

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20659

研究課題名（和文）細胞間隙の分子動態可視化による神経活動抑制の脳内伝播メカニズム解明

研究課題名（英文）Studying the mechanisms of spreading depression in the brain with fluorescent indicators located in intercellular spaces

研究代表者

三田 真理恵（MITA, Marie）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：20964878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳卒中や外傷性脳損傷などにおいては、神経細胞の刺激応答が一過的に失われた状態が、損傷部位から脳の広範囲に広がる事が知られている。拡張性抑制と呼ばれるこの現象はこの神経回路網とは無関係に伝播することから、細胞間隙を拡散するなんらかの分子が伝播を担うと考えられている。本研究では、細胞内分子の動態解析に用いられるツールである蛍光タンパク質センサーを細胞間隙に導入・固定化し、細胞間隙に存在する分子の時空間的な動態を追跡することに成功した。この細胞間隙イメージング技術は拡張性抑制を引き起こす分子の同定や病態解明につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のライブイメージング技術は、主に細胞内の分子動態を詳細に可視化し、細胞機能の解明に貢献してきたが、細胞間隙における細胞間相互作用を解明するための、細胞外の分子動態に適用されている例は少ない。脳卒中や脳損傷に起因する拡張性抑制は脳スライス標本で再現できるため、細胞レベルでの病態と細胞間隙における分子動態をイメージングから理解する格好の研究モデルとなる。拡張性抑制の伝播メカニズム解明は、脳機能障害の抑制薬の開発や、回復を早める治療法の確立などにつながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In stroke and/or traumatic brain injury, transient loss of neuronal excitability spreads from the damaged area to a wide range of the brain. This phenomenon, called as spreading depression, is thought to be mediated by some molecules that diffuse throughout the extracellular space. Fluorescent protein-based indicators have been widely used to observe many intracellular molecular dynamics of interest, but the applications for extracellular space were not very common. In this study, we observed the spatiotemporal dynamics of molecules in the extracellular space by using the fluorescent protein-based indicators immobilized in the extracellular space. This extracellular space imaging technique will be useful for the identification of molecules that cause spreading depression and to the elucidation of pathological mechanisms of many neurodegenerative diseases that relate to spreading depression.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：蛍光タンパク質 ライブイメージング 蛍光タンパク質センサー プローブ 脳 神経

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中や外傷性脳損傷によって損傷した神経細胞から、活動抑制の波が脳全体へと拡張し、脳機能障害をもたらす、拡張性抑制という現象が知られている (Loac et al., JNeurophysiol, 1944; Basarsky et al., J Neurosci., 1998)。これまで、損傷した神経細胞から放出されたサイトカインやプロテアーゼにより、正常な神経細胞での炎症反応を介した活動抑制が誘起されると考えられてきた (Nicholson et al., Brain Res., 1975) が、近年では薬理的な受容体阻害や個体レベルでの遺伝子ノックアウト実験から、高濃度の細胞外グルタミン酸や細胞外イオンによって正常な神経活動が阻害され、障害が伝播する可能性が示された (Ren et al., Nat Commun., 2020)。しかし、細胞外の時空間的な分子動態を解析する手法は未だに確立されていないため、1) 神経障害をもたらす細胞外因子の濃度やその時間変化などの時空間的な定量解析、2) 神経活動に関わる細胞内分子メカニズムとの因果関係、3) 細胞外因子の単純拡散では届き得ない広範囲に伝播する波のリレーメカニズム など、拡張性抑制を引き起こす基本的な分子機序が未解明である。

ライブイメージング手法は、生きたままの細胞や組織を観察でき、このような生体内で起こるイベントの解析に対して有効である。従来のライブイメージングでは、主に細胞内の分子動態が着目され、細胞機能の解明に貢献してきた。これに用いられる蛍光タンパク質センサーは、標的分子の動態を特異的に可視化できる強力なイメージングツールである。しかし、細胞外の分子動態の解析への適用手法は確立していない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞間隙に存在する分子の動態解析を、蛍光タンパク質センサーを用いたライブイメージングによって達成することである。これにより、拡張性抑制の伝播をもたらす時空間的な分子メカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

前期には細胞間隙に存在する分子の可視化技術基盤の確立を、後期にはマウス脳スライス標本での解析を目指し、研究計画に従って以下の3項目を遂行した。

1) 蛍光タンパク質センサーを細胞膜外葉上に提示させる手法について検討した。HEK293細胞を用い、センサー末端に付加するシグナル配列やアンカー配列の組み合わせを検討し、遺伝子導入によって目的の細胞外にセンサーを導入する。これと並行して、遺伝子導入を行わず、センサーを化学修飾することで細胞膜外葉上に提示させる手法について検討した。

