

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2006～2008  
課題番号：18350044  
研究課題名（和文） 脳を対象とするその場分子センシング法の新展開と脳機能計測への応用  
研究課題名（英文） Development of in situ molecular sensing methods and its application to brains  
研究代表者  
菅原 正雄 (SUGAWARA MASAO)  
日本大学・文理学部・教授  
研究者番号： 50002176

## 研究成果の概要：

哺乳類大脳の海馬領域は記憶・学習に関与しているとされる。海馬の神経領野で放出される情報伝達分子を高感度に検出する計測法の開発を行い、実際に、神経伝達分子であるグルタミン酸を計測し、海馬内での分布、時間的変化、濃度などを明らかにした。さらに、神経ペプチドを高感度に検出するアレイ型人工細胞センサーおよび無機チャンネルセンサーを開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：生体分析，急性脳スライス，神経伝達物質，L-グルタミン酸，マイクロセンサー，可視イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生きた脳組織内の情報伝達物質を対象として、生理条件に極めて近い条件で使用できるその場検知法を開発することは、これまで適切なセンシング法が無かったために推論に基づいていた脳機能の機序を、その機序に直接関る物質の動態から解明するための有用な、優れた道具を提供することになる。そ

れらを積極的に活用することにより脳機能に対する分子論的根拠の提出と新たな現象の発見が期待される。本研究で対象とするテーマの一つである脳海馬での長期増強現象（LTP）はその分子機構（前膜説と後膜説）に関する膨大な研究がこの30年来行われてきたにもかかわらず未だ決着がつかっていない

分野である。高感度、かつ超微小なグルタミン酸計測法及び可視イメージング法の開発によって、人工的にLTPを誘導した前後のグルタミン酸濃度を目的とする場所(組織)において、すなわち機能単位である領野ごとに直接、かつ精度よく定量することが可能となる。また、抑制性神経伝達物質 GABA と興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸放出の相互の関係は、近年特にその機構が注目されている領域である。両神経伝達物質の連関を解明するための高感度センシング法の創製は、脳研究に物質化学的基盤を与えるための新しい道具となる。

## 2. 研究の目的

哺乳類脳内では、様々な情報伝達物質は局所領域に放出され、その分布や濃度が時々刻々変化する。従って“生きた”脳スライス組織を計測する場合は、脳組織その場で、しかも対象とする局所組織及び化学系にできる限り摂動を加えない分析法が必要となる。本研究では、脳研究に必須であり、しかも最も *in vivo*に近いモデル系である急性(acute)スライスを対象に、電気生理学的手法と化学的物質検知法との融合を行うことにより、高度に生理適合性のある、即ち計測結果が自然条件下で活動する神経系の発現する現象に直接関連づけることが可能なその場物質検出法を開発し、それらを用いて脳機能の解明に寄与することを目的とする。さらに、(ii)多様、複雑な脳機能を解明するために、グルタミン酸以外の情報伝達物質について急性脳スライスを対象とした高感度、高選択な *in situ* 及び *ex situ* センシング法を提案、それらを脳研究に役立つ道具として普及させる。

## 3. 研究の方法

### (1) ガラスキャピラリー酵素センサー

申請者らが開発した、海馬の局所領域で高

感度検出が可能な超微小グルタミン酸センサー(センサー先端直径  $10\mu\text{m}$  程度)を界面チャンバー内の海馬スライスに適応し、電極をスライス内へ直接挿入して微弱電気刺激及び化学刺激下での測定を行うことができるキャピラリーセンサー計測システムを構築する。これまで脳海馬スライス内のグルタミン酸の検出は、何れも溶液に浸漬した急性(acute)海馬スライス、培養神経組織などを用いて、グルタミン酸が神経シナプスクレフトから細胞外液へ漏れ出(spill over)して溶液へ放出された濃度を検出している。そのために、生理条件を超える過度の刺激によるグルタミン酸の放出を検出するのに応用されている。一方、LTPのように生理現象レベルの弱い電気刺激によって放出されるグルタミン酸を検出するためには、電極を直接スライス内へ挿入、神経細胞に近づけることが必須と考えられる。それには界面タイプのスライスを用いることが必要である。

