

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700387

研究課題名(和文) シナプス小胞融合の可視化による小脳顆粒細胞のプレシナプス活性の解析

研究課題名(英文) Imaging of presynaptic activity in cultured cerebellar granule neurons

研究代表者

井端 啓二 (IBATA, KEIJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30462659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：小脳の顆粒細胞は軸索である上行線維を伸ばし、分子層でその軸索が分岐して平行線維となる。上行線維と平行線維はプルキンエ細胞とシナプス結合を形成しているが、シナプスの活性、シナプス形成に関わる分子の動態を明らかにする事は、顆粒細胞とプルキンエ細胞の小脳神経回路における役割を理解するために重要である。そこで、本研究では、神経伝達物質放出の様子を効率良くイメージングするための、発光型シナプス小胞融合モニタータンパク質の開発を行い、小脳顆粒細胞で発現させ、プレシナプスの活性をイメージングした。その結果、プレシナプス活性を測定するための発光型モニタータンパク質が機能する事が判明した。

研究成果の概要(英文)：To understand the cerebellar neuronal circuit, it is important to measure the presynaptic activities of granule cells when animals are moving or learning. In my research, I developed the reporter proteins for presynaptic activity using luciferase. Because luminescence of luciferase is product of chemical reaction, it does not need excitation light, which may sometimes hurt the cells or make autofluorescence from tissue and cell. Therefore using luminescence should give a better signal to noise ratio. I used Gaussia luciferase, which was pH sensitive. I performed the random mutagenesis to obtain bright luminescence. To visualize presynaptic activity, VAMP2 presynaptic protein was used. As a result, I obtained mutant Gluc (mGluc), which showed about 10 times brighter than wild type Gluc. The VAMP2 mGluc transfected neuron showed strong luminescence after neuronal depolarization, indicated this VAMP2-mGluc presynaptic reporter protein can be used to monitor presynaptic activity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：イメージング 膜輸送

1. 研究開始当初の背景

プルキンエ細胞への興奮性入力には下オリブ核由来の登上線維による入力と、顆粒細胞の上行線維および平行線維からの入力がある。顆粒細胞は顆粒層に位置し、分子層に向けて一本の軸索を伸展させており、上行線維と呼ばれている。上行線維は分子層で二股に分岐し、平行線維と呼ばれる軸索を伸ばしている。上行線維と平行線維はプルキンエ細胞の樹状突起とシナプス結合をしているが、上行線維は一個のプルキンエ細胞とシナプスを形成しており、平行線維は体軸の左右軸にそって伸び、左右軸に並ぶ多数のプルキンエ細胞とシナプスを形成している。平行線維 プルキンエ細胞間および、上行線維 プルキンエ細胞間のシナプス形成メカニズムとシナプス結合活性を明らかにする事は、顆粒細胞とプルキンエ細胞の小脳神経回路における役割を理解するために重要である。

2. 研究の目的

小脳の顆粒細胞は軸索である上行線維を伸ばし、分子層でその軸索が分岐し、平行線維となる。上行線維と平行線維の両方ともプルキンエ細胞とシナプス結合を形成しているが、それぞれの線維のプレシナプスの性質に違いがあるかどうかは明確になっていない。そこで、本研究では、神経細胞の神経伝達物質放出の様子を、効率良くイメージングするための発光型シナプス小胞融合モニタータンパク質の開発を行い、このモニタータンパク質を小脳顆粒細胞で発現させ、顆粒細胞から伸びた上行線維と平行線維、それぞれのプレシナプスに機能的な差が存在するのかを明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では蛍光タンパク質の他、小胞融合をより感度良く検出するために、発光タンパク質であるルシフェラーゼを使用し、シグナルとノイズの比を飛躍的に上げてプレシナプスの挙動を観察した。プレシナプス活性を測定する発光モニタータンパク質の最適化であるが、発光シグナルとノイズの比を良くするために、pH 依存性を持つルシフェラーゼを用いた。これまでに、神経伝達物質放出の時空間情報を計測するために、pH 依存的に蛍光強度が変化する蛍光タンパク質 (pHluorin) が用いられてきた。シナプス小胞内と細胞外の pH 差を利用する事で、シナプス小胞が形質膜に融合し、小胞内側が細胞外に露出後、pH が中性になった時に蛍光強度が上昇する。この方法により、シナプス小胞が形質膜に融合した際に見られる蛍光強度の上昇と、シナプス小胞がエンドサイトーシスにより再び取り込まれ、蛍光強度が減少するまでの間のシナプス小胞の挙動を観察出来る。蛍光タンパク質を用いた方法は、特に Super Ecliptic pHluorin (SEP) をシナプス

