

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500285

研究課題名（和文） セロトニン2A受容体を介するストレス応答性シナプス修飾機構の研究

研究課題名（英文） STUDY OF SYNAPTIC MODULATORY MECHANISMS IN RESPONSE TO STRESS MEDIATED BY 5-HT<sub>2A</sub> RECEPTOR

研究代表者

大倉 正道（OHKURA MASAMICHI）

埼玉大学・脳科学融合研究センター・准教授

研究者番号：70369172

研究成果の概要（和文）：単一発火活動やシナプス入力に対応した神経細胞の微弱なカルシウムシグナルを検出可能にするため、高性能な蛍光カルシウムプローブ（改良 G-CaMP および R-CaMP）を開発した。また、光刺激プローブであるチャンネルロドプシンをセロトニン（5-HT）作動性 HSN 神経に発現させ、かつ GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体、または改良 G-CaMP を HSN 神経が投射する産卵筋細胞に発現させた線虫株の光刺激と蛍光可視化を同時に実施するための実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）：To enable detection of small calcium signals of neurons in response to single action potentials or synaptic inputs, we developed high-performance genetically-encoded fluorescent calcium indicators (improved G-CaMPs and R-CaMPs). We also established an experimental system for simultaneous photo-stimulation and fluorescence imaging of *C. elegans* expressing channelrhodopsin-2 in the HSN neuron and GFP-labeled 5-HT<sub>2A</sub> or an improved G-CaMP in the vulval muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：セロトニン 2A、神経活動、シナプス、カルシウムシグナル、蛍光イメージング、G-CaMP、光刺激、チャンネルロドプシン

## 1. 研究開始当初の背景

近年ストレスによる精神疾患発症への関与で注目されているセロトニン<sub>2A</sub>（5-HT<sub>2A</sub>）受容体は、中枢において感情・知覚等の制御において重要な役割を果たしている Gq 蛋白質共役型の細胞膜受容体である（J Pharmacol Exp Ther 79, 231, 1998）。受容体の細胞膜発現量は時々刻々と変化している。実際にストレ

ス等の外界からの様々な刺激によって 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の細胞膜発現レベルが変化する。例えば鬱病患者では、感情の脳内制御部位の一つでもある海馬において、5-HT<sub>2A</sub> 受容体の細胞膜発現レベルの減弱が認められる（Neuropsychopharmacol 29, 2235, 2004; Biol Psychiatry 55, 217, 2004）。同様に、ストレスの反復負荷を与えたマウスやラットの海馬においても、5-HT<sub>2A</sub> 受容体発現レベルの減弱

が報告されている (Brain Res 980, 169, 2003; Neuropharmacol 48, 204, 2005)。このことから 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介したストレスシグナルが 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の膜発現レベルの減弱を起こして 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を含有するシナプス特性を大きく変化させ、情動が修飾される可能性が考えられた。

研究代表者と研究分担者である中井淳一博士は、発火活動やシナプス入力といった神経活動を生体レベルで蛍光イメージング解析するためのツールとしての蛋白質性蛍光 Ca<sup>2+</sup>プローブを開発し、そのトランスジェニックマウス等を作成して機能解析を行ってきた。我々が開発した G-CaMP (Nature Biotechnol 19, 137, 2001) とその改良体の遺伝子は現在国内外の 300 箇所以上の研究室で使用されるまでに普及している。

またもう一人の研究分担者である安藤恵子博士は、線虫の各種遺伝子改変株を樹立して体系的に遺伝子機能の解明を進めてきた。

線虫は、神経機能の変化を生体レベルで蛍光イメージング解析するための標本として優れ、さらに遺伝子改変株を樹立するのにも適している。ストレスに対する生体応答は高等動物に限定されるものではない。僅かに 959 個の体細胞総数から成る線虫でもストレス応答の分子機構が生物の種を超えて保存されていると推定される。

