

## [課程—2]

### 審査の結果の要旨

氏名 澤田 和可子

本研究はカルシウム依存性開口放出に関わる **SNARE** 分子の細胞膜での複合化状態を、可視化定量化する蛍光測定法を構築し、シナプス前終末と  $\beta$  細胞を比較したものであり、下記の結果を得ている。

大脳皮質単離培養細胞シナプス前終末と膵島  $\beta$  細胞において、2 光子励起 Förster resonance energy transfer (**FRET**)/蛍光寿命(**FLIM**)画像法を用いて、**SNARE** 複合化率を測定した。**FRET** は、一般に二つの色素分子間距離が 5-10 nm 以下に接近したときに見られる共鳴エネルギー移動現象である。パルス状の励起光を利用する 2 光子励起画像法と、時間相関単一光子計測(**TCSPC**)を併用して、各画素におけるドナーの蛍光寿命を計測した。二つの蛍光色素が **FRET** している時には、蛍光寿命に速い減衰相が現れた。この速い成分の割合から、ドナー分子の何割がアクセプター分子へ複合化しているか、算出した。**FRET** を起こしうる二つの **GFP** 変異体で、二種類の **SNARE** 分子を蛍光標識し、**lipofection** 法やウィルスベクターを用いて細胞に発現させた。そして、**t-SNARE** を **FRET** のドナーとして用い、3 種類の組み合わせ(**SNAP25/VAMP2**、**SNAP25/syntaxin1A**、**syntaxin1A/VAMP2**)でそれぞれの複合化率を計測した。

**FRET** 効率は、アクセプターの発現量に依存した。そこで、導入する **FRET** プローブを生理的な量にするため、内因性 **SNARE** の発現量を免疫染色法を用いて算出し、内因性相当量に対応するプローブの蛍光強度を指標に、プローブの発現量をコントロールした。その結果、シナプス前終末ではいずれの 3 種類の複合化率も 約 30 % であることがわかった。**syntaxin1A** と **VAMP2** の細胞内領域(**N** 末)を標識した場合には、膜融合前に形成される *trans*-**SNARE** 複合体と、膜融合後に形成される *cis*-**SNARE** 複体の双方で、**FRET** シグナルが検出される。一方、両分子の細胞外領域(**C** 末)を標識した場合には、膜融合後のみで **FRET** が起こるので、*cis*-**SNARE** を選択的に検出できる。したがって、**N** 末標識プローブの複合化率から **C** 末標識プローブの複合化率を差し引くことで、*trans*-**SNARE** 複合化率をまず推定した。推定値はブートン全体で 10%に達し、アクティブゾーンではより高い複合化率となった。

N 末標識プローブ(mTurquoise (mTq)-Syntaxin1A/Venus(Ven)-VAMP2) の複合化率は、シナプス前終末で高く(約 30%)、軸索では相対的に低い(約 20%)。さらに、ボツリヌス毒素や破傷風毒素で処理すると、軸索の FRET シグナルは消失することから、軸索における FRET シグナルは主に *cis*-SNARE を反映すると考えられた。そこで、シナプス前終末と軸索の複合化率の差から、*trans*-SNARE 複合化を各シナプス前終末ごとに算出した所、シナプスごとに複合化率は異なったが、平均は約 10%と推定された。

高浸透圧刺激(sucrose 刺激)を与えると、神経伝達が起こることが知られている。そこで、*cis*-SNARE 検出 FRET プローブ(Syntaxin1A-mTq/ VAMP2-Ven)を発現させた、神経単離培養細胞に高濃度 sucrose 刺激を与えて FRET シグナルを経時的に測定した結果、*cis*-SNARE 複合化率の増加(10%)を認めた。これは、*trans*-SNARE 複合体から *cis*-SNARE 複合体への移行確認に相当し、約 10% の *trans*-SNARE 複合体は融合準備完了状態にある ternary complex であることが示唆された。

更に、本実験に用いた SNARE の蛍光標識プローブが活動電位による神経伝達放出機能が補完出来ることをシナプス後電流 EPSC 測定により確認した。まず、mTq-SNAP25 を SNAP25 欠損マウス単離培養神経細胞に、レンチウィルスを用いて遺伝子導入し、すべての細胞内 SNAP25 が標識されている機能アッセイ系を確立した。本実験系では、高頻度刺激による伝達抑制やその回復が、コントロールマウスと同様の時間経過で見られることがわかった。さらに、破傷風毒素を用いて、内因性 VAMP2 を切断し、毒素耐性蛍光標識 Ven-VAMP2 (TeNTR ) によって機能的にレスキューすることにも成功した。従って、SNARE を蛍光標識してもその機能や動態は保存され、約 10%という *trans*-SNARE 複合体の推定値は生理的な値であると考えられた。

同様な手法で、海馬スライスにアデノ随伴ウィルスを用いて遺伝子導入し、スパイン後部構造との関連を検討した結果、スパインが大きい程、シナプス前部における SNARE 蛋白の複合化率が高い相関が見られた。また、一つのシナプス前終末内でも、スパインに接した領域でとくに高い複合化率が示されることが分かった。

一方、同様な手法を放出速度の遅い膵島  $\beta$  細胞に用いると、*trans*-SNARE 複合体は安静時には細胞膜ではほとんど検出されず、開口放出の数秒前に初めて *trans*-SNARE 複合体を作ることがわかった。

以上、本論文は *trans*-SNARE 複合体の定量化法を確立し、初めて定量化に成功したものである。本研究により、開口放出の準備状態を作る SNARE 蛋白の状態はシナプスや膵  $\beta$  細胞で大きく異なり、シナプスでは約 10% の SNARE が *trans*-SNARE 複合体を形成していたが、膵島  $\beta$  細胞細胞膜にはその存在が認められなかった。従って、シナプスの *trans*-SNARE 複合体は、速い開口放出の原因であると考えられ、一方、膵島  $\beta$  細胞で開口放出が遅いのは SNARE が複合化していないからであると考えられた。SNARE 分子はシナプス前終末で最も多い蛋白質であり組織の蛍光測定に向く。従って、今後、この手法は生理的な膜融合準備状態の可視化に広い応用を持つことが考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。