### (2) 酵素分子膜イメージング法

上述(1)の微小センサーを用いるアプローチは、脳海馬スライスの特定の領野(単点)におけるグルタミン酸濃度を定量的にあたえるが、一方、海馬スライスの各領野(多点)で放出されるグルタミン酸を同時に *real time* に計測することも脳機能の解明に必要である。グルタミン酸放出を可視イメージングするために、化学的摂動の少ない分子膜の開発と最適化を行い、それをマウス脳スライス内のグルタミン酸放出のイメージングに応用する。

### (3) 生体膜グルタミン酸センサー

急性脳スライスを対象にLTP時の微弱な電気及び化学“基本”刺激に基づくグルタミン酸放出を特定領野内の微小領域で検出できるセンサーを、グルタミン酸受容体イオンチャンネル(GluR)を含む生体膜を感応膜に用いて開発する。生体膜あるいは生体膜中のバ

イオ素子を認識素子として用いる生体膜センサーは、nM レベルの生体物質に高感度に、かつ特異的に応答する。多数個の GluRs を含む生体膜センサーは、nM レベルのグルタミン酸を検知できる可能性があり、さらに数十 ms の応答時間が期待される。さらにそのサイズ (~1  $\mu\text{m}$ ) は上述 (1) のガラスキャピラリーセンサーに比べて 10 分の 1 程度である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脳内グルタミン酸濃度の real time モニタリング

マウス大脳から切り出した急性 (acute) スライスを試料として、キャピラリーセンサーを用いることにより、(i) 生理適合性のある化学刺激 [KC1, 塩化トトラエチルアンモニウム (TEA)] によるグルタミン酸放出の計測、(ii) GABA 刺激下でのグルタミン酸放出の計測および (iii) 電気刺激下でのグルタミン酸放出の計測を行った。

##### ① キャピラリー酵素センサーの“界面”海馬スライスへの適応

浸漬型及び界面型チャンバーに設置した海馬スライスについてキャピラリー酵素センサーおよびパッチセンサーを用いて得られるグルタミン酸濃度の確度を示すために両方法による結果の比較を行った。KC1 刺激および TEA 刺激についての神経領野 CA1 での結果をまとめると次のようになる。

- ・ 埋め込み (implanted) キャピラリーセンサーで得られる濃度はスライス外 (extra-slice) 濃度より高くなる。
- ・ 両センサーを用いて得られたスライス外グルタミン酸濃度は、同じ値となる。
- ・ いずれもグルタミン酸濃度の時間変化は同じパターンを示す。

すなわち、いずれの方法によってもグルタミン酸濃度の時空間分布を正しく測定できることが分かった。今後、すべての神経領

野に展開することで、グルタミン酸の動態を明らかにできると期待される。

##### ② 生体膜グルタミン酸センサーの応用

グルタミン酸受容体イオンチャンネル (GluR) を含む生体膜を感応膜に用いた超微小キャピラリーセンサーを用いて抑制性神経伝達物質 GABA 刺激下で放出されるグルタミン酸を海馬神経領野 CA1 および CA3 でモニターした。その結果に基づいて、抑制性 GABA 受容体と興奮性グルタミン酸放出の関係を明らかにした。本センサーは上記 (1) のキャピラリー酵素センサーよりも微小であり、より低濃度のグルタミン酸を海馬スライス上でモニターできる。

##### ③ 電気刺激下でのグルタミン酸放出のモニタリング

神経電気生理学における基本的実験である EPSP の記録は、神経活動の程度を知るための重要な指標である。特に、電気刺激下で誘起される長期増強現象 (LTP) 及び長期抑圧現象 (LTD) 前後の急性脳スライスで使用できる検出法を開発することは、神経現象の分子機構を神経伝達分子の側から理解するために重要となる。EPSP の記録と同時に、ガラスキャピラリー酵素センサーを用いて、

