

機関番号：63905

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077010

研究課題名（和文） セルセンサーの分子連関とモーダルシフト

研究課題名（英文） Cell sensor and its model shift

研究代表者

鍋倉 淳一 (NABEKURA JUNICHI)

生理学研究所・発達生理学研究室・教授

研究者番号：50237583

研究成果の概要（和文）：

班員の研究を能率よく推進するためのサポートとして、インセルアナライザーおよびセルソーターの高額機器の購入・保守契約の締結および班員独自による維持管理を行なった。また、細胞感覚関連分子の遺伝子操作動物作製支援、および多光子励起法を用いた細胞感覚関連分子および機能のイメージングによる解析の研究支援活動を行った。班員への支援班活動の周知のための広報活動、使用のトレーニングコースを行った。また、夏および冬の当領域班会議に合わせて2回の支援班会議を行い、今後のサポート体制の効率化について議論を行なった。

研究成果の概要（英文）：

To promote each research and collaboration in the Cell-Sensor team efficiently, supporting team bought the expensive and advanced apparatus, and maintained the appropriate condition. In addition, visualization of sensor molecules and analysis of sensor function have been carried-out with a high resonant multiphoton microscopy. Also, we supported the production of gene-manipulated mice. To announce the supporting activity, the technical training course has been provided, to which more than 30 members attended. We also frequently sent the new information to all members with the news letters, which printed every 3-4 month.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	52,400,000	0	52,400,000
2007年度	36,000,000	0	36,000,000
2008年度	3,200,000	0	3,200,000
2009年度	16,600,000	0	16,600,000
2010年度	5,900,000	0	5,900,000
総計	114,100,000	0	114,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：支援活動、セルセンサー、セルソーター、2光子励起顕微鏡、遺伝子改変動物、

1. 研究開始当初の背景  
 特定領域セルセンサーの研究において、セ

ンサーの分子探察と機能評価は、領域内研究の中心的戦略であるが、細胞分離および

センサー発現細胞分離のための機器が高額であるため、個々の研究では購入が困難であるとともに、各課題で共有する技術である。また、その、維持・管理および使用には高度技術を要する。そのため、支援班で一括管理・運用が最も効率的な運用である。

### 3. 研究の方法

初年度（平成18年度）にセルソーター（FACS Aria）、第2年度（平成19年度）に大量細胞機能評価装置（In Cell Analyzer）を購入し、生理学研究所で一括管理し、機器の維持および班員の使用支援を開始した。

また、センサー分子およびその動態の可視化と機能評価のために、生理学研究所に設置されている2光子励起顕微鏡を用いて班員の活動を支援した。

また、生理学研究所の遺伝子改変動物作成支援センターにおいて、センサー分子などの遺伝子改変動物の作成を支援した。

### 4. 研究成果

班員の研究を能率よく推進するためのサポートとして、支援班で購入したインセルアナライザーおよびセルソーター2台の高額機器の保守契約の締結および班員独自による維持管理を行なった。セルソーターを用いて、温度感受性センサーや各種 TRP 受容体の解析のための細胞分離など6課題の研究支援を行った。また、インセルアナライザーを用いて、アポトーシス刺激による細胞容積変化、容積感受性センサーやバゾプレッシン分泌細胞の機能解析など5課題の研究支援用いて、行った。特筆する結果として、バゾプレッシン細胞が細胞外浸透圧を感知する際に、自ら放出するバゾプレッシンによる自己防御のための細胞容積調節機構の解明（Science Signaling, 2011）

などが挙げられる。

また、多光子励起顕微鏡を用いて、細胞内 Ca<sup>2+</sup>センサーの一つである K-Ca 共役担体の細胞膜上における動態の検討、センサーの機能評価として、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定、バゾプレッシン細胞の分布評価、骨細胞の生体イメージングなど、6課題の研究支援を行った。末梢センサーの活動による脳内の活動およびその領域を観察できる内因性シグナル観測システムの高度化を行なった。また、生体および組織内でのセンサー分子の機能の検討を行うため、光感受性化合物の光による活性制御システムの高度化を行った。その結果、生体および組織内におけるサブミクロンの領域における光感受性物質の活性制御を行うことが可能となった。

遺伝子改変動物作成支援として、各種センサー分子の可視化マウスを中心に14種類のトランジェニックマウスの作成を行った。（CAG-Kusabira Orange floxed-ChR2-GFP, Tre-eNpHR, MHC-ChR2 Orexin-ChR2, Orexin-eNpHR, mTNFα-Ds Red, rMCP1-Ds Red, mAdiponectin-Ds Red, hGLUT4-Ds Red など）。現在、すべて解析中である

また、班員への支援班活動の周知のため、生理学研究所での支援活動へのサイトビジット（30名参加）や技術の集中的トレーニングを行った。また、総括班が発行する定期的なニュースレターにより、支援活動の周知を行った。また、夏および冬の当領域班会議に合わせて2回の支援班会議を行い、今後のサポート体制の効率化について議論を行なった。支援班活動はいずれも研究早期段階で重要なスクリーニングやパイロットスタディ、マウス作成である。そのため、支援班が提供した活動をもとに行なった各班員の成果は、多くが論文作成中または、投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kim SK, Nabekura J. Rapid, phase-specific and size-dependent remodeling of synapses in the adult somatosensory cortex during development of neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, 31:5477-5482, 2011. 査読有
2. Eto K, Wake H, Watanabe M, Ishibashi H, Noda M, Yanagawa Y, Nabekura J. Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. *Journal of Neuroscience*, 31: 7631-7636, 2011. 査読有
3. Sato K, Numata T, Saito T, Ueta Y, Okada Y. V2 receptor-mediated autocrine role of somatodendritic release of AVP in rat vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions. *Science Signaling* 4 (157), ra5, 2011. 査読有
4. Marumo T, Eto K, Wake H, Omura T, Nabekura J. The inhibitor of 20-HETE synthesis, TS-011, improves cerebral microcirculatory autoregulation impaired by middle cerebral artery occlusion in mice. *British Journal of Pharmacology* 161:1391-402, 2010. 査読有
5. Subramanyam M, Takahashi N, Hasegawa Y, Mohri T, Okada Y. Inhibition of a protein kinase Akt1 by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1) is involved in apoptotic inhibition of regulatory volume increase. *Journal of Biological Chemistry* 285:6109-6117, 2010. 査読有
6. Liu H-T, Akita T, Shimizu T, Sabirov RZ, Okada Y. Bradykinin-induced astrocyte-neuron signaling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *Journal of Physiology (London)* 587:2197-2209, 2009. 査読有
7. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience* 29:3974-3980, 2009. 査読有
8. Watanabe M, Wake H, Moorhouse A, Nabekura J. Clustering of neuronal  $K^+Cl^-$  cotransporter in the lipid rafts by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 284:27980-27988, 2009. 査読有
9. Numata T, Okada Y. Molecular determinants of sensitivity and conductivity of human TRPM7 to  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ . *Channels* 2:283-286, 2008. 査読有
10. Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J. Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. *Journal of Neuroscience*, 27:1642-1650, 2007. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Nabekura J., Wake H, Eto K, Kim S & Inada H. Microglia directly monitor the functional state of synapses and determine the fate of damaged axon terminals: in vivo observation. 7th Forum of European Neuroscience, July 6th, 2010, Amsterdam (invited speaker).
2. Okada Y., Shimizu T, Lee EL, Inoue H, Uramoto H, Sato K, Numata T. Roles of anion channels and disordered cell volume regulation in apoptotic and necrotic cell death: International Joint Symposium: Physiology of Anion Transport and Cell Volume Regulation (PAT-CVR 2009), invited speaker, August, 2009, Okazaki, Japan
3. Okada Y. Roles of volume-sensitive anion channels in cell death induction and glia-to-neuron signaling: XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), invited speaker, July, 2009, Kyoto, Japan

[その他]

ホームページ

<http://www.nips.ac.jp/cellsensor/shien.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鍋倉 淳一 (NABEKURA JUNICHI)

生理学研究所・発達生理学研究室・教授

研究者番号: 50237583

(2)研究分担者

富田 江一 (TOMITA KOICHI )  
生理学研究所・行動代謝分子解析センター・  
助教  
研究者番号：80314285

富永 真琴 (TOMINAGA MAKOTO) 平成 18 年  
度  
岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授  
研究者番号：90260041

岡田 泰伸 (OKADA YASUNOBU) 平成 18 年度  
生理学研究所 所長  
研究者番号：10025661

槇島 誠 (MAKISHIMA MAKOTO) 平成 18 年度  
日本大学医学部・教授  
研究者番号：70346146

小泉 修一 (KOIZUMI SHUICHI) 平成 18 年  
度  
山梨大学医学部・教授  
研究者番号：10280752

(3)連携研究者

富永 真琴 (TOMINAGA MAKOTO)  
平成 19—22 年度  
岡崎統合バイオサイエンスセンター・教  
授  
研究者番号：90260041

岡田 泰伸 (OKADA YASUNOBU)  
平成 19—22 年度  
生理学研究所 所長  
研究者番号：10025661

槇島 誠 (MAKISHIMA MAKOTO)  
平成 19—22 年度  
日本大学医学部・教授  
研究者番号：70346146

小泉 修一 (KOIZUMI SHUICHI)  
平成 19—22 年度  
山梨大学医学部・教授  
研究者番号：10280752