

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240045

研究課題名(和文) マルチカラーイメージング手法を用いた神経細胞内Mgイオンダイナミクスの包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of intracellular Mg<sup>2+</sup> function in neurons with fluorescent imaging

研究代表者

岡 浩太郎 (OKA, KOTARO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：10276412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円

研究成果の概要(和文)：(1)細胞内の特定器官に局在する新規Mgプローブを開発し、ミトコンドリアから細胞質に放出されるMgイオン動態を解析した。(2)一酸化窒素刺激(NO)に伴う細胞内Mgイオン濃度の上昇が、NO/cGMP/KMGシグナル伝達に伴うミトコンドリアからのMgイオン流出によるものであることを示した。(3)パーキンソン病と細胞内Mgとの関係について明らかにすることを目指し、PC12細胞をパーキンソン病様に細胞死させるMPP+(1-methyl-4-phenylpyridinium ion)で処理した。細胞内Mgイオン濃度と細胞死は強く相関し、MgイオンがMPP+による細胞死を緩和することを突きとめた。

研究成果の概要(英文)：Although the magnesium ion (Mg<sup>2+</sup>) is one of the most abundant divalent cations in cells and known to play critical roles in many physiological processes, its mobilization is still obscure. To understand the Mg<sup>2+</sup> function, first we developed a method for Mg<sup>2+</sup> imaging in cellular local area using a novel fluorescent Mg<sup>2+</sup> probe, "KMG-104-AsH", and succeeded to visualize localized Mg<sup>2+</sup> release in mitochondrial intermembrane space (MIS) induced by a protonophore, FCCP. Furthermore, we also investigated that nitric oxide (NO) activation of mitochondria ATP sensitive potassium channel, and found that NO induces Mg<sup>2+</sup> release from mitochondria by mitochondrial depolarization via cGMP/PKG/mitoKATP channel pathway. Finally, we investigated the Parkinson-like cell death by the application of MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) to differentiated PC12 cells. Higher concentration of intracellular Mg<sup>2+</sup> moderated the toxic effect of MPP+ and suppressed the cell death.

研究分野：システム生物学・神経科学

キーワード：生体生命情報学 シグナル伝達 再生医学 生物物理 神経科学



## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内 Mg イオン ( $Mg^{2+}$ ) 動態を詳細に調べることにより、細胞内情報伝達物質としての  $Mg^{2+}$  の新規な役割を明らかにする。具体的には我々が開発してきた蛍光  $Mg^{2+}$  プローブと種々の細胞内セカンドメッセンジャー (主に  $Ca^{2+}$ ) プローブを併用することにより、神経細胞中での役割を明らかにする。特に神経細胞内での  $Mg^{2+}$  の役割を明らかにすることを旨とし、種々の刺激を培養神経細胞に加えることによる細胞内  $Mg^{2+}$  動員の有無とその機構について明らかにするとともに、レシオメトリックおよび特定オルガネラでの  $Mg^{2+}$  計測を目指した新規プローブの開発を進める。また病態と  $Mg^{2+}$  との関係について明らかにするために、iPS 細胞を用いて、ヒトドーパミン神経細胞、パーキンソン患者由来神経細胞についてその  $Mg^{2+}$  動員メカニズムと神経死との関係を網羅的に解析し、セカンドメッセンジャーとしての  $Mg^{2+}$  の役割について包括的に明らかにする。

## 3. 研究の方法

新規な  $Mg^{2+}$  動員解析のための種々のプローブの開発・評価とそのプローブを用いた細胞内 Mg 動員メカニズムの解析を並行して進める。具体的には3年間の研究期間に  
(1)細胞内特定オルガネラをターゲットとする新規 Mg プローブを開発する。  
(2)種々の薬物刺激に伴う細胞内 Mg 応答を計測し、その動員メカニズムを明らかにする。  
(3)パーキンソン病と細胞内 Mg との関係について細胞生理学的に明らかにする。  
の3つの項目について研究を進めた。

## 4. 研究成果

(1)細胞内特定オルガネラをターゲットとする新規 Mg プローブの開発  
 $Mg^{2+}$  は多くの細胞機能に必須の 2 価陽イオンであり、細胞機能の恒常性維持や調節において重要な役割があると考えられている。細胞内で  $Mg^{2+}$  は、ミトコンドリアにおける ATP 産生や細胞内での ATP 消費、小胞体におけるタンパク質立体構造の安定化、核における DNA の品質管理、細胞周期の制御などに深く関わっていることが報告されている。そのため、細胞内やオルガネラ内の  $Mg^{2+}$  濃度がどのように調節、制御されているのかを調べることは細胞機能を理解するうえで重要である。これを実現するために細胞内局所の  $Mg^{2+}$  濃度変化を測定できる蛍光プローブである KMG-104-AsH を開発した。このプローブは  $Mg^{2+}$  選択性蛍光プローブである KMG-104 と、人工的にアレンジされたペプチドタグであるテトラシステインタグ (TcTag) に選択的に結合し蛍光を発するタンパク質ラベルプローブである FlAsH の長所を組み合わせた分子設計となっている。任意のタンパク質に TcTag を結合させたものを発現させた細胞に KMG-104-AsH を導入することで、そのタンパ

ク質周辺の  $Mg^{2+}$  濃度変化を測定することが可能となる。今回我々は、蛍光タンパク質 mKeima の C' 末端に TcTag を結合させ、HeLa 細胞に発現させた。mKeima は KMG-104-AsH に対して FRET ペアとはならず、KMG-104-AsH のシグナルを打ち消すことがないため、このペアはレシオメトリックプローブとして使用できる。局在シグナルを用いて mKeima-TcTag を細胞内の様々な部位に局在させて発現させることで、図3に示すように HeLa 細胞内の様々な部位に KMG-104-AsH を局在させることに成功した。

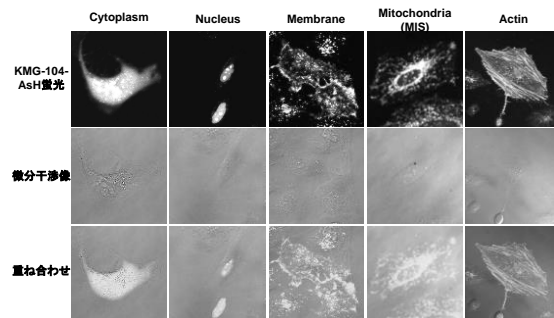


図3細胞の特定部位に発現させ、さらにレシオメトリックに細胞内 Mg イオン計測が可能な新規プローブ

細胞質、細胞膜、特定の細胞内タンパク質のみならず、核やミトコンドリア膜間領域 (MIS) などの細胞内コンパートメントにプローブを局在させることにも成功した。また、ミトコンドリアを脱分極させると  $Mg^{2+}$  が細胞質へと放出されることが知られているが、このときの濃度変化の様子が細胞質と MIS で異なることが、この方法を用いて明らかにされた。このように、KMG-104-AsH を用いた細胞内局所での  $Mg^{2+}$  濃度変化の測定は、細胞内の  $Mg^{2+}$  動態を明らかにしていく上で重要な情報が得られるものと考えられる。

(2)種々の薬物刺激に伴う細胞内 Mg 応答を計測と動員メカニズムの解明

$Mg^{2+}$  は様々な生化学反応と関わっていることが知られており、多くの生理機能に必要とされている。またパーキンソン病などの疾患との関わりが示唆されている。最近になってグルタミン酸や GABA などの神経伝達物質と細胞内  $Mg^{2+}$  との関係が明らかにされてきたが、神経修飾を行うことが知られている、一酸化窒素 (NO) との細胞内 Mg イオン濃度 ( $[Mg^{2+}]_i$ ) との関係は明らかでない。そこで、以前我々の研究グループが開発した  $Mg^{2+}$  選択性蛍光指示薬 KMG-104 を用いて、ラット海馬神経細胞に NO 供給剤を負荷した時の  $Mg^{2+}$  の変化を観察した。

NO 供給剤 SNAP 負荷時における  $Mg^{2+}$  イメージングの結果、SNAP 刺激によって細胞内  $Mg^{2+}$  は上昇した (図4)。さらに NO の下流シグナル分子として知られている cGMP の膜透過型アナログである 8-Br-cGMP によっても  $[Mg^{2+}]_i$