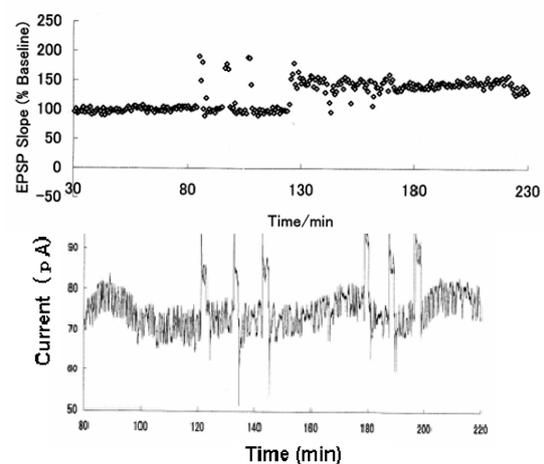


図1 EPSP記録と電流応答  
CA1領域でのグルタミン酸濃度を追跡するこ

とを検討した。EPSP 記録時のキャピラリー酵素センサーの応答例(図1)のように、EPSP の記録とグルタミン酸センサーの応答を同時に記録することに初めて成功した。今後、長期増強現象(LTP)及び長期抑圧現象(LTD)前後の急性脳スライスで使用できる検出法として普及することが期待される。

#### (2) 酵素分子膜イメージング法の開発

センシング素子(酵素GluOx)をガラス基板上に共有結合により固定化、酵素が細胞外液に浸透することを防ぎ化学的摂動を軽減できる酵素固定化基板を開発した。それをマウス脳スライス内のグルタミン酸放出のイメージングに応用、虚血刺激、Uptake 阻害剤TBOA 共存下での KC1 刺激により放出されるグルタミン酸フラックスの領野分布を明らかにした。既報での高分子膜固定化法を用いる虚血下のイメージングに比較して、本研究での酵素固定化膜法は拡散によるぼやけ(blur)のより少ないイメージングを可能にした(図2)。

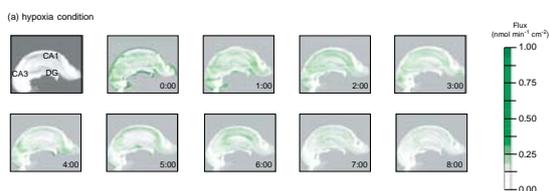


図2 虚血時におけるグルタミン酸放出

また、阻害剤存在下での KC1 刺激の結果、神経領野 CA1 のトランスポーターの働きが強いことを明らかになった。さらに、脳内のエネルギー源としてのグルコース分布をイメージングするために、アビジン修飾ガラス基板上にビオチン化酵素(GOD)を固定化した可視イメージングプレートを開発、領野ごとのグルコース分布を示すことができた。

#### (4) リポソームアレイを用いる神経ペプチドの蛍光アッセイ

神経ペプチドを対象とする網羅的分析法を目指したリポソームアレイを開発、神経ペプチドであるサブスタンスPおよびニューロキニンAの同時蛍光定量に応用した。リポソームをガラス基板に共有結合により固定化、人工細胞膜(リポソーム膜)表面での抗原・抗体反応後に、グラミシジンチャンネルを添加することによって、リポソームの蛍光変化が引き起こされる(図3)。本リポソームアレイはリポソーム内水相のpH変化がグラミシジンチャンネルの添加によって引き起こされることによる。その結果、神経ペプチドであるサブスタンスPおよびニューロキニンAの同時蛍光免疫アッセイが可能になった。

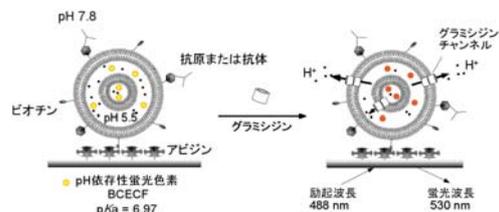


図3 リポソーム免疫アッセイの原理

#### (5) メソポーラスシリカを用いるチャンネルセンサーの開発

メソポーラスシリカ MCM-41 は、規則正しく配列されたナノ細孔を持つ。脂質二分子膜へ包埋することによって、矩形波状のチャンネル様イオン透過性を示すことを見出した。チャンネル状電流は、細孔内に取り込まれた脂質分子の random 運動によると推定される。化学修飾により MCM-41 にビオチンサイトを導入すると、溶液中のアビジンによりイオン透過性を制御でき、無機物質を用いる初めてのイオンチャンネルセンサーを構築できた。今後、レセプターを修飾することによって、脳内物質を高感度に検出するセンサーになることが期待される。

### 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 15 件)

- ① T. Oka, Y. Tominaga, Y. Wakabayashi, A. Shoji, M. Sugawara, Comparison of L-Glutamate Levels in Mouse Hippocampal Slices as Measured with a Glass Capillary Sensor and a Patch Sensor. *Anal. Sci.*, **25**, 353-358 (2009). 査読有
- ② W. Okumura, N. Moridera, E. Kanazawa, A. Shouji, A. Hirano-Iwata, M. Sugawara, Visualizing L-glutamate Fluxes in Acute Brain Slices with Glutamate Oxidase-Immobilized Slips. *Anal. Biochem.*, **385**, 326-333 (2009). 査読有
- ③ A. Hirano, M. Niwano and M. Sugawara, The Design of Molecular Sensing Interfaces with Lipid Bilayers, *Trends in Analytical Chemistry*, **27(6)**, 512-520 (2008). 査読有
- ④ 東海林敦, 堀江未恵子, 菅原正雄, 蛍光リポソームアレイを用いた新規イムノアッセイ法. *バイオサイエンスとインダストリー*, **65**, 606-608 (2007). 査読有
- ⑤ M. Sugawara, Methodological Aspects of *in situ* Sensing of L-Glutamate in Acute Brain Slices, *The Chemical Records*, **7**, 317-325 (2007). 査読有
- ⑥ M. Horie H. Yanagisawa, M. Sugawara, Fluorometric Immunoassay Using pH-sensitive Dye-Encapsulating Liposomes and Gramicidin Channels. *Anal. Biochem.*, **369**, 192-201 (2007). 査読有
- ⑦ K. Nozawa C. Osono, M. Sugawara, Biotinylated MCM-41 Channels as a Sensing Element in Planar Bilayer Lipid Membranes. *Sensors and Actuator B Chemical*, **126**, 632-640 (2007). 査読有
- ⑧ T. Oka, C. Tasaki, A. Sasaki, H. Sezaki, M. Sugawara, Implantation of a Glass

Capillary Electrode in Mouse Brain Slices for Monitoring of L-Glutamate Release. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 1673-1679 (2007). 査読有

⑨ 佐藤雅俊, 柳田孝治, 田中絢子, 菅原正雄 アビジン修飾ガラス基板の作製と安定性の比較. *分析化学*, **56**, 485-489 (2007). 査読有

⑩ 東海林敦, 菅原正雄, 酵素膜プレートを用いて糖を色で測る. *現代化学*, **439**, 47-50 (2007). 査読なし

⑪ Y. Itoh, Y. Ueda, M. Sugawara, M. Kataoka, H. Sato, Y. Umezawa, Nitrogenous Synergists Induced Potentiometric Response to Metal Ions with Polymeric Liquid Membranes Containing Thenoyltrifluoroacetone as an Ionophore. *Anal. Sci.*, **22**, 219-223 (2006). 査読有

⑫ N. Moridera, M. Yamamoto, W. Okumura, M. Sugawara, Glucose Oxidase-Immobilized Glass Disks for Imaging of D-Glucose in Acute Brain Slices. *Anal. Sci.*, **23**, 39-44 (2007). 査読有

⑬ M. Shimane, K. Miyagawa, M. Sugawara, Detection of  $\gamma$ -Aminobutyric acid-induced Glutamate Release in Acute Mouse Hippocampal Slices with a Patch Sensor. *Anal. Biochem.*, **353**, 83-92 (2006). 査読有

⑭ A. Hirano and M. Sugawara, Receptors and Enzymes for Medical Sensing of L-Glutamate, *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, **6**, 1091-1100 (2006). 査読有

⑮ 菅原正雄 チャンネルタンパク質測定技術. *バイオニクス(Bionics)* 7月号, オーム社, 東京, pp36-41 (2006). 査読有

[学会発表] (計 15 件)

① 野澤 桂一郎, 菅原正雄, ナノ細孔内酵素反応の制御に基づく分子センシング法

の基礎検討, 日本化学会第 89 春季年会, 東京 2009 年 3 月 27 日

②東海林 敦, 佐藤 雅俊, 菅原正雄, グルコースおよびガラクトースのキャピラリー蛍光マルチセンシング法の構築とその応用, 日本分析化学会第 57 年会, 福岡, 2008 年 9 月 7 日.

③野澤 桂一郎, 菅原正雄, MCM-41 細孔内の酵素反応の制御に基づく分子センシング法の開発, 日本化学会第 88 春季年会, 東京, 2008 年 3 月 26 日

④堀江未恵子, 東海林敦 菅原正雄, 蛍光リポソームアレイを用いる神経ペプチドアッセイ, 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月 28 日.

⑤佐藤雅俊, 東海林敦 菅原正雄, キャピラリー蛍光マルチセンシング法によるグルコースとガラクトースの定量, 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月 28 日.

⑥野澤 桂一郎, 東海林 敦, 菅原正雄, 酵素反応のゲーティングに基づくナノ細孔センシング法, 日本分析化学会第 57 年会, 福岡, 2008 年 9 月 7 日.

⑦堀江未恵子, 柳沢博行, 菅原正雄, pH依存性蛍光色素を内封したリポソームとグラミシジンをを用いる蛍光イムノアッセイ法の開発, 日本分析化学会第 55 年会, 大阪, 2006 年 9 月 22 日.

⑧岡 貴之, 瀬崎裕美, 根岸加代子, 平野愛弓, 菅原正雄, 超微小ガラスキャピラリー電極の応答機構に関する基礎検討, 日本分析化学会第 55 年会, 大阪, 2006 年 9 月 22 日.

⑨野澤桂一郎, 池田知佳, 小曾野千恵, 菅原正雄, ビオチン修飾MCM-41 を包埋した脂質二分子膜のイオン透過性の制御, 日本分析化学会第 55 年会, 大阪, 2006 年 9 月 21 日.

⑩佐藤雅俊, 菅原正雄, グルコース酸化酵素を修飾したガラスキャピラリーを用いる

マルチ蛍光センシングシステムの開発, 日本分析化学会第 55 年会, 大阪, 2006 年 9 月 22 日.

⑪岡 貴之, 田崎 千尋, 瀬崎 裕美, 東海林 敦, 菅原正雄, 表面埋め込み型ガラスキャピラリー電極を用いる急性脳スライス内グルタミン酸の測定, 日本分析化学会第 56 年会, 徳島, 2006 年 9 月 20 日.

⑫野澤 桂一郎, 根岸 由典, 東海林 敦, 菅原正雄, 酵素内封ナノ細孔のゲーティングに基づくバイオセンシング法の開発, 日本分析化学会第 56 年会, 徳島, 2006 年 9 月 20 日.

⑬奥村 渉, 東海林 敦, 菅原正雄, 急性脳スライスで放出されるグルタミン酸の可視イメージング法, 日本分析化学会第 56 年会, 徳島, 2006 年 9 月 20 日.

⑭佐藤雅俊, 東海林 敦, 菅原正雄, キャピラリー蛍光センシング法によるグルコース及びガラクトースの同時定量, 日本分析化学会第 56 年会, 徳島, 2006 年 9 月 20 日.

⑮奥村 渉, 渋谷洋行, 森寺信勝, 菅原正雄, グルタミン酸オキシダーゼのガラス基板への固定化と脳内グルタミン酸の可視化イメージング, 日本分析化学会第 55 年会, 大阪, 2006 年 9 月 20 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅原 正雄 (SUGAWARA MASAO)  
日本大学・文理学部・教授  
研究者番号: 50002176

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし