

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07316

研究課題名(和文)脳細胞カルシウムシグナルの空間的分離とデコーディング

研究課題名(英文)Spatial separation and decoding of brain cell calcium signals

研究代表者

坂内 博子(Bannai, Hiroko)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40332340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生物はCa<sup>2+</sup>を伝達物質として用いて、多様な生理機能の誘導を可能にしている。しかし、Ca<sup>2+</sup>がどのように多様な情報をエンコードしているかについては、未解明の点が多い。我々は、「local Ca<sup>2+</sup>センサー」を作成し、従来法では判別できなかったCa<sup>2+</sup>シグナルの由来を特定し、Ca<sup>2+</sup>シグナルの多様性を記述するためのlocal Ca<sup>2+</sup>センサーを開発した。このlocal Ca<sup>2+</sup>センサーを利用して脳の制御を担うグリア細胞アストロサイトの自発的Ca<sup>2+</sup>シグナルを解析し、海馬アストロサイトのCa<sup>2+</sup>恒常性を維持するメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Ca<sup>2+</sup>シグナル由来の特定が可能になったことで、細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルがより精度高く記述できるようになった。これにより、アストロサイトでは従来の予想とは全く異なるCa<sup>2+</sup>恒常性の維持機構が明らかになった。「たった一種類の伝達物質Ca<sup>2+</sup>がいかにして多種多様な生命現象を誘導することができるのか」ということは生命科学の本質的な問題である。本研究成果を動物個体、植物、細胞など様々な階層で応用できれば、Ca<sup>2+</sup>シグナルに込められた生命暗号の一端が解読でき、Ca<sup>2+</sup>シグナルに関わる生命現象の普遍的な理解に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Organisms use Ca<sup>2+</sup> as a transmitter to induce diverse physiological functions. However, it remains unclear how Ca<sup>2+</sup> encodes diverse information. We created “local Ca<sup>2+</sup> sensors” that enable us to identify the origin of Ca<sup>2+</sup> signals and to describe the diversity of Ca<sup>2+</sup> signals. Using local Ca<sup>2+</sup> sensors, we analyzed the spontaneous Ca<sup>2+</sup> signals in the astrocyte, which is important for the regulation of the brain. We elucidated the molecular mechanisms underlying the maintain Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal astrocytes.

研究分野：生物物理学

キーワード：カルシウムイメージング カルシウムシグナル 細胞 アストロサイト カルシウムチャネル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )の増減「 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル」は、細胞の外界からの情報を適切な生理応答へと変換する役割を担う、普遍的な細胞内シグナルである。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは単一のメッセンジャーでありながら、複数のメッセージを生命暗号として発信することにより多様な生理機能の誘導を可能にする。しかしながら、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルがどのように特定のエフェクター分子を特異的に活性化してシナプス伝達効率の増強・抑圧の選択的な誘導を可能にするのか、そのメカニズムは未だに解明されていない。また、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの由来まで明らかにできる  $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法がこれまで存在しなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの時空間的パターンの精密な解析と、そのパターンを形成するシグナル分子機構の解明を目指す。細胞局所の  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを独立に追跡するための「Local  $\text{Ca}^{2+}$ センサー」を作成し、従来法では判別できなかった  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの多様性を記述するための新解析法を確立する。カルシウムシグナルのパターンを再現して、期待される生命現象が引き起こされるか否かを検討する。

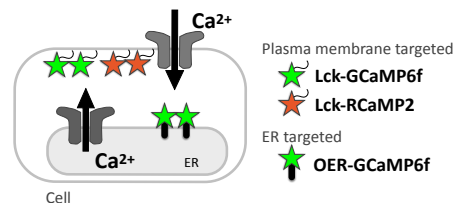
### 3. 研究の方法

$\text{Ca}^{2+}$ 流入と  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を区別できる遺伝子コード型 local  $\text{Ca}^{2+}$ センサーの開発とイメージング系の構築を行う。この local  $\text{Ca}^{2+}$ センサーを利用して、神経細胞やグリア細胞がある刺激に応答する際の  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの由来を特定する。