小胞分子に連結させたモニタータンパク質がよく使用されているが、ルシフェラーゼを用いたモニタータンパク質は発光強度が弱いためほとんど使用されていない。ルシフェラーゼは励起光を用いないため、S/N 比を考えるとライブイメージングには適していると考えられる。本研究では pH 依存性を持つルシフェラーゼを用いたモニタータンパク質を作製、改良した。Gluc (海洋性カイアシ類、Gaussia luciferase) による発光は pH 依存性を持ち、酸性の条件下では発光能が低下する。そのため、シナプス小胞分子のシナプス小胞内側のドメインに Gluc を連結した。SEP を用いた場合と同様に、シナプス小胞が形質膜に融合した際、シナプス小胞側のドメインは細胞外に露出し、Gluc は酸性から中性にさらされるため、強い発光が起こる。本研究ではシナプス小胞分子として VAMP2 を用いた。この VAMP2-Gluc を小脳顆粒細胞に導入後、Gluc の基質であるセレンテラジンを加え、イメージングを行ないながら電気刺激を与えたところ、刺激に応じて発光が観察されたがシグナルが弱く、明るい Gluc を使用する必要がある事が判明した。そのため本研究では、さらに発光強度の強い Gluc を得るためにランダム変異導入法を用いて発光強度の高い Gluc を作製した。

(2) 得られた VAMP2-変異型 Gluc (VAMP2-mGluc) を小脳顆粒細胞に導入し、軸索上のプレシナプスの活性をイメージングした。

(3) さらに、小脳のシナプス形成メカニズムとシナプス活性を明らかにするために、小脳顆粒細胞とプルキンエ細胞のシナプス形成および、維持に必須である Cbln1 分子の顆粒細胞軸索での挙動を調べた。小脳顆粒細胞に SEP を付加した Cbln1 を導入し、軸索上の蛍光シグナルを観察した。

4. 研究成果

(1) ランダム変異導入法を用いて野生型 Gluc に変異を導入、バクテリアプレート上でスクリーニングを行ったところ、野生型 Gluc と比較して発光強度が高い変異体を得られた (図2、ピンク矢印 = 変異体、黄色矢印 = 野生型)。

その後、定量的に発光強度の比較を行ったところ、野生型より約 10 倍強い事が判明した (図2)。発光のキネティクスを比較すると図3のように、変異型は野生型と比較すると長時間の発光を示す事が判明した。しかしながら、発光の立ち上がり時間は遅くなっている可能性がある事が明らかとなった。このキネティクスを調べる実験系は基質を流し入れており、立ち上がり時間に関しては、環流の速度の影響を受ける。そのため、今後のより詳細な解析が必要であるだろう。

(2) 培養小脳顆粒細胞において Gluc 基質存在下で発光が得られた。VAMP2 は刺激なし

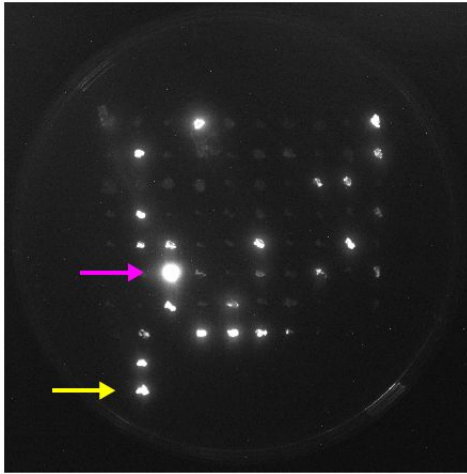


図 1、Gluc 変異体のスクリーニング
黄色矢印は野生型 Gluc の、ピンク矢印は
変異体の発光を示す

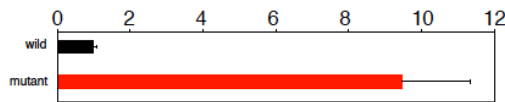


図 2、Gluc 変異体の発光強度の比較
黒は野生型、赤は変異体を示す

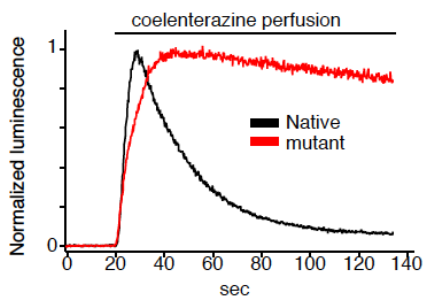


図 3、Gluc 変異体の発光キネティクスの
比較

の条件でもある程度は細胞表面に存在しているため、細胞表面の VAMP2-mGluc の発光シグナルであると考えられる (図 4)。電気刺激を行ったところこの発光シグナルは一過性に上昇した。細胞内のシナプス小胞、分泌小胞の VAMP2-mGluc が細胞表面に露出し、基質と反応したと考えられる (図 4、写真は 500msec の露光時間で得られたタイムラプス画像を 12.5sec 間隔で表示した)。また発光イメージングで得られた画像から輝度値を解析したところ、電気刺激を与えている間は、発光の強度が上昇し、その後、徐々に輝度値が低下する事が判明した (図 5)。これは、VAMP2-SEP 等の蛍光タンパク質を用いた結果と類似している。これらの結果から、プレシナプス活性を測定するための発光モニタータンパク質が、機能する事が判明した。

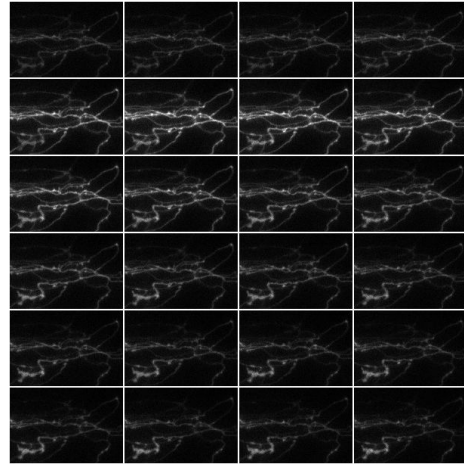


図 4、VAMP2-mGluc の発光イメージング
電気刺激によって発光強度が上昇した

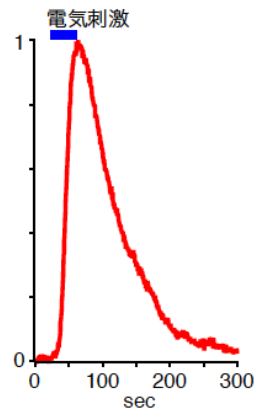


図 5、電気刺激による発光強度の変化

(3) 小脳のシナプス形成と維持に関わる Cbln1 分子とプレシナプスとの機能的な関わりを調べるために、Cbln1 分子についても SEP と mGluc を用いて時空間情報を解析した。そ

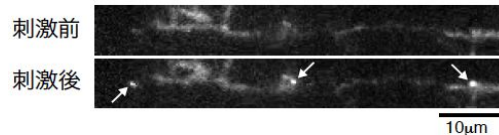


図 6、刺激による Cbln1-SEP の輝度上昇

の結果、Cbln1 は電気刺激によって放出される事が明らかとなった (図 6)。

本研究によって新しく開発された発光型のプレシナプス活性のモニタータンパク質と蛍光タンパク質を用いたモニタータンパク質を利用し、小脳顆粒細胞のプレシナプス活性とシナプス形成分子放出の時空間情報をより詳細に調べる必要がある。

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 2件)

(1) Lindberg E, Mizukami S, Ibata K, Fukano T, Miyawaki A, Kikuchi K (2013) Development of Cell-Impermeable Coelenterazine Derivatives. Chem. Sci. 4, 4395-4400. 査読有DOI, 10.1039/C3SC51985F

(2) Lindberg E, Mizukami S, Ibata K, Miyawaki A, Kikuchi K (2013) Development of Luminescent Coelenterazine Derivatives Activatable by β -Galactosidase for Monitoring Dual Gene Expression. Chem. Eur. J. 19,14970-14976. 査読有 DOI, 10.1002/chem.201302002

〔学会発表〕(計 1件)

(1) 井端啓二、柚崎通介
小脳顆粒細胞の軸索から神経活動依存的に分泌されるCbln1の動態解析
第36回日本神経科学大会、京都、2013年6月21日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

井端 啓二 (IBATA, Keiji)

慶應大学・医学部・助教

研究者番号：30462659