

平成 22 年 4 月 2 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300120

研究課題名(和文) 脳内ストレス関連受容体ダイナミクスのリアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Real-time imaging of stress-related receptor dynamics in the brain

研究代表者

西 真弓 (NISHI MAYUMI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレス応答や概日リズムによるホルモン環境の変化に際して、脳内のグルココルチコイド受容体 (GR) やミネラルコルチコイド受容体 (MR) の動態を生きている丸ごとの脳内で可視化して解析することを目的とした。研究期間内にはその予備段階として、GR が緑色に光る GFP-GR ノックインマウスを用い、海馬培養神経細胞内での動態を解析し、さらに灌流固定し、取り出した脳を全脳レベルで、二光子レーザー顕微鏡にて観察し、マウスの大脳皮質第2層付近の深さにおいて、核内に局在する GR を観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The ultimate aim of the present study is to clarify how glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR) in the brain respond to hormonal milieu fluctuated during stress response and circadian rhythm by directly visualizing these receptors as a whole brain level. As a preliminary study, we analyzed dynamics of GR using primary cultured neurons obtained from GFP-GR knock-in mice, and furthermore, we observed a fixed brain from GFP-GR knock-in mouse as a whole brain level using a two-photon laser microscope. We succeeded a direct visualization of GFP-GR at the depth of layer II of cerebral cortex of GFP-GR knock-in mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：(1) GFP (2) GR (3) MR

(4) ノックインマウス (5) in vivo イメージング (6) 海馬

(7) ストレス (8) 核輸送

1. 研究開始当初の背景

脳内のストレス関連コルチコステロイド

受容体には、グルココルチコイド受容体 (GR) とミネラルコルチコイド受容体 (MR) の2種

類が存在し、いずれもホルモン誘導性の転写制御因子である。低分子脂溶性のコルチコステロイドとの結合により活性化され、細胞質から核へ移行し、標的遺伝子のホルモン応答部位に結合してその転写活性を調節することにより、発生、分化、記憶・学習、ストレス応答など多彩な作用を発揮することが明らかにされてきた。

本研究代表者は、一貫して中枢神経系におけるステロイドホルモンおよびその受容体の作用について機能形態学をベースに研究を進め、これまでにGRおよびMRとGFP(green fluorescent protein)あるいはその色変異体との融合蛋白を作成し、培養細胞系における受容体の生細胞内ダイナミクスを、FRAP(fluorescent recovery after photobleaching)やFRET(fluorescent resonance energy transfer)などの手法を用いて可視化して解析する研究方法を確立した。しかしながら、ストレス応答や日内変動などでダイナミックに変化するホルモン環境に対し、脳内でこれら受容体がどのような挙動を示し、遺伝子発現の制御をしているのか、個体レベルでは全く解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの培養細胞系での研究成果を踏まえ、コルチコステロイドの日内変動、ストレスの強さや種類などの違いに応じて、GRとMRがいかんして神経突起、細胞質および核の間を行き来するのか、核内でホモダイマーとヘテロダイマーをどのように使い分けて標的遺伝子の転写を調節するのかなどを、GFPとの融合蛋白のノックインマウスを用いて、FRET、FRAPならびにFCS(Fluorescence correlation spectroscopy)/FCCS(Fluorescence cross correlation spectroscopy)などの技法と二光子レーザー顕微鏡を組み合わせたシステムにより、“生きている脳内”において、単一神経細胞レベルで時空間特異的に解析し、明らかにしていくことを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) ノックインマウスの作成

GFP-GR ノックインマウスに関しては、すでに共同研究者のDr. Mugliaから供与されたもの

を利用する。MR ノックインマウスは、Mouse genome library から mouse MR の transgenic region を含む genome clone を入手し、目的とする GFP の色変異体(FP:CFP/YFP/DsRed)と受容体との融合蛋白を発現するノックインマウスを作成する。

(2) ノックインマウスの初代培養細胞を用いた細胞内動態の解析

①FP-GR および FP-MR ノックインマウスを用い、脳の種々の部位の初代分散培養を行い、リガンドを加えた際の受容体の細胞内局在の変化を、生細胞イメージングにより経時的に観察する。

②FRAP 法を用い、GFP の蛍光の回復速度を指標にして、受容体が神経細胞の突起、細胞質、核内における動きの相違を検討する。

③異なる色変異体の FP-GR と FP-MR のノックインマウスを掛け合わせたダブルノックインマウスを作成し、培養細胞においてFRETやFCSによりこれら受容体の相互作用の変化を解析する。

(3) ノックインマウスを用いた全脳レベルでの観察

麻酔下にマウスの頭蓋骨に窓を開けて脳実質を露出させ、2光子レーザー顕微鏡ステージ上に固定し、GRやMRの発現動態を観察する。また、ストレス負荷時の動態の変化も調べる。

4. 研究成果

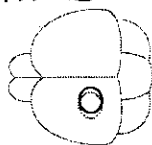
(1) GFP-MR ノックインマウスの作成のために入手した genome clone より targeting vector 構築のための mapping を行っている段階である。Targeting vector 構築に予想以上の時間がかかり、研究期間内に新しいノックインマウスを作成することができなかつたため、以下の in vivo での研究はすでに共同研究者のDr. Mugliaから供与された GFP-GR ノックインマウスを用いた。

(2) FRAP 法を用い、特に核内における受容体の動態を GFP の蛍光の回復速度を half recovery time ($t_{1/2}$) を指標に海馬培養神経細胞において解析した。コルチコステロン投与3時間後、受容体が完全に核内へ移行した後にFRAP解析を行った結果、GFP-GRは低濃度(10^{-9} M; 生理的条件に類似した濃度)のコルチコステロン存在下の方が高濃度(10^{-6} M; ストレス負荷条件に類似した濃度)に比して動きが速く、高濃度においての方が核内の標的遺伝子あるいは核マトリクスなどと強く結

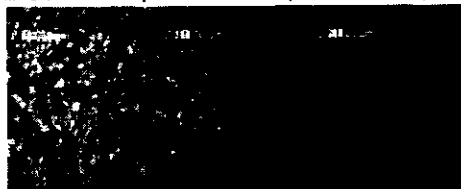
合することが示唆された。ノックインマウスはまだ作成できていないが、GFP-MRを海馬培養神経細胞に強制発現させて行った FRAP 解析では、高濃度においては GFP-GR と核内動態に有意差は認めないが、低濃度においては GR より有意に $t_{1/2}$ が低下しており、低濃度のコルチコステロン存在下においては MR の方が GR より強く標的遺伝子等に結合する可能性が示され、生体脳において定常状態では MR が有意に働き、ストレス負荷等がかかった場合に GR がそれに加わって働くという所見を裏付ける結果を得た。

(3) 生きているマウスでの観察が最終目標であるが、その前段階として固定した脳を用い、スライスを作成せず全脳レベルで二光子レーザー顕微鏡を用いて観察した。8 週齢の GFP-GR ノックインマウスにコルチコステロンを投与 3 時間後に常法に従い経心臓的に灌流固定し、全脳を取り出し二光子レーザー顕微鏡にて観察した。下図に示すように大脳皮質の第 2 層あたりまでの核に GFP-GR のシグナルを鮮明に捉えることができた。全脳レベルで GR の脳の神経細胞内における分布を可視化した例は未だかつてない。

今後は、ノックインマウスを用い、培養細胞あるいは全脳レベルで、ストレス応答や概日リズムに際してのこれら受容体の細胞内動態や発現の変動、受容体陽性細胞による神経回路形成の変化などをリアルタイムに可視化して時空間特異的に解析し、*in vitro* および *in vivo* の両側面からコルチコステロイド受容体を切り口に神経系のストレス応答メカニズムの解明に迫ってきたい。



脳表から 100 μ m 200 μ m 300 μ m



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 24 件)

1. Takanami K, Sakamoto H, Matsuda K-I,

Hosokawa K, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M: Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. **Brain Res**, 2010; 1310: 17-28.

