

小胞体膜電位による神経可塑性制御機構

浜松医科大学 医学部医学科 器官組織解剖学講座
阪東 勇輝

<背景と目的>

シナプス可塑性及び、付随するタンパク質合成は、学習、記憶形成における中心的なプロセスである (Costa-Mattioli et al., Neuron, 2009; Nakazawa et al., Nat Rev Neurosci., 2004)。近年、小胞体ストレス応答を担う中心的な転写因子の一つ、Xbp1をノックアウトすると、海馬におけるシナプス伝達の長期増強が起こらず、学習が阻害される (Martinez et al., Cell Rep., 2016)。小胞体ストレスを与えてからXbp1が成熟型となって転写を活性化するまでに約30分間かかることが知られているが、Xbp1ノックアウトマウスでは、5分以内にシナプス伝達の増強が消失することから (Martinez et al., Cell Rep., 2016)、神経細胞において、Xbp1は定説よりもはるかに速く活性化されると考えられるが、その機構は不明である。細胞膜の脱分極が小胞体膜表面に局在するXbp1の活性化に十分であり、かつ細胞膜の膜電位変化は、小胞体膜電位も同時に変化させることから (Sepehri Rad et al., Sci. Rep., 2018)、申請者は、神経活動は小胞体膜電位の変化を介してXbp1を活性化させるという仮説を得た。本研究では、パッチクランプ法、膜電位イメージング法、Ca²⁺イメージング法及びXbp1の成熟過程の可視化法を組み合わせ、細胞膜と小胞体膜間における同期した電気シグナル(ここでは電気カップリングと呼ぶ)によるタンパク質の品質管理、さらには学習への寄与を明らかにする。また、小胞体だけでなく、ミトコンドリアも神経機能・可塑性に重要であることから、ミトコンドリア膜電位動態も可視化する手法の開発も行った。

<方法>

小胞体及びミトコンドリア膜電位可視化・操作するための分子ツールと小胞体ストレス応答を可視化するためのプローブ開発

蛍光膜電位プローブ、ArcLight-ST (Bando et al., Nat. Commun., 2021)は、細胞膜の脱分極を蛍光輝度の減少によって検出するプローブである。まず、ArcLight-STを小胞体に局在させるため、ArcLight-STのC末端に、ER retention signalを付加した。また、ミトコンドリアに局在させるため、ArcLight-STのN末端に、AbcmeのN末端領域を付加した。さらに、光で膜電位を操作するため、各チャネルロドプシン (ChrimsonR、A1ACR1、HcKCR1) にリアノジン受容体由来の小胞体局在シグナル及びAbcmeのミトコンドリア局在シグナルを付加した。また、Xbp1はオルターナティブスプライシングを受けて成熟するため、スプライシング後にコドンの読み枠が合うように、成熟が速い蛍光タンパク質、Achillesを融合し、小胞体ストレス応答可視化プローブ、GRUPR (Green Reporter of Unfolded Protein Response) を作製した。

生体脳における小胞体及びミトコンドリア膜電位プローブの発現とライブイメージング

生体大脳皮質における膜電位プローブの発現には、子宮内電気穿孔法を用いた (Bando et al., Cell Rep., 2019)。妊娠15日齢のICRマウスをイソフルランで麻酔し (induction, 3%, surgery, 1.5%)、子宮を露出させた。

胎仔側脳室にプラスミド溶液を注入し、その後、電気パルスを与えた(刺激のプロトコルはBando et al., Cell Rep., 2019の通り)。遺伝子導入が終了後、子宮を体内に戻し、腹壁と皮膚を縫合して覚醒させた。その後、生後7~15日齢において、急性スライス標本を作製し、膜電位イメージングを行った。

免疫組織化学

生後15日齢において、遺伝子導入したマウス脳を固定し、50 μm 厚の凍結切片を作製した。次に、脳切片をブロッキング溶液(5% donkey serum, 0.2% tritonX-100 in PBS)中で常温、1時間振盪した。次に、1次抗体(ヤギ抗GFP抗体, 1:600)を加え、4°Cで一晩振盪した。切片をPBSで洗浄後、2次抗体(抗ヤギIgG with Alexa488, 1:1000)を加えて室温、1時間振盪した。切片を洗浄後、スライドガラスに封入した。

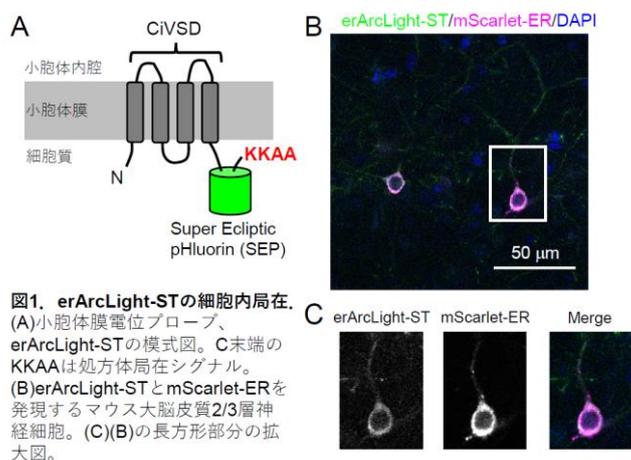
<結果>

高速・高分解能イメージングシステムの構築

膜電位は、ミリ秒オーダーで変動するため、まず、高速かつ高分解能で膜電位変動を記録するためのイメージングシステムを構築した。スピニングディスク共焦点スキャナと超高感度sCMOSカメラをベースとしたシステムに励起光源として488 nmと568 nmのレーザーを導入し、また、2波長の蛍光を1台のカメラで記録するための蛍光スプリッティング光学系をインストールした。これにより、励起・蛍光の組み合わせで3パターン(青励起・緑蛍光、青励起・赤蛍光、緑励起・赤蛍光)同時にイメージングすることが可能となった。また、光遺伝学実験用にファイバーLEDシステムを設置し、また電気生理学用のアンプとマニピュレータもセットアップし、イメージング、光刺激、電気生理学実験が同時に行うことができる実験システムを構築できた。

小胞体膜電位プローブ、光遺伝学ツール、小胞体ストレス応答プローブの開発

方法で述べた通り小胞体膜電位プローブ、erArcLight-ST、小胞体光遺伝学ツール、erChrimsonR、erA1ACR1、erHcKCR1、及び小胞体ストレス応答プローブ、GRUPRを作製した。これらのうち、erArcLight-STを、小胞体局在型赤色蛍光タンパク質、mScarlet-ERとともに子宮内電気穿孔法を用いてマウス大脳皮質2/3層神経細胞に発現させ、生後15日齢で脳を固定し、共焦点観察を行った。結果、erArcLight-STは小胞体に局在することが確認できた(図1)。



大脳皮質神経細胞における小胞体膜電位動態

まず、erArcLight-STを、小胞体局在型赤色蛍光タンパク質、mScarlet-ERとともに、子宮内電気穿孔法を用いてマウス大脳皮質2/3層神経細胞に遺伝子導入した。生後15日齢において脳を固定し、凍結切片を作製し共焦点観察を行ったところ、erArcLight-STは小胞体膜に局在することが分かった(図2)。また、急性スライス標本を作製し、膜電位イメージングを行った。リアノジンの投与により小胞体膜上のリアノジン受容体を活性化させ、小胞体内のCa²⁺を放出させると、erArcLight-STの蛍光輝度が減少し、小胞体膜の脱分極を検出することができた(図2)。さらに、erArcLight-STと赤色Ca²⁺プローブ、jRGECO1aを大脳皮質2/3層神経細胞に発現させ、生後15日齢において急性スライス標本を作製し、膜電位/Ca²⁺同時イメージングを行った。結果、自発神経活動と同期した小胞体膜の過分極が観察された。また、神経活動と同期した小胞体膜の過