2) 細胞膜外葉上でのセンサーのリガンド結合特異的な輝度変化を測定した。センサーへの、アンカー配列や化学修飾により、センサーの分子認識能に影響する可能性が考えられる。そのため、細胞膜外葉上に提示させたセンサーのリガンド認識能を測定し、分子動態可視化への利用可能性を検討した。

3) マウス脳スライスでの細胞間隙イメージングを試みた。マウス海馬スライスを取得し、上記項目で検討した手法で細胞膜外葉上にセンサーを提示させ、リアルタイムな分子動態の可視化を試みた。

4. 研究成果

1) 細胞膜外葉上への蛍光タンパク質センサー提示手法の確立

C末端のシグナル配列と、N末端への膜貫通ドメイン融合により、細胞膜にタンパク質を提示できることが知られている。これに倣い、蛍光タンパク質または蛍光タンパク質センサーにそれぞれの配列を融合しHEK293細胞での発現を確認した。蛍光タンパク質としてはEGFPとmCherry、蛍光タンパク質センサーとしてはグルコースセンサーであるGreen GlifonとRed Glifon (Mita et al., Anal Chem., 2019; Mita et al., Cell Chem Biol., 2022)、カリウムイオンセンサーであるGINKO2とKIRIN1 (Wu et al., PLoS Biol., 2022; Shen et al., Commun Biol., 2019)をそれぞれ選出した。

まず、選出した蛍光タンパク質または蛍光タンパク質センサーが、HEK293 細胞内で発現することを確認した (図 1: 細胞質)。次に、それぞれのセンサーの C 末端に、血小板由来増殖因子受容体の膜貫通ドメイン配列または GPI アンカー配列を付加した。これらの遺伝子を HEK293 細胞に導入したところ、EGFP や mCherry、および一部のセンサーでは細胞膜上での発現が確認できた一方、細胞質に発現しているものや細胞内で凝集体を形成してしまうものなど、細胞膜上での蛍光が確認できないセンサーがあることが判明した (図 1: 膜局在配列 A-C)。蛍光タンパク質センサーの形状や大きさが膜上で発現させる際の問題となる可能性が示唆された。

上記と並行して、遺伝子導入を行わず、細胞外から添加して蛍光タンパク質センサーを細胞膜外葉上に提示させる手法を検討した。この手法には、脂質とポリエチレングリコールから成り、末端に NHS をもつ誘導体を用いた。この誘導体と、大腸菌を用いて合成・精製したセンサータンパク質を反応させ、N 末端が修飾されたセンサータンパク質を得た。この脂質修飾センサーを細胞外から添加し、洗浄後に観察したところ、いずれのセンサーでも細胞外での蛍光が確認できた (図 1: 脂質修飾)。このことから、化学修飾では蛍光タンパク質センサーの構造によらず、細胞膜上に提示できる可能性が明らかになった。

