確立した。膵臓外分泌腺では Ca^{2+} 濃度上昇後、直径 6nm 以上の融合細孔が形成され漸次拡張するものの長時間に渡って 20nm を越えることは無く極めて安定であることが判った。この手法を用い、膵臓 β 細胞の開口放出時の融合細孔形成過程を我々の研究室の高橋博士が中心となって詳細に解析し、融合細孔は脂質によって形成されているモデルを指示する結果を得た(*Science* 2002)。また、副腎髄質クロマフィン細胞における解析も岸本拓哉博士が中心となって成功している(論文準備中)。この融合細孔の安定性の生理学的意義は現在検討されつつある。

5 溶液輸送の 2光子断層イメージング

最後に、2光子励起法による細胞解析法の医学的な応用例として、外分泌腺における溶液輸送の可視化について説明する。我々は、アレルギー性鼻炎などの過剰分泌の病理学的解明を目指し、鼻粘膜における生体防御機能としての Ca^{2+} 依存的な鼻粘膜液の産生機構の可視化解析法の確立を目指した。我々は水溶性蛍光色素により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した。その結果、アセチルコリン刺激による一方向性の Ca^{2+} 波動の発生、溶液輸送、逐次開口放が初めて可視化されると共に、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ることが明らかになった(*Cell Ca, in press*)。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ており、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ことが期待される。

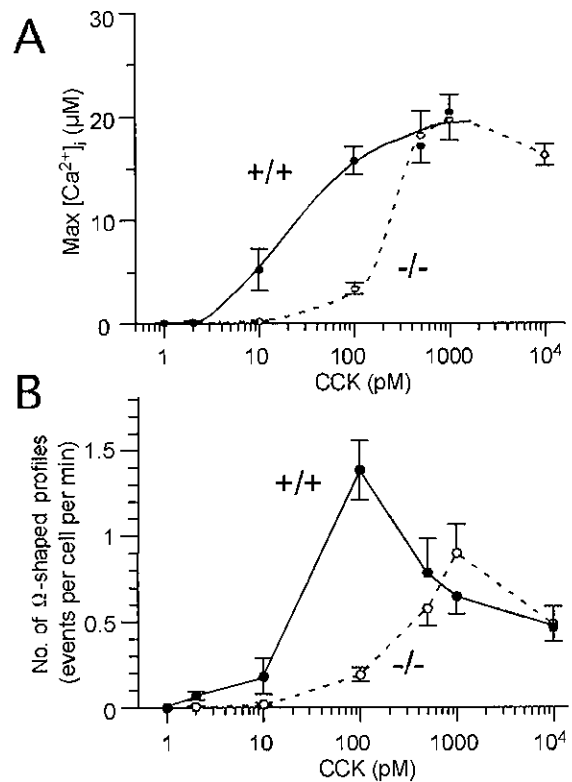


図 4: Noc2^{-/-}の最大 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇 (A) と開口放出数

6 今後の展望

以上のように、2光子励起法を用いた計測・解析法は細胞機能のアッセイに非常に適している。今後さらに、本課題で挑戦したような生体分子複合体の機能発現の現場を生きた細胞内で捉えていく手法は、システム化された細胞機能の解明にとって重要になっていくものと考えられる。また臨床医学への2光子励起法の応用という点では、我々のような分泌腺臓器の機能アッセイのみならず、より広範な領域で始まっている。例えば、2光子励起内視野顕微鏡などが完成した際には、消化器の上皮深部に生じた腫瘍の早期発見が可能となることが期待されており人類の幸福に多大な貢献していくであろう。未だに実用化されていない非線形光学過程は数多く存在することから、本課題のような学際的な研究の重要性はますます増大していくであろう。

