

論文の内容の要旨

論文題目 **Use of two-photon imaging to elucidate the role of Munc18b in sequential granule fusion and primary exocytosis in rat pancreatic islets**

(ラット膵島の一次および逐次開口放出における Munc18b の役割に関する 2 光子顕微鏡画像による検討)

大野 光代

【要旨】

《背景と目的》

インスリン分泌不全は糖尿病の病因の一つであり重要な機能異常である。分泌現象（開口放出）は膵β細胞のみならず、気管支、膵外分泌腺、唾液腺などの各器官において恒常機能維持に欠かせない生理学的に重要な現象である。soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE 蛋白)のうち、t-SNARE (SNAP25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) と Syntaxins) と v-SNAREs (VAMPs(vesicle associated membrane proteins)) が会合し、4つの SNARE モチーフが熱力学的に安定な構造の SNAREpin を形成することで膜が引き付けられ分泌小胞は開口放出を来すが、Munc18 はこれらと共に中心的役割を担っていることが確認されている。開口放出に関する Munc18 のアイソフォームには、Munc18-a、-b、-c の3つがあり、同族の SNARE 蛋白と作用し、器官特異性を有する。Munc18a は、分泌顆粒のドッキングやプライミング、Syntaxin(Syn)1A の活性化シャペロンとして機能することや、インスリン分泌を促進することが報告されている。Munc18c は、Syn-4 と GLUT-4 輸送に関与する報告がされている。しかしながら Munc18b についてはもっとも研究されておらず研究開始時において膵島での既報を認めなかった。

共同研究者らは Munc18b の膵島での存在とその部位を示し、インスリン分泌培養細胞 (INS-1) や膵島のペリフュージョン実験においてインスリン分泌が Munc18b 過剰では増加し、siRNA で減少する結果を見出した。また Syntaxin (Syn) のアイソフォームである Syn-1、-2、-3 の各抗体による免疫共沈降実験において、ブドウ糖刺激後に SNARE 複合体化が起こること、Syn-1 と異なり Munc18b-siRNA によって Syn-2 や Syn-3 では SNARE 複合体形成が低下すること、Munc18b 過剰発現の系では対照と比し SNARE 蛋白/Munc18b 量が増加した (KR>WT) 事が示された。

Munc18b は膵腺房細胞などの逐次開口放出が盛んな細胞に発現していることから、

私は通常逐次開口放出が 10%未満の低頻度である β 細胞のインスリン分泌機構に Munc18b が担う役割を解明するために、分泌様式の変化に着目して研究を行った。

一般に開口放出の様式には大きく 2 種類の一次開口放出と逐次開口放出があり、逐次開口放出の亜分類に先行する細胞内における複数の分泌顆粒 (SG) が融合する多分泌顆粒開口放出がある。膵島では 1.9~4.5%の逐次開口放出と主体となる一次開口放出が報告されている一方、唾液腺や膵外分泌腺では逐次開口放出が、血小板では多分泌顆粒開口放出が特徴とされている。インスリン分泌の定量化は ELISA などを用いたペリフュージョン実験などが一般的であるが、一次開口放出と逐次開口放出との区別は不可能である。分泌現象の可視化を行う 2 光子顕微鏡や電子顕微鏡、共焦点顕微鏡、全反射照明蛍光顕微鏡の中でも、時間的空間的に形態をとらえられ、組織低侵襲で低光毒性が特徴である 2 光子顕微鏡、特に TEP イメージングを用いることは、逐次開口放出の解析に最適な方法である。水溶性の蛍光色素溶液によって浸水膵島の外観観察が、また開口放出の際の細孔から分泌小胞内に蛍光水溶液が流入することで点状に開口放出像が確認できる。この撮影法は膵島の他、膵外分泌腺や唾液腺、副腎髄質など内外分泌腺での開口放出観察が可能であることが既に報告されている。

