

受賞者

廣瀬 謙造

名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学教室

研究テーマ

蛍光イメージングを用いた量子解析による中枢シナプス伝達機構の解明

1. 背景・目的

シナプスは神経回路網の演算処理を行なう基本的な素子である。シナプス伝達がどのように制御されているのかを理解することは、脳高次機能の解明のみならず、中枢神経疾患を標的とした新たな治療戦略を切り開く上で必須である。Katzらの立てた量子仮説によれば、シナプス伝達効率は放出部位の個数・放出確率・量子サイズによって決定される。しかしながら、中枢神経系のシナプス伝達は特有の複雑性・不均一性を持つために、従来の電気生理学的手法を用いた研究では、量子仮説に基づいた解析が困難である。

このような背景のもと、研究代表者は蛍光イメージング技術に着目し、中枢シナプスの代表的な伝達物質であるグルタミン酸をイメージングする蛍光プローブ(EOS)を開発した。この研究を発展させ、海馬神経細胞における単一シナプスレベルのグルタミン酸放出を可視化し、中枢シナプスの伝達機構を明らかにすることが本研究の目的である。具体的には、一部の神経細胞の表面にのみ特異的にプローブを固定する方法を開発し、細胞が密に存在するような組織構築が保たれた標本においても、グルタミン酸動態を観測できるようにEOSによるイメージングを応用した。

2. 方法

リン酸カルシウム法またはレンチウイルス感染を用いたDNA導入によって、PDGFR膜貫通ドメインとmCherryとHA-tagの融合タンパク質を培養神経細胞の膜上に強制発現させた。この発現タンパク質に一次抗体としてAnti-HA IgG抗体を結合させ、さらにビオチン化したAnti-IgG抗体を二次抗体として用いた。そして、ストレプトアビジンを介して、ビオチン化蛍光プローブと二次抗体を結合させた(図1)。この方法により、HA-tagを有する膜タンパク質が強制発現している細胞表面にのみプローブが固定される。以上の方法で、神経細胞の細胞膜上にプローブを固定し、電気刺激に伴って放出されるグルタミン酸の動態を観測した。

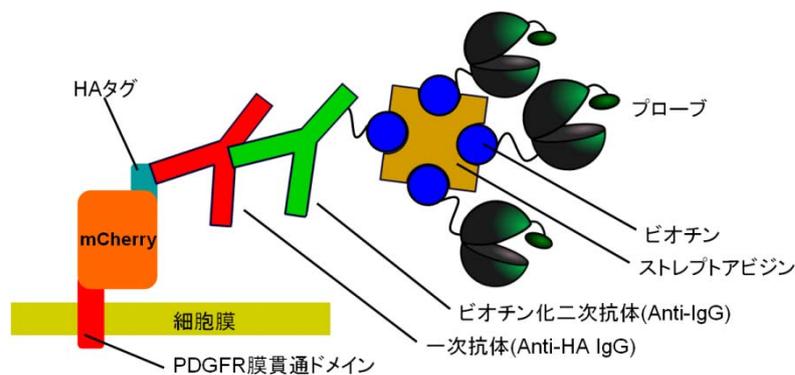


図1 蛍光プローブを細胞膜上に標識したときの模式図

3. 結果

標本に存在する全ての細胞の表面にグルタミン酸蛍光プローブが固定されてしまう従来の方法(図2A左)に対して、今回開発した方法は、一部の神経細胞のみをプローブで標識することができた(図2A右)。この方法によってプローブを細胞膜に固定した神経細胞を電気刺激し、蛍光強度の変化を観測したところ、刺激に依存して放出されるグルタミン酸の動態を観測することに成功した(図2B・C)。さらに、自発的なグルタミン酸放出も捉えることができることが分かった(図2C)。

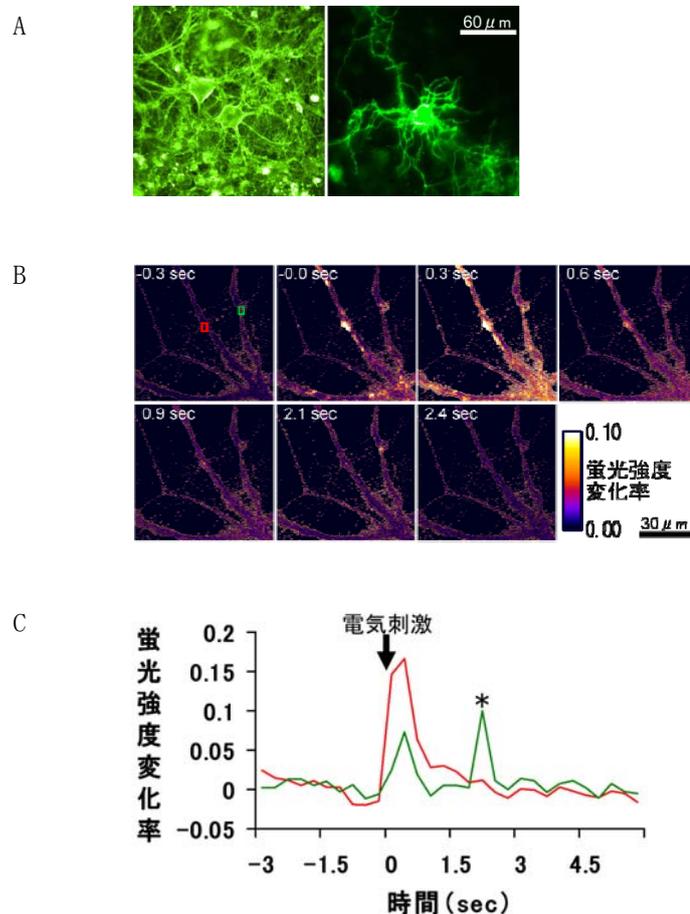


図2

- A) 従来法(左)と今回開発した方法(右)での神経細胞の蛍光像
- B) 電気刺激前後の樹状突起におけるグルタミン酸動態の可視化
- C) B図で示した赤枠内、緑枠内の蛍光シグナルの経時変化
*は、電気刺激によらない自発的なグルタミン酸放出を示す

4. 考察

本研究では、組織が密に存在する系でも単一の神経細胞でグルタミン酸の動態を捉えることを可能にした。本研究で確立したこの方法は、脳スライス切片のような標本での観測に適していると考えられる。今後、生体により近い標本で単一細胞レベルでの神経伝達物質の蛍光イメージングが可能になることで、複雑性を持つ中枢神経系のシナプス伝達機構やその調節様式の解明へと繋がっていくことが期待される。

5. 参考文献

- 1) Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Iino M, Hirose K.:

Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission.
Eur. J. Neurosci., 25(8):2249-59, 2007.

2) Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E. :

Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate.
Nature., 395(6705):913-7, 1998.

3) Chen GQ, Sun Y, Jin R, Gouaux E. :

Probing the ligand binding domain of the GluR2 receptor by proteolysis and deletion mutagenesis defines domain boundaries and yields a crystallizable construct.
Protein Sci., 7(12):2623-30, 1998.