謝辞

GFP- β -アクチン発現用ウイルスは東京大学尾藤晴彦先生と京都大学古屋敷智之先生から、C3エクソエンザイムは京都大学成宮周先生から頂戴した。Noc2の実験は、神戸大清野進先生・三木隆司先生との、鼻粘膜上皮腺は京都府医大・耳鼻咽喉科の大嶋章裕先生との、唾液腺は日本大学松戸歯学部杉谷博士先生との共同研究である。また、本研究は、生理学研究所・生体膜研究部門において行われた。生体膜部門の河西春郎教授を始め、さまざまなご助言、ご助力を頂戴いたしました研究スタッフ、生体膜技術課職員、研究補助者の皆様にお礼申し上げます。

3年間の研究成果発表状況

[論文、学術書]

1. “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)
2. “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.* (in press)
3. “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)
4. “Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the β -cell model of mitochondrial diabetes: Characteristics of β H9C9 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)
5. 学術書「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」担当、畠山裕康、高橋倫子、根本知己、河西春郎、文光堂、東京、2004年5月
6. 学術書「ナノテクノロジー大辞典」第8章「2光子顕微鏡」担当、根本知己、工業調査会出版部、東京、2003年12月

7. 総説「2光子励起法による神経機能研究」河西春郎、根本知己、松崎政紀、早川泰之、生物物理、vol. 42, No.2, 91-94 (2002).

[招待を受けた学術的集会における発表]

1. *Gordon Research Conferences, Salivary Glands & Exocrine Secretion*, Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Ohshima and Haruo Kasai. "Dynamic role of actin in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini", Feb 2-7, 2003, Holiday Inn Ventura, CA, USA. (co-chair 及び judge for poster session としても招聘を受け運営に参加した。)
2. 「多光子励起過程を用いた分泌・開口放出現象の可視化解析」根本知己、河西春郎、第66回分析化学討論会、若手シンポジウム「レーザー分光分析の新潮流」、北見工業大学、2005年5月14,15日(予定)、北海道北見市
3. 平成16年度基礎生物学会「生体シグナルの可視化を目指して」、2004年12月2,3日、岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市
4. 平成16年度基礎生物学会「光生物学の課題と光技術の展望」、2004年11月25,26日、基礎生物学会研究所、愛知県岡崎市
5. 「2光子顕微鏡によるCa²⁺依存性開口放出の解析」根本知己、日本生物物理学会第41回年会、2003年9月23-25日、新潟県新潟市
6. 平成14年度生理学会「外分泌腺における開口放出とアクチン動態」根本知己、兒島辰哉、大嶋章裕、河西春郎、2002年10月11日、岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市
7. 「レーザー顕微鏡と光学実験」根本知己、岡崎市教育委員会による講演会、2002年11月17日、愛知県岡崎市

[上記以外の学術的集会における発表]

1. 「モルモット鼻粘膜分泌細胞における分泌現象の可視化」大嶋章裕、根本知己、出島健司、河西春郎、久育男、第54回日本アレルギー学会総会、2004年11月4-6日パシフィコ横浜、横浜市
2. Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Ohshima, Haruo Kasai, "Dynamic Actin Reorganization in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini mediated by Rho", *43rd annual meeting, the American society of cell biology*, Dec. 13-17, 2003, San Francisco, CA, USA
3. 「2光子励起断層イメージングを用いた開口放出におけるRhoによる顆粒膜の高速なアクチン被覆の解析」根本知己、兒島辰哉、大嶋章裕、河西春郎、日本生物物理学会第41回年会、2003年9月23-25日、新潟市。
4. 「膵臓外分泌腺の酵素原顆粒の開口放出におけるFアクチンの動的役割」根本知己、兒島辰哉、大嶋章裕、河西春郎、第80回日本生理学会大会、2003年3月24-26日、福岡市。
5. 「2光子励起画像法によるインスリン分泌過程の解析」高橋倫子、岸本拓哉、根本知己、河西春郎、第76回日本薬理学会大会、2003年3月24-26日、福岡市。
6. 「2光子顕微鏡と閃光活性化法を用いたCa²⁺依存性開口放出のFアクチンによる制御機構の解析」根本知己、兒島辰哉、大嶋章裕、河西春郎、日本生物物理学会第40回年会、11月2-4日、名古屋大学、名古屋市。