

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590313

研究課題名(和文) 高精細 *in vivo* グルタミン酸イメージングによる大脳皮質シナプス機能の精密解析

研究課題名(英文) Analysis of dynamics of synaptically released glutamate in cortical neurons

研究代表者

並木 繁行 (Namiki, Shigeyuki)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90452193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路での神経伝達物質の放出機構を理解には個々のシナプスでのグルタミン酸の放出ダイナミクスの精密な計測が必要である。本研究では脳標本における神経細胞のシナプスから放出された神経伝達物質グルタミン酸の高精細な蛍光イメージング技術の確立を目的とする。本研究では高性能グルタミン酸蛍光プローブの開発と神経細胞に選択的にグルタミン酸プローブを標識する技術の開発を行った。開発したグルタミン酸プローブをボツリヌス毒素の非毒性領域やHaloTag技術を採用することで神経細胞に選択的に標識することで、大脳皮質標本において放出されたグルタミン酸をシナプスレベルの解像度で可視化解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：An analysis of synaptic properties at individual synapses in living brain preparations is an essential requirement for the study of regulation mechanism underlying synaptic transmission. The aim of this study is to establish a technical platform for a imaging of synaptically released glutamate with a synapse resolution in slice preparations and *in vivo*. First, we generated novel fluorescent glutamate probes which show more than 10-fold increase of fluorescence intensity, enabling to visualize synaptically released glutamate with high spatiotemporal resolution. Second, we developed methods for a neuron-specific labeling of glutamate probe. Combined these techniques, we tried imaging of spatiotemporal glutamate dynamics in a mouse cortical slice preparation. In this glutamate imaging, glutamate release was visualized at a dendritic spine, indicating that our glutamate imaging platform is applicable to a imaging of synaptically released glutamate in slice preparations and *in vivo*.

研究分野：薬理学

キーワード：シナプス グルタミン酸 イメージング

1. 研究開始当初の背景

脳機能は大脳皮質や海馬などの回路上に存在する幾多ものシナプスの応答が統合されて決定付けられており、シナプス機能の理解は神経回路の制御機構を解明する上で不可欠である。近年、神経回路上で各シナプスがどのような時空間パターンで活性化し、情報の処理を行っているのかが重要な問題とされ (*Curr Opin Neurobiol.* 20, 494, 2010)。シナプスレベルの解像度での解析技術が希求されている。さらに、神経回路の制御におけるシナプス機能を決定づける重要な因子としてシナプス前部からのグルタミン酸放出様式の変化が関わっていることが明らかになりつつあり、シナプス前部からのグルタミン酸の放出様式の正確な理解が求められている。

現在まで、神経回路におけるシナプス機能の研究は生理的な神経回路が良好に維持されている脳スライス標本や動物個体の脳を用いてパッチクランプ法を始めとする電気生理学的手法で進められてきた。しかしながら、パッチクランプ法では対象としている神経細胞上の多数のシナプスのレスポンスのアンサンブルを見ているに過ぎず、神経回路上の個々のシナプスがどのような時空間パターンを持って活性化しているのか、またどのような制御様式で活性化の強度が調節されているのかという詳細な知見を得ることはできなかった。近年になって、カルシウムイメージングを用いて脳スライス標本や動物個体脳の神経回路上のシナプス動態の解析を行った複数の報告がなされている (*Curr Opin Neurobiol.* 19, 520 (2009))。しかしながら、カルシウムイメージングで評価しているのはシナプス後部の NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化を介したカルシウム上昇であり、そのレスポンスは受容体の密度や感度などに大きな影響を受けるため、シナプス前部の動態を直接的に理解することはできない。以上のような背景で、シナプス前部の機能をシナプス毎に精密の計測することができる技術が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、脳スライス標本や動物個体の脳においてシナプス前部の機能をシナプスレベルの解像度で解析するために、シナプス前部から放出される神経伝達物質グルタミン酸の新規蛍光イメージング技術を開発することを目的とする。具体的には、1) 光の散乱や組織由来の自家蛍光の影響を受けにくい 620nm 以上の長波長の蛍光を発するグルタミン酸プローブの開発、2) 神経細胞特異的にグルタミン酸プローブを標識する技術の開発を行う。加えて、3) 確立した技術を大脳皮質でのイメージングに用いて、開発した技術の有用性を示す。

3. 研究の方法

長波長蛍光を発するグルタミン酸プローブの開発

脳スライス標本や動物個体の in vivo イメージングでは周辺の組織に由来する自家蛍光や光散乱が大きな問題となり空間解像度を著しく低下させる要因となっている。従来のグルタミン酸プローブは 520nm 付近の緑色の蛍光を発するものであるため、脳組織内のイメージングに対応するために蛍光プローブの改変が必要である。組織由来の自家蛍光は一般に 620nm 以上の長波長で大幅に減弱するため、現行のグルタミン酸プローブの緑色蛍光色素 Alexa Fluor 488 を 620nm 以上の蛍光を発するローダミン系やシアニン系の赤色の蛍光を発する蛍光色素に交換し、長波長蛍光を発する構成のグルタミン酸プローブを開発した。ここでは、グルタミン酸結合に伴って 2 倍以上の蛍光変化を示すように、グルタミン酸結合ドメイン内での最適な色素の結合個所を決定した。このためには申請者が既に開発に成功し、グルタミン酸の他にグルコース、ATP などの高性能蛍光プローブの開発に成功しているハイスループットスクリーニング系を適用して行った。得られた有望な長波長蛍光プローブについて、グルタミン酸との反応特性 (結合・解離速度定数、最大蛍光変化率) を評価し、実際に培養海馬神経細胞でのグルタミン酸イメージングに適用できるかを検証した。

分子タグを用いた蛍光プローブの標的細胞・部位への局在化技術の開発

開発したグルタミン酸プローブを脳スライス標本内の神経細胞上にのみに局在化させ、グリア細胞などに結合したグルタミン酸プローブの蛍光がないイメージング系の開発を行った。そのために神経細胞上で分子タグと分子タグの選択的リガンドとの選択的な結合を実現する組み合わせを探索した。具体的には、分子タグを付加した膜タンパク質を神経細胞の細胞膜表面に特異的に発現させた後に、分子タグに対する選択的リガンドを標識したグルタミン酸プローブを標本に付加することで細胞膜上において分子タグとグルタミン酸プローブからなる蛍光複合体を特異的に形成させ、グルタミン酸プローブを神経細胞へ選択的な標識を試みた。ここでは、分子タグとして Halo タグ、SNAP タグ、ロイシンジッパータグなどを、膜タンパク質として PDGF 受容体の膜貫通領域や GPI アンカードメインを用いた。これらの分子タグ付き膜タンパク質を神経細胞に特異的に発現させるために、神経細胞特異的に遺伝子導入が可能ないように改変したレンチウイルス、シンドビスウイルス、アデノ随伴ウイルスを用いた発現系を用いた。

グルタミン酸プローブの神経細胞への局在化の成否は大脳皮質スライス標本での共焦点顕微鏡や二光子励起顕微鏡を用いた高精度イメージングによって評価した。ここで

十分な蛍光量を確保できるように分子タグを発現させる際のプロモーターの種類やウイルスベクターの種類を変えることで発現量の増加を図った。緑色蛍光タンパク質とグルタミン酸受容体等のシナプス局在タンパク質の融合タンパク質もシナプスマーカーとして合わせて大脳皮質に発現させ、神経細胞近傍を局所刺激した際に、シナプスの位置においてグルタミン酸放出を捉えられることを確認した。

マウス大脳皮質での in vivo グルタミン酸イメージング

マウス大脳皮質標本において高精細なグルタミン酸イメージングを行った。ウイルスベクターや子宮内電気穿孔法を用いてタグ付き膜タンパク質をマウス大脳皮質聴覚野の錐体細胞に選択的に発現させ、数日後に大脳皮質標本へタグに対する選択的リガンドを付加したグルタミン酸プローブをインジェクションすることによって、神経細胞特異的なグルタミン酸プローブを標識した。神経線維を電気刺激した際に、シナプス前部間で活性化の強度の違いに着目して解析を行った。

4. 研究成果

長波長蛍光グルタミン酸プローブの開発

脳スライス標本や動物個体の in vivo での蛍光イメージングにおいて大きな問題となりうる脳組織に由来する自家蛍光や光散乱を回避するために長波長蛍光を有する蛍光性のグルタミン酸プローブの開発に取り組んだ。このために、申請者らが既に開発に成功し、グルコースや ATP などの高性能蛍光プローブの開発に応用しているハイスループットスクリーニング系を採用した。620nm 以上の長波長の蛍光を発するローダミン系やシアニン系の赤色の蛍光を発する蛍光色素に交換し、長波長蛍光を発する構成のグルタミン酸プローブの開発を行った結果、赤色の蛍光プローブとして Cy3 を標識した蛍光プローブを得ることができた。得られた長波長蛍光プローブについて、グルタミン酸との反応特性（グルタミン酸への親和性、最大蛍光変化率）を評価し、実際のイメージングに適用するための基礎的なデータを取得した。また、この赤色プローブを海馬神経細胞の分散培養標本に適用し、実際にグルタミン酸イメージングを試みたところ、一回の活動電位でプレシナプスから放出されたグルタミン酸を単一シナプスレベルの解像度で得ることに成功したことより、脳スライス標本や動物個体標本での使用に耐えうることを示唆された。

蛍光プローブの神経細胞上への局在技術の開発

蛍光グルタミン酸プローブを脳スライス標本内の神経細胞上だけに局在化させる

ために神経細胞上で分子タグと分子タグの選択的リガンドとの選択的な結合を用いた方法論の構築を行った。そのために、分子タグとして Halo タグ、ロイシンジッパータグなどを、膜タンパク質として PDGF 受容体の膜貫通領域や GPI アンカドメインを用いた分子タグ付き膜タンパク質を神経細胞に特異的に発現させるためのレンチウイルス、シンドビスウイルス、アデノ随伴ウイルスを製作した。

神経細胞上のシナプスから放出されたグルタミン酸を高いシグナル/ノイズ比で検出できるように、グルタミン酸プローブを神経細胞上にのみ選択的に標識するためのウイルスベクターのテストを行った。その結果、Halo タグを採用した系でグルタミン酸プローブを神経細胞選択的に標識することができた。また、神経細胞上に存在しているガングリオシドへの選択的な結合が報告されているボツリヌス毒素 C 型の非毒性ドメインとグルタミン酸プローブの複合体形成を利用して神経細胞選択的にグルタミン酸プローブを標識することができた。いずれの標識方法でグルタミン酸プローブを標識した神経細胞でも、電気刺激によって惹起されたグルタミン酸放出を蛍光顕微鏡システムで可視化することに成功した。

大脳皮質標本でのグルタミン酸イメージング

高性能グルタミン酸蛍光プローブと神経細胞への特異的な蛍光プローブの標識法を用いて、大脳皮質標本においてグルタミン酸イメージングを行った。神経細胞に発現させた HaloTag を介した蛍光プローブを標識する方法によって、大脳皮質の 2/3 層の神経細胞に蛍光プローブを選択的に標識することができた。この標本を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、樹状突起上のスパインまで明瞭に確認できた。さらに、グルタミン酸蛍光プローブを標識した神経細胞上の樹状突起スパインの近傍への電気刺激によって近傍のプレシナプスを活性化させてグルタミン酸放出を惹起させた。この際に、共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプスイメージングによって単一スパインレベルの空間分解能でのグルタミン酸プローブの蛍光変化を捉えることに成功した。本研究で確立したグルタミン酸の蛍光イメージング技術によって、脳内の神経回路での興奮性シナプスの活性化をシナプスレベルの解像度で定量的に解析することが可能になり、シナプスにおける情報のコーディング機構の理解への貢献が期待できる。

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4件)

Isa M, Namiki S, Asanuma D, and Hirose K. Spatiotemporal Control of Receptor Tyrosine Kinase Activity by Caged Ligands. *Chem Lett*, 44, 150-1 (2015)

Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N & Hirose K. High-throughput development of hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 13439-43 (2014), DOI 10.1002/anie.201407181

Isa M, Asanuma D, Namiki S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Hirose K. High-Throughput Screening System To Identify Small Molecules That Induce Internalization and Degradation of HER2. *ACS Chem Biol.*, 9, 2237-41 (2014)

Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, Hirose K. Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 6085-9 (2014), DOI 10.1002/anie.201402030

〔学会発表〕(計 6件)

金原直也、坂本寛和、太向勇、並木繁行、廣瀬謙造、グルタミン酸イメージングによるプレシナプス機能を制御する分子基盤の解析、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 09 月 19 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

有吉哲郎、坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造、脳スライスにおける単一シナプス解像度でのグルタミン酸イメージング技術の開発、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 09 月 19 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

瀧川健司、並木繁行、坂本寛和、有吉哲郎、金原直也、浅沼大祐、廣瀬謙造、シナプス伝達を可視化する高性能グルタミン酸センサーの開発、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 03 月 13 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

金原直也、坂本寛和、太向勇、並木繁行、廣瀬謙造、グルタミン酸イメージング技術を用いた神経伝達物質放出の分子基盤の解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 06 月 20 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

瀧川健司、並木繁行、坂本寛和、有吉哲郎、金原直也、浅沼大祐、廣瀬謙造、シナプス伝達を可視化する蛍光性グルタミン酸センサーの開発、第 87 回日本薬理学会、2013 年 03 月 19 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

並木繁行、グルタミン酸イメージングによる単一シナプスレベルでのシナプス機能解析、日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会(招待講演)、2014 年 05 月 12 日、幕張メッセ国際会議場（千葉県千葉市）

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木 繁行 (NAMIKI Shigeyuki)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90452193

(2) 連携研究者

廣瀬 謙造 (HIROSE Kenzo)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00292730