2. Morisaki S, Nishi M, Fujiwara H, Oda R, Kawata M, Kubo T: Endogenous glucocorticoids improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: in vivo study using crush injury model. **Glia**, 2010; 58: 954-963.
3. Terada S, Kinjo M, Aihara M, Takei Y, Hirokawa N: Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. **EMBO J**. 2010; 29: 843-54.
4. Sasaki A, Kinjo M: Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties. **J Control Release**. 2010; 143: 104-11.
5. Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, Kinjo M: Conformational analysis of soluble oligomers of GFP tagged prion protein by fluorescence fluctuation spectroscopy. **Curr Pharm Biotechnol**. 2009; 11: 87-95.
6. Ohsugi Y, Kinjo M: Multipoint fluorescence correlation spectroscopy with total internal reflection fluorescence microscope. **J Biomed Opt**. 2009; 14: 014030.
7. Sasaki A, Sakata H, Kinjo M: Single-cell quantitative analysis of DNA incorporation and protein expression in microwells. **Curr Pharm Biotechnol**. 2009; 11: 117-21.
8. Nishi M, Kawata M. Corticosteroid receptor dynamics: lessons from live cell imaging. **Priming BioMedicine** 2008; 3: 25-33.
9. Kawata M, Nishi M, Matsuda K, Sakamoto H, Kaku N, Masugi-Tokita M, Fujikawa K, Hirahara-Wada Y, Takanami K, Mori H: Steroid receptor signalling in the brain--lessons learned from molecular imaging. **J Neuroendocrinol**. 2008; 20: 673-676.
10. Hosokawa K, Nishi M, Sakamoto H, Tanaka Y, Kawata M: Regional distribution of importin subtype mRNA expression in the nervous system: study of early postnatal and adult mouse. **Neuroscience**, 2008; 157: 864-877.
11. Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa

- K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M.: Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. **Neurosci Lett**. 2008; 441: 94-99.
12. Matsuda K-I, Nishi M, Kaku N, Takaya T, Kawata M: Intranuclear mobility of estrogen receptor α and progesterone receptor in association with nuclear matrix dynamics. **J Cell Biochem**. 2008; 103: 136-148.
13. Shimi T, Pflieger K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, Adam SA, Shumaker DK, Kinjo M, Cremer T, Goldman RD: The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. **Genes Dev**. 2008; 22: 3409-21.
14. Noda Y, Horikawa S, Kanda E, Yamashita M, Meng H, Eto K, Li Y, Kuwahara M, Hirai K, Pack C, Kinjo M, Okabe S, Sasaki S: Reciprocal interaction with G-actin and tropomyosin is essential for aquaporin-2 trafficking. **J Cell Biol**. 2008; 182: 587-601.
15. Park H, Pack C, Kinjo M, Kaang BK: In vivo quantitative analysis of PKA subunit interaction and cAMP level by dual color fluorescence cross correlation spectroscopy. **Mol Cells**. 2008; 26: 87-92.
16. Aoki Y, Nagao I, Saito D, Ebe Y, Kinjo M, Tanaka M: Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. **Dev Dyn**. 2008; 237: 800-7.
17. Nagaya H, Tamura T, Higa-Nishiyama A, Ohashi K, Takeuchi M, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Kinjo M, Okada T, Wada I: Regulated motion of glycoproteins revealed by direct visualization of a single cargo in the endoplasmic reticulum. **J Cell Biol**. 2008; 180: 129-43.
18. Nagao I, Aoki Y, Tanaka M, Kinjo M: Analysis of the molecular dynamics of medaka nuage proteins by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. **FEBS J**. 2008; 275: 341-9.
19. Nishi M, Kawata: Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticosteroid receptor. **Neuroendocrinology**. 2007; 85: 186-192.
20. Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris J, Kawata M: Expression of GPR 30, a G-protein coupled membrane estrogen receptor in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. **Endocrinology**, 2007; 148:5842-5850.
21. Nishi M, Usuku T, Itose M, Fujikawa K, Hosokawa K, Matsuda K-I, Kawata M: Direct visualization of glucocorticoid receptor positive cells in the hippocampal regions using green fluorescent protein transgenic mice. **Neuroscience**. 2007; 146: 1555-1560.
22. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J: Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007; 104: 13678-83.
23. Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, Matsuno K, Kinjo M, Suzuki T: The novel cargo Alcadin induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. **EMBO J**. 2007; 26: 1475-86.
24. Mikuni S, Tamura M, Kinjo M: Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. **FEBS Lett**. 2007; 581: 389-93.

[学会発表] (計20件)

<特別講演、教育講演等>

1. 西真弓: ストレスホルモン・ステロイドホルモンの神経生物学 一分子から行動へ。私立大学学術研究高度化推進事業・学術フロンティア推進事業「虐待のメカニズムと防止の研究開発」成果報告会シンポジウム。栃木。200人、5.1.2010
2. 西真弓: 顕微鏡で見る生きている細胞の世界: GFPを用いて受容体の動きを可視化する。未来の科学者養成講座。フューチャーサイエンティスト育成プログラム 学び担えよ先端的生命医科学 平成21年度 第2回 セミナー。福井。2.13.2010
3. 西真弓: GFPを用いた機能分子の蛍光イメージング。第19回 Nishiowari Radiological

Technology Seminar. 一宮 3.14. 2009

4. 西真弓: ステロイドホルモン受容体のバイオイメージング. 第3回バイオメディカル研究会. 京都. 7.26. 2008

<シンポジウム等>

1. 西真弓: GFP イメージングの実際: 受容体ダイナミクスの可視化. 第115回 日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム 岩手. 3.28-30, 2010
2. 西真弓、河田光博: GFP を用いた分子イメージング. シンポジウム「分子から個体への機能分子の可視化」第50回日本組織細胞化学会 大津. 9.26-27, 2009
3. 西真弓: ステロイド受容体ダイナミクスの蛍光イメージング 第48回日本核医学会学術総会 合同シンポジウム. 千葉. 10.24. 2008
4. 西真弓、河田光博: GFP イメージングによる機能分子動態の形態学的解析 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム 大分. 3.27-29 2008
5. 西真弓: 中枢神経系におけるステロイド^{*}ホルモン受容体^αの機能形態学. 第二回 X線・遠赤外線応用重点研究分科会. 奈良. 11.28. 2007
6. 西真弓、河田光博: GFP イメージングの実際 第32回組織細胞化学会講習会. 8.7-9, 2007, 京都

<国際学会>

1. Hosokawa M, Nishi M, Fujikawa K, Kawata M. Expression of importins in the mouse brain and their possible involvement in activity-dependent synapse-to-nucleus signaling. 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2007.11. 3-7, San Diego, CA

<国内学会>

1. 西真弓: 幼少期の生育環境が生育後の脳機能や構造に及ぼす環境. 第20回日本病態生理学会. 2010.1.23-24, 橿原
2. 西真弓、八神美香、児玉尚子、河田光博: The relationship between early life adverse events and behavioral disorders in adulthood. 第32回日本神経科学学会大会, 2009. 9. 16-18, 名古屋
3. 西真弓、八神美香、河田光博: Effects of maternal separation on behavioral disorders in adulthood. 第36回日本神経内分泌学会. 2009.9.3-4, 北九州
4. 西真弓、細川康二、藤川和世、河田光博:

Signal transport from synapse to the nucleus. 第31回日本神経科学学会大会, 2008. 7. 10-12, 東京

5. 西真弓: シナプスから核へのシグナル伝達. 統合脳 2007 冬の班会議. 12.22-24, 2007, 東京
6. 細川康二、西真弓、藤川和世、河田光博: In situ hybridization によるインポーチン α および β の脳内発現分布. 第30回日本神経科学学会大会, 2007. 9. 10-12, 横浜
7. 藤川和世、西真弓、河田光博: ストレス応答における NF κ B とグルココルチコイドレセプターとの相互作用. 第30回日本神経科学学会大会, 2007. 9. 10-12, 横浜
8. 西真弓、細川康二、藤川和世、河田光博: Signal transport from synapse to the nucleus. 第30回日本神経科学学会大会, 2007. 9. 10-12, 横浜
9. 西真弓: シナプスから核へのシグナル伝達. 統合脳 2007 夏の班会議. 8.21-24, 2007, 札幌

[図書] (計2件)

1. Nishi M. Imaging of Transcription Factor Trafficking in Living Cells: Lessons from Corticosteroid Receptor Dynamics. Method Book : Transcription Factors: Methods and Protocols, Ed. Paul Higgins, Humana Press, USA, In Press, 2010.
2. 西真弓: GFP イメージングの実際. 日本組織細胞化学編. 組織細胞化学、学際企画、東京: pp 183-189, 2007

○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]

報道関連情報：

1. 福井大学の「未来の科学者養成講座」での講演が福井新聞情報ガイド（平成22年2月14日、3面）に掲載。

6. 研究組織

(1) 研究代表者：西 真弓

現所属：(奈良県立医科大学・医学部・教授)

研究者番号：40295639

(2) 研究分担者：金城政孝

現所属：(北海道大学大学院先端生命科学
研究院・教授)

研究者番号：70177971

研究分担者：藤川和世

現所属：(京都府立医科大学・医学研究
科・プロジェクト研究員)

研究者番号：40433247

(3) 連携研究者

()

研究者番号：