

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370060
 研究課題名（和文）シナプス伝達の調節に関わる神経栄養因子受容体トラフィックの1分子イメージング
 研究課題名（英文）Single molecule imaging of neurotrophin receptor trafficking during the modulation of synaptic transmission

研究代表者
 谷 知己 (Tani Tomomi)
 北海道大学・電子科学研究所・准教授
 研究者番号 80332378

研究成果の概要：神経栄養因子 Brain derived neurotrophic factor (BDNF)は極低濃度で中枢神経系の回路形成に極めて重要な作用を示す分泌性タンパク質である。本研究では小脳を材料として、このスライス標本に蛍光標識 BDNF を投与し、BDNF とその受容体である TrkB の振る舞いを1分子レベルで観察するとともに、中枢神経系のシナプス活動を電気生理学的に計測する実験系の確立をおこなった。本研究では、小脳神経系に極めて重要な細胞であり、小脳表層から内部に向かう顆粒細胞の移動や、顆粒細胞由来の平行線維とプルキンエ細胞のシナプス伝達の恒常性を維持するグリア細胞、バークマン細胞に極めて特異的に BDNF が結合し、細胞内に取り込まれて主に molecular layer 側から granule cell layer の方向に向かって細胞内を輸送されることを発見した。バークマングリア細胞に対する BDNF の生理機能は不明である。そこで、小脳スライス標本でバークマングリア細胞の電気的活動と、BDNF の作用を同時に計測する顕微鏡の構築をおこなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,500,000	3,150,000	13,650,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ライブイメージング 蛍光顕微鏡
電気生理学的計測

蛍光1分子観察 神経栄養因子 小脳スライス標本

1. 研究開始当初の背景

神経栄養因子は神経回路形成や記憶学習機能に不可欠な分泌因子である。神経栄養因子のうち、脳由来神経栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF と略) は海馬や小脳、大脳皮質に豊富に存在する。近年、活動依存的なシナプスの形成やシナプス伝達の

調節において、BDNF とその受容体 TrkB のふるまいが非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。興味深いことには、シナプス前膜あるいは後膜に、シナプス活動依存的に TrkB 受容体が挿入/除去され、シナプスにおける TrkB 受容体数が増加/減少することによっても、このようなシナプス伝

達の調節がおこることが明らかとなりつつある。このような神経活動依存的な BDNF や TrkB のトラフィックは、生化学的手法や、蛍光タンパク質を用いた可視化実験等によって確認されている。しかしながら、単一シナプス内での、BDNF および TrkB の振る舞い、特にシナプス膜への挿入や局所的な発現、エンドサイトーシスを介したインターナリゼーションなどを、スライス標本内のシナプスにおいて観察することは極めて困難であった。

2. 研究の目的

シナプス等の微細構造内における分子の振る舞いは、蛍光1分子イメージングによって明らかにすることが可能である。そこで、蛍光1分子イメージングの手法を用いて、中枢のシナプス活動やその制御に極めて重要な因子 BDNF と TrkB 受容体の振る舞いを1分子単位で解析し、活動するシナプスにおける TrkB 受容体のふるまいから、シナプス伝達の調節メカニズムを解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

蛍光標識 BDNF の合成にはこれまで蛍光1分子観察においてよく用いられている蛍光色素、Cy3 を用いる。Cy3 標識は、すでに研究代表者らにより確立された NGF の Cy3 標識法を踏襲しておこなう。本応募研究課題において中心となるのが、スライス標本を観察対象とする蛍光1分子イメージングシステムの構築である。この研究では、ある程度高い開口数 (0.95) を持ち、しかも作動距離が 3mm 確保できる電気生理学用水浸対物レンズを用いる。励起光の導入法として、マルチモードの大口径光ファイバー端面から射出した光をクリティカル照明で試料に導入する方法、あるいは、シングルモード光ファイバーをスライス標本内に刺入し、ファイバーの光射出端面において、単一蛍光分子を可視化する方法を試みた。

4. 研究成果

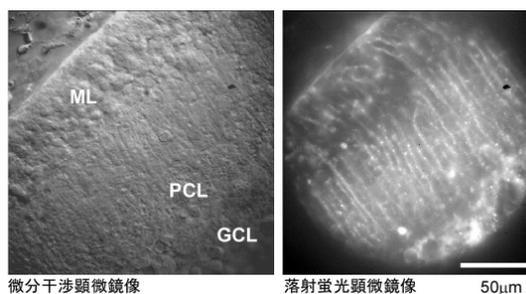
(1) 蛍光標識 BDNF の合成

化学修飾法によって BDNF のカルボキシル基に SH 基を導入し、SH 基にマレイミド化 Cy3 を導入することによって、Cy3-BDNF を合成した。ラベル率は 0.5 から 1 程度であった。

(2) 蛍光標識 BDNF による小脳スライス標本内在の BDNF 受容体 TrkB の可視化

調製した蛍光 BDNF を用いて、ニワトリ胚由来の小脳スライス標本内における TrkB 受容体の分布とその動態を可視化した。ニワトリ 15 日-17 日胚から取り出した小脳を、正中線に平行で左右軸に直交する平面で、厚さ

250 ミクロンのスライスにして、これを 5nM の BDNF を含む DMEM/F12 培養液中で 1 時間培養したのち落射型蛍光顕微鏡で蛍光観察をおこなった。この観察の結果、小脳表層から内部に向かう筋状の構造に Cy3-BDNF が特異的に結合することを見いだした (図 1)。検討の結果、この筋状構造はバグマングリア細胞であることが示唆された。BDNF が結合する状態としては、その特異的受容体である TrkB のほかに、神経栄養因子一般を受容する p75 受容体の存在が知られている。この受容体の関与を検討する目的で、p75 と結合する神経栄養因子 NGF の蛍光標識アナログ 5nM を

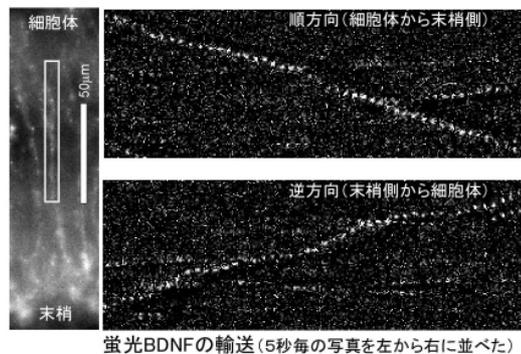


(図 1) 微分干渉顕微鏡 (左) および蛍光顕微鏡 (右) で観察したニワトリ小脳スライス標本における蛍光 BDNF の分布。ML: Molecular layer, PCL: Purkinje cell layer, GCL: Granule cell layer

小脳スライス標本に投与し、その蛍光観察をおこなった結果、蛍光 BDNF で観察された筋状の蛍光染色は見られなかった。蛍光 BDNF によって観察される筋状のパターンは、小脳内に発現する TrkB 受容体の分布を反映していると考えられる。

(3) 小脳バグマングリア細胞内で観察された BDNF の分子動態観察

このように、小脳バグマングリア細胞に結合する蛍光 BDNF の振る舞いをタイムラプス記録によって 1 時間程度観察したところ、興味深い現象を見いだした。蛍光 BDNF 投与後の時間経過にともない、小脳スライス中に見



(図 2) 蛍光 BDNF の軸索輸送。左図の蛍光像内に区切られた領域のキモグラフを左の上下に示す。上: granule layer から molecular layer 方向に向かう輸送、下: molecular layer 側から granule layer 側に向かう輸送

られる線状の蛍光シグナルは増大するが、この増大とともに、明るい蛍光輝点が形成された。この明るい蛍光輝点の大部分は、小脳の molecular layer 側から granule cell layer 側に向かって輸送されていることが観察された (図 2)。この蛍光輝点は、その明るさから多分子の蛍光 BDNF クラスタ、おそらくはバグマングリア細胞内に取り込まれた蛍光 BDNF クラスタと推定された。

バグマングリア細胞は小脳神経系に極めて重要な細胞であり、小脳表層から内部に向かう顆粒細胞の移動や、顆粒細胞由来の平行線維とプルキンエ細胞のシナプス伝達の恒常性を維持している。バグマングリア細胞に対する BDNF の生理機能は不明である。ドイツの Konnerth らのグループは、バグマングリア細胞は truncated 型の BDNF 受容体を発現しており、BDNF の受容に伴って細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることを報告している。また、バグマングリア細胞は、小脳における代表的なシナプス結合である平行線維とプルキンエ細胞のシナプス結合部位を包み込む構造を有しており、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率やその恒常性を制御していると考えられている。本研究では、このような知見を基に、小脳スライス標本でバグマングリア細胞の電気的活動と、BDNF の作用を同時に計測する顕微鏡の構築をおこなった。バグマングリア細胞膜に結合した蛍光 BDNF の振る舞いを観察するためには、スライス標本内で蛍光 1 分子観察をおこなう必要がある。このために、シングルモード光ファイバーを内蔵したガラス微小ピペットをスライス内に挿入した。光ファイバーに励起レーザー光を導入すると、光ファイバー端面近傍で、100nm の濃度で投与した Cy3-BDNF を 1 分子観察することが出来た。この光ファイバー先端をスライス内のバグマングリア細胞膜の近傍に密接させ、同時にパッチ電極でバグマングリア細胞の電気記録をおこなうことにより、目的とする実験系を確立させた。

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 3 件)

① Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K. and Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods*, published online : 6 April 2009 (査読有)

② Saito K., Kobayashi K., Tani T. and Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color

confocal real time imaging system for cellular structure and function. *Cell Structure and Function* 33, 133-141, 2008 (査読有)

③ Zhou, X., Babu, J. R., da Silva, S., Shu, Q., Graef, I. A., Oliver, T., Tomoda, T., Tani, T., Wooten, M. W. and Wang, F. Unc-51-like kinase 1/2 mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 5842-5847, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① Tomomi Tani. Single molecule analysis of NGF and the receptor trafficking on growth cones EMBO Conference Series on Spatial Dynamics of Intracellular Signaling 2009.3, Jerusalem (Maale Hachmisha), Israel

② Mami Nomura, Takeharu Nagai, Yoshie Harada and Tomomi Tani Nerve growth factor-induced translocation of TrkA-GFP expressed on PC12 cells 第 46 回日本生物物理学会年会 2008.12 福岡 (福岡国際会議場)

③ Tomomi Tani, Kenta Saito and Takeharu Nagai Trapping single molecules of GFP-tagged nerve growth factor receptor via ligands immobilized on a solid surface 第 46 回日本生物物理学会年会 2008.12 福岡 (福岡国際会議場)

④ 谷知己・斉藤健太・永井健治 リガンド結合にともなう神経成長因子受容体 TrkA の構造ダイナミクスを可視化する試み 日本生物物理学会年大会 2007.12 横浜 (パシフィコ横浜)

⑤ 野村真未・原田慶恵・谷知己 切断された神経軸索の再生における神経成長因子の作用 日本生物物理学会年大会 2007.12 横浜 (パシフィコ横浜)

[図書] (計 1 件)

① 谷知己・永井健治 スパイは一人で充分—蛍光タンパク質を用いた蛍光 1 分子イメージング (分担執筆) 「蛍光・発光試薬の選び方と使い方」三輪佳宏編集 羊土社 (2007) p147.

[その他]

アウトリーチ活動

①北海道大学女性研究者支援室主催 理系
応援キャラバン隊 「生きているタマゴの中
をのぞいてみよう」ブース出展

胚発生中のニワトリの卵に窓をあけ、生きて
いるニワトリ胚の観察を一般の方々や高校
生、中学生、小学生に観察してもらうことで、
我々ヒトをふくめた生物の体作りの不思議
を体感してもらう。

2007.8.4 北広島エルフィンパーク交流広
場 北広島市

2007.9.7 函館市立函館高校 函館市

2007.9.8 函館工業高等専門学校 函館市

2007.9.9 函館中部高校 函館市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 知己 (TANI TOMOMI)

北海道大学電子科学研究所・准教授

研究者番号：80332378

(2) 研究分担者

小池 (谷) 真紀 (KOIKE-TANI TOMOMI)

北海道大学女性研究者支援室・客員准教授

研究者番号：60396702

(3) 連携研究者

なし