以上のような背景から、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

5-HT 作動性神経シナプスにおいて、5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介したストレスシグナルが 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の細胞膜発現量やシナプス機能に対してどのような影響を及ぼすのかを蛍光分子イメージング法により解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) GFP標識5-HT<sub>2A</sub>受容体や各種プローブを発現させた遺伝子改変線虫株の作出

### ① 高性能な蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブの開発

遺伝子工学的手法を用いて、従来型の G-CaMP に種々の変異を導入した改変体を多数試作した。試作したプローブを大腸菌で発現させて精製し、蛍光分光光度計および分光光度計を用いて光学測定して *in vitro* のプローブ性能を評価し、有望なプローブを探索した。

有望なプローブの cDNA は動物細胞発現ベクターに組み込んで HeLa 等の培養細胞にリポフェクション法で導入した。ATP 等の Ca<sup>2+</sup>

上昇を誘発する試薬を投与し、その際の蛍光変化を蛍光顕微鏡を用いて測定して培養細胞でのプローブ性能を評価した。

培養細胞の評価系でも有望と判断されたプローブはさらにラット海馬培養スライス中の神経細胞に単一細胞電気穿孔法により発現させた。パッチピペットを介した電流注入により誘発させた活動電位に応答した蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で解析し、神経細胞でのプローブ性能を評価した。

### ② 遺伝子改変線虫株の作出

遺伝子工学的手法を用いて、線虫発現用プロモーターを有する発現ベクターに GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体 (Proc Natl Acad USA 99, 14470, 2002) や各種プローブの cDNA を組み込んだコンストラクトを作製した。このコンストラクトを線虫雌雄同体の生殖巣にマイクロインジェクションして遺伝子改変線虫株を作成した。

### (2) 線虫の光刺激と蛍光可視化

光刺激プローブであるチャンネルロドプシン (ChR2) を 5-HT 作動性神経に発現させ、かつ GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体や改良 G-CaMP を 5-HT 作動性神経が投射するシナプス後細胞に発現させた線虫株を使用し、ChR2 の光刺激と GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体や改良 G-CaMP の蛍光可視化を同時に実施した。光刺激時の GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の局在や改良 G-CaMP の蛍光は共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

### (3) 海馬神経細胞の光刺激と蛍光可視化

ChR2 と R-CaMP をラット海馬培養スライス標本中の神経細胞に単一細胞エレクトロポレーション法により発現させ、ChR2 の光刺激と R-CaMP の蛍光可視化を同時に実施した。光刺激時の R-CaMP の蛍光は共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 高性能な蛍光 Ca<sup>2+</sup>プローブの開発

Ca<sup>2+</sup>感受性や蛍光シグナルを改善させることが報告されている既知の変異やランダム変異を遺伝子工学的に導入した G-CaMP2 の改変体を多数試作し、より高い性能を示すセンサーを *in vitro*、HeLa 細胞および海馬神経細胞の評価系で選抜した。その結果、Ca<sup>2+</sup>感受性が高い改変体である G-CaMP6 や蛍光変化量が大きい G-CaMP8 を見出すことに成功した (図 1)。

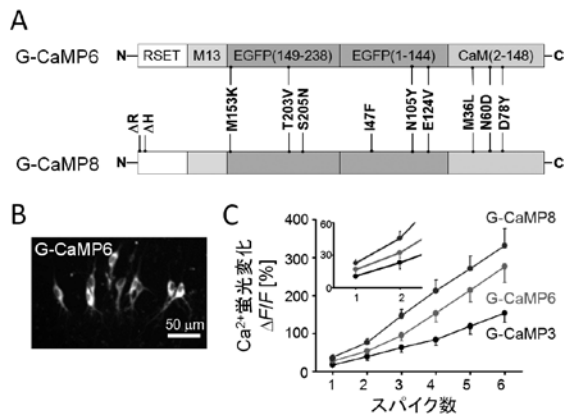


図1 従来型蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブG-CaMP2への変異導入により開発された改良型プローブG-CaMP6とG-CaMP8の構造と性能。(A) G-CaMP6とG-CaMP8の構造模式図。アミノ酸変異はプロトタイプのG-CaMP2を基に記載した。(B) G-CaMP6発現細胞の蛍光画像。海馬培養スライス標本のCA3野錐体細胞に単一細胞エレクトロポレーション法でG-CaMP6を発現させた。(C) 誘発させた1~6回のスパイク活動(50 Hz)に対する各種G-CaMP発現細胞の細胞体におけるピークCa<sup>2+</sup>蛍光変化(ΔF/F)。(論文2の図を改変)

さらに我々はスパインのCa<sup>2+</sup>変動を検出できるCa<sup>2+</sup>プローブの開発に取り組んだ。前出の高感度なCa<sup>2+</sup>プローブG-CaMP6とactinを遺伝子工学的手法で融合させた蛋白質であるG-CaMP6-actinを作製した(図2)。

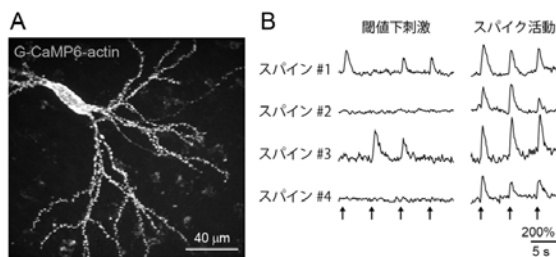


図2 G-CaMP6-actinによるスパイン内のCa<sup>2+</sup>活動の検出。(A) G-CaMP6-actin発現細胞の蛍光画像。海馬培養スライス標本のCA3野錐体細胞にG-CaMP6-actinを発現させた。視野内のほぼすべてのスパインに蛍光蛋白質の発現が確認できる。(B) 歯状回に電気刺激を行った際の典型的なスパインのCa<sup>2+</sup>蛍光変化。上向き矢印は刺激タイミングを示す。閾値下の刺激では約半数のスパインが確率的にCa<sup>2+</sup>活動するのに対し、細胞体にスパイク活動を起こす閾値上の刺激では、ほぼすべてのスパインでCa<sup>2+</sup>蛍光上昇が観測される。(論文2の図を改変)

またG-CaMPと異なり赤色蛍光を発するCa<sup>2+</sup>プローブR-CaMP1.07を開発した(図3)。R-CaMP1.07とChR2を同一の神経細胞に発現させ、R-CaMP1.07を568 nmの光で励起し、ChR2を488 nmの光で活性化したところ、ChR2の活性化によって誘発された人為的な活動電位をR-CaMP1.07の蛍光変化として検出することに成功した。

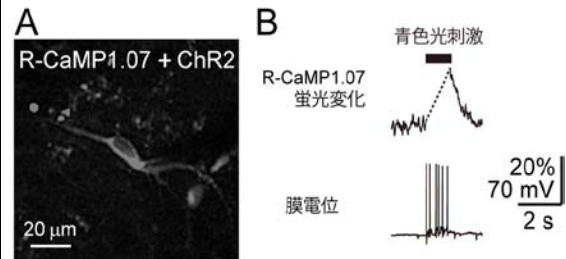


図3 ChR2の光刺激により誘発された細胞活動のR-CaMP1.07による検出。(A) 海馬CA3野の錐体細胞にR-CaMP1.07とChR2を同時に発現させた。(B) R-CaMP1.07の蛍光可視化中に青色光刺激を行った。光刺激によってスパイク活動が誘発され(下)、それに伴ってR-CaMP1.07の蛍光強度が増大した(上)。(論文3の図を改変)

R-CaMPと改良G-CaMPの励起および蛍光波長はほとんど重複しないため、R-CaMPと改良G-CaMPを用いてシナプス前・後の神経活動性を異なる2波長で測定することが可能になった。