は上昇し、cGMP の下流分子 PKG の阻害剤によって、この Mg イオン濃度上昇は抑えられた。これらの結果より NO は cGMP/PKG シグナル経路を介して  $[Mg^{2+}]_i$  を上昇させていることがわかった。次に、 $Mg^{2+}$  の供給源を明らかにするために、細胞外の Mg イオンを除いた条件下において SNAP 刺激を行なったところ、通常条件下と同様の  $[Mg^{2+}]_i$  上昇が観察されたため、NO/cGMP/PKG 経路を介した  $[Mg^{2+}]_i$  上昇の  $Mg^{2+}$  供給源は細胞内にあることがわかった。

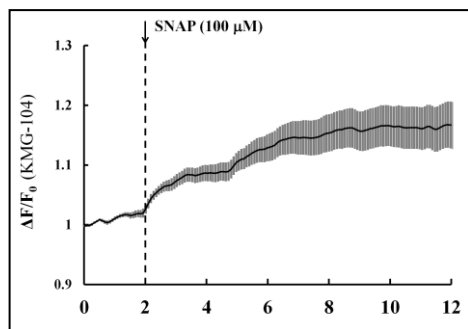


図4 海馬培養神経細胞に一酸化窒素 (NO) 刺激を与えた時の細胞内 Mg イオン濃度 ( $[Mg^{2+}]_i$ ) 変化 NO はドナーである SNAP より放出される。

細胞内の  $Mg^{2+}$  の貯蔵場所としてミトコンドリアが知られている。そこで、NO/cGMP/PKG 経路を介した  $[Mg^{2+}]_i$  上昇の  $Mg^{2+}$  供給源がミトコンドリアかどうかを明らかにするために、ミトコンドリアの脱共役剤 FCCP によってミトコンドリアからの  $Mg^{2+}$  放出を誘導後に、SNAP 刺激を行なったところ、さらなる  $[Mg^{2+}]_i$  上昇は誘導されなかった。このことより NO/cGMP/PKG を介した  $[Mg^{2+}]_i$  上昇はミトコンドリアからの  $Mg^{2+}$  放出が原因であることがわかった。先行研究で報告されているミトコンドリアからの  $[Mg^{2+}]_i$  上昇の多くが、ミトコンドリア内膜の脱分極を伴うことが知られているため、NO/cGMP/PKG シグナル経路を介した  $[Mg^{2+}]_i$  上昇にミトコンドリアの脱分極を伴うかどうかを調べた。ミトコンドリア膜電位感受性色素 TMRE を用いて KMG-104 との同時イメージングを行なったところ、NO/cGMP/PKG シグナル経路を介した  $[Mg^{2+}]_i$  上昇にはミトコンドリアの脱分極を伴うことがわかった。NO/cGMP/PKG シグナル経路の下流にあり、ミトコンドリアの脱分極を伴う現象としてミトコンドリアの ATP 作動性カリウムチャンネル (mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル) が知られているため、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの開口剤 diazoxide 添加したところ、 $[Mg^{2+}]_i$  上昇が観察された。また、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの阻害剤 5-HD の前処理によって SNAP、8-Br-cGMP、diazoxide による  $Mg^{2+}$  濃度上昇は抑制された。一方で PKG 阻害剤 KT5823 によって diazoxide による Mg 濃度上昇は抑えられなかった。これらの結果より NO/cGMP/PKG シグナル経路を介した  $[Mg^{2+}]_i$  上昇は mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルを介してミトコンドリアからの  $[Mg^{2+}]_i$  上昇を引き

起こしていることがわかった。また、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの開口はミトコンドリアの脱分極、ROS の生産、PKG の活性化を介したポジティブフィードバックの経路によって制御されていることが知られている。このポジティブフィードバックがミトコンドリアからの  $Mg^{2+}$  放出に関与しているかどうかを明らかにするために、PKG 阻害剤 Go6987 で前処理を行なった神経細胞において SNAP、diazoxide 刺激を行なったところ  $[Mg^{2+}]_i$  上昇は抑制された。この結果より上記のポジティブフィードバック経路はミトコンドリアからの  $Mg^{2+}$  放出を調節していることがわかった。

本研究の結果をまとめると、ラット海馬神経細胞において NO/cGMP/PKG シグナル経路を介した mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの活性化によってミトコンドリアからの Mg 放出が誘導されること、及びこの  $Mg^{2+}$  放出は PKG を介したポジティブフィードバック経路を介した制御を受けていることがわかった (図5)。