### 4. 研究成果

#### (1) Local $\text{Ca}^{2+}$ センサーの開発 (Niwa et al. BBRC 2016)

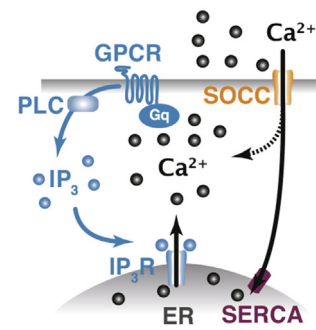
$\text{Ca}^{2+}$ ストアである細胞内小胞体(ER)膜の細胞質側に遺伝子コード型  $\text{Ca}^{2+}$ センサー(GECI)を標的とした「ER 標的型センサー」を新たに作成した。この「ER 標的型センサー」は、既存の  $\text{Ca}^{2+}$ センサーに比べて、より高感度で時間解像度良く  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を検出できることが分かった。また、生きた線虫個体内でも、「ER 標的型センサー」を用いた1細胞レベルの  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングが可能であった。さらに、げっ歯類海馬アストロサイトの自発的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを調べたところ、「細胞膜標的型センサー(Lck-GCaMP6f)」の方が「ER 標的型センサー(OER-GCaMP6f)」より高頻度で  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを検出することがわかった。この結果は、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは従来の予測に反して、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入成分が多い可能性を示している。



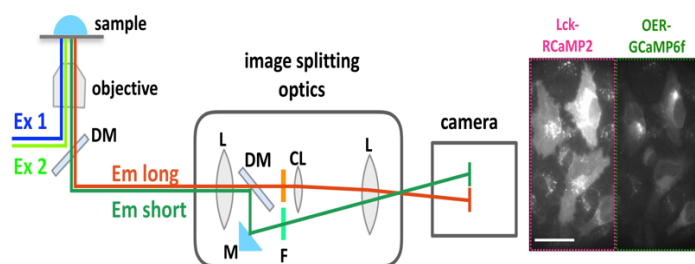
また国際共同研究において、この OER-GCaMP6f を HEK293 細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を特異的に感度良く認識する実験に活用した。(Vervliet et al. Biochem. Pharmacol. 2017)

#### (2) アストロサイトの自発的 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの分子機構の解明 (Sakuragi et al. BBRC 2017)

(1)の研究でアストロサイトの自発的Ca<sup>2+</sup>の由来が主にCa<sup>2+</sup>流入であることが明らかになったが、どのCa<sup>2+</sup>チャンネルが関わっているかは明らかになっていなかった。阻害剤を用いた実験から、Ca<sup>2+</sup>流入を起こす直接のチャンネルはStore operated Ca<sup>2+</sup> channel (SOCC)であることがわかった。しかし、Ca<sup>2+</sup>ストアの枯渇やCa<sup>2+</sup>放出経路の阻害によっても自発的Ca<sup>2+</sup>シグナルは停止することから、アストロサイトの自発的Ca<sup>2+</sup>シグナルはCa<sup>2+</sup>流入とCa<sup>2+</sup>放出の連携によって引き起こされることが明らかになった。従来SOCCは細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫が枯渇したときに活性化されるとされてきた。しかし本研究の結果は、海馬アストロサイトではERが枯渇しない状態でもSOCCが恒常的に活性化され、ERのCa<sup>2+</sup>量を一定に保つことに貢献していることを示している。



(3) 細胞内の複数箇所のCa<sup>2+</sup>シグナルの同時計測系の確立 (Bannai et al. J Vis Exp, 2019)  
 同一細胞で2カ所同時でのCa<sup>2+</sup>シグナル測定を可能にするために、波長の異なるセンサーを利用して細胞膜とER膜の同時カルシウムイメージングの技術を確立した。細胞膜に標的したRCaMP2 (Lck-RCaMP2)とER膜に標的したGCaMP6f (OER-GCaMP6f)を同一細胞で、同時に観察できる測定系を確立した。広い視野をもつCMOSカメラとイメージスプリッティング光学系の組み合わせにより、時空間的に高い解像度で、Ca<sup>2+</sup>シグナルの発生パターンを記録することができた。この測定系を用いてHeLa細胞のHistamine刺激に対する応答を観察したところ、細胞膜に標的したセンサーは長期間持続したCa<sup>2+</sup>シグナルを示すのに対し、ER膜標的センサーは速やかなCa<sup>2+</sup>シグナルの低下を示した。この結果は、同じ刺激をうけても、Ca<sup>2+</sup>シグナルは細胞の局所ドメインごとに異なる挙動を示すということを意味している。さらに、Local Ca<sup>2+</sup>センサーの発現ベクターを、すべてアデノ随伴ウイルス(AAV)へと移行した。それにより、従来のプラスミドベクターに比べて神経細胞・グリア細胞におけるセンサー発現効率が大幅に上昇した。



(4) アストロサイトの微小カルシウムシグナルの検出 (未発表)

興奮性神経伝達を担うAMPA受容体はごくわずかであるが、アストロサイトに発現している。ドイツDusseldorf大学Nikolaj Klöckerとの国際共同研究でアストロサイトのAMPA受容体を解析したところ、Ca<sup>2+</sup>透過性のAMPA受容体が存在する可能性が示唆された。そこで、Local Ca<sup>2+</sup>センサーを用いて細胞膜近傍のカルシウム流入を感度よく検出したところ、たしかにAMPA受容体からのCa<sup>2+</sup>流入が検出された。先行研究では、小脳バグマングリアにおいて、AMPA受容体由来のCa<sup>2+</sup>シグナルが存在し、重要な役割を担うことが報告されていた。本研究により、海馬アストロサイトにも、AMPA受容体由来のCa<sup>2+</sup>シグナルが存在する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bannai Hiroko, Hirose Matsumi, Niwa Fumihiko, Mikoshiba Katsuhiko	4. 巻 145
2. 論文標題 Dissection of Local Ca <sup>2+</sup> Signals in Cultured Cells by Membrane-targeted Ca <sup>2+</sup> Indicators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.3791/59246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bannai Hiroko	4. 巻 129
2. 論文標題 Molecular membrane dynamics: Insights into synaptic function and neuropathological disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 47～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2017.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bannai H.	4. 巻 129
2. 論文標題 Molecular membrane dynamics: Insights into synaptic function and neuropathological disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 47-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1016/j.neures.2017.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakuragi S, Niwa F, Oda Y, Mikoshiba K, Bannai H.	4. 巻 486
2. 論文標題 Astroglial Ca <sup>2+</sup> signaling is generated by the coordination of IP3R and store-operated Ca <sup>2+</sup> channels.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 879-885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 V Vervliet T, Pintelon I, Welkenhuyzen K, Bootman MD, Bannai H, Mikoshiba K, Martinet W, Nadif Kasri N, Parys JB, Bultynck G.	4. 巻 132
2. 論文標題 Basal ryanodine receptor activity suppresses autophagic flux.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 133-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1016/j.bcp.2017.03.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakuragi S, Niwa F, Oda Y, Mikoshiba K, Bannai H	4. 巻 486
2. 論文標題 Astroglial Ca <sup>2+</sup> signaling is generated by the coordination of IP3R and store-operated Ca <sup>2+</sup> channels	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 879-885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1016/j.bbrc.2017.03.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vervliet T, Pintelon I, Welkenhuyzen K, Bootman MD, Bannai H, Mikoshiba K, Martinet W, Nadif Kasri N, Parys JB, Bultynck G	4. 巻 132
2. 論文標題 Basal ryanodine receptor activity suppresses autophagic flux.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 133-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sherwood MW, Arizono M, Hisatsune C, Bannai H, Ebisui E, Sherwood JL, Panatier A, Olier SH, Mikoshiba K	4. 巻 65
2. 論文標題 Astrocytic IP3Rs: Contribution to Ca <sup>2+</sup> signalling and hippocampal LTP.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 502-513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/glia.23107.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Niwa F, Sakuragi S, Kobayashi A, Takagi S, Oda Y, Bannai H, Mikoshiba K	4. 巻 479
2. 論文標題 Dissection of local Ca(2+) signals inside cytosol by ER-targeted Ca(2+) indicator.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 67-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丹羽史尋, 坂内博子, 御子柴克彦	4. 巻 34
2. 論文標題 「2つのシグナル物質の使い分けによる正反対の神経制御—新たな抑制性シナプス伝達制御メカニズムの発見」	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2190-2193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丹羽 史尋, 坂内 博子, 御子柴克彦	4. 巻 147
2. 論文標題 小胞体からのカルシウム放出によるGABA作動性シナプス構造の安定化	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 184-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.147.184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hiroko Bannai, Misa Kanatani, Sumihiro Maeda, Matsumi Hirose, Akihiko Takashima, Katsuhiko Mikoshiba
2. 発表標題 "Approach to neurodegenerative disease by singularity biology"
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（日本、岡山）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Bannai
2. 発表標題 "Deciphering the cell individuality of a cell by single molecule analysis of membrane molecule dynamics -What molecular behavior tells us about brain?-
3. 学会等名 MPFI-JST(PRESTO) Joint Workshop on Neuroscience and Single Cell Analysis, Jupiter FL USA, 2018/10/29-30 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Bannai, Misa Kanatani, Sumihiro Maeda, Matsumi Hirose, Akihiko Takashima, Katsuhiko Mikoshiba
2. 発表標題 "Approach to role of physiological Tau protein by single molecule analysis of membrane molecule dynamics "
3. 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine (日本、宇部)2018/12/6-8 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Bannai
2. 発表標題 "Physiology and pathology of brains revealed by single molecule imaging"
3. 学会等名 Keynote lecture in OIST Joint Minisymposium with The 16th International Membrane Research Forum Okinawa, 沖縄、2019/3/18-20 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroko Bannai, Fumihiro Niwa, Shigeo Sakuragi, Katsuhiko Mikoshiba
2. 発表標題 A new approach to decoding of Ca <sup>2+</sup> signals in a single cell
3. 学会等名 第54回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 BANNAI Hiroko, Fumihiro Niwa, Shigeo Sakuragi, Katsuhiko Mikoshiba
2. 発表標題 Molecular mechanism supporting brain functions revealed by single molecule dynamics and subcellular Ca <sup>2+</sup> signaling
3. 学会等名 11th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂内博子、御子柴克彦
2. 発表標題 Physiology and pathology of the brain revealed by single molecule dynamics
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂内博子、丹羽史尋、有菌美沙、御子柴克彦
2. 発表標題 Deciphering the property of individual cells by single molecule analysis of membrane molecule dynamics
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 坂内博子
2. 発表標題 細胞膜分子動態が語る脳のしくみ
3. 学会等名 第8回生命情報若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 坂内博子
2. 発表標題 分子のふるまいから読み解く、脳のしくみ
3. 学会等名 日仏生物学会主催一般公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroko Bannai
2. 発表標題 APPROACH TO THE BRAIN FUNCTION BY IMAGING SINGLE MOLECULE BEHAVIOR IN SINGLE, LIVING CELLS
3. 学会等名 International Conference on Single Cell Research 2016（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroko Bannai
2. 発表標題 Physiology and pathology of brains revealed by single molecule imaging
3. 学会等名 OIST Joint Minisymposium with The 16th International Membrane Research Forum Okinawa（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroko Bannai
2. 発表標題 Physiology and pathology of brains revealed by single molecule imaging
3. 学会等名 7th Chinese Biophysics Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂内博子
2. 発表標題 1分子イメージングで読み解く脳の生理と病理
3. 学会等名 和光-精神神経懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----