

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790244

研究課題名（和文） 中枢神経系におけるD-セリンの時空間動態の可視化解析

研究課題名（英文） Development of imaging technique for D-serine dynamics in central nervous system

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

研究成果の概要（和文）：D-セリンは神経細胞やグリア細胞から放出され、中枢神経系の興奮性シナプスの活性制御に関与している事が示唆されている。しかしながら、中枢神経系でのD-セリンがいつ、どこで放出され、どのようにしてシナプスの活性を制御しているのかという点は不明な点が多い。本研究ではこの問題にアプローチする為のD-セリンの蛍光イメージングに用いる蛍光プローブ開発の為に効率的な蛍光プローブの作製の開発と実際にそれを用いたD-セリンプローブの開発を行い、蛍光イメージングに向けて複数の有望なプローブを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：D-serine is known to regulate synaptic functions in a central nervous systems (CNS). However, spatiotemporal dynamics of D-serine in CNS remains unclear. In this study, we aimed to develop a novel fluorescent probes for visualizing D-serine dynamics. For this purpose, we established high throughput screening system for the development of fluorescent probe. By using this technical platform, we obtained several candidate fluorescent conjugates for D-serine probes which are expected to show a large fluorescence change upon D-serine binding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：D-セリン、蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は、これまで高等動物には何の生理作用も示さないとわれてきた。しかし、最近、哺乳動物の脳にD-セリンが存在することが見出され (Hashimoto et al. *J*

*Chromatogr* (1992))、その生理的役割に注目が集まっている (Wolosker, *Mol. Neurobiol.* (2007))。D-セリンはNMDA型グルタミン酸受容体にコアゴニストとして作用し、興奮性シ

ナプスの可塑性を通じて学習、記憶、行動等の制御に関与する分子であることが明らかになりつつある。また、病態においても神経細胞死および種々の精神神経症状で見られる NMDA 受容体の機能障害への D-セリンの関与が報告され、種々の精神神経疾患と D-セリンの関係も注目されている。D-セリンはグリア細胞でセリンラセマーゼによって L-セリンから合成された後に細胞外へ放出され、周辺の神経細胞に作用していると考えられてきたが、近年、D-セリンはグリア細胞のみならず神経細胞においても合成され、放出されているという報告もなされている。また、放出された D-セリンのシナプス近傍からの消去機構として神経細胞やアストロサイトに存在するトランスポーターの関与が指摘されているが、D-セリンの時空間動態とシナプス機能制御との関連については様々な矛盾する報告によって混乱が生じており、生理的条件での実験に基づいた正確な理解が求められている。

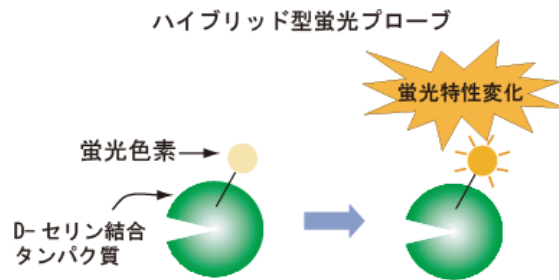
## 2. 研究の目的

近年、D-セリンによる中枢神経系の興奮性シナプスの制御が生理学的、病理学的視点から注目されている。本研究では、D-セリンのシナプス近傍での時空間パターンが神経機能の特徴づける重要な因子であるとの視点に立ち、D-セリンの時空間動態を高い時空間解像度可視化・解析するための D-セリンの蛍光可視化技術の開発を行う。この技術を用いることで、D-セリンの放出個所やタイミングの違いなどのシナプス近傍での時空間パターンの解析に資する基盤技術を確立する。

## 3. 研究の方法

本研究では蛍光性 D-セリンプローブの基本的な分子設計として、D-セリンを特異的に認識する D-セリン結合タンパク質と合成小分子色素ハイブリッド構造である蛍光複合体を基本デザインとして採用した(下図)。ハイブリッド型の蛍光プローブではタンパク質へのリガンドの結合に伴ってタンパク質の構造変化を標識されている蛍光色素の蛍光特性の変化として観測することができる。本研究では D-セリン結合タンパク質として

NMDA 型グルタミン酸受容体の NR3A もしくは NR3B サブユニットの細胞外領域を用いた蛍



光プローブの開発を行った。これらの領域は x 線結晶構造解析によって、D-セリンの結合によって高次構造の変化が生じることが明らかになっており (Yao et al. *EMBO J.* (2008))、D-セリン結合タンパク質として有望であった。D-セリン結合タンパク質に標識する合成小分子蛍光色素は分子内にチオール基と選択的に反応する置換基 (マレイミドやハロアセトアミド) を有したものをを用い、タンパク質内の色素を標識したい位置へのシステイン変異導入を行うことによって、D-セリン結合タンパク質内での色素の結合個所を任意に制御することが可能になった。標識された蛍光色素がタンパク質内に生じた構造変化を検出するためにはタンパク質内の適切な位置に蛍光標識を行う必要があるが、最適な蛍光色素の導入個所を予測することは難しく、多くの try-and-error を必要とする。したがって、本研究課題では研究代表者らが既に開発に着手しているハイスループットでのハイブリッド型蛍光プローブの作製技術を完成させ、採用することとした。複数種類の蛍光色素を用いてスクリーニングを行った結果得られた D-セリン可視化プローブとして有望な蛍光複合体については、D-セリンに対する親和性や蛍光特性に着目してより詳細な評価を行い、生細胞での D-セリンの可視化に適するかどうかの評価を行った。

## 4. 研究成果

D-セリンの時空間動態を高い時空間解像度で可視化・解析を行うための D-セリンの蛍光可視化技術の開発を行った。蛍光性 D-セリンプローブの基本的な分子設計として、D-セリンを特異的に認識する D-セリン結合タンパ

ク質と合成小分子色素ハイブリッド構造である蛍光複合体を基本デザインとして採用した。ハイブリッド型の蛍光プローブではタンパク質へのリガンドの結合に伴ってタンパク質の構造変化を標識されている蛍光色素の蛍光特性の変化として観測することができる。本研究ではD-セリン結合タンパク質の候補として NMDA 型グルタミン酸受容体の NR3A もしくは NR3B サブユニットの細胞外領域を選定し、大腸菌での発現コンストラクトの作製を行った。D-セリン結合タンパク質内での最適な蛍光色素の標識位置は予測が困難なため、研究代表者らが既に開発に着手していたハイスループットでのハイブリッド型蛍光プローブのスクリーニング技術の確立によって蛍光性 D-セリンプローブの効率的な作製プロセス整備に取り組んだ。本システムでは色素標識の為のシステイン変異導入のコンストラクション作製から大腸菌でのシステイン変異体の発現、精製及び最終的なタンパク質への色素標識までを 96 ウェルプレート上でのサンプルの同時処理によって可能にした。また、蛍光複合体のD-セリン結合に依存した蛍光強度変化は蛍光プレートリーダーでの迅速な評価が可能になった。この方法論の完成によって、全てのプロセスを 96 ウェルプレート上で 96 サンプル同時の扱いが可能となり、開発工程の大幅な短縮が実現された。

本スクリーニング系で D-セリン結合タンパク質のシステイン変異体を網羅的に作製

#### 蛍光プローブのハイスループット作製技術



し、蛍光標識を行うための条件の整備を行っ

た。具体的には、D-セリン結合タンパク質のリコンビナントタンパク質の大腸菌での最適な発現、精製条件の決定、蛍光色素との反応条件、蛍光複合体の精製条件の最適化を行い、スクリーニングを開始する準備を完了した。

確立したハイブリッド型プローブのハイスループットスクリーニング系を用いて、実際にD-セリンプローブの開発を進めた。ここでは目的のリガンドを選択的に結合するタンパク質と小分子蛍光色素からなるハイブリッド型の蛍光プローブを採用した。ハイブリッド型D-セリンプローブのD-セリン結合タンパク質として NMDA 型グルタミン酸受容体 GluN3A および GluN3B を、小分子蛍光色素として Alexa シリーズや Cy シリーズの色素を採用した。ハイスループットスクリーニング系を用いて、全ての組み合わせの蛍光複合体を作製し、D-セリンプローブとしての性能評価を過剰量のD-セリンに対する蛍光複合体の蛍光の応答で評価した。ここで有望な応答性を示した複数の蛍光複合体については、より精密な評価を行うために、蛍光複合体を高純度に精製した。これを用いて最大の蛍光レスポンスや蛍光変化のD-セリン濃度依存性、神経細胞に適用した際の応答性を評価する準備が完了した。

#### 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 2 件)

1. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. *Nature*, 464, 1313-1319 (2010) (査読有) DOI:10.1038/nature08991

2. Okubo Y\*, Sekiya H\*, Namiki S\*, Sakamoto H, Iinuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M. \*Equally contributed Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107, 6526-6531 (2010). (査読有)  
DOI:10.1073/pnas.0913154107

〔学会発表〕(計1件)

1. 瀧川健司、並木繁行、坂本寛和、廣瀬謙造・蛍光性バイオセンサーの効率的作製法の開発・第85回日本薬理学会、2012.3.15, 国立京都国際会館(京都府)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：酸性環境検出蛍光プローブ  
発明者：浦野泰照、長野哲雄、浅沼大祐、廣瀬謙造、並木繁行、高岡洋輔  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2011- 194652、および、特願 2012-46922  
出願年月日：平成23年9月7日  
国内外の別：国内

〔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) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし