

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04029

研究課題名(和文) 中枢カテコラミンの蛍光イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of fluorescence imaging technology for central catecholamines

研究代表者

廣瀬 謙造 (Hirose, Kenzo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：00292730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳機能を制御する重要な神経伝達物質である脳内カテコラミンの時空間動態を明らかにするため、カテコラミンを可視化する蛍光プローブの開発を行った。蛍光プローブのリガンド分子認識のため、抗カテコラミン抗体を取得して一本鎖化して利用することとした。カテコラミン誘導体の分子設計・有機合成を行い、免疫用コンジュゲートの作製に供与した。これをマウスに免疫した後多数のハイブリドーマを取得し、スクリーニングを行うことによりカテコラミンに結合する抗体を見出した。しかしながら、生理的なカテコラミン群に対する結合選択性の課題も明らかとなった。本研究で得た知見は、今後の有望な蛍光プローブの開発に役立つと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内カテコラミンを可視化する蛍光プローブの開発により、いつどこでカテコラミンが上昇するのかを生きた動物の脳において可視化が実現されるようになる。カテコラミンの関与する神経機能の解析にとって今後非常に重要なツールとして役立つと考えられる。特に、カテコラミンの関与する神経機能を時空間的コンテキストで理解を提供できる点で疾病の理解、創薬を目指す上でも大きな意義を持つ。本研究で得た知見は、今後の有望な蛍光プローブの開発に役立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：The research aimed at developing fluorescence probes for visualization of the spatiotemporal dynamics of catecholamines in the brain, which are important neurotransmitters that control brain functions. In order to develop catecholamine-binding domain for fluorescence probes, we decided to obtain anti-catecholamine antibodies and convert them to single-chain fragments. We performed molecular design and organic synthesis of catecholamine derivatives and provided them for the production of immunoconjugates. A large number of hybridomas were obtained after treatment of mice with the conjugates, and antibodies binding to catecholamines were found through subsequent screening. However, a problem with their binding selectivity to physiological catecholamines has also been revealed. The findings obtained in this research are expected to be useful for future development of promising fluorescent probes.

研究分野：薬理学

キーワード：カテコラミン シナプス 蛍光イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の中では多様な物質が神経伝達物質として働き、脳機能の統合を行っている。最も主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸は、シナプスにおける素早い応答は神経細胞間の速い伝達に役立っており、脳における演算の中心を担っている。一方、ニューロモジュレータとして機能するカテコラミンは、このような速い神経伝達と比較して長いタイムスケールで調節を担っている神経伝達物質である。カテコラミンは注意等の制御に関わっており、その異常が注意欠損多動性障害等の行動異常の原因の1つと考えられている。また、うつ病や統合失調症にも深く関連しており、カテコラミンの受容体、輸送体や代謝酵素は薬物標的としても重要である。脳内で主要な役割を果たすカテコラミンはドパミンとノルアドレナリンという2つの神経伝達物質である(図1)。両物質の分子構造は類似しており、生合成過程から見ても関連が深い。すなわち、チロシン水酸化酵素を発現している一群の神経細胞においては、チロシンを原料として水酸基が付加されドーパとなったのちドパミンが生成される。ノルアドレナリンはドパミンを前駆体として水酸基が付加され生成される。ドパミンは運動機能、報酬、認知機能に重要であり、ノルアドレナリンは感覚入力の情報処理を修飾し、情報の先鋭化に寄与する。カテコラミンは適切なタイミングで適切な場所で放出が制御されることで神経回路のダイナミクスを調節し、結果的に脳情報をコーディネートしていると考えられている。これまでに脳内カテコラミンの生理的役割や病態への関わりを理解するために、微小透析法やボルタンメトリー、免疫組織化学染色等の測定法が開発されてきたが、リアルタイムに空間的な解像度を十分に持つカテコラミンの測定法は存在しない。そのため、時空間的コンテキストでのカテコラミンの役割、すなわち、どのようなタイミングで、あるいは、どの部位でどのような範囲でカテコラミン放出が起こるのかはほとんど分かっていない。

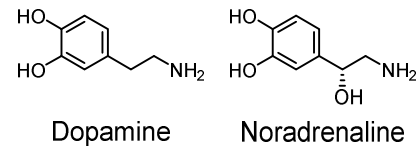


図1. カテコラミン

2. 研究の目的

脳内カテコラミンであるドパミンやノルアドレナリンは脳機能を制御する重要な神経伝達物質であり、適切なタイミングで適切な場所で放出が制御されることで脳情報をコーディネートしていると考えられている。しかし、カテコラミンの放出を十分な時間・空間分解能で解析する技術は不十分であり、カテコラミンによる調節の実態には不明な点が多い。本研究では、中枢神経におけるカテコラミンを蛍光イメージングするための蛍光プローブを開発し、カテコラミンによる調節の時空間的挙動を可視化することを目的とした。

3. 研究の方法

カテコラミン蛍光プローブの開発と蛍光イメージングへの応用が主たる研究の流れである。蛍光プローブの開発については、カテコラミンの誘導体合成、カテコラミンをハプテンとするモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得と抗体可変領域のクローニングによる標的カテコラミンに対する単鎖抗体(single-chain variable fragment; scFv)の取得、scFvを蛍光色素で特異的部位へ標識するエンジニアリングを施した上で、蛍光化合物と導入位置の最適化をハイスループットシステムによって決定し、カテコラミンを高感度で検出する蛍光強度変化の大きいプローブを得る。蛍光イメージングへの応用については、培養神経細胞、スライス標本で最適な蛍光プローブを選び、*in vivo* 脳でのアプリケーションを行う。

4. 研究成果

・カテコラミンの誘導体合成および免疫用コンジュゲートの取得

本研究では、カテコラミンの動態を高い時空間分解能で高精細に明らかにするため、ハイブリット型蛍光プローブの開発を目指した。ハイブリット型蛍光プローブは、リガンド結合タンパク質に有機蛍光色素を位置特異的に標識した複合体であり、リガンドの結合により蛍光特性が変化する。カテコラミンの蛍光プローブの開発において、カテコラミン結合タンパク質として抗カテコラミン抗体に由来するscFvとする設計として抗体の取得を行った。Changnaudらは、ウシ血清アルブミン(BSA)にグルタルアルデヒドとドパミンを混合して調製したBSA-G-DAを用いてマウスに免疫して抗ドパミン抗体を取得した(*J. Neurochem.* 49, 487, 1987)。同様に調製したBSA-G-DAを用いてマウスに免疫したが、遊離型のドパミンに結合する抗体の取得に至らなかった。本抗原調製法は、キャリアタンパク質と多価アルデヒドとドパミンを単に混合して調製するため簡便ではあるが、タンパク質同士の架橋によって抗原が不安定にならないように当量調整を経験的に行う必要があり、ドパミンの標識分子数を調整した抗原の作製は困難である。そのため、抗ドパミン抗体の取得のため、免疫用の抗原調製にドパミンの標識分子数の調整が比較的容易な二段階標識法を利用した。すなわち、キャリアタンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)にマレイミドを標識した後、マレイミドを介してチオールを有するドパミン誘導体を加えてKLH-DAコンジュゲートを調製することとした。

生理的条件下で電荷を持つドパミンのアミノ基の構造を保持した上で、適当な長さのペグ鎖を介して免疫用のキャリアタンパク質に標識できるようにDA-SHの分子設計を行った(図2a)。DA-SHは、1,1,1-トリフェニル-5,8,11-トリオキサ-2-チアトリデカン-13-オールを出発物質

とした5段階の反応により合成した(図2b)。すなわち、1,1,1-トリフェニル-5,8,11-トリオキサ-2-チアトリデカン-13-オールと2-プロモエタン酸メチルを原料とした求核置換反応からエステルを取得し、それを加水分解することにより化合物1を得た。また、化合物1と*O*-(*N*-スクシニミジル)-*N,N,N,N*-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート (TSTU)を反応させて取得した活性エステルを持つ化合物2に、ドパミンを反応させて化合物3を得た。化合物3をボランで還元することにより化合物4を取得し、さらにトリチル基を脱保護することによりDA-SHを取得した。続いて、免疫用コンジュゲートの調製を行った(図3)。まず、KLHと1,000当量のsulfo-SMCCと反応させ、1分子あたり約240分子のマレイミドが標識されたKLH-マレイミドコンジュゲートを取得した。さらに、DA-SHと反応させることにより1分子あたり約160分子のドパミン構造を有するKLH-DAコンジュゲートを取得し、マウスの免疫に供与した。

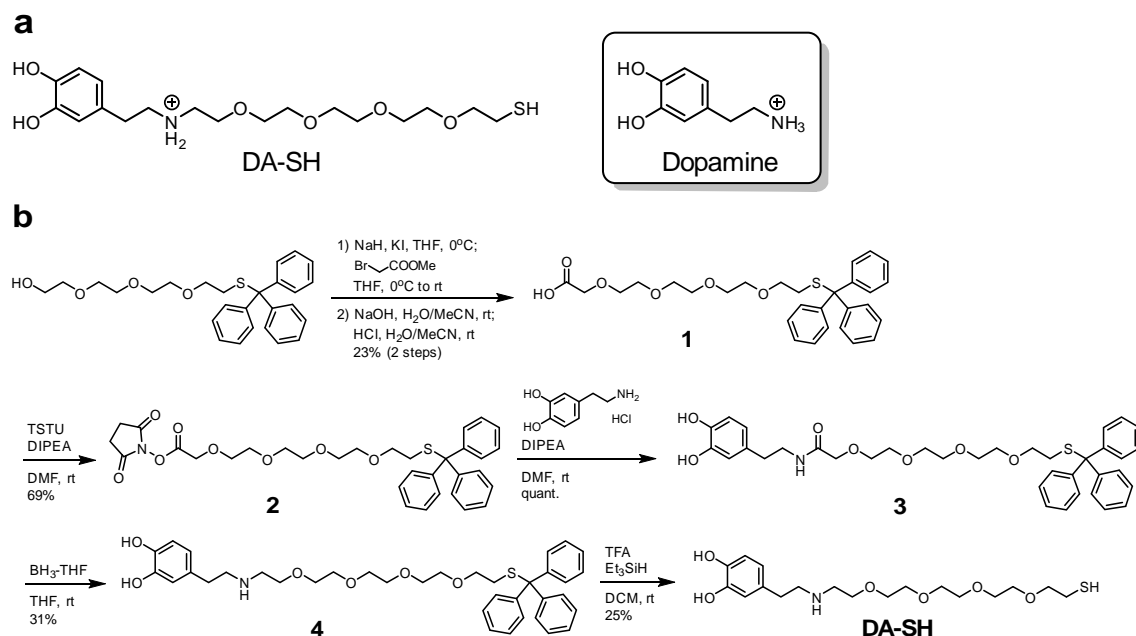


図2. DA-SHの分子設計(a)および合成スキーム(b)

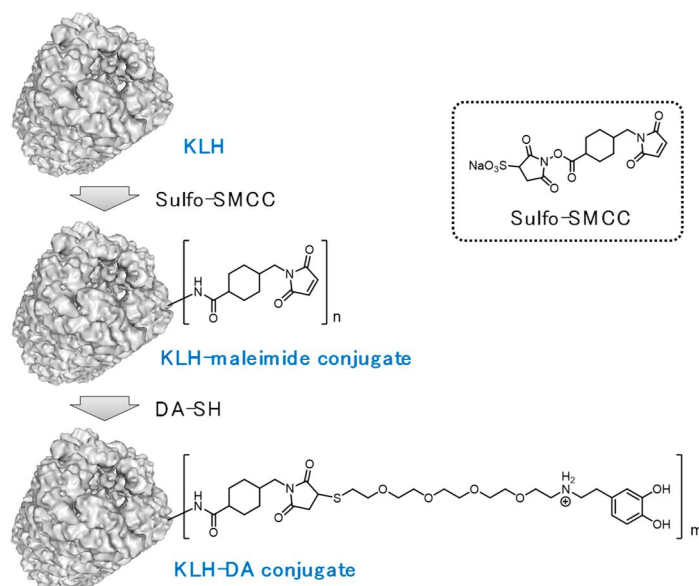


図3. 抗ドパミン抗体の取得のための免疫用コンジュゲートの調製スキーム

・スクリーニングによる抗ドパミン抗体の取得

KLH-DAコンジュゲートを用いてマウスに免疫を行い、抗ドパミン抗体を産生する細胞の取得を行った。すなわち、KLH-DAコンジュゲートと Freundの完全アジュバンドにより調製したエマルジョンをマウスに投与し、17日後にリンパ節細胞を取得してハイブリドーマの作製を行った。ハイブリドーマの培養上清を用いて酵素結合免疫吸着法(ELISA)による産生抗体の1次スクリーニングを行い、評価した765ウェルのうち95ウェルが陽性となった。このとき、

ELISA では KLH-DA コンジュゲートと同様のプロトコルで調製した BSA-DA コンジュゲートを用いており、擬陽性となる KLH に結合する抗体を除外して、ドパミンに結合する抗体の選別を行った。続いて、2 次スクリーニングとして 1-100 μM のドパミンを競合物として加えて ELISA を行ったところ、1 次スクリーニングで陽性となった 95 ウェルのうち 2 ウェルにおいてドパミンの濃度依存的に BSA-DA コンジュゲートに対する抗体結合の阻害が見られ、抗ドパミン抗体が含まれることが明らかとなった。これらの 2 ウェルに対応する細胞培養ウェルにおいて、複数のハイブリドーマクローンが含まれている可能性があったため、限界希釈法を用いてモノクローンの選別を行い、ハイブリドーマ 6E7_E4 と 8G5_D4 を取得した。次に、これらのハイブリドーマが産生する抗体の結合の選択性について明らかにするため、1-1,000 μM のドパミン、アドレナリン、ノルアドレナリン、または、カテコールの存在下で BSA-DA コンジュゲートに対する抗体の結合を評価する ELISA を行った。いずれのハイブリドーマに由来する抗体も、アドレナリンによる抗体の結合阻害がドパミンより強く見られ、また、カテコールによる結合阻害は見られず、ノルアドレナリンによる結合阻害は 6E7_E4 ではドパミンより弱く、8G5_D4 ではドパミンと同程度であった(図 4)。アドレナリンは *N*-メチル化されたノルアドレナリンの誘導体であり 2 級アミンを有するが、他のカテコラミンは 1 級アミンを有する(図 1)。KLH-DA コンジュゲートの作製に用いたドパミン誘導体 DA-SH が 2 級アミンであることを鑑みると、DA-SH の分子構造によりこの抗体結合の選択性をもたらされたことが示唆される。この結果から、カテコールを酸化して得た o -キノンにスペーサーを導入する Mitchell らの合成法 (*Bioconjug. Chem.* 18, 268, 2007) 等を基にドパミンに内在する 1 級アミンを保持した誘導体を合成して抗原作製を行うことにより、ドパミン選択性の高い抗体の取得が可能になると期待できる。

