

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229004

研究課題名(和文) 中枢神経系細胞間ネットワークにおけるシグナル機構の可視化解析

研究課題名(英文) Imaging analyses of signaling mechanism in central nervous system cell-cell network

研究代表者

飯野 正光 (Iino, Masamitsu)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50133939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 156,700,000円、(間接経費) 47,010,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系において、Ca²⁺シグナルの未知機能探索とシグナル分子可視化研究を介して中枢神経ネットワーク機能について以下の成果を得た。(1) アストロサイト細胞内Ca²⁺シグナルを介したアストログリアーシス機構および神経細胞保護作用を明らかにした。(2) グルタミン酸シグナルがどのような時空間分布をとって伝達を行っているかについて、直接的な解析に初めて成功した。生体脳内測定へと拡張し、感覚入力によりグルタミン酸スピルオーバーが起きることを証明した。(3) NOによるCa²⁺放出(NICR)を発見。小脳シナプス長期増強を惹起することとNOによる神経細胞死にNICRが関与し得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：We searched for previously unidentified functions of intracellular Ca²⁺ signals in the central nervous system (CNS) using imaging methods for signaling molecules, and obtained the following results as regard the network mechanism in the CNS. (1) We discovered astrocytic Ca²⁺ signaling-mediated mechanism for astrogliosis and neuroprotection. (2) We succeeded in the visualization of spatiotemporal dynamics of glutamate signaling. This study was extended to in vivo glutamate imaging, and proved that sensory input induces glutamate spillover. (3) We discovered NO-induced Ca²⁺ release mechanism (NICR). NICR is involved in the long-term potentiation in the cerebellar cortex and in NO-mediated neuronal cell death.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：受容体 チャンネル 輸送系 シグナル情報伝達

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、多数のニューロンおよびグリア細胞間の複雑なネットワーク機構により機能を果たしており、これを統合的に理解するには、基本的なネットワーク機構を明らかにすることが必須である。中枢神経細胞は複雑な形態をもち、細胞局所におけるシグナル伝達が神経回路の性質を決定している。従って、細胞局所のシグナル機構を解析できるシグナル分子可視化法は、ネットワーク機構解析に極めて有効であり欠くことのできない手法である。また、中枢神経系において、Ca²⁺シグナルは神経伝達物質放出やシナプス可塑性などに関与することが知られているが、Ca²⁺が制御する未知機能も多数残されている。これら未知機能を明らかにすることにより、ネットワーク機構を新たな側面から展望することが可能になると期待できる。

2. 研究の目的

ニューロン・ニューロン相互作用とニューロン・グリア相互作用に焦点を絞り、Ca²⁺シグナルの未知機能解明とシグナル分子可視化研究を介して中枢神経ネットワーク機構研究を格段に進めることを目的としている。具体的には、以下のテーマについてブレークスルーを目指す研究を推進する。

(1) IP₃-Ca²⁺シグナルの新機能探索 アストロサイトの形態維持機構・神経細胞機能維持機構と大脳皮質におけるシナプス維持機構などについて、IP₃-Ca²⁺シグナルの機能的意義の解析を進める。これに際し、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 解析を進める。

(2) グルタミン酸動態解析 主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸シグナルの時空間分布について、直接的な解析は行われていない。そこで、新たなグルタミン酸プローブ (EOS) を使い、細胞間ネットワークにおけるグルタミン酸シグナルの可視化解析を行ってグルタミン酸動態を明らかにする。

(3) NO シグナル・Ca²⁺シグナル関連機構 NO

シグナルは、小脳シナプス可塑性を誘発する。この機構に細胞内 Ca²⁺放出機構が関連することを示す成果を既に得ている。この新たなシグナル伝達様式の分子機構と、生理的および病態生理的意義を明らかにし、中枢神経系における NO シグナルの意義を明確にする。

3. 研究の方法

分子生物学、分子遺伝学、電気生理学など必要な方法は全て用い、先端的な顕微鏡法による可視化解析を進めた。特徴的な手法を以下に説明する。

(1) IP₃-Ca²⁺シグナルの意義を解析するため、このシグナル伝達を IP₃ 5-phosphatase を用いて抑制した。また、アストロサイトでは IP₃ 受容体 2 型 (IP₃R2) が Ca²⁺シグナルに関与することが知られているので、IP₃R2 ノックアウトマウスを用いた解析を行った。

(2) グルタミン酸動態の可視化には、EOS を脳組織の細胞外に固定し、2光子励起顕微鏡を用いて観測した。脳スライス標本を用いた測定とともに、*in vivo* イメージング法も行った。

