

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18984

研究課題名(和文) in vivo グルタミン酸イメージングによるグリア伝達物質の可視化解析

研究課題名(英文) In vivo imaging of astrocytic glutamate dynamics in the brain

研究代表者

灌川 健司 (TAKIKAWA, Kenji)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員

研究者番号：60749274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトから放出される主要なグリア伝達物質であるグルタミン酸のシナプス伝達に与える影響を理解するためには、生きた動物個体の脳内シナプス近傍でのグルタミン酸の時空間動態の精密な計測が必要である。本研究では、生きたマウス脳内のシナプス近傍でのグルタミン酸の時空間動態を可視化する in vivo グルタミン酸イメージング技術の確立を目的とする。そこで高性能蛍光性グルタミン酸センサーの開発とシナプス近傍への蛍光性センサーの配置技術の開発を行った。開発したこれらの技術を組み合わせることで、生きたマウスの大脳皮質において放出されたグルタミン酸のシナプス近傍での時空間動態の可視化解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：In vivo analysis of spatiotemporal dynamics of glutamate released from astrocytes in the brain provides an essential information for understanding of astrocyte-mediated synaptic plasticity. For visualizing glutamate dynamics in the vicinity of synapses in the living mouse brain, we aimed to develop an in vivo glutamate imaging system. We first generated a novel optical glutamate sensor, EOS, engineered by position-specific labeling of glutamate-binding protein with a small-molecular fluorescent dye. We then developed methods for specific EOS labeling of neuronal surfaces including synapses. By combining these techniques, we successfully visualized glutamate dynamics around the synapses in vivo in the living mouse cerebral cortex during astrocyte activation. Our in vivo glutamate imaging system should shed light on astrocyte-mediated synaptic plasticity.

研究分野：薬理学

キーワード：グルタミン酸 イメージング in vivo グリア

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の情報伝達の基本単位であるシナプス伝達の調節は、前シナプスと後シナプスとの神経伝達物質の授受の調節によって制御されており、記憶や学習といった脳機能の形成に重要な役割を果たしている。ところが最近、前シナプスと後シナプスに加えてアストロサイトが中枢神経系の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸を細胞外に放出することでシナプス伝達の調節に参与する「三者間シナプス」という概念が提唱され(図1)シナプス伝達の調節におけるアストロサイトの放出に由来するグルタミン酸の生理的役割に注目が集まっている(Trends Neurosci. 2009, 32, 421-431)。アストロサイトは種々の神経伝達物質に対する受容体を発現しており、受容体刺激に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇に反応してグルタミン酸、ATP、D-セリンなどのグリア伝達物質を放出すると考えられている。その中でも特にグルタミン酸は、前シナプスに存在する代謝型グルタミン酸受容体(Science 2007, 317, 1083-1086)あるいは後シナプスに存在するNMDA型グルタミン酸受容体に作用し(Neuron 2004, 43, 729-743)シナプスの可塑性を通じて学習、記憶、行動等の高次脳機能の制御に参与する重要なグリア伝達物質であることが明らかになりつつある。また、てんかんや脳虚血時の神経細胞死において、アストロサイト由来のグルタミン酸が病態の発症や増悪に参与することが報告されており、脳疾患におけるシナプス伝達の異常とグリア伝達物質との関係も注目されている(Nat. Med. 2005, 11, 973-981, Neuron 2014, 81, 314-320)。

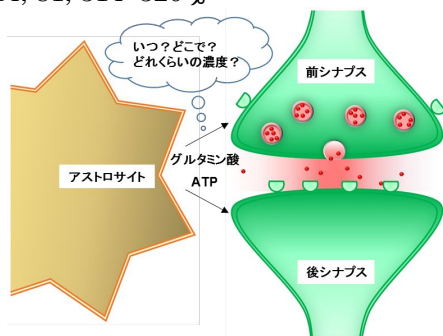


図1. 三者間シナプス

現在までに得られているグリア伝達物質としてのグルタミン酸の神経機能に関する報告は生化学や薬理学的な実験(HPLCによる定量や受容体阻害薬による機能評価など)によって得られている。これらの手法では標本でのグルタミン酸の存在についての情報は得られるものの、グルタミン酸がいつ、どこから放出され、どのような空間パターンを持って広がり、シナプス伝達を調節しているのか(図1)についての情報を得ることができないという問題点がある。その結果、グリア伝達物質としてのグルタミン酸のシナプス伝達への寄与についての相反する複数の仮説を許している(Science 2007, 317,

