

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390063
 研究課題名（和文） 中枢神経におけるグルタミン酸の時空間ダイナミクス可視化解析
 研究課題名（英文） Visualization analysis of spatiotemporal dynamics of glutamate in central nervous system

研究代表者
 廣瀬 謙造 (Hirose Kenzo)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00292730

研究成果の概要：

直接的に中枢シナプスのメジャーな神経伝達物質であるグルタミン酸の時空間ダイナミクスの解析を可能にする高感度なグルタミン酸可視化プローブの開発を行った。多数の試作を行った結果、グルタミン酸により蛍光強度が十分に大きく変化するプローブを複数種類得ることに成功し、実際に神経細胞から放出されるグルタミン酸を観測することに成功した。本研究の成果は今後中枢シナプスの機能制御の解明に大きく資すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：グルタミン酸・中枢神経・シナプス・バイオテクノロジー・蛍光

1. 研究開始当初の背景

脳高次機能はシナプス伝達を介した神経細胞間の情報のやり取りにより支えられている。グルタミン酸は中枢神経系において代表的な興奮性神経伝達物質として知られる。活動電位が軸索の終末部（シナプス前部）に到達すると、そこからグルタミン酸を蓄積しているシナプス小胞の開口放出が生じて、グル

タミン酸がシナプス間隙へと遊離する。遊離したグルタミン酸はシナプス後部の膜上にあるグルタミン酸受容体を活性化して興奮性シナプス後電流（EPSC）を生じ、興奮性シナプス伝達が成立する。このグルタミン酸作動性シナプスの伝達効率の調節が、記憶・学習において重要な役割を持っていることが知られており、その制御機構の解明は神経科

学における重要な問題のひとつとなっている (Kandel ER (2001) Science 294:1030)。シナプス伝達は、シナプス前部および後部の両方で制御されるが、シナプス前部からグルタミン酸放出の実態自体があまり明らかでなく、その制御や調節機構については不明な点が多い (Stevens CF (2003) Neuron 40:381)。さらに、シナプスにおいて放出されたグルタミン酸はそのシナプスにとどまらず、シナプスから溢れ出る現象 (スピルオーバー) が存在することが最近指摘されるようになった (Isaacson JS (1999) Neuron 23:377)。スピルオーバーによって拡散したグルタミン酸は、近隣のシナプスや神経周りを取り囲むグリア細胞に作用するのではないかと考えられている。しかしながら、このスピルオーバーの実態についても研究は進んでいない。

2. 研究の目的

シナプス前部におけるグルタミン酸放出の実態とそれに引き続くグルタミン酸の運命について理解が進んでいない理由としては、適切な方法論が存在しないことが挙げられる。従来、グルタミン酸放出を研究するための手法としては主にパッチクランプ全細胞記録をはじめとした電気生理学的手法が用いられている。しかしながら、記録される EPSC の大きさはグルタミン酸放出量のある程度反映するものの、シナプス後部におけるグルタミン酸感受性が常に一定であるとは限らないため、EPSC の大きさのみからグルタミン酸放出量を評価することはできない。さらに、EPSC は神経樹状突起上に存在する多数のシナプスからの電気信号が加算されたものであるため、グルタミン酸が放出されたシナプスを空間的に特定することはできない。このように電気生理学的な手法は、グルタミン酸の時空間的ダイナミクスを評価するう

えではあくまでも間接的な手段であり、十分な解析力を持ち得ない。本研究では、直接的にグルタミン酸の時空間ダイナミクスの解析を可能にするグルタミン酸イメージング技術を開発し、これまで直接検証することが困難であったシナプス前部におけるグルタミン酸放出機構や放出されたグルタミン酸の運命を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

グルタミン酸可視化プローブは、生理的な受容体のひとつである AMPA 型グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR2 を改変することによって作製する。GluR2 を利用する理由は、グルタミン酸を結合する S1S2 と呼ばれる細胞外領域が大腸菌発現系を用いてリコンビナント蛋白質として得る事が可能であるからである。GluR2 の S1S1 ドメインはグルタミン酸の結合によって、蛋白質の立体構造変化 (コンフォメーション変化) が惹起されることが知られている (Armstrong N (1998) Nature 395:913)。この蛋白質コンフォメーション変化を読み出すため、蛍光分子を蛋白質に導入する。低分子蛍光化合物が蛋白質のコンフォメーション変化を捉えるのに適切な位置に導入されれば、この蛍光性コンジュゲートはグルタミン酸蛍光プローブとして機能することができる。