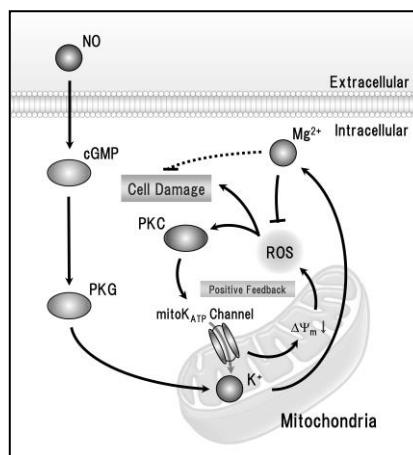


図5 我々が明らかにした NO/cGMP/PKG 情報伝達系によるミトコンドリアからの Mg イオン放出メカニズムの概要

### (3) パーキンソン病と細胞内 Mg との関係についての細胞生理学的なメカニズム解明

我々は PC12 細胞に MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) による刺激を行ったところ、ミトコンドリアからの Mg イオンの放出を世界で初めて報告した (Shindo et al. PLoS One, 2011)。この実験系は従来パーキンソン病様に細胞死を誘導できる系として知られていたが、その初期に細胞内 Mg イオン濃度変化が起きることを世界で初めて明らかにしたものである。このモデル系を用いて、MPP<sup>+</sup> 添加に伴う細胞死と細胞内 Mg イオン濃度 ( $[Mg^{2+}]_i$ ) との関係を明らかにする研究を進めた。

まず MPP<sup>+</sup> 刺激前に細胞に種々の前処理を行い、 $[Mg^{2+}]_i$  の変化を調べた (図6)。その結果、前処理を加えない細胞と比較してミトコンドリア内膜の脱共役剤である FCCP で前処理した細胞では MPP<sup>+</sup> 添加に伴う  $[Mg^{2+}]_i$  は有意に減少した。FCCP はミトコンドリア内部から細胞質への Mg イオン流出を促すことが知ら

れている (Kubota et al. 2005) ことから、MPP<sup>+</sup>処理による[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇の一部は、ミトコンドリアから細胞質へのMg<sup>2+</sup>の放出によるものであると考えられる。また一方で細胞外のMg<sup>2+</sup>を除いておくと、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は大きく減少した。このことはMPP<sup>+</sup>添加直後の[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の主たる要因は、細胞外からのMg<sup>2+</sup>流入によるものであると考えられる。また imipramine によってこの[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を抑えられることから、細胞膜上のNa/Mgイオン交換体がこの細胞外からのMg<sup>2+</sup>流入を引き起こしているものと考えた。

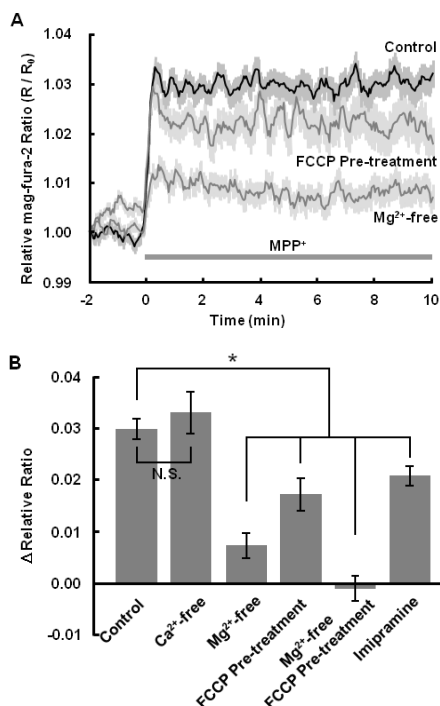


図6 MPP<sup>+</sup>添加に伴う[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>濃度変化 A: FCCCP処理を行い、ミトコンドリアから事前にMgイオン放出を行うと、Mg<sup>2+</sup>濃度上昇は少し抑制された。また細胞外Mg<sup>2+</sup>を除くと、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は大きく減少した。B: 種々の薬物処理が[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に与える影響

