

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560461

研究課題名(和文)新規インバースタイプのカルシウムプローブを用いた抑制性神経活動測定法の開発

研究課題名(英文)Development of new inverse-type calcium probe for analysis of inhibitory neuronal activities

研究代表者

久下 小百合(Kuge, Sayuri)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：50260104

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):現在使われている蛍光カルシウムプローブは、興奮性の神経活動を鋭敏に捉えることに適しているのに対し、抑制性の神経活動を観察することは困難である。そこで、これまでのカルシウムプローブとは反対の性質を持つ、カルシウムイオンの減少に伴い、蛍光を発する新たなインバースタイプのカルシウムプローブ、IP2.0を開発した。IP2.0は、カルシウムイオンの有無による蛍光変化率が20倍であった。そこで、実際に線虫のAWC感覚神経細胞にIP2.0を発現させ、イソアミルアルコール刺激に対する神経活動を測定した結果、刺激に対して、蛍光の減少が観察され、抑制性神経活動を解析出来ることが示された。

研究成果の概要(英文):Fluorescent Ca²⁺ indicators, which have been improved for the last several decades are ideal only for monitoring the activation of neurons. To understand precise functions of the neuronal network, a fluorescent Ca²⁺ indicator that is suitable for monitoring the neuronal inhibition would be necessary. Previously reported "inverse-pericam" has unique property; the fluorescence intensity gets 7-fold dimmer upon Ca²⁺ binding. After creating a large mutant library of "inverse-pericam" by error-prone PCR, a variant, IP2.0, which shows nearly 20-folds dynamic range in vitro, was found. When IP2.0 was expressed in AWC neuron of *C. elegans*, the increase of fluorescence of IP2.0 during the stimulation of isoamyl alcohol was observed. These results suggest that odor stimuli decreases Ca²⁺ concentration in AWCON neurons and so IP2.0 will be an indispensable tool for studying neuronal inhibition.

研究分野：神経科学

キーワード：カルシウムプローブ 神経活動 線虫 インバース

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、主に興奮性と抑制性のシナプス伝達を組み合わせた回路によって、情報処理を行っている。神経回路の活動の測定には、電気生理学的な手法のみならず、同時に多数の神経細胞を非侵襲的に観察することができる蛍光カルシウムプローブを用いたイメージング解析が盛んに行われている。とくに、遺伝子にコードされたカルシウムプローブ (GECI) を用いたイメージングは、観察する神経細胞を特定できるなど優れた利点を持っている。この数年のめざましい開発の進歩により、興奮性神経活動を高感度に測定できる GECI が多く発表されている(1,2)。当研究室でも共同研究によって広範囲の波長のイメージングが可能な GECO シリーズの開発に携わった(3)。しかしながら、これらのプローブでは抑制性の神経活動を検出することは難しいことから、情報処理の全体像を解明するためには、抑制性シグナルを高感度に測定するプローブが必要であると考えた。

2. 研究の目的

高感度に神経活動の抑制を捉えることができるプローブを開発する。これを、興奮性の神経活動を測定するプローブと組み合わせることによって、神経活動の興奮と抑制を同時に測定し、情報処理の全体像を解析できることが期待できる。

3. 研究の方法

インバースタイプのカルシウムプローブとしてはインバースペリカム(4)が知られているが、これまで神経活動の測定に用いられたことはなかった。そこで、このインバースペリカムをテンプレートとして、ランダムに変異を入れ、カルシウムの有無によるダイナミックレンジのさらに大きいものをスクリーニングする。得られたプローブに、目的の波長、カルシウムイオンへの親和性を持たせるために配列をデザインし、さらに変異を導入する。種々作製したプローブを線虫の各種ニューロンに発現させ、イメージングを行ない、それぞれの実験条件に最適なプローブを特定する。これまでの GFP/RFP から開発された種々のプローブと同時に発現させ、刺激に対する神経の興奮と抑制反応を単一ニューロン、または各種ニューロン間においてマルチカラーで観察し、刺激に反応する神経回路を解析する。線虫で得られた結果をもとに他の生物において、広範囲に応用できるよう、解析システムを組み立てる。

4. 研究成果

インバースタイプのカルシウムプローブとしてのインバースペリカムは、これまで神経活動の測定に用いられたことはなかった。そこで、このインバースペリカムに

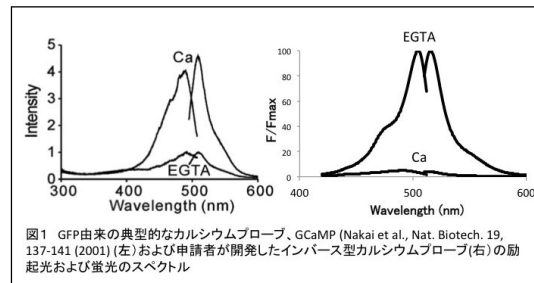


図1 GFP由来の典型的なカルシウムプローブ、GCaMP (Nakai et al., Nat. Biotech. 19, 137-141 (2001)) (左) および申請者が開発したインバース型カルシウムプローブ(右)の励起光および蛍光のスペクトル

ランダムに変異を導入し、カルシウムイオン有無による蛍光強度の変化量が大きいものをスクリーニングすることにより、改変型インバースペリカム(IP2.0 など)を作成した(図1)。IP2.0 は in vitro において、カルシウムイオンの有無による蛍光強度の変化量は 20 倍であった。この値はこれまでの GCaMP3 よりも高い値であり、プローブとして活用できる期待が持たれた。IP2.0 のアミノ酸配列を調べたところ、一カ所のアミノ酸変異が起きていることが

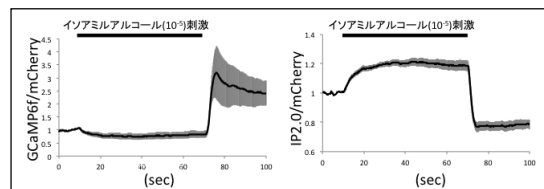


図2 線虫のAWC^{Ca}神経細胞にGFP由来のカルシウムプローブ、GCaMP6f(左)および申請者が開発したインバース型カルシウムプローブ、IP2.0(右)をそれぞれmCherryと共に発現させ、イソアミルアルコール刺激を行ったときの反応。GCaMP6fにより、AWC^{Ca}は刺激物質を取り除くことにより興奮することが確認できる(左)。一方、IP2.0を用いることにより、刺激物質添加中、カルシウム濃度が低下し、抑制反応が起きていることが明らかとなった(右)。

明らかとなった。さらに IP2.0 に変異を入れ、IP3.0 を作成した。IP3.0 のカルシウムイオン有無による蛍光強度の変化量は 90 倍を超えていた。しかしながら、カルシウムイオンに対する親和性は IP2.0 の 200 nM に対し、IP3.0 の親和性は 150 nM と高く、細胞内でカルシウムプローブとして活用できるか、今後の課題となった。種々の細胞でカルシウムプローブとして利用できるように、IP2.0 にさらに変異を入れ、蛍光強度の強いものやカルシウムイオンに対する親和性を変化したものなど、種々作成した。

IP2.0 を用いて線虫の神経活動を測定したところ、神経活動の抑制に伴う蛍光強度の増加を観察することに成功した(図2)。図2の左に示すように、これまでのカルシウムプローブを線虫の AWC ニューロンに発現させ、イソアミルアルコール刺激を行うと、刺激を取り除くことにより、著しいカルシウムイオンの増加が観察された。しかしながら、イソアミルアルコール刺激中に何が起きているのか、ここからでは、理解することは出来なかった。IP2.0 をおなじ、線虫の AWC ニューロンに発現させたところ、イソアミルアルコール刺激に伴い、蛍光が上昇、すなわちカルシウムイオンの減少が起きていることが確認された。これは、イソアミルアルコール刺激により、神経の抑制反応が起きていることを意味

すると考えられた。今回の研究結果は、インバースタイプのカルシウムプローブを改良することによって、抑制性シグナルを鋭敏に検出できる可能性があることを示している。

参考文献

1. Ohkura, M. et al. PLOS ONE, 2012 7, 1-10
2. Akerboom, J. et al. Front. Mol. Neurosci. (2013) **6**, 1-27
3. Zhao, Y. et al. Science 2011 333 1888-1891
4. Nagai, T. et al. PNAS (2001) **98**, 3197-3202

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 1 件)

Jiang L., Hara-Kuge S., Yamashita S. and Fujiki Y. Peroxin Pex14p is the key component for coordinated autophagic degradation of mammalian peroxisomes by direct binding to LC3-II. Genes Cells 査読あり Vol. 20 2015 pp. 36-49, DOI: 10.1111/gtc.12198

〔学会発表〕(計 5 件)

Sayuri Kuge, Tomonobu Nishihara, Tomoki Matsuda, Hironobu Furuie, Takayuki Teramoto, Takeharu Nagai, Takeshi Ishihara. A quenching-type of fluorescent Ca²⁺ indicator for detecting neuronal inhibition. C.elegans 2015 20th International Meeting. 2015, 6.24-28, UCLA Mamoru Usuyama, Sayuri Kuge, Takayuki Teramoto, Takeshi Ishihara, YUishi Iwasaki. Ca²⁺ dependent negative feedback loop in AWC olfactory neurons. C.elegans 2015 20th International Meeting 2015, 6.24-28, UCLA
大江紗、寺本孝行、徳永旭将、広瀬修、豊島有、久下小百合、飯野雄一、吉田亮、石原健、線虫 C.elegans の頭部神経系全体の GCaMP6f を用いた活動解析、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015, 12.1-4. 神戸ポートアイランド
久下小百合、西原知伸、松田知己、古家博信、寺本孝行、永井健治、石原健、抑制性神経活動を検出する消光型蛍光カルシウムプローブタンパク質、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015, 12.1-4.

神戸ポートアイランド
Sayuri Kuge, Tomonobu Nishihara, Tomoki Matsuda, Hironobu Furuie, Takayuki Teramoto, Takeharu Nagai, Takeshi Ishihara. Quenching-type of fluorescent Ca²⁺ indicator for detecting neuronal inhibition. 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 12.15-20, Honolulu, Hawaii

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
久下小百合 (KUGE, Sayuri)
九州大学大学院・理学研究院・学術研究員
研究者番号：50260104

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
石原健 (ISHIHARA, Takeshi)
九州大学大学院・理学研究院・教授
研究者番号：10249948

寺本孝行 (TERAMOTO, Takayuki)
九州大学大学院・理学研究院・准教授
研究者番号：90571836

永井健治 (NAGAI, Takeharu)
大阪大学・産業科学研究所
研究者番号：20311350

松田知己 (MATSUDA, Tomoki)
大阪大学・産業科学研究所
研究者番号：50419206