蛍光分子を特定の位置に導入するために、Site-directed mutagenesis を適用し、アミノ酸残基をシステインに置換した変異 S1S2 ドメイン蛋白質を作製する。システイン残基の持つ遊離 SH 基に特異的に反応できる低分子蛍光分子を結合させる。同様の原理で蛍光プローブが作製可能であることを別のリガンドであるイノシトール三リン酸を測定する蛍光プローブの開発を通じて実証している (Hirose K (1999) Anal. Commun. 36:175,.)。

本研究で作製されるグルタミン酸蛍光プローブは、可溶性であり、細胞外に存在させれば、放出されたグルタミン酸を検出することができる。しかし、細胞外液を交換する度に、プローブは洗い流され、プローブを再添加し直さなければならなくなる。そこで、得られたグルタミン酸プローブを細胞の膜上にストレプトアビジン・ビオチンを介して固定する。プローブを細胞膜上に固定化することによって、細胞外液交換が可能になるだけでなく、放出されたグルタミン酸を近傍で捉えることができるようになる。

蛍光プローブはビオチン化し、予め適切なモル比でストレプトアビジン混和して複合体を形成させる。次に、細胞膜をビオチン化したのち、蛍光プローブ・ストレプトアビジン複合体を添加し、細胞膜に固定する。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸可視化プローブ S403C-0G の開発

我々はハイブリッド型グルタミン酸可視化プローブの候補として、種々の蛍光色素と AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞外ドメインシステイン変異体の組み合わせによって 100 以上の蛍光複合体を作製した。作製した蛍光複合体は大過剰のグルタミン酸に対する蛍光強度変化率を基に性能を評価した。探索及び評価の結果、S1S2 の 403 番目のセリンをシステインに置換した変異体に蛍光色素オレゴングリーンを結合させた複合体 (S403C-0G) を得ることができた (図 1)。

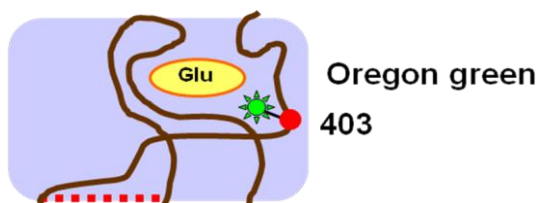


図 1 グルタミン酸プローブ S403C-0G の構造

S403C-0G は過剰量のグルタミン酸存在下で約 40%の蛍光強度の上昇を示す (。グルタミン酸及び類似分子に対する用量反応曲線を作製したところ、S403C-0G はグルタミン酸と解離定数 148 nM で結合するのに対し、他のアミノ酸に対してはグルタミン酸の 1/1000 倍から 1/10000 倍低い親和性を示した (図 2)。特にグルタミン酸と良く似た化学構造を持つアスパラギン酸やグルタミンに対しても非常に低い親和性を示すことは注目に値する結果であり、S403C-0G が極めて選択的かつ高感度にグルタミン酸を検出することが明らかになった。

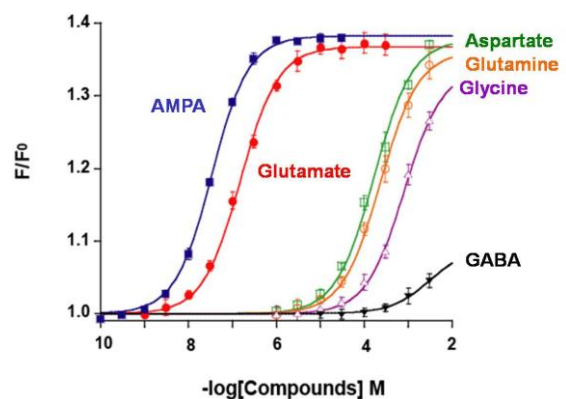


図 2 グルタミン酸プローブ S403C-0G の用量反応曲線

(2) 神経細胞からのグルタミン酸放出の可視化

単層のグリア細胞上に神経細胞を播種した標本の細胞膜上にヘビオチン・ストレプトアビジン結合を利用して S403C-0G を固定化した。この標本で CCD カメラと蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス蛍光測定とその画像解析によって、自発的活動電位に伴う S403C-0G の蛍光シグナルの上昇＝グルタミン酸放出の量を経時的に観察した (図 2C)。EOS シグナルの変化率の空間的差異を解析したところ、神経細胞上の細胞体や樹状突起の近傍で EOS シグナルの変化が見られたが、S403C-0G シグナルの変化の大きさは空間的に均一ではなく、ムラがあるものであった。このことは

