

令和元年5月28日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13268

研究課題名(和文)新規Mg<sup>2+</sup>イメージング法の開発とそれを用いたグリア細胞内Mg<sup>2+</sup>動態の解析研究課題名(英文) Development of novel Mg<sup>2+</sup> imaging technique and measurement of Mg<sup>2+</sup> concentration changes in cultured glial cells.

研究代表者

新藤 豊 (Shindo, Yutaka)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・特任助教

研究者番号：30449029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が以前開発したMg<sup>2+</sup>イオン選択的蛍光プローブであるKMG-104-AsHを蛍光タンパク質と組み合わせることで、細胞内の任意の部位でのMg<sup>2+</sup>濃度変化を、定量性が高いとされるレシオイメージングにより測定可能な新技術を開発した。また、この技術および、これまでに開発したMg<sup>2+</sup>選択的プローブを用いた測定から、ラット胎児より分散培養したグリア細胞の一種であるアストロサイトにおいて、神経伝達物質であるGABAやセロトニンが細胞内Mg<sup>2+</sup>濃度変化を引き起こすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mg<sup>2+</sup>は細胞内代謝やエネルギー産生を制御することが近年示され、その細胞内外での濃度変化に注目が集まりつつあるイオンである。特に脳神経系では、主要な神経伝達物質であるグルタミン酸によるシナプス伝達がシナプス間隙のMg<sup>2+</sup>濃度の影響を受けることが知られている。本研究で開発した手法は、細胞内外の任意の箇所でのMg<sup>2+</sup>濃度変化を測定でき、このイオンの挙動を詳細に調べることに大変役に立つ。また、神経細胞を取り巻くアストロサイトはその活動自体や細胞外イオン濃度の調節により神経伝達に影響を与える細胞であり、本研究で見出された、内部のMg<sup>2+</sup>濃度変化は脳神経系の情報伝達に何らかの影響を及ぼすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed novel technique to measure intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration changes based on fluorescent resonance energy transfer (FRET) between a fluorescent protein and KMG-104-AsH, which is a Mg<sup>2+</sup>-selective fluorescent probe we developed before. This technique enables us to quantitatively visualize changes in Mg<sup>2+</sup> concentration in intracellular specific areas on demand. By using it and other KMG probes, I checked whether neurotransmitters affect Mg<sup>2+</sup> concentration in astrocyte, which is a kind of glial cells. I demonstrated that GABA and serotonin induce changes in Mg<sup>2+</sup> concentration in cultured rat astrocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：蛍光イメージング マグネシウム アストロサイト グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マグネシウムイオン( $Mg^{2+}$ )は生体内にカルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )に次いで多く存在する2価陽イオンであるが、細胞内シグナルとしての重要性が広く知られている  $Ca^{2+}$  に対して、 $Mg^{2+}$  の生体内での動態や役割は注目されてこなかった。しかし近年、その重要性を示す論文がいくつも発表され、生体内での  $Mg^{2+}$  動態への注目が集まりつつある。例えば T 細胞では細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化が細胞内シグナルとして働いていることが明らかにされた(Nature, 2011)。これは細胞内シグナル伝達を理解するうえで  $Mg^{2+}$  にも注目せざるを得ないことを示唆している。また、 $Mg^{2+}$  が細胞内代謝の調節因子として働き、細胞内外での  $Mg^{2+}$  イオンのやり取りが概日リズムを制御することや(Nature, 2016)、マウスの脳脊髄液中の  $Mg^{2+}$  を含むイオン濃度の変化が睡眠と覚醒を切り替えていることが報告された(Nature, 2016)。これらは、脳神経系の細胞内外のイオン濃度が神経活動を制御する一つの因子であることを示している。

我々のグループは早くから細胞内の  $Mg^{2+}$  動態に注目し研究を進めてきた。細胞内  $Mg^{2+}$  を観察するうえで一番問題となるのは、市販の蛍光プローブのイオン選択性の低さである(図1)。これらのプローブは細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルも検出してしまう可能性があるため、細胞内の  $Mg^{2+}$  動態を正確にとらえることは困難であった。そこで我々のグループではこれまでに  $Mg^{2+}$  選択性の高い蛍光プローブ、KMG シリーズを開発してきた。これらのプローブは細胞内で起こり得る濃度範囲では  $Ca^{2+}$  イオンに全く応答せず  $Mg^{2+}$  イオンのみを捉えることができる。近年は遺伝子コード型の  $Mg^{2+}$  センサータンパク質で比較的イオン選択性が良いものも報告されているが(図1中のMagFRET, MagIC)、pH に対する安定性などを考えると、KMG シリーズが現在最も正確に細胞内  $Mg^{2+}$  動態を捉えることができるプローブだと考えられる。中でも KMG-104-AsH は TC タグというペプチドタグに結合して機能するケミカルプローブであり、細胞に発現させた TC タグ付タンパク質に局在し、その周囲の  $Mg^{2+}$  濃度変化を捉えることができる、新しいタイプのプローブである(J Am Chem Soc, 2014)。これらの新たなプローブを用いることで、細胞内の  $Mg^{2+}$  動態を詳細に調べることができると期待される。