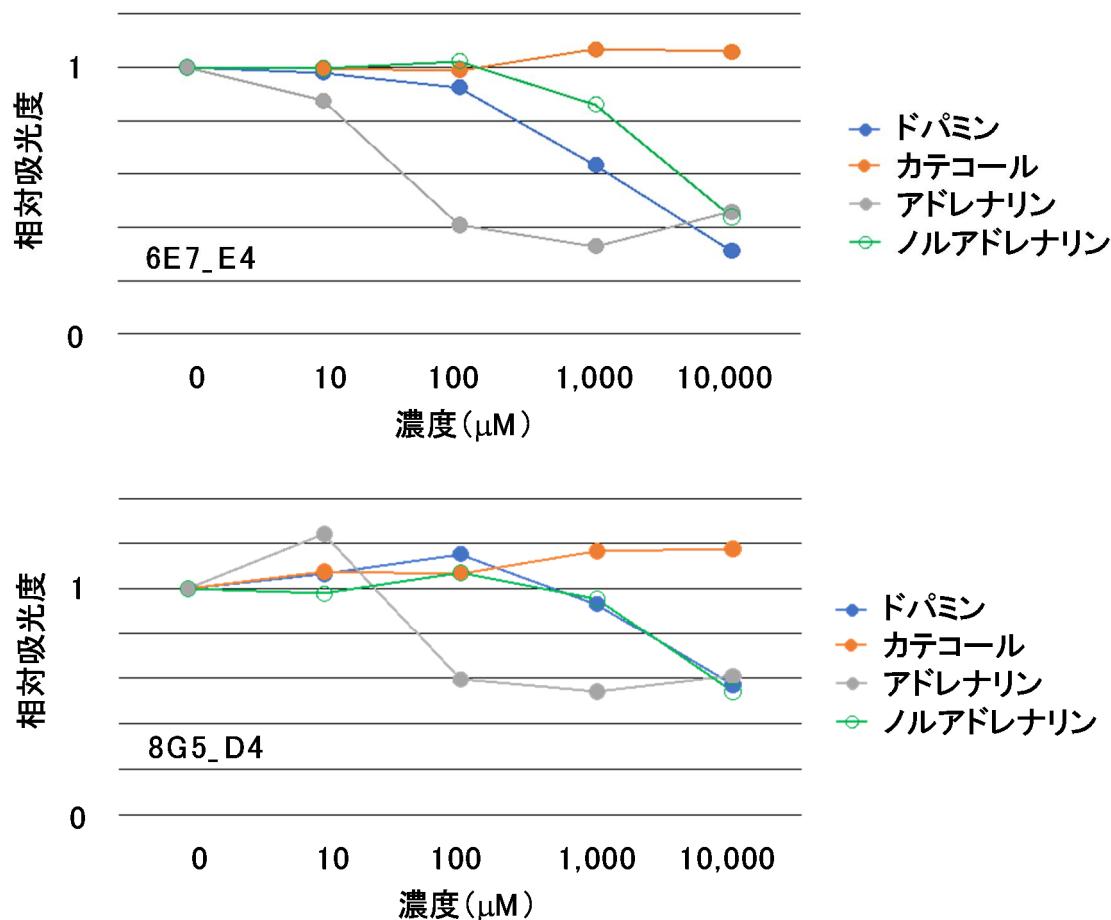


図 4. 取得したハイブリドーマクローンから産生された抗体の結合性の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onishi Taichi, Sakamoto Hirokazu, Namiki Shigeyuki, Hirose Kenzo	4. 巻 8
2. 論文標題 The Altered Supramolecular Structure of Dopamine D2 Receptors in Disc1-deficient Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20090-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Hirokazu, Ariyoshi Tetsuroh, Kimpara Naoya, Sugao Kohtaroh, Taiko Isamu, Takikawa Kenji, Asanuma Daisuke, Namiki Shigeyuki, Hirose Kenzo	4. 巻 21
2. 論文標題 Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 41-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-017-0041-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kenzo Hirose
2. 発表標題 Quantal glutamate release organized by supramolecular assembly at presynaptic terminals
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大島知子、坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造、立花政夫、鷹合秀輝
2. 発表標題 Optical measurement of glutamate release from multiple ribbon-type synapses at the terminal of goldfish retinal bipolar cell
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保洋平、飯野正光、廣瀬謙造
2. 発表標題 Visualization of Ca ²⁺ release and filling mechanisms in the endoplasmic reticulum of astrocytes
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林新九郎、大久大久保洋平、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造保洋平、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 Establishment of a new method for long-term single-molecule fluorescence imaging and its application to synaptic molecules
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯野有希、浅沼大祐、大久保洋平、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 Development of a novel chemical tag tool for calcium imaging by near-infrared fluorescence
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenzo Hirose
2. 発表標題 Molecular organization underlying presynaptic function
3. 学会等名 Core-to-Core Program "Understanding Synapses-from molecules to function" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenzo Hirose
2. 発表標題 Synaptic release sites studied by glutamate imaging techniques and superresolution microscopy
3. 学会等名 Ribbon Synapses Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北島奈美、瀧川健司、関谷敬、並木繁行、飯野正光、廣瀬謙造
2. 発表標題 大脳皮質における細胞外ATP動態のin vivo蛍光イメージング
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Okamoto, Daisuke Asanuma, Shigeyuki Namiki, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development of a tag-probe based cell labeling technique in vivo fluorescence imaging
3. 学会等名 WCP2018 (日本、京都) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeyuki Namiki, Daisuke Asanuma, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development live cell superresolution microscopy based on a novel fluorescence switching technology
3. 学会等名 WCP2018 (日本、京都) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保 洋平、金丸 和典、廣瀬 謙造、飯野 正光
2. 発表標題 アストロサイトにおけるIP3受容体2型非依存性Ca ²⁺ 放出
3. 学会等名 生理研研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」(日本、愛知)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保 洋平、金丸 和典、鈴木 純二、小林 憲太、廣瀬 謙造、飯野 正光
2. 発表標題 アストロサイトにおけるIP3受容体2型非依存性Ca ²⁺ 放出
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会(日本、大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sin Ying Yip, Shigeyuki Namiki, Daisuke Asanuma, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development of turn-on fluorescent tag system for live-cell imaging
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会(日本、大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島 佑介、浅沼 大祐、岡本 紘幸、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 近赤外蛍光in vivoイメージングのためのケミカルタグツールの開発
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会(日本、大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島 佑介、浅沼 大祐、岡本 紘幸、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 近赤外蛍光 in vivoイメージングのためのケミカルタグツールの開発
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (日本、兵庫)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島 佑介、浅沼 大祐、岡本 紘幸、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 近赤外蛍光 in vivoイメージングのためのケミカルタグツールの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (日本、千葉)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻細胞分子薬理学分野 http://www.pharmacol.m.u-tokyo.ac.jp/</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考