

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750395

研究課題名(和文)新規開発したイオン選択的蛍光プローブを用いた神経細胞内マグネシウム動態の解析

研究課題名(英文)Imaging of magnesium mobilization in neurons using newly developed magnesium selective fluorescent probes

研究代表者

新藤 豊 (Shindo, Yutaka)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：30449029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分散培養したラット海馬神経細胞がどのような外部刺激に対して細胞内マグネシウムイオン濃度を変化させるかを、我々のグループで開発したマグネシウム選択的蛍光プローブであるKMGシリーズを用いた蛍光イメージングにより調べた。その結果、シグナル分子のひとつである一酸化窒素がミトコンドリアからのマグネシウム放出を誘導することを明らかにし、論文として発表した。また、抑制性の神経伝達物質であるGABAや、電流刺激により誘発された神経発火自体も細胞内マグネシウム濃度を上昇させることを見出し、学会発表を行った。本研究を通して、神経細胞内マグネシウムイオン濃度は神経活動に伴い変化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated intracellular magnesium mobilization in rat hippocampal neurons using KMG series, magnesium selective fluorescent probes developed in our group. We developed magnesium imaging technique to visualize changes in magnesium concentration in local area in cells using newly developed probe, KMG-104-AsH, and published in JACS. Using those probes, we demonstrated that application of nitric oxide to cultured neurons induces magnesium release from mitochondria, resulting in the increase in cytoplasmic magnesium concentration. This result has been published in FEBS letters. Moreover, we found that GABA, which is an inhibitory neurotransmitter, and neuronal firing itself also increase magnesium concentration in neurons. These results have been presented in conferences. Our results obtained in this project clearly show that magnesium concentration in neurons can change during neuronal activities.

研究分野：神経科学

キーワード：蛍光イメージング 神経細胞 マグネシウム

1. 研究開始当初の背景

生体内の主要なイオンであるマグネシウムイオン (Mg^{2+}) は300種類以上の酵素反応や核酸、タンパク質の安定化、イオンチャネルの透過性制御等にかかわり、細胞機能にとって必要不可欠なイオンであることが古くから知られていたが、このイオンの細胞内濃度はほぼ一定で、ほとんど変化しないものと考えられてきた。ところが近年、 Mg^{2+} 選択性の高いイオンチャネルが相次いで発見され、細胞が Mg^{2+} の取り込みを状況に応じて変化させている可能性が示唆された(Quamme, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010)。これらのイオンチャネルはヒトの神経細胞でも発現しており、その中には神経疾患の原因遺伝子として報告されていたものも存在した。また、ヒトの免疫細胞では、イオンチャネルから流入した Mg^{2+} が細胞内でセカンドメッセンジャーとして働くことも報告された(Li et al., *Nature*, 2011)。このように、一定に保たれていると考えられていた細胞内 Mg^{2+} 濃度は実は大きく変化し得るものであり、細胞の機能制御に能動的にかかわっているという考えを支持する報告が相次いでいる。しかし、神経細胞内の Mg^{2+} 動態に関する研究は少なく、脳神経系において細胞内 Mg^{2+} 濃度がどのように変化するのかはわかっていない。神経細胞における Mg^{2+} 濃度変化測定の問題点として、市販の蛍光 Mg^{2+} プローブのイオン選択性の低さが挙げられる。右図に示したとおり、市販の Mg^{2+} プローブは Ca^{2+} とも親和性が高く、神経細胞のようにその活動に応じて大きく細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させる細胞においては、 Mg^{2+} 濃度変化だけを正確に測定することは困難であった。そこで我々の研究グループは細胞内 Mg^{2+} 濃度変化を正確に調べるために、 Mg^{2+} 選択性の高い蛍光プローブ(KMG シリーズ)の開発に携わり、他イオンの影響を受けずに Mg^{2+} 濃度変化のみを正確に測定できる実験系を確立した。そしてこれらのプローブを用いて細胞内 Mg^{2+} 濃度変化を測定し、 Mg^{2+} 濃度変化にかかわるメカニズムの解明を進めてきた。本研究開始以前に我々のグループでは、ミトコンドリアの脱分極がミトコンドリア内から細胞質への Mg^{2+} 放出を誘導すること(Kubota, Shindo et al., *BBA*, 2005)、細胞質中の余剰な Mg^{2+} は Na^+/Mg^{2+} 交換体を介して細胞外へと放出されること(Kubota et al., *BBRC*, 2003)を神経細胞様に分化させたPC12細胞を用いて明らかにしてきた。また、分散培養したラット海馬神経細胞を用いた実験において、高濃度グルタミン酸添加により引き起こされる Ca^{2+} の細胞内への過剰な流入は、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 流入を介してミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を誘導することを明らかにした(Shindo et al., *J Neurosci Res*, 2010)。さらには細胞中のミトコンドリア内 Mg^{2+} 濃度変化を測定するためのプローブ KMG-301の開発も行い(Shindo et al., *PLoS One*,

