

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06936

研究課題名(和文) シナプスにおける代謝型グルタミン酸受容体シグナリングの多重可視化解析

研究課題名(英文) Multiplexed imaging of metabotropic glutamate receptor signaling at synapses

研究代表者

大久保 洋平 (Okubo, Yohei)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40422282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスにおけるグループ1代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)のシグナル伝達メカニズムを解明するため、蛍光イメージング技術に基づく高解像度時空間解析を行った。mGluRシグナリングに関与するグルタミン酸、イノシトール三リン酸、小胞体内腔Ca²⁺について新規蛍光プローブを開発した。そして二光子顕微鏡を用いて脳組織内シナプス周囲において高解像度イメージングを行った。mGluR活性化に必要なグルタミン酸動態の定量に成功し、グルタミン酸動態と細胞内シグナリングの相関を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mGluR作用薬の多様な中枢作用から、mGluRの脳における機能的意義と創薬標的としての有効性は明らかであった。しかしシナプスにおけるmGluRシグナリングの詳細なメカニズムについては、不明な点が多く残されており、研究開発の障壁となっていた。本研究では、研究代表者独自の蛍光イメージング技術を発展させることにより、mGluRシグナリングの高解像度時空間解析を実現した。本研究成果はmGluR標的創薬やmGluR関連病態メカニズム解明に向けた基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the signal transduction mechanism of group 1 metabotropic glutamate receptors (mGluR) at synapses, high-resolution spatiotemporal analysis based on fluorescence imaging technology was performed. We developed novel fluorescent probes for glutamate, inositol trisphosphate, and Ca²⁺ in the endoplasmic reticulum that are involved in mGluR signaling. Then, high-resolution imaging was performed around synapses in the brain tissue using a two-photon microscope. We succeeded in quantifying the glutamate dynamics required for mGluR activation, and clarified the correlation between glutamate dynamics and intracellular signaling.

研究分野：神経科学 薬理学

キーワード：代謝型グルタミン酸受容体 カルシウム イノシトール三リン酸 シナプス 蛍光イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は微小な接合部であるシナプスを介して情報を伝達する。前シナプス終末から放出された神経伝達物質が後シナプスの神経伝達物質受容体を活性化することにより、シナプスにおける情報伝達が引き起こされる。このシナプス伝達は脳機能の素過程であると言え、そのメカニズムの解明は脳機能および病態の理解に不可欠である。脳神経細胞の活動を上昇させる興奮性シナプス伝達は、主にグルタミン酸を伝達物質とする。細胞内シグナルに参与する G タンパク質共役型受容体であるグループ 1 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR、AMPA 受容体や NMDA 受容体など) と共に、グルタミン酸作動性シナプス伝達を担っている。iGluR は前シナプスと後シナプスが形成する微小な隙間であるシナプス間隙に面して局在し、陽イオンの流れによるシナプス電流を引き起こし、神経細胞の電氣的興奮性を制御する。一方、mGluR はシナプス間隙の外側 (ペリシナプス領域) に局在し、シナプス間隙からのグルタミン酸漏出 (スピルオーバー) が活性化に必要である。そして Gq タンパク質シグナリング、特にイノシトール三リン酸 (IP₃) / IP₃ 受容体を介した小胞体からの Ca²⁺ 放出などにより、シナプス可塑性を始めとした様々な機能を担っている。mGluR 遺伝子欠損マウスの表現型や、mGluR 作動薬 / 拮抗薬の多様な中枢作用などから、mGluR の脳における機能的意義自体は明らかとなっていた。しかし mGluR がその機能的意義を発現するメカニズムについては、不明な点が多く残されていた。

この問題の主な要因として、iGluR を介したシナプス電流とは異なり、mGluR が実際のシナプス伝達において、どのような条件下で活性化され、どのように細胞内シグナリング動態を惹起するのかという、基本的な知見が欠けていることが挙げられた。mGluR シグナリングは電流を必ずしも伴わないので、神経細胞に流れる電流の計測に基づく電気生理学的解析法は適用できない。また mGluR シグナリングはシナプス周辺に限局してごく短時間の間に惹起されるものであるため、成分抽出に基づく生化学的解析法も適用が難しい。高度な時空間的解像度を有する新規の観測技術を開発することが、上記の問いに答えるためには不可欠な状況であった。

2. 研究の目的

シナプス伝達における mGluR シグナリングについて、蛍光イメージング技術に基づく高解像度時空間解析、すなわち光生理学的解析法を確立することを目的とした。関連分子のシナプスにおける時空間動態を多重に高解像度で可視化することで、mGluR シグナリングの誘導条件および入出力特性、iGluR も含めたシグナリングフローの中での相互作用とそのメカニズムの全容解明を目指すこととした。

応募者はこれまでに、グルタミン酸プローブ EOS (引用文献 1)、IP₃ プローブ GFP-PHD (引用文献 2, 3)、小胞体内腔 Ca²⁺ プローブ CEPIA (引用文献 4, 5) という独自の蛍光プローブを開発し、mGluR シグナリング動態の各ステップを可視化することで、数々の新規知見を得ることに成功してきた (図 1)。EOS により mGluR 活性化に足るグルタミン酸スピルオーバーを特異的・高感度に可視化することに成功した。GFP-PHD は IP₃ 産生における mGluR と iGluR の新規協調機構を解明した。CEPIA は小胞体内腔 Ca²⁺ 動態が mGluR シグナリング出力 (= IP₃ 受容体を介した Ca²⁺ 放出) の特異的・高感度指標になり得ることを示した。このように各分子を可視化するツールを揃えることができて初めて、同時イメージングによる多重解析が可能となり、包括的な光生理学的解析を目指すことが可能となった。

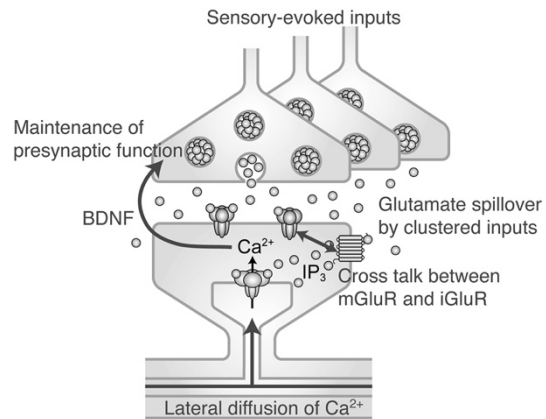


図 1 シナプスにおける mGluR シグナリング

3. 研究の方法

(1) 標本

mGluR および iGluR を含むグルタミン酸作動性シナプスの典型例として、大脳皮質錐体細胞の樹状突起スパイン (後シナプスを形成する微小な突起) 周囲を主な観察対象とした。マウス大脳皮質の急性スライス標本 (0.3 mm 厚) をマイクロスライサーにより作製し、人工脳脊髄液を灌流しながら観察を行った。

(2) 蛍光イメージング

二光子励起顕微鏡による脳組織内高解像度蛍光イメージングを行った。EOS については、従来から用いているレクチンおよびビオチン-ストレプトアビジン結合を介した細胞外標識法 (図 2) によりシナプス外に標識した。GFP-PHD、CEPIA については、ウイルスベクターを用いて錐体細胞に発現させた。グルタミン酸、IP₃、小胞体内腔 Ca²⁺、それぞれの組み合わせについて同時イメージングを行い、神経活動/グルタミン酸スピルオーバー/後シナプス IP₃ 産生/小胞体内腔 Ca²⁺動態 (IP₃ 受容体を介した Ca²⁺放出に伴う濃度減少) の間の相関を可視化することを目指した。

(3) 画像解析

得られた画像データについて画像解析ソフトウェアを用いて解析した。各波長の蛍光強度変化率の時系列変化を画像化し、シナプス周囲におけるシグナリング動態を検証した。

4. 研究成果

(1) 蛍光プローブの多色化

二色同時イメージングを行うために、各プローブについて緑色および赤色蛍光バージョンを作製した。EOS はタンパク質に小分子の蛍光色素を標識したハイブリッド型プローブである。従来は緑色蛍光色素を標識したものを用いてきたが、新たに赤色蛍光色素に置き換えたものを作製した。蛍光色素によってプローブの特性は大幅に変化するので、複数の色素についてスクリーニングを行い、グルタミン酸親和性とシグナル強度の点で最適なものを得た。CEPIA については、緑色型の G-CEPIA1*er* および赤色型の R-CEPIA1*er* を開発した。

(2) グルタミン酸濃度定量プローブの開発と応用

EOS についてはさらに新規バリエーションの開発を進めた。これまでの EOS は、単一蛍光波長の輝度変化に基づくものであり、EOS 自体の標識濃度差や脳組織の光散乱などの影響を受けるものであった。よってグルタミン酸濃度の絶対定量と、それに基づく mGluR シグナリング解析は困難であった。そこで緑色と赤色の EOS を組み合わせることで蛍光強度比による測定を可能にする ratiometric EOS を開発した (図 2)。

標識する色素の交換による迅速な展開が可能である EOS の特性を最大限活用した開発を行った。脳内の細胞外グルタミン酸濃度は静止時が 20 nM 程度であり、活動依存的に μM の領域にかけて変化すると見込まれていたため、この濃度範囲に適したグルタミン酸親和性を有する EOS を選定した。また蛍光強度比の変化率を大きくするために、緑色と赤色でグルタミン酸結合に対する蛍光強度変化が反転した関係になるように EOS を開発・選定した (図 2)。

rEOS を用いることにより、蛍光強度比に基づくグルタミン酸濃度定量を、脳組織内で空間解像度を持った形で実現した (図 2)。そして高頻度/高密度シナプス伝達に伴うグルタミン酸スピルオーバーにより、シナプス外のグルタミン酸濃度が mGluR の活性化に十分な μM オーダーに到達することを確認した。rEOS は脳組織内の微小領域のグルタミン酸濃度定量という、従来困難であった測定を可能にする蛍光プローブであり、mGluR シグナリング研究以外にも応用の展開が期待される。

(3) 二因子の同時イメージング

開発した蛍光プローブで観察できる最上流と最下流であるグルタミン酸と小胞体内腔 Ca²⁺について、EOS と CEPIA による同時イメージング解析に取り組んだ。前シナプス活動を自発活動から強刺激まで変化させたところ、グルタミン酸および小胞体内腔 Ca²⁺シグナルの惹起にはある程度の強度の前シナプス刺激が必要であった。これはこれまでの一因子イメージングでの結果と一致する。この閾値以上の前シナプス刺激強度ではグルタミン酸スピルオーバーと小胞体内腔 Ca²⁺濃度減少が良く相関しており、グルタミン酸スピルオーバーが mGluR シグナリングの主要な決定因子であることが示唆された。今後は mGluR 前後の入出力特性について光生理学的解析をさらに詳細に行う予定である。

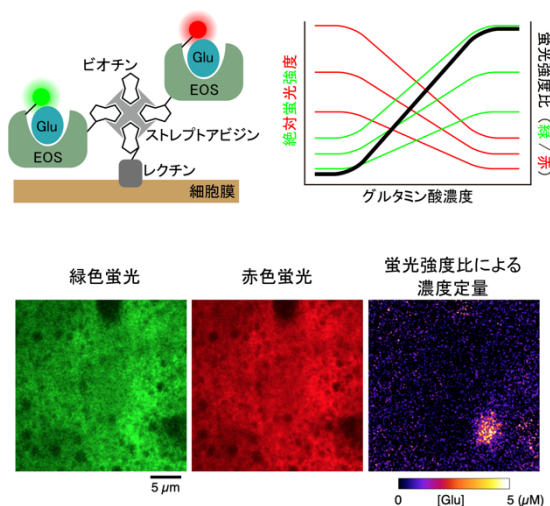


図 2 rEOS による脳組織内グルタミン酸濃度定量

<引用文献>

1. Yohei Okubo, Hiroshi Sekiya, Shigeyuki Namiki, Hirokazu Sakamoto, Sho Inuma, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 107:6526-6531 (2010)
2. Yohei Okubo, Sho Kakizawa, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino. Visualization of IP₃ dynamics reveals a novel AMPA receptor-triggered IP₃ production pathway mediated by voltage-dependent Ca²⁺ influx in Purkinje cells. **Neuron** 32:113-122 (2001)
3. Yohei Okubo, Sho Kakizawa, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino. Cross talk between metabotropic and ionotropic glutamate receptor-mediated signaling in parallel fiber-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production in cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 24:9513-9520 (2004)
4. Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Kuniaki Ishii, Masamichi Ohkura, Yohei Okubo, Masamitsu Iino. Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. **Nat. Commun.** 5:4153 (2014)
5. Yohei Okubo, Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Naotoshi Nakamura, Tatsuo Shibata, Masamitsu Iino. Visualization of Ca²⁺ filling mechanisms upon synaptic inputs in the endoplasmic reticulum of cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 35:15837-15846 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yohei Okubo	4. 巻 68
2. 論文標題 Investigation of brain functions with fluorescence imaging techniques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 157-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.JMJ21-0051-OT	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 Yohei Okubo, Masamitsu Iino, Kenzo Hirose	4. 巻 522
2. 論文標題 Store-operated Ca ²⁺ entry-dependent Ca ²⁺ refilling in the endoplasmic reticulum in astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1003-1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.006	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 Shodai Takahashi, Kenjiro Hanaoka, Yohei Okubo, Honami Echizen, Takayuki Ikeno, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano	4. 巻 15
2. 論文標題 Rational design of a near infrared fluorescence probe for Ca ²⁺ based on phosphorus substituted rhodamines utilizing photoinduced electron transfer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry-An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 524-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901689	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 Yohei Okubo, Masamitsu Iino	4. 巻 598
2. 論文標題 Visualization of astrocytic intracellular Ca ²⁺ mobilization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of physiology	6. 最初と最後の頁 1671-1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277609	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 Yohei Okubo	4. 巻 144
2. 論文標題 Astrocytic Ca ²⁺ signaling mediated by the endoplasmic reticulum in health and disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 83-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.07.006	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 Yohei Okubo, Kazunori Kanemaru, Junji Suzuki, Kenta Kobayashi, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino	4. 巻 67
2. 論文標題 Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type 2 independent Ca ²⁺ release from the endoplasmic reticulum in astrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 113-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23531	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 大久保 洋平	4. 巻 153
2. 論文標題 小胞体Ca ²⁺ シグナリングの変調による神経細胞死	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 155-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.153.155	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 並木 繁行、浅沼 大祐、大久保 洋平、廣瀬 謙造
2. 発表標題 ライブセル超解像イメージングを実現する新規蛍光標識技術の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西 泰地、坂本 寛和、大久保 洋平、廣瀬 謙造
2. 発表標題 記憶形成に関与するシナプスの検出法の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保 洋平、並木 繁行、浅沼 大祐、櫻井 隆、廣瀬 謙造
2. 発表標題 脳組織内1分子イメージング法の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yohei Okubo, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino
2. 発表標題 Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2-independent Ca ²⁺ release from the endoplasmic reticulum in astrocytes
3. 学会等名 The 23rd Korea-Japan Joint Seminar of Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保 洋平
2. 発表標題 アストロサイトにおける小胞体Ca ²⁺ 放出および充填機構の可視化解析
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並木 繁行、浅沼 大祐、大久保 洋平、廣瀬 謙造
2. 発表標題 新規蛍光スイッチングプローブによるライブセル超解像イメージング法の開発
3. 学会等名 生理研研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯野 有希、浅沼 大祐、大久保 洋平、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 近赤外領域におけるカルシウム蛍光イメージングのための新規タグツールの開発
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 新九郎、大久保 洋平、並木 繁行、浅沼 大祐、廣瀬 謙造
2. 発表標題 長時間1分子蛍光イメージング技術の開発とそのシナプス分子イメージングへの応用
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保 洋平、飯野 正光、廣瀬 謙造
2. 発表標題 アストロサイトにおける小胞体Ca ²⁺ 放出および充填機構の可視化解析
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣川 信隆、板東 武彦、大久保 洋平、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 240
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2021	

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学大学院 細胞・分子薬理学 http://pharmacology.sakura.ne.jp/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------