《方法》

私が行った実験は、以下の方法である。オスの SD ラットから膵島を分離し、アデノウイルスベクターまたはレンチウイルスを添加し 1~2 日インキュベーション後に 2 光子顕微鏡にて観察を行った。膵島刺激は加温下にて 10 nM glucagon-like peptide-1 (GLP-1) と 150 μ M isobutylmethylxanthine (IBMX)を加えた 20mM ブドウ糖で膵島ごとに刺激し、後 10 分間の開口放出画像から分泌総量と一次開口放出数、逐次開口放出数を解析した。アデノベクターには Munc18b 野生型 (WT) または変異体 (Syn-2 と-3 を含む SNARE 複合体への結合をなくした E59K、SNARE 複合体形成をしやすくする KR) が、レンチウイルスには Munc18b の shRNA が設計されており、その発現確認には同時発現する蛍光蛋白 GFP または CFP を用いた。浸水水溶液は水溶性蛍光色素 Alexa594 を使用し、励起光は 830 nm で各蛍光波長を 525/25BP、490SP+570SP、605/35BP で分離した。開口放出数は 1 細胞当りに換算し、蛍光強度から開口放出小胞のサイズを算出した。全てのデータは means \pm SEM で表記し、統計は 2 群比較に Student-t 検定を 多群比較に 多重比較検定を使用し、 $P < 0.05$ を有意とした。

《結果》

私はラット膵島の TEP イメージングを施行し、対照、WT、KR、E59K いずれの群においても一次開口放出と逐次開口放出を確認した。開口放出は低蛍光強度部位から突然点状の蛍光高強度部分が出現し膜融合・膜平坦化 (full fusion) とともに点状部の蛍光は低下する (WT、画像例提示、蛍光強度変化例提示)。同様に逐次開口放出では、膵島に通常観察される 2 個の顆粒小胞による開口放出像が確認した (KR)。

過剰発現系では、総開口放出数はペリフュージョンの結果と同様に対照が 7.7、WT で 14.1、KR で 26.4、E59K で 5.4 イベント・細胞⁻¹・分⁻¹であり KR > WT > 対照 > E59K

の順に増加した。総開口放出数中の逐次開口放出数の割合は KR11.2%、WT7.1%、対照 3.5%、E59K1.6%であった。10 分間中ほとんどの時間帯で同様の傾向を認めた (WT で開口放出が大体の時間帯で、KR では対照及び WT と比し全時間帯で増加した。E59K ではほぼ全時間帯で対照より開口放出は低下した)。更に逐次開口放出を起こすβ細胞数割合は KR74%、WT55%、対照 31%、E59K13%であり、逐次開口放出を起こす細胞数への影響を認めた。以上から Munc18b 過剰で 10 分の時間内の一次開口放出及び逐次開口放出の両方において分泌増強を認め、更に逐次開口放出を起こす細胞数も増加させたことが分かった。加えて Munc18b の開口放出増強効果は KR でより強く、E59K で有意ではないが低い傾向を示した。更に本研究では初めて逐次開口放出の中に 3 個以上の特に長く連続する開口放出を認めた。この分泌様式は肥満細胞や好酸球に特徴的で、詳しい分子機構は解明されていない。対照群では逐次開口放出は 2 個までが、WT や KR 過剰発現系で 3 個以上の逐次開口放出が確認されたことから、Munc18b の作用には分泌小胞間で融合する頻度の増加を有することを意味する。KR で 7 個の小胞による逐次開口放出の 1 例を提示した。次に SG サイズを検討したところ、対照群や WT、各変異体群の一次開口放出や 2 個までの逐次開口放出に関与した分泌小胞 (SG) の平均直径はほぼ同サイズで一般的なインスリン SG の直径と同様であった。しかしながら WT と KR で認めた逐次開口放出 3 番目以上の SG の推定体積では通常の 1.7 倍と有意に大きかった。また Munc18b は逐次開口放出間の潜時には何ら影響を与えず、また SNARE 複合体は刺激後に集合することが示唆された。

前述の過剰発現系の結果と一致する様に、内在性 Munc18b を shRNA によって枯渇させた場合、総開口放出数は 40%の有意な減少を認め、逐次開口放出率は 83%も有意な減少を認め逐次開口放出はほとんど抑制される結果であった。

《考察》

以上の結果から、Munc18b はインスリン分泌促進作用を有し、その機序には一次開口放出に加え逐次開口放出を増加させることが過剰・抑制の両方の系から示唆された。また逐次開口放出の増強作用は 3 個以上の SG—SG 融合の関与も確認された。以上から一次開口放出は Syn1-SNAP25-VAMP2 /Munc18a または Munc18b が関与しているが、逐次開口放出の 2 個目以上では拡散した SNAP25 と Syn-2 や-3、VAMP-2 や-8 関与しているという仮説を立てた。約半数の開口放出に Munc18b が関与しており、分泌低下した糖尿病患者のβ細胞を Munc18b によって治療できる可能性が示唆された。