(3) NO による Ca²⁺放出機能については、培養細胞を用いて分子的な解析を進めた。シナプス伝達における機能は、脳スライス標本を用いた電気生理学的測定を行った。また、病態生理機能を明らかにするため、中大脳動脈閉塞モデルおよび NO 合成酵素 (Nos1) ノックアウトマウスを用いて解析を行った。

4. 研究成果

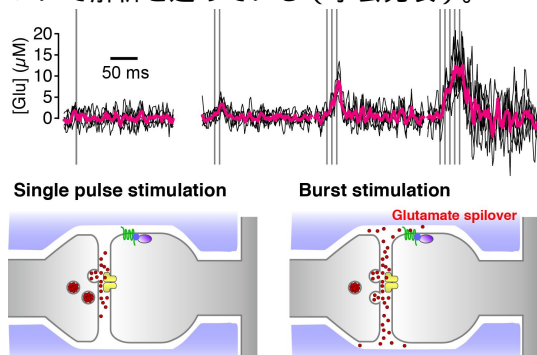
(1) Ca²⁺シグナルの新機能探索 脳に対する様々な傷害に対して、アストロサイトでは細胞内 Ca²⁺シグナルが形成され、これがアストロサイトの N-カドヘリンの発現を調節して、活性化アストログリオシスを惹起し、神経細胞の保護に関与することを、遺伝子改変マウスを用いて明らかにした。また、翻訳抑制因子である Pum2 が、Ca²⁺シグナル依存性に N-カドヘリンの発現を調節する新たな機構も明らかにした。本成果は、後継の基盤 (S)

研究に引き継ぎ論文を発表した(文献)。

(2) Ca²⁺シグナルの新機能探索 末梢神経の髄鞘形成に、神経細胞の活動に依存したシュワン細胞内 Ca²⁺シグナルが関与することを明らかにした。さらに、この機構にミトコンドリアの関与を示す結果が得られている。ミエリン形成機構を明らかにする重要な発見であると考えられ、論文発表の準備を進めている。

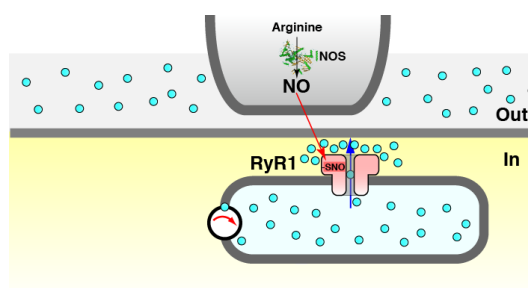
(3) Ca²⁺シグナルの新機能探索 大脳皮質シナプスにおいて、ポストシナプス側の代謝型グルタミン酸受容体を介する IP₃-Ca²⁺シグナルの意義を解析し、シナプスの機能維持機構に関与することを明らかにし、論文発表の準備を進めている。

(4) グルタミン酸動態解析 グルタミン酸プロブ (EOS) を用いて、小脳スライス標本において平行線維刺激によりシナプス前部から放出されたグルタミン酸がシナプス外へ漏れだすスピルオーバーの可視化測定に成功した。これにより、バースト刺激によりスピルオーバーが生じ、数 μM 程度の細胞外濃度に達することを明らかにした。さらに、グルタミン酸可視化法をラット生体脳内測定へと拡張し、感覚入力によりグルタミン酸スピルオーバーが起きることも証明した。以上の成果について論文を発表した(文献)。マウス生体脳内グルタミン酸可視化測定をさらに拡張し、脳の自発活動との関連などについて解析を進めている(学会発表)。



(5) NO シグナル・Ca²⁺シグナル関連機構 小脳皮質では平行線維電気刺激により、濃度数 μM に達する NO シグナルが形成され、プルキンエ細胞のグルタミン酸感受性を高めてシナプス長期増強を誘発する。NO から長期増強に

至る過程を追及したところ、プルキンエ細胞内のリアノジン受容体が NO により活性化される NO による Ca²⁺放出機構(NICR)を発見し、これが長期増強に関与することを示す成果を得た。NICR 機構にリアノジン受容体の S-ニトロシル化が関与することを明らかにした。さらに、NICR が虚血性脳障害に関与することを示す結果を得て論文発表を行った(文献)。この成果を個体レベルでの解析に応用するため、リアノジン受容体の S-ニトロシル化部位を変異させたノックインマウスの作成を行った。



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 10 件) 全て査読あり

Kanemaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y. and Iino, M.

Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. **Proc Natl Acad Sci USA** 110, 11612-11617, 2013. doi: 10.1073/pnas.1300378110.

Yano, F., Saito, T., Ogata, N., Yamazawa, T., Iino, M., Chung, U.I. and Kawaguchi, H.

β-catenin regulates PTH/PTHrP receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to its intracellular C-terminal region.

Arthritis Rheum. 65, 429-435, 2013. doi: 10.1002/art.37779.

Kakizawa, S., Yamazawa, T. and Iino, M.

Nitric oxide-induced calcium release: activation of type 1 ryanodine receptor by

endogenous nitric oxide. **Channels** 7, 1–5, 2013. doi: 10.4161/chan.22555.

Kakizawa, S., Takeshima, H. and Iino, M. Nitric oxide-induced calcium release: A novel calcium-mobilizing mechanism mediated by S-nitrosylation-dependent modulation of ryanodine receptor. **Messenger**. 1, 133–140, 2012. doi:10.1166/msr.2012.1011.

Kakizawa, S., Yamazawa, T., Chen, Y., Ito, A., Murayama, T., Oyamada, H., Kurebayashi, N., Sato, O., Watanabe, M., Mori, N., Oguchi, K., Sakurai, T., Takeshima, H., Saito, N. and Iino, M. Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. **EMBO J.** 31, 417-428, 2012. doi: 10.1038/emboj.2011.386.

Okubo, Y., Kanemaru, K. and Iino, M. Imaging of Ca²⁺ and related signaling molecules and investigation of their functions in the brain. **Antioxid Redox Signal**. 14, 1303-1314, 2011. doi: 10.1089/ars.2010.3367.

Okubo, Y. and Iino, M. Visualization of glutamate as a volume transmitter. **J. Physiol.** 589, 481-488, 2011. doi: 10.1113/jphysiol.2010.199539.

Mashimo, M., Okubo, Y., Yamazawa, T., Yamasaki, M., Watanabe, M., Murayama, T. and Iino, M. Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains the activity of glutamate uptake in Bergmann glia. **Eur. J. Neurosci.** 32, 1668-1677, 2010. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07452.x.

Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Iinuma, S., Yamasaki, M., Watanabe, M., Hirose, K. and Iino, M. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 107, 6526-6531, 2010. doi: 10.1073/pnas.0913154107.

Iino, M. Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. **Proc.**

Jpn. Acad. Ser. B-Phys. Biol. Sci. 86, 244-256, 2010. doi: 10.2183/pjab.86.244

[学会発表] (計 88 件)

Iino, M. Involvement of intracellular Ca²⁺ release in nitric oxide-dependent neuronal cell death (Plenary Lecture), The 21st Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, 2012/11/1, Shineville Luxury Resort, Jeju, Korea.

Iino, M. Pathophysiological roles of the astrocytic intracellular Ca²⁺ release mechanism in the brain. New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, 2011/11/15, The Luigans, Fukuoka, Japan.

Iino, M. Nitric oxide-induced Ca²⁺ release from intracellular stores: a new regulatory mechanism of neuronal function in the brain. UT-MPS Neuroscience Symposium, 2011/10/28, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Iino, M. Synaptic functions probed by chemobiomolecular indicators. The Uehara Memorial Foundation Symposium 2011, 2011/06/07, Hyatt Regency Tokyo, Tokyo, Japan.

Iino, M. Calcium and cell functions. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (Plenary Lecture), 2010/07/21, Bella Centre, Copenhagen, Denmark.

Iino, M. Ryanodine receptor: NO connection in the brain. 16th Symposium on Ca²⁺-Binding Proteins and Ca²⁺ Function in Health and Disease, 2009/11/20, Gran Hotel Pucon, Pucon, Chile.

Iino, M. Intracellular calcium release mechanisms in central nervous system functions. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), 2009/07/31, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

Iino, M. NO activation of RyRs in the brain. Gordon Research Conference, 2009/06/16, Waterville Valley Resort, Waterville Valley, NH, USA.

他 80 件

〔図書〕(計1件)

Iino, M. Synaptic function monitored using chemobiomolecular indicators. *In* Chemobiomolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology. pp. 207–215, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 正光 (IINO, Masamitsu)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50133939

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山澤徳志子 (YAMAZAWA, Toshiko)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00282616

大久保洋平 (OKUBO, Yohei)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40422282

金丸和典 (KANEMARU, Kazunori)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10456105

関谷 敬 (SEKIYA, Hiroshi)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40511374