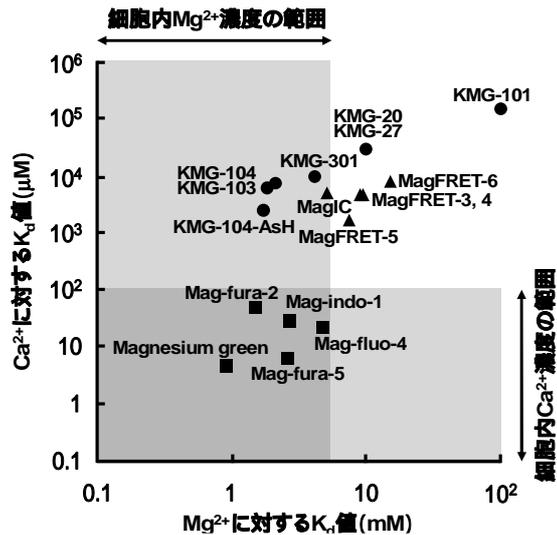


図1 蛍光  $Mg^{2+}$  プローブの  $Mg^{2+}$  選択性比較

### 2. 研究の目的

本研究は、以下の2項目を達成することを目的として実施した。

- (1)我々が以前に開発した  $Mg^{2+}$  選択的蛍光プローブ KMG-104-AsH を応用して、定量性の高いレシオメトリックな  $Mg^{2+}$  イメージングを、細胞内外の局所で行うことを可能とする新たな測定法を確立する。
- (2)培養したグリア細胞内の  $Mg^{2+}$  動態とその制御メカニズムを詳細に明らかにし、その役割を調べる。

### 3. 研究の方法

上記のように本研究は、(1)我々が以前開発した KMG-104-AsH を用いた細胞内外の局所  $Mg^{2+}$  濃度変化を測定する手法の開発、および(2)培養グリア細胞内の  $Mg^{2+}$  動態の測定、の2段階に分けて実施した。

(1) 細胞内局所または細胞膜すぐ外側の  $Mg^{2+}$  濃度変化を正確に測定するために、我々が以前開発した KMG-104-AsH を用いた FRET による測定系の確立を目指す。KMG-104-AsH は TC タグというペプチドタグに結合することで  $Mg^{2+}$  プローブとして機能する小分子であり、細胞に発現させた TC タグ付タンパク質に局在し、その周囲の  $Mg^{2+}$  濃度変化を測定することができる(J Am Chem Soc, 2014)。この分子との間で蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)によるエネルギー転移が期待される蛍光タンパク質をペアにすることで、両分子の蛍光強度比を測定するレシオメトリックイメージングにより、定量性の高い測定を可能にする。そのため、KMG-104-AsH とペアになる蛍光タンパク質の種類、TC タグの付加位置等を検討する。また、細胞内局所でのイメージングに応用するために、さらに蛍光タンパク質に局在シグナルペプチド配列をつけたものを作成し、細胞イメージングに応用する。

(2) ラット胎児の脳から単離し、分散培養したグリア細胞(主にアストロサイト)内の  $Mg^{2+}$  濃度がどのようなシグナルの影響で変化するかを調べる。 $Mg^{2+}$  濃度変化は我々のグループで開発された KMG シリーズの蛍光プローブを用いて、蛍光顕微鏡による観察で評価する。グリア細胞は神経細胞が放出するニューロトランスミッターやニューロモジュレーター分子を受け取るため、まずはこれらの分子の影響を調べる。必要に応じて、(1)で開発した新規手法も用いた詳細な解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) KMG-104-AsH を用いた FRET による細胞内外の局所  $Mg^{2+}$  濃度変化測定系 (KMG-FRET) の開発  
 まず、我々のグループが以前開発した KMG-104-AsH を応用し、 $Mg^{2+}$  選択性が高く細胞内で局在化可能なレシオイメージング法 (KMG-FRET と命名) の確立を目指した。KMG シリーズのプロープは  $Mg^{2+}$  選択性が非常に高い。一方で蛍光タンパク質はシグナルペプチド配列を付加することで細胞内での局在化を容易に実現できるメリットがある。これら両方の利点を有し、かつ蛍光強度比 (レシオ) による定量性の高い測定 (レシオメトリックイメージング) を実現するため、KMG-104-AsH と蛍光タンパク質の間の蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を用いた測定が可能かを検討した。その結果、青色蛍光タンパク質である TagBFP が KMG-104-AsH とのペアに適することを見出した (図 2 左)。これら 2 分子の蛍光シグナルは、別々に分けて観察することが容易であり、TagBFP を励起したときに発せられる蛍光のうち KMG-104-AsH の蛍光のみが周囲の  $Mg^{2+}$  濃度に依存して強度を変化させた (図 2 中央)。これらの蛍光強度の比率 (KMG/BFP) も  $Mg^{2+}$  濃度依存的に変化し、その解離定数 (Kd 値) は 1.8 mM であった (図 2 右)。この値は KMG-104-AsH 自体の Kd 値 (1.7 mM) とほぼ同様の値となった。

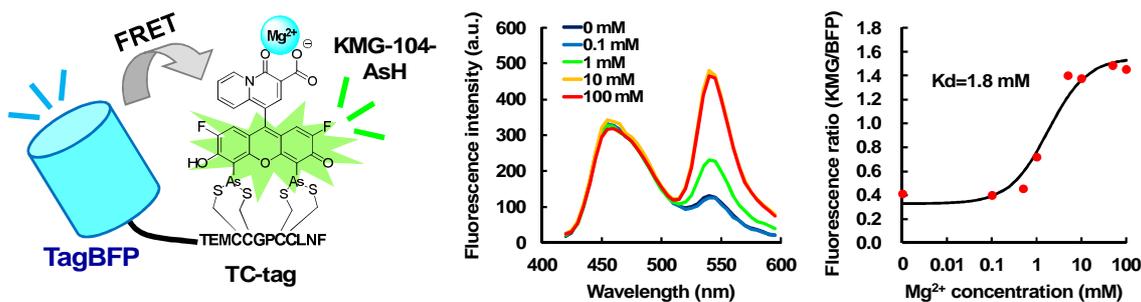


図 2 KMG-FRET の構成と性能

次に、これが細胞内で機能することを確認するために、細胞質に TagBFP-TC タグを発現させた HeLa 細胞を KMG-104-AsH で染色し、KMG-FRET による細胞質中の  $Mg^{2+}$  濃度変化の観察を行った (図 3 左上)。細胞質中の  $Mg^{2+}$  濃度は、ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP の添加により上昇させることができる (2005, BBA)。FCCP 添加後、KMG-FRET の蛍光比は徐々に上昇し、10 分以内に高い値で安定した (図 3 右上グラフおよび下疑似カラー画像)。この様子は以前に報告した FCCP による細胞質中  $Mg^{2+}$  濃度上昇の様子と同様であることから、KMG-FRET は細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化を測定可能であることが明らかになった。

さらにこれを細胞内で局在化せることで、細胞内の任意の箇所での  $Mg^{2+}$  濃度変化を調べることが可能となる。蛍光タンパク質に局在化シグナルペプチドを付加することで、細胞質以外にも、細胞膜内側、核や小胞体などの細胞内小器官内部、ミトコンドリア膜間領域などに KMG-FRET を局在化させることに成功した (図 4)。また、シグナルペプチド配列を用いた局在化以外にも、特定のタンパク質の末端に TagBFP-TC タグを付加したタンパク質を発現させることで、そのタンパク質周囲に KMG-FRET を局在化させることにも成功している。図 4 ではアクチンタンパク質と結合させたものを発現させることで、細胞骨格の一種であるアクチンフィラメントに KMG-FRET を局在化させた例を示す (図 4 右上)。このように、細胞内の任意の局所での、レシオメトリックな  $Mg^{2+}$  濃度変化の測定が、KMG-FRET の開発により可能となった。

