

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25410149

研究課題名(和文)電気化学センサーを用いる脳内グルタミン酸計測の高度化と応用

研究課題名(英文)Advanced design and application of an electrochemical sensor for monitoring of glutamate in brain slices

研究代表者

菅原 正雄 (SUGAWARA, Masao)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：50002176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが開発したキャピラリー酵素センサーを用いる哺乳類脳内のグルタミン酸の計測に関して、電気化学センサーの信号と電気生理学的信号とを同時、かつreal timeに記録することを行う上での問題点を考察し、実際の実験に基づいて諸問題を解決した。本法が脳内のグルタミン酸濃度を計測する優れたツールになることを示した。グルタミン酸濃度の実測に基づいて、神経可塑性の分子機構に関して、前膜からのグルタミン酸放出の増加があることを支持する実験的証拠を示した。さらに、フロー系におけるグルタミン酸の化学イメージング法を提案した。

研究成果の概要(英文)：An obstacle for the simultaneous monitoring of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) and glutamate currents at a glass capillary-based L-glutamate sensor was investigated. The proposed protocols were tested to acquire Faradaic currents at the region CA1 of mouse hippocampal slices and showed that the present approach is a useful technique knowing L-glutamate level at CA1 region in brain slices. We showed an evidence that the release of glutamate is enhanced after the induction of long-term potentiation in the presence and absence of an AMPA receptor CNQX. Also, we proposed a new method for chemical imaging of extracellular L-glutamate in a flow system.

研究分野：分析化学

キーワード：L-グルタミン酸 イオセンシング 電気化学センサー fEPSP 急性脳スライス 神経伝達物質 可視イメージング パ

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに生きた脳組織で放出されるグルタミン酸の濃度を計測するツールとして、キャピラリー酵素センサー、生体膜パッチセンサー、酵素膜イメージング法を開発、マウス脳から切り出した急性海馬スライスに適応し、主に化学刺激によって放出されるグルタミン酸の神経領野ごとの濃度を定めてきた。また、方法的視点、特に確度の観点からの整理を行い、濃度の正しさを把握することを試みてきた。その過程において、電気生理学者が得意とし、汎用する手法を活かしたうえでグルタミン酸濃度を直接計測する技術を開発することが役立つと判断し、興奮性シナプス後膜電位とグルタミン酸濃度の同時計測をすることに至った。その結果、LTPの生起後にグルタミン酸の放出量が増加すること及び後膜のグルタミン酸受容体（NMDA および AMPA 受容体）の働きを阻害剤により止めた場合でも、グルタミン酸の放出が続くことをキャピラリー酵素センサーにより突き止めた。

このような背景のもと、電気化学計測法と電気生理学的手法の融合をめざし、関連する諸問題点を整理、解決することは今後のこの分野の進展に役立つと判断した。

2. 研究の目的

神経可塑性と呼ばれている現象は、神経伝達が増強あるいは抑圧される現象、すなわち長期増強現象（LTP）と長期抑圧現象（LTD）を伴う。この過程は記憶・学習の素過程として理解されている。神経領野は数十μmのサイズであり、申請者は、これまで分子機構の解明には同程度のサイズのバイオセンサーを用いてグルタミン酸を“直接”

計測することが重要と考え、キャピラリー酵素センサーを開発し、“生きた”脳スライス組織である急性海馬スライスに適応して、神経領野ごとのグルタミン酸濃度を定めることを行ってきた。

本研究では、電気化学センサーの信号と電気生理学的信号を同時に記録する技術の構築がLTPの分子機構の解明に重要なツールとなることを示すと同時に、得られるグルタミン酸濃度に立脚して、LTPの分子機構の課題解決に寄与することを目的とする。具体的にはキャピラリー酵素センサーを用いるこれまでの知見を基盤として次の研究を行う。

- (1) 細胞外グルタミン酸放出の計測上の問題点を解決する。
- (2) LTP発現時に細胞外グルタミン酸放出が高まる実験事実に基づき、LTP発現の分子機構に“前膜”の寄与があることの実験的証拠を様々な阻害剤の存在下および測定の高精度化によって積み上げる。
- (3) 神経伝達物質グルタミン酸の放出を可視化する方法を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、代表者らが開発してきた脳を対象とするバイオセンシング法を基盤として、それらをより微小な時空間のバイオセンシング法として発展させ、脳の基礎研究に役立てることを目指している。そのために以下の諸問題の解決を行う。(1)生きている脳海馬スライスを対象に、キャピラリーセンサーによる計測と電気刺激とを一体化する諸問題を解決し、神経領野でグルタミン酸放出量を定量的に定めための方法を提案する。(2) L-グルタミン酸センサーに及ぼす様々な神

経阻害剤の影響を検討する、(3)神経伝達物質を可視化する方法の高度化を図る。

4. 研究成果

(1) キャピラリー酵素センサーの開発と応用

微小電極を用いるイオン、分子のその場検出法は、細胞内や細胞外の局所領域における情報伝達物質の濃度やその時間変化を追跡するための重要な方法の一つである。特に興奮性神経伝達物質である L-グルタミン酸は、脳の発達や記憶・学習形成に関わると考えられているため、その濃度のモニタリングは重要である。電気生理学的測定と電気化学的測定の併用は、神経活動依存のグルタミン酸レベルを知るために用いられてきたが、同時計測の難しい点の一つとして、電気生理学的な電流刺激が適用された時に脳組織を経由してグルタミン酸電流測定と fEPSP 測定の回路が閉回路を形成してしまうことである。その結果、グルタミン酸センサーに、artifact 電流と fEPSP の大きさに依存した非 Faradaic 電流(容量性電流)が誘起される。相互干渉を回避する手段として、グルタミン酸センサーと刺激電極間の回路をスイッチングする方法や、高頻度での電流サンプリングによる記録から容量性電流が減衰した後のグルタミン酸濃度を反映した Faradaic 電流をサンプリングする方法が報告されている。しかし、新たな手法の必要性も指摘されている。本研究では、低頻度刺激(2 Hz)適用下で、グルタミン酸受容体阻害剤の共存下と非共存下におけるグルタミン酸電流を得るための方法を検討した。

Faradaic 電流を取得するための一つ目のアプローチは、刺激により誘起される非 Faradaic 電流が 2 Hz 刺激の開始から約

400 ms 過ぎ去った後にゼロに近いところまで減衰することを利用する。電流刺激が適用された時間から 460 ms 以降の電流のみを抽出することで、電流対時間トレースを再構築する。再構築された電流対時間トレースの例を図 1 に示す。

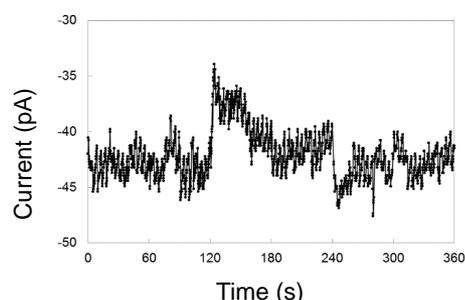


図 1 刺激後 0.46 s 以降の電流をサンプリング

このアプローチは、グルタミン酸センサーの電流を 20 ms 間隔で記録し、それから Faradaic 電流を抽出、解析し、電流対時間トレースの再構築を行うものである。

もう一つのアプローチでは、記録された 20 ms の電流サンプリング間隔のトレースから、低頻度(1 s)のサンプリング間隔で Faradaic 電流を抽出する。電流を抽出するタイミングは、刺激に誘起された artifact 電流と非 Faradaic 電流がほとんどゼロに減衰する 2 Hz 刺激直前の時間になる。各 2 Hz 刺激の開始は、大きく負の方向にシフトする artifact 電流の出現から知ることができ、そこから 1 s 間隔で電流を抽出し電流対時間トレースを再構築する。1 s のサンプリング間隔で再構築された電流対時間トレースを図 2 に示す。

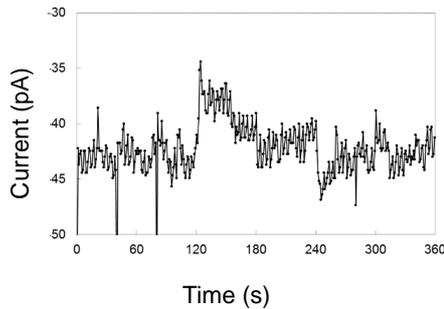


図2 刺激直前を基準とした 1 s 間隔サンプリング

この電流対時間トレースは、一つ目のアプローチにより再構築された電流対時間トレースと一致した。このアプローチは、刺激のタイミングが明確に決定されるという利点を持っている。再構築された電流対時間トレースを作成した上述の結果は、阻害剤共存下で 2 Hz 刺激によるグルタミン酸電流をサンプリング時間 1 s で観測し記録すればよいことを示す。

(2) グルタミン酸センサーに及ぼす阻害剤の影響の検討

著者らが開発したキャピラリー酵素センサーの応答に及ぼすタンパク質吸着の影響、また電気生理学的分野で汎用される神経阻害剤および関連物質の妨害の影響を体系的に検討した。まず、タンパク質がキャピラリー酵素センサーに及ぼす影響について検討した。キャピラリー酵素センサーを海馬スライスの神経領野 CA 1 に移植して 1 時間静置し、その後引き上げて L-グルタミン酸に対する応答を記録した。その結果、キャピラリー酵素センサーを用いると海馬スライスに移植前後で電流応答の大きさに有意な差は

見られなかった(図3)。この結果は、内部溶液の存在する本キャピラリー酵素センサーはたんぱく質の吸着の影響を受けにくいことを示す。

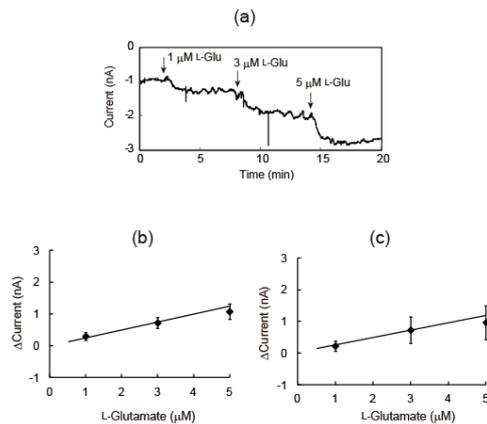


図3 キャピラリー酵素センサーにおよぼすタンパク質の影響

さらに、キャピラリー酵素センサーの応答に対する阻害剤、脳内物質、神経伝達物質および関連物質の影響について検討した。AMPA型受容体阻害剤(DNQX、CNQX、GYKI52466)およびNMDA型受容体阻害剤((R)-3,4-DCPG、D-APV、Ifenprodil、(RS)-CPP)はいずれも生理学的実験で用いられている濃度では妨害しなかった。キヌレン酸は、その濃度が 1 mM の場合には影響を受けなかったが、5 mM の濃度では影響を受けた。キヌレン酸はキャピラリー酵素センサーの毛管作用を妨害することが分かった。同様な影響はジメチルスルホキシド(DMSO)でもみられた。興奮性アミノ酸輸送体(EAA1-4)阻害剤であるTHAおよびDL-TBOAは水溶液として用いた場合でも応答は消失した。

グリシン、GABA、セロトニン、D-セリンはそれぞれ 1 mM でも応答に影響しなかった。L-アスパラギン酸は 200 μM を超えると妨害

が見られた。しかし、その応答の大きさはグルタミン酸の応答に比べて著しく小さかった。ドーパミンは 50 μ M において数 nA の応答がみられるが、通常の生理条件下での妨害は無視できると考えられる。

(3) グルタミン酸の可視イメージング法の開発

本研究では、このグルタミン酸イメージング法をフロー系へ発展させるための検討を行なった。アガロース膜内で酸化酵素 (GluOx)、西洋わさびペオキシダーゼ (HRP) とのメジエーター反応を用い急性海馬スライス外へ放出されたグルタミン酸を検出する方法を検討した。その結果、GluOx、HRP、基質 (DA-64) をアガロースに封入する際における溶液の温度が 35 $^{\circ}$ C であれば、酵素反応に大きな影響を与えないこと、アガロースの濃度が 1% であれば十分にグルタミン酸が膜内に浸透することが分かった。またアガロースに GluOx、HRP および DA-64 を封入した場合、封入した GluOx の濃度が上昇するに従いグルタミン酸に対する応答が増大することが分かった。

虚血刺激に伴う急性海馬スライス外のグルタミン酸による時空間分布を可視化した結果、ACSF を急性海馬スライスに送液した場合では GluOx 封入アガロース膜の応答に変化は見られなかったのに対して、虚血刺激に切り替えて送液したところ、時間の経過とともに海馬 CA1 および CA1 領野で GluOx 封入アガロース膜の輝度が減少した。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 5 件)

Atsushi Shoji, Kana Ikeya, Miki Aoyagi, Ryutaro Takatsuji, Akio Yanagida, Youichi Shibusawa, M. Sugawara, Monitoring of cholesterol oxidation in a lipid bilayer membrane using streptolysin O as a sensing and signal transduction element, 査読有, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 128, 2016, 455-461
DOI: 10.1061/j.jpba.2016.06.009