1083-1086, Neuron 2007, 54, 611-626)。また、グリア伝達物質の放出機能に関する研究は主に培養細胞の系で行われており、生きた動物個体の脳内において実際にアストロサイトからグルタミン酸が放出されるのかについては決定的な証拠が得られておらず、懐疑的な見解を示す報告もなされている(Nat. Rev. Neurosci. 2010, 11, 227-238)。

2. 研究の目的

本研究では、アストロサイトから放出される主要なグリア伝達物質であるグルタミン酸のシナプス伝達に与える影響を理解するために、生きた動物個体の脳内シナプス近傍でのグルタミン酸の時空間動態を可視化するin vivoグルタミン酸イメージング技術の確立を目的とする。具体的には、1)脳組織に由来する自家蛍光や光の散乱を回避するために、長波長の蛍光を発する蛍光性グルタミン酸センサーの開発、2)蛍光性センサーのシナプス近傍への配置技術の開発を行い、生きたマウスの大脳皮質において放出されるグルタミン酸の時空間動態を可視化解析するために必要となる基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

長波長型蛍光性グルタミン酸センサーの開発

開発する蛍光性センサーの分子設計として、グルタミン酸を特異的に認識するグルタミン酸結合タンパク質と低分子蛍光色素との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(図2)。ハイブリ

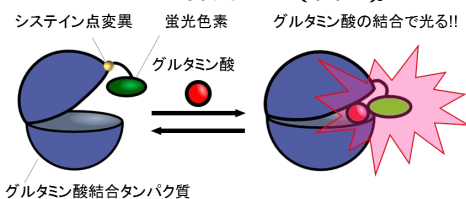


図2. ハイブリッド蛍光性グルタミン酸センサー

ッド型の蛍光性センサーでは、リガンドの結合に伴う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。本研究ではグルタミン酸結合タンパク質として知られているグルタミン酸受容体GluA2のS1S2ドメインを用いた。また、in vivoイメージングにおいて大きな問題となり得る脳組織に由来する自家蛍光や光の散乱を回避するために、従来の蛍光性グルタミン酸センサーに標識されているAlexa Fluor 488(520 nm)に替わって、赤色蛍光を発するローダミン系、シアニン系の蛍光色素を用いることにした。グルタミン酸結合タンパク質に標識する低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を有しており、タンパク質内の色素を標識したい位置にシステイン変異導入を行うことによって、グルタミン酸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。グルタミン酸の結合によって大きな蛍光

変化を示す最適な蛍光色素の導入個所を予測することは難しいが、ハイブリッド型センサーの作製と性能評価をハイスループットに行うことのできる HyFInD 法 (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 13439–13443) を活用することで、1 週間で 1,000 種類以上の候補センサーのスクリーニングを実施し、グルタミン酸結合タンパク質と低分子蛍光色素からなるハイブリッド型の蛍光性センサーの開発を行った。取得した有望な候補センサーについて、in vivo イメージングに適用する際の選定基準として、グルタミン酸に対する親和性や最大蛍光強度変化率といった反応特性を評価した。

蛍光性センサーのシナプス近傍への配置技術の開発

シナプス近傍でのグルタミン酸の時空間動態を可視化する in vivo イメージング技術を開発するために、蛍光性グルタミン酸センサーを生きたマウス脳内の神経細胞膜上へ選択的に配置させる技術の開発を行った。そのために、神経細胞の膜上分子と結合する 16 種類の組換えタンパク質を選定し、蛍光性センサーを神経細胞膜上に配置させることのできる組換えタンパク質の探索を行った。具体的には、試験管内で各々の組換えタンパク質と蛍光性センサーとをピオチン、ストレプトアビジンを介して架橋した蛍光性センサー複合体を調製後、生きたマウス大脳皮質内に蛍光性センサー複合体をインジェクションし、二光子励起顕微鏡を用いた高精細なイメージングによって蛍光性センサーの神経細胞膜上への標識の成否を評価した。この際、高精細な in vivo グルタミン酸イメージングを実現する上で、高い標識効率を有し、十分な蛍光量を確保できる蛍光性センサー複合体が望ましいため、神経細胞に標識された蛍光性センサーの蛍光値を選定基準に加えて評価した。in vivo 標識での選別で良好な結果を示した有望な蛍光性センサー複合体候補については、神経細胞とグリア細胞の共培養標本に添加し、神経細胞とグリア細胞を免疫染色によって染め分けることで、蛍光性センサーが神経細胞膜上へ選択的に標識されているかを評価した。さらに、超解像顕微鏡の一つである STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) を用いて、蛍光性センサーのシナプス近傍への局在性を確認した。

マウス大脳皮質での in vivo グルタミン酸イメージング

高性能蛍光性グルタミン酸センサーとシナプス近傍への蛍光性センサーの標識法を用いて、生きたマウス脳内のシナプス近傍でのグルタミン酸の時空間動態の可視化を試みた。具体的には、マウスに頭蓋骨開窓手術を行った後、神経細胞膜上へ選択的に配置させることのできる蛍光性センサー複合体を

ガラスピペットで大脳皮質に導入した。この標本の大脳皮質を電気刺激した際に、蛍光実体顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行った。

マウス大脳皮質での in vivo Ca^{2+} イメージング

蛍光性グルタミン酸センサーの蛍光変化が神経細胞の放出に由来するのか、アストロサイトのグリア伝達物質の放出に由来するのかを検証するために、KENGE-tet システム (*Cell Rep.* 2012, 30, 397-406) を用いて、蛍光性 Ca^{2+} センサー YellowCameleon を神経細胞およびアストロサイト選択的に発現させたトランスジェニックマウスを開発した。各トランスジェニックマウスに対して、グルタミン酸イメージング時と同様に大脳皮質を電気刺激した際に、蛍光実体顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行った。

4. 研究成果

長波長型蛍光性グルタミン酸センサーの開発

動物個体の in vivo 蛍光イメージングにおいて大きな問題となり得る脳組織に由来する自家蛍光や光の散乱を回避するために、長波長の蛍光を発するハイブリッド型の蛍光性グルタミン酸センサーの開発に取り組んだ。ハイブリッド型センサーを効率的に開発するために、HyFInD 法を活用することで、グルタミン酸結合タンパク質のシステイン点変異体を網羅的に調製し、赤色蛍光を発するローダミン系、シアニン系の蛍光色素を標識した候補センサーの作製と性能評価を 1 週間で 1,000 種類以上行った。その結果、ピーク波長 670 nm の蛍光を発する長波長型蛍光性センサー等、有望な候補センサーを取得することができた。取得した候補センサーについて、グルタミン酸に対する親和性や最大蛍光強度変化率といった反応特性を評価し、in vivo イメージングに適用する際の選定基準となる基礎データを取得した。

本技術を様々なグリア伝達物質の機能解析に発展させられることを着想し、主要なグリア伝達物質である ATP に対する蛍光性センサーの開発にも成功した。

蛍光性センサーのシナプス近傍への配置技術の開発

蛍光性グルタミン酸センサーを生きたマウス脳内の神経細胞膜上へ選択的に配置させる技術の開発を行った。そのために、神経細胞の膜上分子と結合する 16 種類の組換えタンパク質を選定し、試験管内で各々の組換えタンパク質と蛍光性センサーとをピオチン、ストレプトアビジンを介して架橋した蛍光性センサー複合体を調製後、生きたマウス大脳皮質内に蛍光性センサー複合体をインジェクションし、二光子励起顕微鏡を用いた高精細なイメージングによって蛍光性セン