現在この成果は投稿論文として発表すべく準備中である。

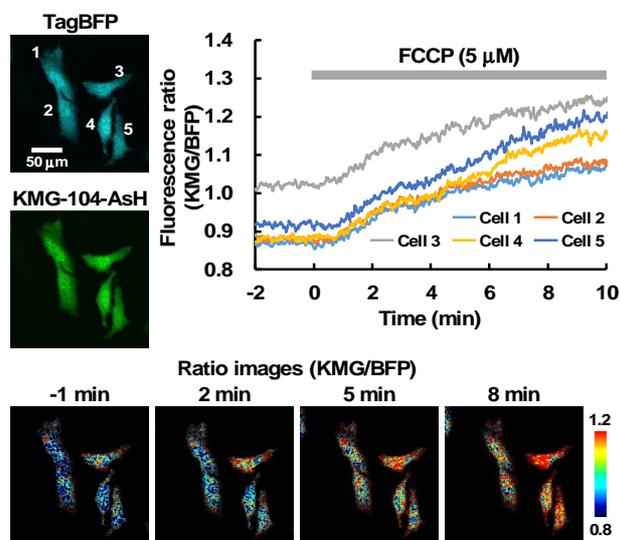


図 3 KMG-FRET による細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化の測定

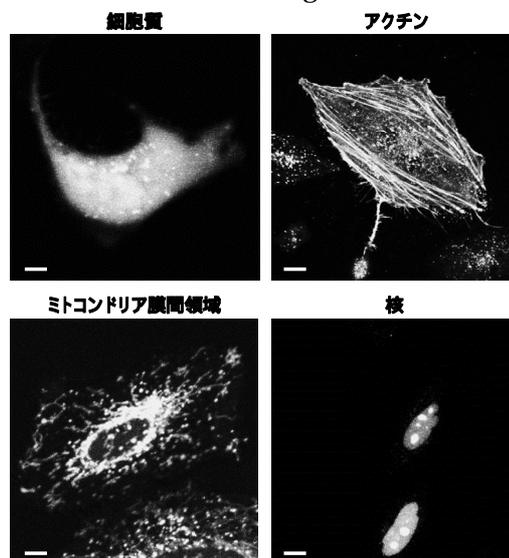


図 4 KMG-FRET の局在化

## (2)培養グリア細胞内の Mg<sup>2+</sup>動態の測定

本研究では、これまでに開発した KMG シリーズのプロープおよび、本研究課題の中で開発した KMG-FRET を用いて、グリア細胞内の Mg<sup>2+</sup>動態を明らかにすることも目的とした。ラット胎児の脳から分散培養したグリア細胞(主にアストロサイト)がどのような刺激に対して細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度を変化させるのかを、蛍光イメージングにより検討した。脳神経系で神経細胞を取り巻いているアストロサイトは、神経細胞から放出された神経伝達物質を多く受け取る。そのためまずは、KMG-104 で染色したアストロサイトに種々の神経伝達物質を添加した際の細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度変化を測定した。代表的な神経伝達物質の中でも、GABA を受け取った際には細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度の緩やかな上昇が、セロトニンを受け取った際には緩やかな減少が観察された。この濃度変化は細胞内シグナルとして下流のタンパク質に情報を伝えている可能性や、最終的に周辺の神経細胞に対して何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。今回発見した現象は、その役割について今後より詳細な研究が必要となるが、脳神経系の情報処理に重要な役割を持つ現象である可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamanaka Ryu, Shindo Yutaka, Hotta Kohji, Suzuki Koji, Oka Kotaro, GABA-Induced Intracellular Mg<sup>2+</sup> Mobilization Integrates and Coordinates Cellular Information Processing for the Maturation of Neural Networks, *Current Biology*, 査読あり, 2018 Dec 17;28(24):3984-3991.

DOI: 10.1016/j.cub.2018.10.044.

Maeshima Kazuhiro, Matsuda Tomoki, Shindo Yutaka, Imamura Hiromi, Tamura Sachiko, Imai Ryosuke, Kawakami Syoji, Nagashima Ryosuke, Soga Tomoyoshi, Noji Hiroyuki, Oka Kotaro, Nagai Takeharu, A Transient Rise in Free Mg<sup>2+</sup> Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation, *Current Biology*, 査読あり, 2018 Feb 5;28(3):444-451.

DOI: 10.1016/j.cub.2017.12.035.

### 〔学会発表〕(計 3 件)

新藤豊、山中龍、鈴木孝治、堀田耕司、岡浩太郎、細胞内局所でのマグネシウムイオンの FRET イメージング、日本バイオイメーキング学会、2018 年 9 月、つくば

新藤豊、山中龍、鈴木孝治、堀田耕司、岡浩太郎、FRET を用いた細胞内局所のマグネシウムイオンイメージング、日本ケミカルバイオロジー学会、2018 年 6 月、東京

新藤豊、山中龍、鈴木孝治、堀田耕司、岡浩太郎、局在化プロープを用いた細胞内マグネシウムイオンの FRET イメージング、日本バイオイメーキング学会、2017 年 9 月、東京

### 〔その他〕

ホームページ等

<https://www.bpni.bio.keio.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。