2011)細胞内の Mg^{2+} 動態をより詳細に調べることが可能となった。

2. 研究の目的

これらの背景および先行研究を受けて、神経細胞内で Mg^{2+} 濃度が神経活動と連動して能動的に変化し、神経活動の制御にかかわっているのではないかと考えた。また、近年開発したプローブを用いることで、細胞内 Mg^{2+} の動態をより詳細に調べることができると考え、本研究を提案するに至った。本研究の目的は以下の3点を明らかにすることである。

神経細胞内 Mg^{2+} 濃度を变化させる細胞外シグナルを探索する。

神経細胞の活動自体が細胞内 Mg^{2+} 濃度に影響を及ぼすのかを明らかにする。

神経細胞において Mg^{2+} 濃度変化を引き起こすメカニズムを明らかにする。

以上の3点を調べるための実験を行い、神経細胞においてはどのような刺激や活動に応じて、どのようなメカニズムで細胞内 Mg^{2+} 濃度が変化するのかを明らかにする。また、

のメカニズムを明らかにするために有用となる細胞内マグネシウム動態の詳細なイメージング方法を開発することも重要となる。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞内 Mg^{2+} 濃度を变化させる細胞外シグナルの探索は、細胞質中の Mg^{2+} 濃度変化を計測できるプローブ KMG-104 を用いて行った。分散培養したラット海馬神経細胞を KMG-104 で染色し、神経細胞が生体内で受け取る可能性のある細胞外シグナル分子(神経伝達物質およびニューロトロフィン等)を添加し、蛍光輝度変化を測定した。このとき変化が見られた物質に対して、 Mg^{2+} 濃度変化を引き起こすメカニズムの解析を行った。

(2) 神経細胞の活動自体が細胞内 Mg^{2+} 濃度に影響を及ぼすのかを明らかにするために、ITO 透明ガラス電極を用いた神経細胞への刺激を KMG-104 を用いた蛍光イメージングと組み合わせた実験系を用いた。個々の神経細胞が実際に発火したかどうかは Ca^{2+} 選択的蛍光プローブである Fura-Red の蛍光を同時に観察して Ca^{2+} 濃度変化が見られるかどうかで判断した。

(3) 神経細胞において Mg^{2+} 濃度変化を引き起こすメカニズムは、活性化剤や阻害剤を用いた薬理実験、RNAi を用いた Mg^{2+} 輸送タンパク質のノックダウンを細胞質や細胞内局所での Mg^{2+} イメージングと組み合わせて行い、解析した。また、細胞内小器官による Mg^{2+} 輸送についても解析できるように、細胞内局所での Mg^{2+} 濃度変化を測定する手法を開発した。これも応用することで細胞内での Mg^{2+} 輸送についても詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞内局所での Mg^{2+} 濃度変化を測定する手法の開発

細胞内小器官が関連した Mg^{2+} 輸送を明らかにするためには目的の小期間内やその周辺に特化した、細胞内局所での濃度変化を可視化できる技術が有用である。そこで、テトラシステインタグという 12 アミノ酸からなるタグに選択的に結合するプローブである FIAsh と KMG-104 の機能を合わせ持つ KMG-104-AsH を開発した。このプローブは高いタグ選択性、 Mg^{2+} 選択性を有し、テトラシステインタグに結合したときのみ Mg^{2+} 濃度によって輝度が変化する緑色蛍光を発する。これにより、タグをつけたタンパク質を細胞内に遺伝子導入して発現させることでそのタンパク質のタグ部分に選択的にプローブが局在するため、そのタンパク質周辺の Mg^{2+} 濃度変化を測定することが可能となった。また、赤色蛍光タンパク質 mKeima にタグを結合させ、N' 末端につけた局在シグナルでこれをミトコンドリア膜間領域に局在させることにより、ミトコンドリア膜間領域での Mg^{2+} 濃度変化を測定することに成功した。このように蛍光タンパク質と同時計測を行うことで小器官の動きによる蛍光のゆらぎの影響を相殺できる。この成果は 2013 年度に論文として発表した (Fujii, Shindo et al., J Am Chem Soc, 2013)。この手法により Mg^{2+} 濃度変化を引き起こすメカニズムのより詳細な解析が可能となった。

(2) 一酸化窒素により誘導される神経細胞内 Mg^{2+} 濃度上昇

本研究では、神経細胞内 Mg^{2+} 濃度を変化させる物質の探索を行った。まず、神経細胞が生体内で受け取る可能性のある物質のうち主要な神経伝達物質を分散培養した海馬神経細胞にそれぞれ添加し、そのときの細胞内 Mg^{2+} 濃度変化を、蛍光イメージング法により観察し、解析した。その結果、一酸化窒素が、神経細胞内の Mg^{2+} 濃度の上昇を誘導することを見出した。一酸化窒素は細胞膜を透過して細胞内のグアニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内の cGMP を上昇させる。cGMP は PKG の活性化を介してミトコンドリア内膜上の ATP 作動性カリウムチャンネルを活性化する。この NO/cGMP/PKG シグナルおよびその下流のチャンネルの活性化が引き金となり、PKG シグナルを介してミトコンドリアからマグネシウムイオンが放出されることを明らかにした。NO/cGMP/PKG シグナルは代表的な細胞内シグナル経路のひとつであり、今回明らかにした結果は神経細胞内の Mg^{2+} 濃度が一般的な細胞内シグナルによって変化するを示しており、神経細胞内での Mg^{2+} の役割を解き明かしていく上で重要な発見であると言える。この結果は 2013 年度に論文として発表した (Yamanaka, Shindo et al., FEBS Lett, 2013)。

(3) 神経活動に伴う細胞内 Mg^{2+} 濃度変化
神経活動に伴い細胞内 Mg^{2+} 濃度が変化するかどうかを、ITO ガラス電極を用いた刺激系と、KMG-104 と Fura-Red を用いた細胞内 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 同時イメージングと組み合わせることにより調べた。 Ca^{2+} 濃度変化は神経活動の指標とした。神経活動は細胞内 Ca^{2+} 濃度の急激な上昇を伴うため、 Ca^{2+} に対する選択性が低い市販の蛍光 Mg^{2+} プローブではそのときの Mg^{2+} 濃度変化は測定困難であった。一方、我々のグループが開発した KMG シリーズは Mg^{2+} 選択性が高いためにその解析が可能となった。その結果、電流刺激により Ca^{2+} 濃度変化が誘発された神経細胞においては、わずかな幅ではあるものの Mg^{2+} 濃度も上昇することを発見した。 Ca^{2+} 濃度変化は入力する電流刺激の強度に応じて大きくなったが、 Mg^{2+} 濃度変化は Ca^{2+} の変化とは相関がなかった。また、電位依存性ナトリウムチャンネルの活性化剤による強制的な神経発火によっても神経細胞内 Mg^{2+} 濃度上昇は引き起こされた。これらのことより、神経発火それ自体も細胞内 Mg^{2+} 濃度変化を引き起こすことが明らかになった。これらの結果の一部は Neuroscience2014 (日本神経科学学会) にて発表した。また今後の解析結果を含めて Neuroscience2015 (日本神経科学学会) にて発表予定である。