S403C-0G が神経細胞上でのグルタミン酸放出の不均一性を感度良く捉えられることを示している。

(3) 単一シナプスレベルでのグルタミン酸イメージング

S403C-0G の感度をさらに上げることを狙って、さらに変異体を作製した。その結果、S403C-0G のリジン残基の一つをアラニンに置換した変異体や S403C とは異なった四ステイン変異体との蛍光色素コンジュゲートにおいて、蛍光強度変化のダイナミックレンジの増大が見られた。この改良型プローブ

(EOS2 および EOS3) によって、単一シナプスレベルのイメージングが可能であることが明らかとなった。

(4) 成果の位置づけと今後の展望

本研究の成果によって、高感度にグルタミン酸をイメージングする技術が確立された。同様の結果は国内外において例を見ない。今後グルタミン酸イメージング技術を駆使することによって、いままで解明することができなかった中枢シナプスの諸性質が明らかになるものと期待される。

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 1 件)

Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Iino M, Hirose K.

Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission.

Eur J Neurosci. 25, 2249-59 (2007) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 飯沼将 蛍光性分子センサー作成の迅速化技術の開発 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 2008

年 12 月 11 日 神戸

- ② 廣瀬謙造 生細胞分子イメージングのためのハイブリッド型プローブ 日本細胞生物学会大会 2008 年 6 月 29 日 横浜

- ③ 並木 繁行 蛍光イメージングによる中枢シナプスでのグルタミン酸動態の解明 日本生理学会大会 2008 年 3 月 26 日 東京

- ④ 坂本寛和 中枢シナプスにおけるグルタミン酸放出の素量解析 日本生理学会大会 2008 年 3 月 21 日 東京

- ⑤ 大久保洋平 蛍光性グルタミン酸指示分子を用いたシナプス間隙からのグルタミン酸漏出の可視化 日本薬理学会年会 2008 年 3 月 18 日 横浜

- ⑥ 並木繁行 中枢神経シナプスのグルタミン酸放出様式のグルタミン酸イメージングによる解析 日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 横浜

- ⑦ 滝川健司 ハイスループットスクリーニングによる新規蛍光性グルタミン酸プローブの開発 日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 横浜

- ⑧ 坂本寛和 Optical imaging of glutamate release at individual hippocampal synapses. 日本神経科学学会 2007 年 7 月 9 日 横浜

- ⑨ 坂本寛和 グルタミン酸の可視化で探る中枢シナプスの伝達様式 日本薬理学会近畿部会 2007 年 11 月 16 日 三重

- ⑩ 坂本寛和 グルタミン酸プローブで見る中枢シナプス伝達様式 日本生理学会近畿・中部合同部会 2007 年 10 月 19 日 三重

[その他]

ホームページ等

- ① <http://www.cir.tohoku.ac.jp/higuchi-p/NanoSystem/index.htm>
② <http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Seiri>

1/
③ <http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 謙造 (Hirose Kenzo)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00292730

(4) 研究協力者

並木 繁行 (Namiki Shigeyuki)
研究者番号：90452193
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

太田 裕作 (Ohta Yusaku)

神谷 真子 (Kamiya Mako)
名古屋大学・大学院医学系研究科・日本学
術振興会特別研究員 S P D

平野 知宏 (Hirano Tomohiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員

菅生 厚太郎 (Sugao Kohtaro)
東京大学・大学院医学系研究科・博士課程
学生

飯沼 将 (Inuma Sho)
東京大学・大学院医学系研究科・博士課程
学生

武井 大祐 (Takei Daisuke)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程学生

坂本 寛和 (Sakamoto Hirokazu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程学生

伊佐 真幸 (Isa Masayuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課
程学生

太向 勇 (Taiko Isamu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課
程学生

滝川 健司 (Takikawa Kenji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課
程学生

岸 俊輔 (Kishi Shunsuke)
名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課
程学生

神田 真衣 (Kanda Mai)
名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課
程学生

田所 大 (Tadokoro Dai)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程学生