## (2) 5-HT作動性神経シナプスにおけるGFP標識5-HT<sub>2A</sub>受容体の局在とシナプス特性の変化の解析

線虫の前進運動時には体壁筋に投射している5-HT作動性神経の活動が亢進することが知られている。そこで野生型(WT)および5-HT合成酵素欠損変異体(*tph-1*)の線虫を用いて前進運動時における5-HT作動性神経活動の関与を検討した。改良G-CaMPを用いて体壁筋のCa<sup>2+</sup>変動を可視解析した結果、*tph-1*ではCa<sup>2+</sup>変動が低下していることが見出された。このことから、*tph-1*では5-HT伝達不全により、シナプス後部の体壁筋における5-HT作動性神経シナプス機能が阻害されて筋緊張が低下していることが考えられた。

一方、線虫の産卵時には産卵筋に投射している5-HT作動性神経(HSN神経)の活動が亢進することが知られている。産卵筋には5-HT<sub>2A</sub>受容体ホモログ(SER-1)が発現している。そこでGFP標識5-HT<sub>2A</sub>受容体を産卵筋細胞に発現させることを試みた。その結果、発現させたGFP標識5-HT<sub>2A</sub>受容体は細胞膜

に局在することが確認された (図 4)。

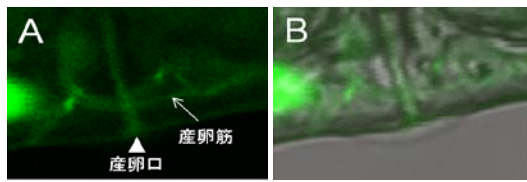


図 4 線虫の産卵筋細胞に発現させた GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の局在。(A) GFP 蛍光像。(B) GFP 蛍光像と透過光像の重ね合わせ。

次に HSN 神経細胞を人為的に興奮させた時にシナプス後部の産卵筋細胞における GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の局在とシナプス特性がどのように変化するかを解析するための実験系の構築を進めた。HSN 神経細胞には光刺激プローブ ChR2 を発現させ、産卵筋細胞には GFP 標識 5-HT<sub>2A</sub> 受容体や改良 G-CaMP を発現させた。ここで ChR2 の光刺激とイメージングを同時に実施したところ、まず改良 G-CaMP の蛍光上昇が観測され、その蛍光がピークに達した時に産卵行動が誘発された。

現在、HSN 神経の光刺激による産卵筋 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の局在変化について詳細な解析を進めている。

#### 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 8 件)

1. Muto A\*, Ohkura M\*, Abe G, Nakai J, Kawakami K: Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Current Biology* 23, 307-311 (2013). \*Co-first authors. 査読有  
doi:10.1016/j.cub.2012.12.040
2. Ohkura M\*, Sasaki T\*, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J: Genetically encoded green fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators with improved detectability for neuronal Ca<sup>2+</sup> signals. *PLoS One* 7, e51286, 1-10 (2012). \*Co-first authors. 査読有  
doi:10.1371/journal.pone.0051286
3. Ohkura M\*, Sasaki T\*, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J: An improved genetically encoded red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator for optically evoked action potentials. *PLoS One* 7, e39933, 1-7 (2012). \*Co-first authors. 査読有  
doi:10.1371/journal.pone.0039933

4. 大倉正道, 中井淳一: 遺伝子コード型赤色蛍光 Ca<sup>2+</sup>プローブ R-CaMP1.07. *日本薬理学雑誌* 141, 175-175 (2013). 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1254/fpj.141.175>
5. 大倉正道, 貞莉純子, 中井淳一: タンパク質でできた高性能な蛍光カルシウムセンサー. *ケミカルエンジニアリング* 57, 926-931 (2012). 査読有
6. Kawabata I, Kashiwagi Y, Obayashi K, Ohkura M, Nakai J, Wynshaw-Boris A, Yanagawa Y, Okabe S: LIS1-dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nature Communications* 3:722, 1-13 (2012). 査読有  
doi:10.1038/ncomms1736
7. Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S-I, Nakai J, Kawakami K: Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 5425-5430 (2011). 査読有  
doi:10.1073/pnas.1000887108
8. Sudo Y, Matsuo K, Tetsuo T, Tsutsumi S, Ohkura M, Nakai J, Uezono Y: Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca<sup>2+</sup> influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: evidence from *Xenopus* oocytes and mammalian cell expression system. *J Pharmacol Sci* 114, 281-291 (2010). 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.10169FP>

[学会発表] (計 19 件)

1. 真仁田聡, 鈴木崇之, 小田川摩耶, 松原智恵, 大倉正道, 佐藤正晃, 中井淳一, 林康紀, M.E. Larkum, 村山正宜: *In vivo* マウス脳における皮質間の相互連絡. 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 03 月 27 日~2013 年 03 月 29 日, 東京 (タワーホール船堀)
2. 大倉正道, 佐々木拓哉, 小林千晃, 池谷裕二, 中井淳一: 改良型赤色蛍光カルシウムプローブ蛋白質 R-CaMP1.07 を用いた channelrhodopsin-2 の光刺激による神経発火の可視化. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 21 日~2013 年 03 月 23 日, 福岡 (福岡国際会議場)
3. 貞莉純子, 大倉正道, 佐々木拓哉, 安藤恵子, 永村ゆう子, 小林千晃, 池谷裕二, 中井淳一: 高感度かつ高速応答性の G-CaMP 型改良カルシウムプローブ蛋白質を用いた細胞単位およびシナプス単位での神経活動の可視化. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 21 日~2013

- 年 03 月 23 日, 福岡 (福岡国際会議場)
4. 鈴木純二, 金丸和典, 石井邦明, 大倉正道, 飯野正光: タンパク質型  $Ca^{2+}$  インジケーターによる小胞体内腔  $Ca^{2+}$  動態の可視化と機能解析. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 21 日~2013 年 03 月 23 日, 福岡 (福岡国際会議場)
  5. 安藤恵子, 宇佐美篤, 永村ゆう子, 大倉正道, 池谷裕二, 松木則夫, 中井淳一: 改良型 G-CaMP を用いた自由運動中の線虫神経筋活動の  $Ca^{2+}$  イメージング. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日, 福岡 (福岡国際会議場)
  6. 安藤恵子, 宇佐美篤, 永村ゆう子, 大倉正道, 池谷裕二, 松木則夫, 中井淳一: 生体  $Ca^{2+}$  imaging を用いた線虫運動出力系の調節機構の解明. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム, 2012 年 09 月 18 日~2012 年 09 月 21 日, 名古屋 (名古屋国際会議場)
  7. 丸岡久人, 中川直, 佐伯麻衣, 松本直実, 大倉正道, 中井淳一, 細谷俊彦: 深層における特定のニューロナルサブタイプからの *in vivo* カルシウムイメージング. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム, 2012 年 09 月 18 日~2012 年 09 月 21 日, 名古屋 (名古屋国際会議場)
  8. 佐藤正晃, イスラムタンビル, 竹川高志, 山川宏, 河野真子, 山口陽子, 深井朋樹, 大倉正道, 中井淳一, 林康紀: 二光子カルシウムイメージングのためのマウス仮想ナビゲーションシステム. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム, 2012 年 09 月 18 日~2012 年 09 月 21 日, 名古屋 (名古屋国際会議場)
  9. Ohkura M, Sasaki T, Ikegaya Y, Nakai J: Probing activities of single neurons with an improved genetically encoded  $Ca^{2+}$  indicator. 8th FENS Forum of Neuroscience, 2012 年 07 月 14 日~2012 年 07 月 18 日, Barcelona, Spain (International Convention Center)
  10. 大倉正道: 蛍光カルシウムプローブ蛋白質を用いたグリアー神経連関の可視化. 第 86 回日本薬理学会年会シンポジウム (招待講演), 2013 年 03 月 21 日~2013 年 03 月 23 日, 福岡 (福岡国際会議場)
  11. Ohkura M, Nakai J: Development and neuronal application of G-CaMP-type genetically encoded  $Ca^{2+}$  indicators with high-sensitivity and high-responsivity. 高等研プロジェクト「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」研究会 (招待講演), 2013 年 02 月 22 日~2013 年 02 月 23 日, 木津川 (国際高等研究所)
  12. Ohkura M, Nakai J: Development and application of G-CaMP-type genetically encoded  $Ca^{2+}$  indicators. 2012 Fall Janelia Conference "Fluorescent Proteins and Biological Sensors III" (招待講演), 2012 年 11 月 04 日~2012 年 11 月 07 日, Ashburn, USA (Janelia Farm Research Campus)
  13. 大倉正道: 生体での細胞活動を検出できる高性能蛍光  $Ca^{2+}$  センサーの開発: G-CaMP から R-CaMP まで. 九州大学大学院薬学研究院 第 1 回創薬育産学官連携セミナー (招待講演), 2012 年 08 月 16 日, 福岡 (九州大学大学院薬学研究院)
  14. 稲生大輔, 金丸和典, 大久保洋平, 石井邦明, 大倉正道, 飯野正光: 軸索・シユワン細胞間 ATP シグナルを介したミエリン鞘形成機構. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 03 月 14 日~2012 年 03 月 16 日, 京都 (国立京都国際会館)
  15. 大倉正道, 武藤彩, 小谷友也, 東島眞一, 川上浩一, 中井淳一: カルシウムプローブ蛋白質によるゼブラフィッシュ脊髄運動神経の時空間活動の可視化. 第 85 回日本薬理学会年会. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 03 月 14 日~2012 年 03 月 16 日, 京都 (国立京都国際会館)
  16. 鈴木純二, 金丸和典, 石井邦明, 大倉正道, 飯野正光: タンパク質型  $Ca^{2+}$  インジケーターによる小胞体内腔  $Ca^{2+}$  動態の可視化と機能解析. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 03 月 14 日~2012 年 03 月 16 日, 京都 (国立京都国際会館)
  17. 大倉正道, 進藤麻子, 原佑介, 山本隆正, 上野直人, 中井淳一: GCaMP 型改良カルシウムプローブ蛋白質を用いた *Xenopus* 胚発生時のカルシウム動態の可視化. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 03 月 22 日~2011 年 03 月 24 日, 横浜 (パシフィコ横浜)
  18. 稲生大輔, 金丸和典, 大久保洋平, 石井邦明, 大倉正道, 飯野正光: シユワン細胞における ATP-イノシトール 1,4,5-三リン酸シグナルを介したミエリン鞘形成機構. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 03 月 22 日~2011 年 03 月 24 日, 横浜 (パシフィコ横浜)
  19. 中井淳一, 安藤恵子, 宇佐美篤, 大倉正道, 池谷裕二, 松木則夫: G-CaMP を用いた線虫体壁筋の *in vivo* カルシウムイメージング. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 03 月 22 日~2011 年 03 月 24 日, 横浜 (パシフィコ横浜)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：赤色蛍光蛋白質を用いたカルシウムセンサー蛋白質

発明者：大倉正道、中井淳一

権利者：国立大学法人埼玉大学

種類：特許

番号：特願 2012-137434

出願年月日：24年6月19日

国内外の別：国内

名称：特定部位のアミノ酸を置換した緑色蛍光蛋白質またはそのホモログを用いたカルシウムセンサー蛋白質

発明者：大倉正道、中井淳一

権利者：国立大学法人埼玉大学

種類：特許

番号：特願 2010-232788

出願年月日：22年10月15日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://subsi.saitama-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大倉 正道 (OHKURA MASAMICHI)

埼玉大学・脳科学融合研究センター・准教授

研究者番号：70369172

### (2) 研究分担者

中井 淳一 (NAKAI JUNICHI)

埼玉大学・脳科学融合研究センター・教授

研究者番号：80237198

安藤 恵子 (ANDO KEIKO)

埼玉大学・脳科学融合研究センター・特任准教授

研究者番号：40221741

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：