

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 大野 光代

本研究は膜融合現象に主要な SNARE 蛋白の複合化促進に関与するとされる重要な蛋白である Munc18 のアイソフォーム Munc18b が、開口放出へどのような影響があるか、膜融合現象の一つであるインスリン開口放出動態への影響を明らかにする目的のため、単離ラット膵島に Munc18b を過剰発現する系と発現抑制する系、さらに過剰発現系において Munc18b 機能増強する変異体 Munc18b-KR を用いる系を作成し、つまり膵β細胞におけるブドウ糖応答性インスリン分泌を二光子顕微鏡画像で可視化し、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. アデノウイルスベクターを用いて、Munc18b (-WT) 過剰発現、Munc18b-KR 過剰発現させた膵島において対照となる蛍光蛋白を発現させた膵島の応答性は、二光子顕微鏡画像において一次開口放出と通常の 2 個の分泌小胞からなる逐次開口放出が確認された。また分泌への作用は、WT で 1.8 倍、KR で 3.4 倍の増強作用が示され、共同研究者らの膵還流実験結果と同様の結果が示された。

2. 総開口放出数中の逐次開口放出数の割合は WT で 7.1%、KR で 11.2%、対照は 3.5% であり、WT で 2 倍、KR で 3.2 倍の逐次開口放出頻度の増加作用が示された。更に開口放出を起こすβ細胞数中の逐次開口放出を起こすβ細胞数の割合は、KR で 74%、WT で 55%、対照では 31%であり、逐次開口放出を起こす細胞数への影響が示された。

3. 二光子顕微鏡によるインスリン開口放出可視化において、初めて逐次開口放出の中に 3 個以上の長く連続する開口放出像が示された。代表例として、KR 過剰発現細胞での 7 個の分泌小胞による逐次開口放出の 1 例を提示した。対照では逐次開口放出は 2 個までが、WT や KR の過剰発現系で 3 個以上の分泌小胞による逐次開口放出が確認された。

4. 開口放出分泌小胞のサイズを検討したところ、対照や WT、KR の一次開口放出や 2 個までの逐次開口放出に関与したものの平均直径は、ほぼ同サイズで一般的なインスリン分泌小胞の直径と同様であった。しかしながら WT と KR の逐次開口放出の 3 番目以上の分泌小胞の推定体積では通常の 1.7 倍と有意に大きい事が示された。項目 3 と 4 から、Munc18b の作用には細胞内で分泌小胞同士の融合する頻度を増加する作用を有する可能性が示された。

5. 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。

6. 内在性 Munc18b を shRNA によって枯渇させた発現抑制系の場合、総開口放出数は 40% の有意な減少を認め、逐次開口放出割合は 83% も有意な減少を認めており、逐次開口放出がほとんど抑制される事が示され、過剰発現系の結果と一致した。

以上、本論文はラット膵島の $\beta$ 細胞において、グルコース応答性インスリン分泌を二光子顕微鏡画像による開口放出可視化の解析から、**Munc18b**がインスリン分泌に促進的に働く作用を有し、逐次開口放出に加え一次開口放出も増加させることを明らかにした。本研究はインスリン分泌においての**Munc18b**の作用について、新たな知見である分泌小胞の開口放出が3個以上に連なる逐次開口放出の可視化と細胞内分泌小胞同士の融合の可能性について明示し、**Munc18b**の分泌現象への関与の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。