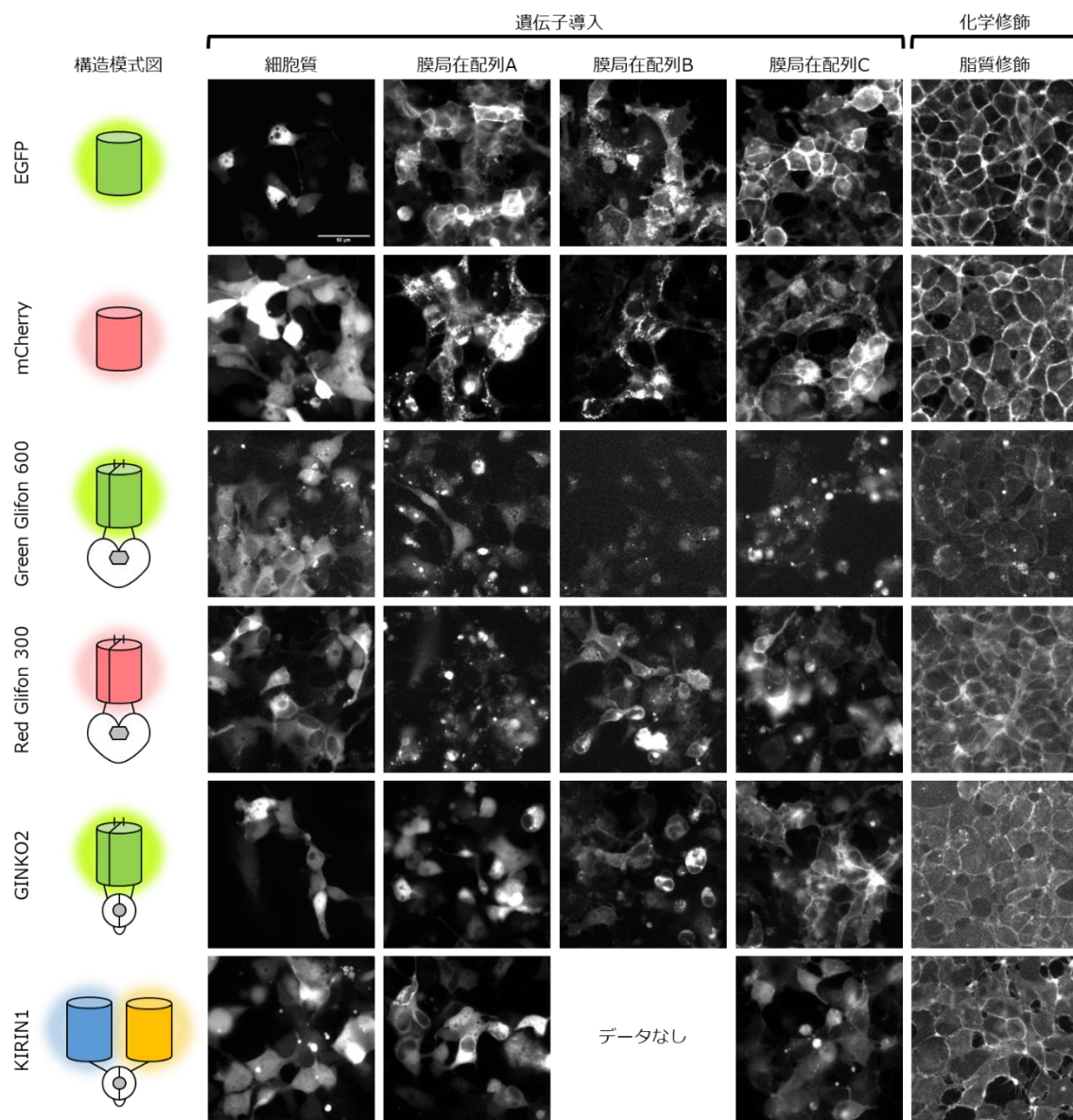


図 1. それぞれの蛍光タンパク質センサーの HEK293 細胞における発現様式。スケールバーは 50 μm を示す。

2) 細胞膜外葉上でのライブイメージング実現可能性の検討

細胞膜外葉上に提示された蛍光タンパク質センサーの、リガンド結合特異的な輝度変化を検討した。遺伝子導入によって細胞膜上に提示できたセンサーのうち、細胞外へのリガンド投与に

応じた輝度変化を示すものを数種類確認した。一方で、細胞膜外葉上に局在していても、リガンド投与に応じた輝度変化を示さなくなってしまうセンサーがあることが明らかとなった。センサーのもつ性質が細胞外環境に適さないことや、付加配列がセンサーの立体構造変化に影響したためと推測している。

これに対し、脂質修飾によって細胞膜外葉上に提示された蛍光タンパク質センサーはいずれも、リガンド特異的な輝度変化を示した。このことから、細胞間隙に存在する分子のライブイメージングによる動態解析には、化学修飾したセンサーが利用できると結論づけた。

3) マウス脳スライスでの細胞間隙イメージング技術の確立

脂質で作成した脂質修飾センサーを用い、マウス海馬スライスでの観察を試みた。海馬スライスに脂質修飾あり/なしの蛍光タンパク質または蛍光タンパク質センサーをそれぞれ添加した。洗浄後に顕微鏡下で観察したところ、脂質修飾した条件において細胞外での蛍光を観察した。また、脂質修飾した蛍光タンパク質を添加したスライスに対し、リガンドを灌流によって投与したところ、リガンド特異的な輝度変化がみられた。今後、この海馬スライス標本を用いて、拡張性抑制にともなう細胞間隙の分子濃度の時間・空間変化を観察する予定である。

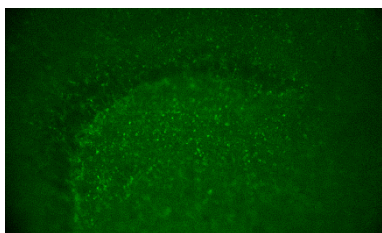


図2. マウス海馬スライスにおける脂質修飾EGFPの局在様式。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mita Marie, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 159
2. 論文標題 生体分子を「みえる化」する技術 単色蛍光タンパク質センサーの革新	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 13~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.23067	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三田真理恵
2. 発表標題 遺伝子コード型蛍光センサーの開発とオキシトシン分泌イメージングの展望
3. 学会等名 第49回 日本神経内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三田真理恵
2. 発表標題 単色蛍光タンパク質型センサーの開発とライブセルイメージング解析
3. 学会等名 第6回 Neuro-Vascular研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三田真理恵	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 84
3. 書名 月刊「細胞」2023年 4月臨時増刊号 蛍光タンパク質センサー「生体内のグルコース検出技術の進展と展望」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------