このように[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化がMPP<sup>+</sup>添加により引き起こされることから、MPP<sup>+</sup>添加による細胞死と[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>との関係を定量的に調べることとした(図7)。Mg<sup>2+</sup>を含まない溶液中で細胞を生育させたり、また通常よりMg<sup>2+</sup>濃度が高い溶液中で生育させることにより、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は減少させたり、また増加させたりすることができる。また imipramine 添加条件で培養した場合も[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は低下した。このような環境で育成させた細胞について、MPP<sup>+</sup>添加に伴う細胞死との関係を調べてみると、生存率と[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>には正の相関、すなわち[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>低下は細胞死を招くことを初めて明らかにすることができた。

さらに興味深いことは、細胞膜に存在することが知られているMg<sup>2+</sup>輸送体であるSLC41A2を過剰に発現させた細胞では、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は増加し、さらに生存率も向上した

(図8)。このことも、Mg<sup>2+</sup>濃度の増加がMPP<sup>+</sup>添加に伴う細胞死を緩和することができるという新たな知見を得た。

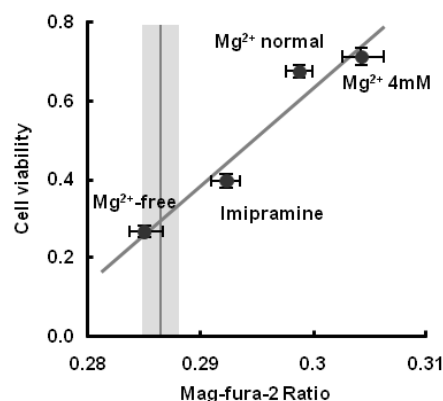


図7 MPP<sup>+</sup>処理による[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>と生存率の関係

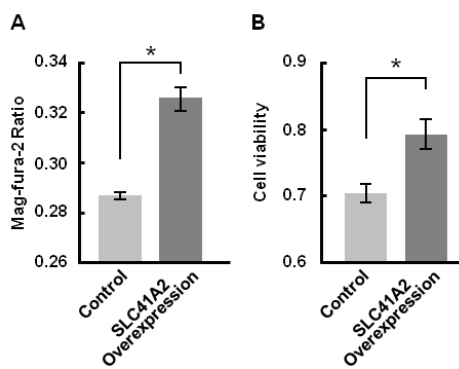


図8 Mg<sup>2+</sup>輸送体SLC41A2を過剰に発現させた細胞でのMPP<sup>+</sup>添加に伴う[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化 A: [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>濃度変化、B: 細胞生存率

さらにヒトiPS細胞より分化させたドーパミン神経細胞についても、同様にMPP<sup>+</sup>添加によるMg<sup>2+</sup>動態を調べたところ、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加を見出した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- Fujii T., Shindo Y., Hotta K., Citterio D., Nishiyama S., Suzuki K., Oka K.: Design and Synthesis of a FLAsH type Mg<sup>2+</sup> Fluorescent Probe for Specific Protein Labeling. *J Am Chem Soc.* 136(6):2374-81, 2014. (査読有)  
DOI:10.1021/ja410031n
- Yamanaka R., Shindo Y., Hotta K., Oka K.: NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by mitoKATP channel opening in rat hippocampal neurons. *FEBS Lett.* 587(16):2643-2648, 2013. (査読有)  
DOI:10.1016/j.febslet.2013.06.049.

[学会発表] (計 17 件)

1. 山中龍, 新藤豊, 苅部亮, 棚元亮, 堀田耕司, 鈴木孝治, 岡浩太郎, ラット海馬神経細胞における神経活動にともなう細胞内マグネシウムイオン濃度上昇, 第 37 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2014. 9. 12.
2. 新藤豊, 藤井智彦, 山中龍, 堀田耕司, 西山繁, ダニエル・チッテリオ, 鈴木孝治, 岡浩太郎, 細胞内局所でのマグネシウムイオン濃度変化の計測, 第 23 回日本バイオイメーシング学会, 大阪大学銀杏会館 (大阪), 2014. 9. 5.
3. Shindo Y., Oka K.: Fluorescent imaging of  $Mg^{2+}$  in neurons. Magnesium in Translational Medicine, Smolenice Castle (Slovakia), May 14, 2014.
4. Yamanaka R., Shindo Y., Hotta K., Suzuki K., Oka K.: NO/cGMP/PKG signaling induced mitochondrial  $Mg^{2+}$  release via mitoKATP channel activation in rat hippocampal neurons. Magnesium in Translational Medicine, Smolenice Castle (Slovakia), May 14, 2014.
5. Shindo Y., Fujii T., Hotta K., Citterio D., Nishiyama S., Suzuki K., Oka K.: Magnesium imaging in cellular local area with FLASH-type fluorescent probe. Magnesium in Translational Medicine, Smolenice Castle (Slovakia), May 12, 2014.
6. Enya A., Yamanaka R., Shindo Y., Kitogo T., Hotta K., Oka K.: Characterization of neurons derived from human iPS cells with CREB phosphorylation and calcium dynamics. Neuroscience 2013, San Diego (USA), Nov 11, 2013.
7. Shindo Y., Yamanaka R., Suzuki K., Hotta K., Oka K.: Increase in intracellular magnesium concentration has protective effect in MPP<sup>+</sup> model of Parkinson's disease in PC12 cells. Neuroscience 2013, San Diego (USA), Nov 11, 2013.
8. Yamanaka R., Shindo Y., Hotta K., Suzuki K., Oka K.:  $Mg^{2+}$  mobilization mediated by both GABA (A) and GABA (B) receptors in rat hippocampal neurons. Neuroscience 2013, San Diego (USA), Nov 13, 2013.
9. 山中龍, 新藤豊, 堀田耕司, 鈴木孝治, 岡浩太郎, 一酸化窒素によるマグネシウム動員構成の解明, 第 22 回日本バイオイメーシング学会学術集会, 東京大学薬学部講堂 (東京), 2013. 9. 16.
10. 塩谷晃弘, 山中龍, 新藤豊, 堀田耕司, 木藤古孝行, 岡浩太郎, ヒト iPS 細胞から分化させた神経細胞の蛍光イメージング法を用いた特徴づけ, 第 22 回日本バイオイメーシング学会学術集会, 東京大学薬学部講堂 (東京), 2013. 9. 16.
11. 新藤豊, 小松広和, 堀田耕司, 金井求, 有賀克彦, 岡浩太郎, ミトコンドリア内でのアセチル CoA の活性化とその計測およびミトコンドリア機能への影響と解析, 第 22 回日本バイオイメーシング学会学術集会, 東京大学薬学部講堂 (東京), 2013. 9. 16.
12. 塩谷晃弘, 山中龍, 新藤豊, 木藤古孝行, 堀田耕司, 岡浩太郎, ヒト iPS 細胞から分化させた神経細胞の蛍光イメージングを用いた特徴づけ, 第 36 回日本神経科学大会, 国立京都国際会館 (京都), 2013. 6. 22.
13. 山中龍, 新藤豊, 堀田耕司, 鈴木孝治, 岡浩太郎, ラット海馬神経細胞における GABA による二元的なマグネシウム動員機構, 第 36 回日本神経科学大会, 国立京都国際会館 (京都), 2013. 6. 22.
14. Shindo Y., Yamanaka R., Hotta K., Suzuki K., Oka K.: Upregulation of cellular  $Mg^{2+}$  transport attenuates the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) in PC12 cells. Society for Neuroscience 2012, New Orleans (USA), Oct 16, 2012.
15. Yamanaka R., Shindo Y., Hotta K., Suzuki K., Oka K.: Intracellular  $Mg^{2+}$  mobilization by nitric oxide in rat hippocampal neurons. Society for Neuroscience 2012, New Orleans (USA), Oct 14, 2012.
16. 新藤豊, 堀田耕司, 鈴木孝治, 岡浩太郎, PC12 細胞における MPP<sup>+</sup>により引き起こされる  $Mg^{2+}$  輸送タンパクの発現量変化, 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場 (名古屋), 2012. 9. 20.
17. 山中龍, 新藤豊, 堀田耕司, 鈴木孝治, 岡浩太郎, ラット海馬神経細胞における一酸化窒素によるマグネシウム動員, 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場 (名古屋), 2012. 9. 19.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡 浩太郎 (OKA, Kotaro)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号: 10276412

### (2) 研究分担者

鈴木 孝治 (SUZUKI, Koji)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号: 80154540