(4) GABA により誘導される細胞内 Mg^{2+} 濃度上昇

神経細胞内 Mg^{2+} 濃度変化を引き起こす細胞外シグナルの探索により、抑制性の神経伝達物質である GABA も細胞内 Mg^{2+} 濃度上昇を引き起こすことを発見した。薬理実験より GABA_A 受容体と GABA_B 受容体からのシグナルがそれぞれ別々のシグナル経路を介して独立に Mg^{2+} 濃度上昇を引き起こしていることがわかった。この結果は Society for Neuroscience 2013 および Neuroscience2013 (日本神経科学学会) にて発表された。この詳細なメカニズムは現在も解析中である。

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 2 件)

藤井 智彦、新藤 豊、堀田 耕司、チッテリオ ダニエル、西山 繁、鈴木 孝治、岡 浩太郎、Design and synthesis of a FIAsh type Mg^{2+} fluorescent probe for specific protein labeling., J Am Chem Soc. 2014 Feb 12; 136(6):2374-81. 査読あり
DOI: 10.1021/ja410031n.

山中 龍、新藤 豊、堀田 耕司、鈴木 孝治、岡 浩太郎、NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by

mitoKATP channel opening in rat hippocampal neurons., FEBS Lett. 2013 Aug 19;587(16):2643-8. 査読あり
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.06.049.

〔学会発表〕(計 8件)

山中 龍、新藤 豊、苅部 亮、棚元 亮、堀田 耕司、鈴木 孝治、岡 浩太郎、ラット海馬神経細胞における神経活動にともなう細胞内マグネシウムイオン濃度上昇、Neuroscience2014、2014年9月11日 - 13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

新藤 豊、藤井 智彦、山中 龍、堀田 耕司、西山 繁、チツテリオ ダニエル、鈴木 孝治、岡 浩太郎、細胞内局所でのマグネシウムイオン濃度変化の計測、第23回日本バイオイメーシング学会、2014年9月4 - 6日、大阪大学(大阪府・大阪市)

新藤 豊、Fluorescent imaging of Mg²⁺ mobilization in neurons, Magnesium in Translational Medicine, 2014, 5, 11-15, Smolenice, Slovak Republic

新藤 豊、藤井 智彦、堀田 耕司、チツテリオ ダニエル、西山 繁、鈴木 孝治、岡 浩太郎、Magnesium imaging in cellular local area with FLAsH-type fluorescent probe, Magnesium in Translational Medicine, 2014, 5, 11-15, Smolenice, Slovak Republic

山中 龍、新藤 豊、堀田 耕司、鈴木 孝治、岡 浩太郎、NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by mitoKATP channel opening in rat hippocampal neurons, Magnesium in Translational Medicine, 2014, 5, 11-15, Smolenice, Slovak Republic

山中 龍、新藤 豊、堀田 耕司、鈴木 孝治、岡 浩太郎、Mg²⁺ mobilization mediated by both GABA(A) and GABA(B) receptors in rat hippocampal neurons, Society for Neuroscience, 2013. 11.9-13, San Diego, USA

山中 龍、新藤 豊、堀田 耕司、鈴木 孝治、岡 浩太郎、一酸化窒素によるマグネシウム動員機構の解明、第22回日本バイオイメーシング学会、2013年9月15 - 16日、東京大学(東京都・文京区)

山中 龍、新藤 豊、堀田 耕司、鈴木 孝治、岡 浩太郎、ラット海馬神経細胞におけるGABAによる二元的なマグネシウム動員機構、Neuro2013、2013年6月20 - 23日、国立京都国際会館(京

都府・京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bpni.bio.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
新藤 豊 (SHINDO, Yutaka)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：30449029

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：