Misato Sakamoto, Atsushi Ashoji, Masao Sugawara, Giant unilamellar vesicles containing rhodamine 6G as a marker for immunoassay for BSA and lipocalin-2, 査読有, *Anal. Biochem.*, 505, 2016, 66-72
DOI: 10.1016/j.ab.2016.04.011

Misato Sakamoto, Keita Hizawa, Manabu Hosaka, Masao Sugawara, Visual assay of total iron in human serum with bathophenanthroline disulfonate-accommodated MCM-41, 査読有, *Anal. Sci.*, 32, 2016, 241-244
DOI: 10.2116/analsci.32.241

池澤香奈, 菅澤 隆幸, 池上由季, 穂積志津子, 東海林敦, 菅原正雄, タンパク質および神経阻害剤がキャピラリー型 L-グルタミン酸センサーの応答に及ぼす影響, 査読有, *分析化学*, 64, 2015, 243 - 750
DOI: 10.2116/analsci.31.321

Kazuhisa Tanaka, Atsushi Shoji, Masao Sugawara, An enzyme-entrapped agarose gel for visualization of ischemia-induced L-glutamate fluxes in hippocampal slices in a flow system, 査読有, *Anal. Sci.*, 31, 2015, 321-325

DOI: 10.2116/analsci.31.321

[学会発表] (計 9 件)

Masao Sugawara, The design of bilayer lipid membranes as a platform for channel-based biosensing, 8th International Workshop on Nanostructures & nanoelectronics, 2017 年 3 月 3 日, 東北大学電気通信研究所 (宮城県仙台市)

阪本 美里, 高橋 裕輔, 東海林 敦, 菅原正雄, ジャイアントリポソームを用いた高感度蛍光イムノアッセイの構築, 日本分析化学会 65 年会, 2016 年 9 月 15 日, 北海道大学工学部 (北海道札幌市)

今村俊裕, 池上由季, 穂積志津子, 高橋裕輔, 平野愛弓, 菅原正雄, 阻害剤共存下での L-グルタミン酸センサーの容量性電流に関する基礎検討, 日本分析化学会 65 年会, 2016 年 9 月 15 日, 北海道大学工学部 (北海道札幌市)

西下直希, 坂本美里, 東海林 敦, 菅原正雄, Alamethicin チャンネルを用いる蛍光イムノアッセイの構築, 日本分析化学会 65 年会, 2016 年 9 月 15 日, 北海道大学工学部 (北海道札幌市)

東海林 敦, 山本 美友, 柳田 顕郎, 菅原正雄, 脂質膜内に存在するコレステロールの酸化反応評価, 日本分析化学会 65 年会, 2016 年 9 月 13 日, 北海道大学工学部 (北海道札幌市)

東海林 敦, 池谷 佳奈, 吉川未季子, 柳田顕郎, 菅原正雄, 固定化リポソームを用いる脂質内コレステロールの酸化反応の計測法, 日本分析化学会 64 年会, 2015 年 9 月 10 日, 九州大学伊都キャン

パスセンターゾーン (福岡県福岡市)
阪本美里, 菅原正雄, ジャイアントリポソームをマーカーとして用いるイムノアッセイの基礎検討, 日本分析化学会 64 年会, 2015 年 9 月 10 日, 九州大学伊都キャンパスセンターゾーン (福岡県福岡市)
富永 総, 西尾将人, 菅原正雄, 安定な微小平面脂質膜を用いるイムノセンサーの検討, 日本分析化学会 64 年会, 2015 年 9 月 10 日, 九州大学伊都キャンパスセンターゾーン (福岡県福岡市)

阪本美里, 日澤啓太, 保坂 学, 菅原正雄, パソフェナントロリンスルホン酸封入 MCM-41 を用いる血清鉄の目視分析法の構築, 日本分析化学会第 75 回分析化学討論会, 2015 年 5 月 23 日, 山梨大学甲府キャンパス (山梨県山梨市)

[図書] (計 1 件)

Masao Sugawara, Design of liposomes with a pH-sensitive fluorescent dye and gramicidin channels for immune-sensing in "Advances in Liposome Researches" Chapter 6, 2014, Nova Science Publishers, New York

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 正雄 (SUGAWARA, Masao)
日本大学・文理学部・教授
研究者番号: 50002176

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし