

# Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and beta cells

その他のタイトル	シナプス前終末と膵 細胞におけるSNARE複合体状態の2光子FRET蛍光寿命イメージング
学位授与年月日	2016-03-24
URL	<a href="http://doi.org/10.15083/00073668">http://doi.org/10.15083/00073668</a>

## 論文の内容の要旨

論文題目        Two-photon fluorescence lifetime imaging of  
primed SNARE complexes in presynaptic terminals and beta cells  
(シナプス前終末と膵β細胞における SNARE 複合体状態の  
2光子 FRET 蛍光寿命イメージング)

氏名                澤田 和可子

神経細胞では活動電位に応じてシナプス前終末の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が起き、1 ミリ秒以内に開口放出が起きる。それに対して、インスリンの開口放出は食事によって血中グルコース濃度が上昇すると膵ランゲルハンス島(膵島) β細胞で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、100 秒、1000 秒の時定数で、2 相性に起きる。このように両者の放出速度には 10 万倍以上の違いがあるにも関わらず、膜融合の中核をなす SNARE 分子は、シナプス前終末にも膵島β細胞にも、共通の分子が発現している。細胞膜には SNAP25<sup>注1)</sup>と Syntaxin1A (t-SNAREs)、小胞膜には VAMP2<sup>注2)</sup> (v-SNARE)が発現する。各 SNARE 分子は 1 つあるいは 2 つの  $\alpha$ ヘリックスを有し、その複合化を介して、細胞膜と小胞膜が接近し、膜融合を惹起する。細胞種の違いによる分泌速度の差異は、生理機能の最適化に重要であるが、その多様性のメカニズムは不明であった。ケイジド試薬を用いて細胞内カルシウム濃度上昇を同様に与えても、神経と膵島の放出速度には 1000 倍以上の違いがあることが報告されている。そこで、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β細胞を比較した。

大脳皮質単離培養細胞シナプス前終末と膵島β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 複合体の双方で、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。

本研究は *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る。

注

1)SNAP25 : synaptosomal-associated protein 25

2)VAMP2 : vesicle-associated membrane protein 2

3)SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)attachment  
protein receptors