

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23820

研究課題名(和文)超小型内視顕微鏡を用いたバソプレシン受容体遺伝子欠損による神経疾患発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms of neuronal disorders in vasopressin receptor-deficient mice by using microendoscopy

研究代表者

原田 一貴(Harada, Kazuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：60830734

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):アルギニンバソプレシンの受容体遺伝子欠損マウスは、てんかん発作や社会行動の低下症状を示すが、その発症機構は未解明である。そこで申請者は、細胞内の分子動態をリアルタイムに可視化できる蛍光タンパク質センサーと、行動中のマウスの神経活動を観察できる生体イメージング技術を組み合わせて解明を試みる。緑色乳酸センサー、緑色ピルビン酸センサー、赤色グルコースセンサーの開発に成功し、マウス脳におけるセンサー発現と深部観察用のレンズ装着に至っている。今後は、超小型内視顕微鏡を装着して、発作時の各分子の応答観察を行うことで、受容体遺伝子欠損マウスのニューロンおよびアストロサイトで動態異常を示す分子の特定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AVPの機能について、社会行動や概日リズム、血糖値制御への関与を示す研究が、近年国内外で数多く行われている。しかし、これまでに個体レベルの生細胞イメージングは行われていない。本研究は、AVP受容体欠損により生じる神経病態の分子レベルでの解析を目指すもので、原因分子の特定と治療方針に結びつく。ヒトの疾患研究レベルにおいても、血中AVP濃度は、子どもの自閉スペクトラム症の障害傾向との相関が示されている(Carson et al., PLoS ONE, 201)。そのため、AVPの中枢神経における詳細な生理作用の解明に成功すれば、精神疾患の治療法開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文): Arginine vasopressin receptor deficient mice show altered seizures and social behaviours, whose molecular mechanisms remain unclear. I focused to elucidate the mechanisms of these symptoms using fluorescent protein-based indicators for intracellular signalling and metabolism-related molecules, and in vivo imaging in mice. I successfully developed fluorescent protein-based green lactate and pyruvate indicators, and a red glucose indicator. I also developed the protocol for expression of these indicators in mice brain and insertion of a gradient-index lens to observe deep brain area. I will perform further in vivo imaging and aim to identify the critical molecules which cause the reported phenotypes.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：アルギニンバソプレシン 生体イメージング 超小型内視顕微鏡 蛍光タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

アルギニンバソプレシン (arginine vasopressin: AVP) は脳下垂体から分泌されるペプチドホルモンとして知られ、腎臓からの水の再吸収を促すほか、インスリン、グルカゴンなどの分泌促進作用を持つ。さらに近年、**脳において AVP が神経伝達物質として作用し、概日リズムや社会行動を制御している**ことが示されている(文献 1、2)。AVP 受容体には、V1aR、V1bR、V2R がある。V1a・V1bR 遺伝子二重欠損マウスでは、てんかん発作が強化される(申請者らグループの未発表データ)。また、V1aR 遺伝子欠損マウスおよび V1bR 遺伝子欠損マウスは社会的行動の低下を示す(文献 3)。しかし、これらの症状に AVP が脳内のどの部位でどのように関与しているのか、その詳細な分子機構は不明である。

これらの疾患発症機構を解明するには、疾患発症部位のニューロンおよびアストロサイトの活動を生きたマウス個体で直接観察する生体イメージング手法が有効である。AVP 分泌ニューロンの分布、また発作や社会行動に関与する部位の知見から、海馬、前頭前野、側坐核、室傍核、淡蒼球の関与が考えられるが、いずれも脳深部に位置する領域であり、生体イメージングの主流な手段として普及している二光子顕微鏡を用いても神経活動の観察が困難である。特に、発作や社会行動など、大規模な体の動きを伴う活動の観察手段としては適用できない。また、従来生体内のイメージングは神経系の  $Ca^{2+}$  動態の解析が中心で、代謝や遺伝子発現に関与する他分子の作用は多くが未解明である。