サーの神経細胞膜上への標識の成否を評価した。その結果、神経細胞に対して高い標識効率を有し、in vivo 蛍光イメージングを行う上で十分な蛍光量を確保できる蛍光性センサー複合体候補を見出すことができた。次に、有望な蛍光性センサー複合体候補を神経細胞とグリア細胞の共培養標本に添加し、神経細胞とグリア細胞を免疫染色によって染め分けることで、蛍光性センサーが神経細胞膜上へ選択的に標識されているかを評価した。その結果、蛍光性センサーはグリア細胞膜上に標識されておらず、神経細胞膜上へ選択的に配置されている染色像を確認することができた。さらに、蛍光性センサーのシナプス近傍への局在性を評価するために、超解像顕微鏡 STORM で培養標本を観察した。その結果、蛍光性センサーがシナプスやその近傍に配置されていることを確認することができた。

マウス大脳皮質での in vivo グルタミン酸イメージング

生きたマウス脳内のシナプス近傍でのグルタミン酸の時空間動態の可視化を試みた。マウスに頭蓋骨開窓手術を行った後、ガラスピペットを大脳皮質の第 2/3 層まで挿入し、蛍光性センサー複合体を導入した。その結果、大脳皮質の第 2/3 層一帯の神経細胞の膜上へ選択的に蛍光性センサーを配置させることができた。この際、蛍光性センサーにポリエチレングリコール構造の付加修飾を施すことで、脳内環境において長時間安定的な測定が可能になることを見出した。この標本に対して、大脳皮質を電気刺激することでアストロサイトの活性化を伴う脳病態環境を再現した。この際に、蛍光実体顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行った結果、グルタミン酸蛍光性センサーの蛍光変化を捉えることに成功した。

マウス大脳皮質での in vivo Ca^{2+} イメージング

蛍光性グルタミン酸センサーの蛍光変化が神経細胞の放出に由来するのか、アストロサイトのグリア伝達物質の放出に由来するのかを検証するために、蛍光性 Ca^{2+} センサー YellowCameleon を神経細胞およびアストロサイト選択的に発現させたトランスジェニックマウスを開発し、大脳皮質を電気刺激した際の神経細胞およびアストロサイトの活動を in vivo Ca^{2+} イメージングによって評価した。その結果、神経細胞とアストロサイトとで活性化パターンが異なることが明らかになった。

本研究で開発したグルタミン酸および Ca^{2+} に対する in vivo イメージング技術を組み合わせることで生きたマウス脳内でのグルタミン酸の時空間動態と各種細胞の活性化パターンとの比較解析が可能になり、in vivo 環境における脳内グリア伝達物質の生

理機能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)

[学会発表](計 3 件)

瀧川健司、関谷敬、佐藤要、北島奈美、高木美貴、金丸和典、坂本寛和、並木繁行、田中謙二、廣瀬謙造、飯野正光、大脳皮質における細胞外 ATP 動態を可視化する in vivo イメージングシステムの開発、第 38 回日本神経科学大会、2015 年(平成 27 年)7 月 29 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

瀧川健司、関谷敬、佐藤要、高木美貴、北島奈美、金丸和典、坂本寛和、並木繁行、山澤徳志子、田中謙二、廣瀬謙造、飯野正光、大脳皮質における細胞外 ATP 動態を可視化する in vivo イメージング技術の開発、第 89 回日本薬理学会年会 2016 年(平成 28 年)3 月 10 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

関谷敬、瀧川健司、佐藤要、高木美貴、北島奈美、山澤徳志子、坂本寛和、並木繁行、金丸和典、田中謙二、廣瀬謙造、飯野正光、脳梗塞におけるアストロサイトの神経保護作用の生体内可視化解析、第 90 回日本薬理学会年会 2017 年(平成 29 年)3 月 17 日、長崎パブリックホール(長崎県長崎市)

[その他]

東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学教室ホームページ
<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生物学教室ホームページ
<http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧川 健司 (TAKIKAWA, Kenji)
東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員
研究者番号: 60749274

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし