

平成22年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2005～2008

課題番号：17109003

研究課題名(和文) 動的細胞内シグナルの可視化研究

研究課題名(英文) Imaging Study of Dynamic Cellular Signaling

研究代表者

飯野 正光 (IINO MASAMITSU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50133939

研究成果の概要(和文)：カルシウムは、骨を構成する成分として重要なだけでなく、細胞内で機能をオン・オフするスイッチとして働いています。本研究では、脳などにおけるカルシウムのスイッチング・メカニズムを、特にスイッチされる現場を目で見る方法も活用して研究を行いました。これにより、神経回路を使い続けることが回路の機能維持に大事なことや、グリア細胞が神経細胞の伸びを助けるメカニズムなど、脳の働きに関する重要な発見がありました。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺ makes bones strong but is also a “switch” for cellular functions. We studied the switching mechanism of Ca²⁺ in the brain and other tissues making use of imaging methods to visualize the switching events. We found new Ca²⁺ switch-dependent mechanisms in the following functions. To keep using neural circuit is required for its maintenance. Glial cells support neuron to extend their processes. Thus, the present study shed new light on the functions of the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	35,700,000	10,710,000	46,410,000
2006年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2007年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2008年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
年度			
総計	76,800,000	23,040,000	99,840,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：細胞内情報伝達、ニューロン・シナプス機能

1. 研究開始当初の背景

生命の基盤となる細胞機能は、構成する分子群の相互作用によって担われており、それをシグナル分子が「時間的」および「空間的」

枠組みの中で制御している。シグナル分子の時間的・空間的動態を解析することは重要だが困難であり、21世紀生命科学の主要な研究課題となっている。このためには、多方面か

らの研究手法を総合的に駆使することが必要であり、とりわけシグナル分子の可視化法は、時空間的枠組みを理解する上で極めて強力な方法論である。

2. 研究の目的

本研究では、 Ca^{2+} シグナルとそれに関連するシグナル伝達系に焦点を絞り、シグナル分子可視化法と新たに開発する分子遺伝学的 Ca^{2+} シグナル抑制法を有機的に結合して、時空間的な枠組みの中でシグナル伝達を明らかにする。更にこの解析法を切り口として、 Ca^{2+} シグナル制御を受ける未知細胞機能の解析を強力に推進する。

3. 研究の方法

当研究室で開発した可視化プローブ (IP_3 , NO, 小胞体内腔 Ca^{2+} , グルタミン酸など) と、高度な光学顕微鏡法を用い、シグナル伝達の時空間解析を進める。特に、小脳プルキンエ細胞におけるシナプス伝達機構について分子基盤を追究する。また、組織特異的に IP_3 - Ca^{2+} シグナル系をマウスで抑制し、その意義を細胞・組織・個体レベルで詳細に解析する。

4. 研究成果

1) シナプス強度の活動依存的維持機構

小脳平行線維→プルキンエ細胞シナプスには、電気的な信号を受け渡すイオンチャネル型グルタミン酸受容体の他に代謝型グルタミン酸受容体が存在する。特異的 IP_3 加水分解酵素発現により、代謝型グルタミン酸受容体下流の IP_3 シグナル機構を抑制したところ、平行線維終末からのグルタミン酸放出低下によるシナプス伝達効率の低下が観測された。さらに、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が逆行性シグナルとして関与することが示された (図1)。すなわち、代謝型グルタミン酸受容体は、シナプスの活性化状態をモニターしてシナプスの機能維持に関与している。

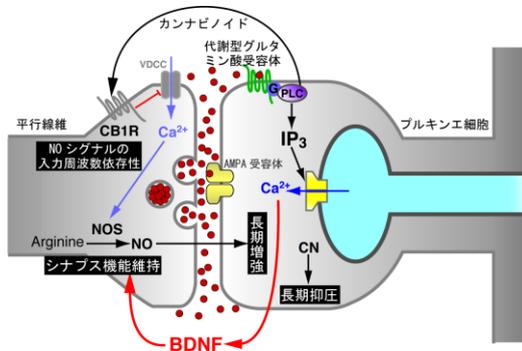


図1. 小脳平行線維→プルキンエ細胞シナプスにおいて本研究により明らかにされたシグナル伝達

2) シナプス可塑性の分子機構

平行線維→プルキンエ細胞シナプスには

運動学習に関連する可塑的变化が見られる。まず、一酸化窒素 (NO) シグナルと可塑性の関係を追及した。新規 NO プローブ (HBR-GFP) を用い、平行線維由来 NO シグナルの可視化に成功した。ガス性シグナル分子である NO は産生部位から数百 μm 程度拡散すると考えられていた。しかし、可視化により、NO はシナプス特異的なシグナルとして機能することが明らかになった。さらに、NO シグナル強度は平行線維刺激周波数に対して二相性に依存し 1 Hz において最高強度がえられ、高周波数刺激では内因性カンナビノイドを介した逆行性シグナルにより NO シグナルは低下する (図1)。しかも、NO はシナプス伝達の長期増強を起し、これにも同様なシナプス特異性と刺激周波数依存性があることを明らかにした。加えて、同シナプスにおいてカルシニューリンが長期抑圧形成に関与することを明らかにした (図1)。

3) アストロサイト・神経細胞相互作用

アストロサイトにおける自発 Ca^{2+} オシレーションの機能的意義を検索するため、 IP_3 加水分解酵素をアストロサイトに導入して Ca^{2+} オシレーションを止め、神経伸長に対する影響を解析した。その結果、自発 Ca^{2+} オシレーションは、アストロサイト表面の分子発現を制御することにより、神経伸長を維持していることが明らかとなった。

4) Ca^{2+} オシレーション形成機構の解明

Ca^{2+} オシレーションは Ca^{2+} シグナルの効率化に役立っている。しかし、 Ca^{2+} 濃度が振動する機序は明らかでなかった。タンパク質性 Ca^{2+} インジケータを新たに作製し、小胞体およびミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度と細胞質 Ca^{2+} 濃度を比較することに成功した。これにより、小胞体から放出された Ca^{2+} は一旦ミトコンドリアに移動し、その後徐々に放出される。これが引き金となって、周期的に小胞体から Ca^{2+} 放出が繰り返されるメカニズムが明らかになった。

5) 細胞間接触情報としての Ca^{2+} 雷光

細胞間接触部位にのみ見られる全く新しいタイプの Ca^{2+} シグナル “ Ca^{2+} lightning” (Ca^{2+} 雷光) を発見した。さらに、 Ca^{2+} 雷光は、 Ca^{2+} 依存性チロシン酸化酵素 PYK2 を活性化して細胞の葉状仮足の退縮を誘導することを明らかにした。 Ca^{2+} 雷光は、細胞間の接触を検知するメカニズムとして機能していると考えられる。

6) グルタミン酸シグナルの可視化解析

興奮性伝達物質であるグルタミン酸の可視化プローブを新たに作製し、これを小脳スライス標本の測定に応用することに成功し

た。これにより、シナプス間隙外のグルタミン酸動態を始めて可視化することに成功した(学会発表)。さらに、本方法を生体内測定に適用すべく、生きたラットの脳皮質でのグルタミン酸シグナル測定に挑戦して成功している(学会発表)。これは中枢神経シナプスの活動状況を解析する全く新しい方法として、今後の解析に大きなインパクトを与えると考えられる。

7) 細胞間多様性のメカニズム解析

同じ遺伝的背景を有している細胞間でも発現型に大きな差が見られることがある。リアノジン受容体を介するCa²⁺応答について、細胞間多様性機構を解析した。その結果、リアノジン受容体の実効的発現量のわずかな差が、Ca²⁺によるCa²⁺放出機構による正帰還によって全か無かのCa²⁺応答を引き起こすことを明らかにした。さらに、この全か無かの状態は恒常的なものではなく、数十時間周期で切り替わることを明らかにした。以上の結果は、細胞分化などにおける運命決定に同様の正帰還メカニズムが何らかの役割を果たすことを示唆する。

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13件)
以下すべて査読あり。

- 1) Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Inuma, S., Yamasaki, M., Watanabe, M., Hirose, K. and Iino, M. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 107, 6526-6531, 2010.
- 2) Nakamura, N., Yamazawa, T., Okubo, Y., and Iino, M. Temporal switching and cell-to-cell variability in Ca²⁺ release activity in mammalian cells. **Mol. Syst. Biol.**, 5:247, 1-10, 2009.
- 3) Kakizawa, S., Moriguchi, S., Ikeda, A., Iino, M. and Takeshima, H. Functional crosstalk between cell-surface and intracellular channels mediated by junctophilins essential for neuronal functions. **Cerebellum** 7, 385-391, 2008.
- 4) Iino, M. Identification of new functions of Ca²⁺ release from intracellular stores in central nervous system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 369, 220-224, 2008
- 5) Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K. and Iino, M. Regulation of neurite growth by spontaneous Ca²⁺ oscillations in astrocytes. **J. Neurosci.** 27, 8957-8966, 2007.
- 6) Fujiwara, A., Kakizawa, S. and Iino, M. Induction of cerebellar long-term depression requires activation of calcineurin in Purkinje cells. **Neuropharmacology** 52, 1663-1670, 2007.
- 7) Namiki, S., Sakamoto, H., Inuma, S., Iino, M. and Hirose, K. Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission. **Eur. J. Neurosci.** 25, 2249-2259, 2007.
- 8) Kakizawa, S., Kishimoto, Y., Hashimoto, K., Miyazaki, T., Furutani, K., Shimizu, H., Fukaya, M., Nishi, M., Sakagami, H., Ikeda, A., Kondo, H., Kano, M., Watanabe, M., Iino, M. and Takeshima, H. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. **EMBO J.** 26, 1924-1933, 2007.
- 9) Hashido, M., Hayashi, K., Hirose, K. and Iino, M. Ca²⁺ lightning conveys cell-cell contact information inside the cells. **EMBO Rep.** 7, 1117-1123, 2006.
- 10) Furutani, K., Okubo, Y., Kakizawa, S. and Iino, M. Postsynaptic inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains presynaptic function of parallel fiber-Purkinje cell synapses via BDNF. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 103, 8528-8533, 2006.
- 11) Ishii, K., Hirose, K. and Iino, M. Ca²⁺ shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca²⁺ oscillations. **EMBO Rep.** 7, 390-396, 2006.
- 12) Namiki, S., Kakizawa, S., Hirose, K. and Iino, M. NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. **J. Physiol.** 566, 849-863, 2005.
- 13) Hashimoto, A., Hirose, K. and Iino, M. BAD detects coincidence of G2/M Phase and growth factor deprivation to regulate apoptosis. **J. Biol. Chem.** 280, 26225-26232, 2005.

[学会発表] (計 112 件)
以下 20 件抜粋

- 1) Iino, M., NO activation of RyRs in the brain, Gordon Research Conference, 2009年6月16日, Waterville Valley Resort, NH, USA
- 2) Iino, M., Intracellular Ca^{2+} release mechanisms and central nervous system functions, 4th Japan-China Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology, 2009年3月18日, パシフィコ横浜, 横浜市
- 3) Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K., and Iino, M., Regulation of neurite growth by spontaneous Ca^{2+} oscillations in astrocytes, The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008年11月17日, Washington Convention Center, Washington DC, USA
- 4) Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Sho Inuma, Hirose, K., and Iino, M., In vivo imaging of intercellular messengers released from neurons, The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008年11月16日, Washington Convention Center, Washington DC, USA
- 5) Iino, M., Functional roles of IP_3 -induced Ca^{2+} release in the central nervous system, Yamagata International Symposium, 2008年5月24日, 山形テルサ, 山形市
- 6) Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K. and Iino, M., Regulation of Neurite Growth by Spontaneous Ca^{2+} Oscillations in Astrocytes, The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2007年11月5日, San Diego Convention Center, San Diego, USA
- 7) Kakizawa, S., Kishimoto, Y., Hashimoto, K., Miyazaki, T., Furutani, K., Shimizu, H., Fukaya, M., Nishi, M., Sakagami, H., Ikeda, A., Kondo, K., Kano, M., Watanabe, M., Iino, M. and Takeshima, H., Junctophilin-mediated functional crosstalk between ryanodine receptors and SK channels essential for cerebellar long-term depression, The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2007年11月3日, San Diego Convention Center, San Diego, USA
- 8) Iino, M., Roles of IP_3 -induced Ca^{2+} release in the regulation of synaptic functions and neuron-glia interactions, 統合脳シンポジウ

ム, 2007年8月22日, 北海道厚生年金会館, 札幌

- 9) Sekiya, H., Okubo, Y., and Iino, M., Visualization of cerebrovascular movement by two-photon microscopy, The 5th US/Japan Workshop on Molecular and Cellular Aspects of Vascular Smooth Muscle Function, 2007年1月9日, Outrigger Keahou Beach Resort, Hawaii, USA
- 10) Iino, M., Synaptic maintenance by activity dependent IP_3 - Ca^{2+} signaling in cerebellar Purkinje cells, FAOPS 2006 (The 6th Congress of the Federation of Asian and Oseanian Physiological Societies), 2006年10月18日, JW Marriott Hotel, Seoul, Korea
- 11) Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Sho Inuma, Hirose, K. and Iino, M., Visualization of Glutamate Spillover from Synaptic Clefts Using a Novel Fluorescent Glutamate Indicator, The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2006年10月18日, Georgia World Congress Center, Atlanta, USA
- 12) Iino, M., Cell signaling downstream of cell-cell contact, FAOPS 2006 (The 6th Congress of the Federation of Asian and Oseanian Physiological Societies), 2006年10月17日, JW Marriott Hotel, Seoul, Korea
- 13) Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K., and Iino, M., Spontaneous Ca^{2+} signals in astrocytes promote neurite outgrowth, The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2006年10月17日, Georgia World Congress Center, Atlanta, USA
- 14) Furutani, K., Okubo, Y., Kakizawa, S., and Iino, M., Metabotropic glutamate receptor-mediated postsynaptic inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains presynaptic function of parallel fiber-Purkinje cell synapses via BDNF, 5th Forum of European Neuroscience, 2006年7月9日, Austria Center Vienna, Vienna, Austria
- 15) Kakizawa S., Namiki, S., Hirose, K. and Iino, M., Visualization of nitric oxide signaling inducing input-specific and frequency-dependent long-term potentiation of parallel-fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum, 5th Forum of European Neuroscience, 2006年7月9日, Austria Center Vienna, Vienna, Austria

(3) 連携研究者
なし

- 16) Iino, M., Mechanisms of IP₃ receptor-mediated Ca²⁺ oscillations, Gordon Research Conference, 2006年6月7日, Colby-Sawyer College, New London, USA
- 17) Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K., Iino, M., Spontaneous Ca²⁺ transients in astrocytes promote neurite outgrowth, The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月14日, Washington Convention Center, Washington D.C., USA
- 18) Kakizawa, S., Namiki, S., Hirose, K. and Iino, M., Visualization of nitric oxide signaling inducing input-specific and frequency-dependent long-term potentiation in the mouse cerebellum, The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月14日, Washington Convention Center, Washington D.C., USA
- 19) Furutani, K., Okubo, Y., Kakizawa, S., and Iino, M., Maintenance of presynaptic function of cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses by metabotropic glutamate receptor-mediated postsynaptic activity, The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月12日, Washington Convention Center, Washington D.C., USA
- 20) Iino, M., Regulation of cell function by Ca²⁺ oscillation, International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, 2005年10月27日, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市

[その他]

ホームページ:

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

新聞掲載:

朝日新聞 2006年5月25日夕刊
「勘が鈍る」科学で立証

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野正光 (IINO MASAMITSU)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50133939

(2) 研究分担者

なし