

## [最近のトピックス]

## 開口分泌の全反射蛍光顕微鏡観察とSNARE機能解析

田隈 泰信

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野

Taishin TAKUMA

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

全反射蛍光顕微鏡法TIRF-M (Total Internal Reflection Fluorescence-Microscopy) は, evanescent wave microscopyとも呼ばれ, 使い方によっては1分子のイメージングが可能となる高感度な顕微鏡技術である. その原理を図に示す(図1). 光が屈折率の大きい透明物体(この場合はカバーガラス)から屈折率の小さい物質(培養液)に入射するとき, 入射角がある角度以上になると光は全反射する. ところで, この現象は全反射と呼ばれているにもかかわらず, 光は100%反射されるわけではなく, エヴァネッセント波と呼ばれる極めて微弱な光が境界面から反対側に漏れ出す. エヴァネッセント波は, 境界面からの距離に比例して指数関数的に減弱するため, 蛍光物質を励起しうる範囲は境界面から100 nm前後といわれている. このため, 細胞全体にGFP融合タンパク質を発現させた場合でも, 観察可能な蛍光タンパク質はカバーガラスに接した細胞膜近傍に存在するものに限られる. TIRF-Mのこの特性は, 開口分泌の最終ステップである分泌顆粒と細胞膜の融合過程や分泌物の放出を観察するのに極めて都合がよい. 開口分泌をTIRFの動画として撮影すると, 分泌物の蛍光は, 一瞬, 暗黒の夜空に火花が広がるように見える.

私たちは, 最近, 開口分泌をTIRF-M観察することによりSNAREタンパク質の機能を解析する研究をはじめた. この分野では杏林大学の研究グループからインスリンの分泌機構に関する独創的な報告が続いている(1-3). 膵臓のβ細胞からのインスリン分泌は, 迅速で多量の分泌が起こる第1相と, 少量の分泌が持続する第2相の二相性を示すことが知られている. TIRF-M観察の結果, 第1相はあらかじめ細胞膜にドッキング状態で待機している分泌顆粒からの分泌で, 第2相は細胞中心部から新に移動してきた顆粒のドッキング・融合によることが証明された. I型糖尿病では第1相の分泌が障害さ

れるが, 炎症性のサイトカインであるIL-1βは, SNAP-25の合成と細胞膜への発現を抑制することで細胞膜への分泌顆粒のドッキングを減少させることが明らかとなった(1). Syntaxin 1はSNAP-25とSNARE複合体を形成することから, 分泌には必須の役割を果たしていると認識されていた. しかし, Syntaxin1Aをノックアウトしたマウスのβ細胞では, 細胞膜とドッキングした分泌顆粒がほとんど存在しないため, 第1相の分泌は強く障害されたが, 第2相の分泌には全く影響が見られなかった(3). この発見は, SNAREタンパク質の役割が分泌相によって著しく異なることを示しており, 今後の展開が注目される.

蛇足ながら, 我々はHeLa細胞の構成的な分泌にSNAP-23が必ずしも必須ではないという結果を得ている(4).

## 文献

1. Ohara-Imaizumi M, Cardozo AK, Kikuta T, Eizirik DL, Nagamatsu S. The cytokine interleukin-1 beta reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic beta-cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(40) : 41271-41274.
2. Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Kikuta T, Nagai S, Nagamatsu S. Correlation of syntaxin-1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analysed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Diabetologia.* 2004 ; 47(12) : 2200-2207.
3. Ohara-Imaizumi M, Fujiwara T, Nakamichi Y, Okamura T, Akimoto Y, Kawai J, Matsushima S, Kawakami H, Watanabe T, Akagawa K, Nagamatsu S. Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis. *J Cell Biol.* 2007 ; 177(4) : 695-

705.

4. Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Tajima Y, Takuma T. SNAP-23 is not essential for constitutive exocytosis in HeLa cells. FEBS Lett. 2007 ; 581(24) : 4583–4588.

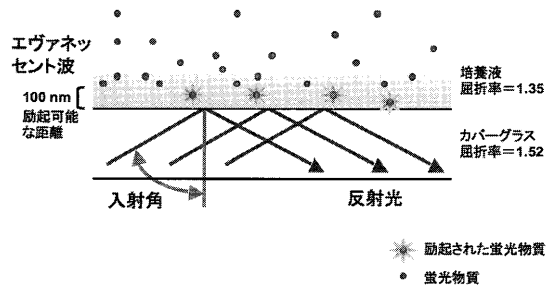


図1. 全反射蛍光顕微鏡の原理. カバーガラス側から培養液に向かって鈍な角度で入射する光が全反射するとき, エヴァネッセント波と呼ばれる微弱な光が培養液側に漏れ出す. 蛍光物質を励起し得る強度のエヴァネッセント波は, カバーガラスの表面から100 nm前後しか届かない. そのため, カバーガラス近傍に存在する蛍光物質だけを, 極めて暗い背景光の中で観察することが可能となる.