## 2. 研究の目的

申請者は、蛍光タンパク質を基盤とし、細胞内シグナル分子や代謝関連分子の動態を可視化する分子センサーを開発し、cAMP、cGMP、ATP、グルコースの生細胞イメージングに適用してきた。そこで、**開発した分子センサーを自由行動中の動物に適用可能な超小型内視顕微鏡を用いた生体イメージング手法と組み合わせることで、AVP 受容体遺伝子欠損マウスの神経疾患症状を解明すること**を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) グルコース、乳酸、ビルビン酸可視化センサーの開発と多色化

従来開発してきた赤色 cAMP センサー、緑色 cGMP センサー、赤・緑・青色 ATP センサーに加え、緑色乳酸センサーとビルビン酸センサー、赤色グルコースセンサーの開発を目指した。蛍光タンパク質センサーは、蛍光タンパク質を分割し、可視化したい分子の結合ドメインを遺伝子工学的に融合することで作成される。両者の間のリンカーの長さやその配列を最適化することで、標的分子の結合に伴い蛍光輝度が顕著に変化するセンサーを構築した。

### (2) 初代培養ニューロンおよびアストロサイトにおける発作応答の解析

生体イメージングに先立ち、発作応答の分子メカニズムを解明するために初代培養ニューロンおよびアストロサイトを用いて各種センサーの観察を行った。生後 1 日のマウスから大脳皮質と海馬の混合組織を採取し、神経細胞とアストロサイトの初代共培養細胞を得た。各種センサーを発現させるために、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) ベクターを用いた。神経細胞には CaMKII $\alpha$  プロモーター、アストロサイトには mGFAP (ABC1D) プロモーターを用いた。作成した各種 AAV ベクターを感染させたのち蛍光顕微鏡で観察し、発作モデルに用いられるカイニン酸を投与してタイムラプス撮影した。

### (3) 生体イメージング技術の確立

マウス脳に各種 AAV ベクターをマイクロインジェクションして感染させ、脳内の観察目標部位に各種センサーを発現させた。さらに GRIN レンズを観察目標部位に挿入し、麻酔下では生体共焦点顕微鏡、自由行動中では超小型内視顕微鏡で観察を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 緑色乳酸センサーとビルビン酸センサー、赤色グルコースセンサーの開発

乳酸散在下で蛍光強度が約5.2倍に上昇する緑色乳酸センサー Green Lindoblum、ピルビン酸存在下で蛍光強度が約3.3倍に上昇する緑色ピルビン酸センサー Green Pegassos を得た。さらに、グルコースに対して異なるアフィニティを持つ2種類の赤色グルコースセンサーを得ることができ、その EC<sub>50</sub> 値に基づき Red Glifon 300 (EC<sub>50</sub>: 300 μM)、Red Glifon 3000 (EC<sub>50</sub>: 3000 μM) と名付けた(図1、文献4、5)。

### (2) 初代培養ニューロンおよびアストロサイトにおける発作応答の解析

カイニン酸を投与すると、ニューロンにおいては ATP とピルビン酸の濃度が持続的に低下し、Ca<sup>2+</sup>とグルコースの濃度が上昇した。一方、アストロサイトにおいては ATP とピルビン酸の濃度が一過的に低下し、Ca<sup>2+</sup>とグルコースの濃度は変化しなかった。このことから、発作時のニューロンでは過興奮に伴うエネルギー消費により細胞内の ATP とピルビン酸が枯渇し、それを補うためにグルコースの取り込みが促進されたと示唆された。

### (3) 生体イメージング技術の確立

マウスのでんかん発作モデルとして用いられるカイニン酸投与において、海馬の CA3 で最も顕著な炎症反応が起こり、次いで CA1 でも炎症反応が起こることが知られている。そこで海馬の CA1 または CA3 で、AAV ベクターのマイクロインジェクションと GRIN レンズ挿入により生体イメージングを目指した。現在までに、海馬全域の AAV ベクター感染とセンサー発現に成功しており(図2) 脳内への GRIN レンズ挿入の手技も確立できたが、発作時の各分子の応答の観察には至っていない。

今後は引き続き超小型内視顕微鏡の装着手技を習得し、てんかん発作と社会行動低下の発症機序解明を試みる。

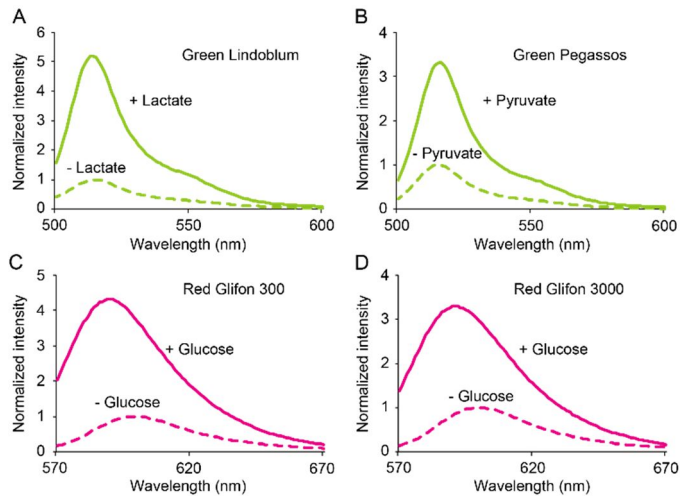


図1 Green Lindoblum (A)、Green Pegassos (B)、Red Glifon 300 (C)、Red Glifon 3000 (D) の精製タンパク質に 10 mM 乳酸 (A)、1 mM ピルビン酸 (B)、10 mM グルコース (C、D) を添加した際の蛍光スペクトル。文献4および5より改変。

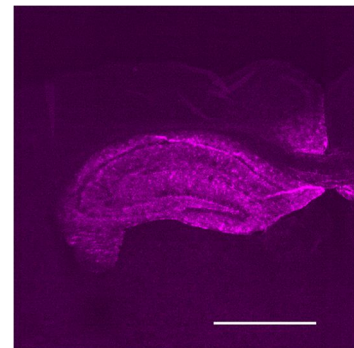


図2 マウス海馬アストロサイトにおける Red Glifon 3000 の発現。スケールバーは 1 mm。

### 文献 (研究代表者には二重下線を付した)

1. Tobin V et al. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* **18**, 413-417, 2010.
2. Yamaguchi Y et al. Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag. *Science* **342**, 85-90, 2014.
3. 江頭伸昭ら. 精神機能におけるバソプレシン受容体の役割. *日薬理誌* **134**, 3-7, 2009.
4. Harada K\*, Chihara T\*, Hayasaka Y\* et al. Green fluorescent protein-based lactate and pyruvate indicators suitable for biochemical assays and live cell imaging. *Sci Rep* **10**, 19562, 2020. \*Equal contribution
5. Mita M\*, Sugawara I\*, Harada K\* et al. Development of red genetically encoded biosensor for visualization of intracellular glucose dynamics. *Cell Chem Biol* **29**, 98-108.e4, 2022. \*Equal contribution

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada K*, Chihara T*, Hayasaka Y*, Mita M, Takizawa M, Ishida K, Arai M, Tsuno S, Matsumoto M, Ishihara T, Ueda H, Kitaguchi T, Tsuboi T. *Equal contribution	4. 巻 10
2. 論文標題 Green fluorescent protein-based lactate and pyruvate indicators suitable for biochemical assays and live cell imaging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76440-4	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 Mita Marie, Sugawara Izumi, Harada Kazuki, Ito Motoki, Takizawa Mai, Ishida Kentaro, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya, Tsuboi Takashi	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of red genetically encoded biosensor for visualization of intracellular glucose dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 108.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2021.06.002	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

緑色蛍光タンパク質型乳酸センサーとピルビン酸センサーの開発 <a href="https://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/files/20201113sobuntsuboi101.pdf">https://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/files/20201113sobuntsuboi101.pdf</a> 赤色蛍光タンパク質型グルコースセンサーの開発 <a href="https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0109_00005.html">https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0109_00005.html</a>
---

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