

蛍光技術を活用した生理活性物質の放出機構の解明



北里大学 医学部 教授

高橋 倫子

(お問い合わせ先) TEL: 042-778-8803 E-MAIL: ntakahas@med.kitasato-u.ac.jp

研究の背景

神経伝達物質やホルモンは、分泌細胞からシナプス間隙や血液中に放出されることによって、個体の行動を調節し恒常性を保ちます。これらの反応の異常は、精神疾患や糖尿病などの原因にも深く関わります。これまで、このような生理活性物質の放出を司る分子には数多くのもものが同定されてきました。また、各分子の働きについては、生化学的な検討をはじめ、遺伝子改変動物の表現型の解析や、変異体発現細胞の機能解析などを通して、多くの知見が積み重ねられてきました。しかし、実際に生体で起きている生理現象と分子動態との関連を直接捉えるのは困難を極めていました。

研究の成果

神経伝達物質やホルモンの分泌は、刺激後に細胞内の分泌小胞が細胞膜に融合することによって起こります。私たちは、細胞膜と小胞膜の融合反応の中核を担うタンパク質群に注目し、放出機能との関連を解明しました(図1)。このタンパク質分子群は、電気刺激が到来すると、ミリ秒の次元で伝達物質の放出を起こす神経細胞に発現する一方、内分泌細胞のように、ホルモンをよりゆるやかに持続的な分泌を起こす細胞にも発現します。神経細胞と内分泌細胞の両細胞群の放出速度の間には1万倍以上もの違いがあります。

生きた細胞の中で分子間の複合化率を定量できる「蛍光寿命測定法」を、生体深部の観察に適した「2光子励起顕微鏡」と組み合わせた実験系を構築しました。この実験系における分子間結合の解析には「蛍光共鳴エネルギー移動」と呼ばれる現象も活用しています。これらの方法を脳皮質神経細胞と膵臓β細胞に適用して、タンパク質の複合化を比較しました。

脳皮質神経細胞のシナプスの活性帯では、分子同士が「放出準備状態のパターン(trans-SNARE)」であらかじめ複合化して、活動電位の到来を待ちかまえていました(図1)。膜融合に伴い「放出後のパターン(cis-SNARE)」に移行する様子を実時間で可視化するとともに、海馬のスライス標本で検討した結果、より大きなシナプス後部に面するシナプス前終末領域では、特に高率な複合化が見られ、伝達物質が高頻度に放出されることが初めて明らかになりました。それに対し、インスリン

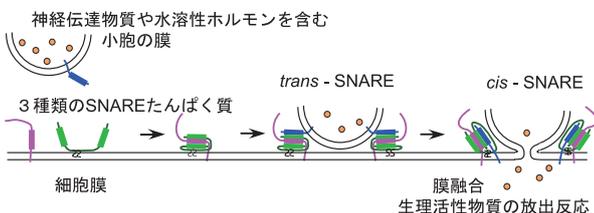


図1 膜融合の基本機構とSNARE分子群

を分泌する膵臓β細胞の細胞膜では、安静時には放出準備状態がほとんど検出されず、グルコースによる分泌刺激を与えると、初めて trans-SNARE が形成され、膜融合が誘導されるまでの時間経過がわかりました(図2)。このように、神経細胞ではすでにタンパク質分子が複合した状態で刺激を待っているのに対し、内分泌細胞では、刺激後に複合化が起きることがリアルタイムで可視化され、分子の複合化は放出の確率や速度に深く関連することが判明しました。

今後の展望

生理活性物質の放出反応には、細胞の種類や機能による著しい多様性があります。今回、私たちはその分子的基盤の一端を解明しました。また、確立した実験手法は生体内の多くの組織に応用できる可能性があります。中でも、新たに開発した神経標本のシナプス結合を光学顕微鏡で同定する方法は、生体内の機能的神経回路の同定に活用されることが期待されます。

関連する論文

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 pre-synaptic terminals and β cells. Nature Commun.6, 8531, 1-15, 2015 doi:10.1038/ncomms9531.

関連する科研費

2014-2016年度 基盤研究(C)「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」

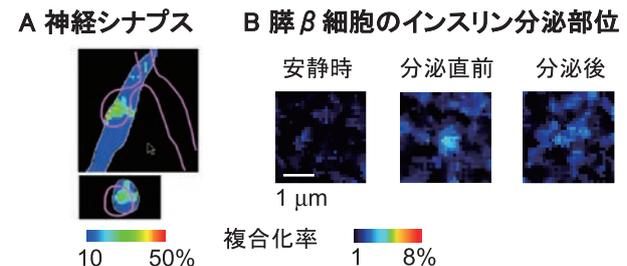


図2 神経シナプスと膵臓β細胞における膜融合準備状態(trans-SNARE形成率)

- A 海馬スライス標本: 赤で示されるシナプス後構造(スパイン)が大きいほど、相対するシナプス前終末で高い形成率と放出確率を検出した。
- B インスリン分泌細胞: 分泌刺激の到来後、放出部位で一過性にSNAREが複合化して膜融合が引き起こされた。