分極が見られないケースも認められた。さらに、神経活動とは独立して、非常にゆっくりとした小胞体膜の過分極も観察された。今後、これらの現象の再現性を確認し、小胞体膜電位動態制御の分子実体を明らかにしていく。

ミトコンドリア膜電位プローブの開発

ミトコンドリア膜電位プローブ、mtArcLight-ST、ミトコンドリア光遺伝学ツール、mtChrimsonR, mtA1ACR1, mtHcKCR1 及び mtArch を作製した。これらのうち、mtArcLight-ST を、ミトコンドリア局在型赤色蛍光タンパク質、mScarlet-mt とともに大脳皮質2/3層神経細胞に共発現させ、生後15日齢で固定後、共焦点観察を行ったところ、mtArcLight-ST がミトコンドリアに局在することが確認できた(図3)。また、生後10日齢で急性スライス標本を作製し、膜電位イメージングを行った。ミトコンドリア脱共役剤であるカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) の投与によるミトコンドリア内膜の脱分極により、mtArcLight-ST の輝度が顕著に減少したことから、mtArcLight-ST はミトコンドリア膜電位プローブとして機能することが明らかになった(図3)。

<考察及び今後の展望>

本研究で、小胞体及びミトコンドリア膜電位動態を測定するための蛍光膜電位プローブの開発に成功した。また、膜電位イメージング法により、大脳皮質神経細胞の小胞体及びミトコンドリアは、従来の、膜電位が安定していてほとんど動かないというイメージとは異なり、ダイナミックに変動すること、そしてオルガネラ電気シグナルには多様性が存在することが明らかになりつつある。今後は、

神経細胞内のオルガネラの電気特性、機能の多様性を明らかにし、オルガネラ電気信号を制御する分子実体を解明する。また、多様な小胞体、ミトコンドリアがどのように神経機能を制御するか明らかにしていく。

小胞体及びミトコンドリアは細胞の内側に存在するため、従来の電極を用いた手法では、細胞が活着している生理的条件下における小胞体及びミトコンドリア膜電位変化を記録することは不可能であった。私が開発した膜電位プローブを用いて小胞体及びミトコンドリア膜の電気動態を光学的に検出することで、これまで見えなかったオルガネラ機能を可視化し、ゆっくりと機能するオルガネラというイメージを刷新し、電気シグナルを介した超高速計算機としてのオルガネラという新たなコンセプトの確立を目指し、神経科学のみならず、生物学の幅広い分野の発展に波及させることを目指す。

最後に、本研究の遂行に際し、多大なるご支援を賜ったアステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。

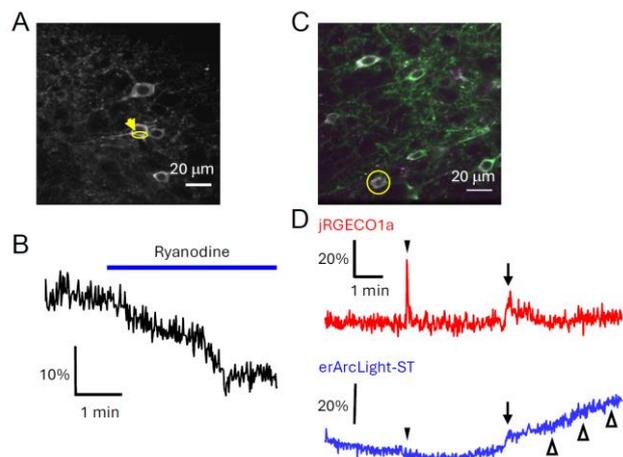


図2. 大脳皮質神経細胞における小胞体膜電位動態。(A) erArcLight-ST を発現する大脳皮質2/3層神経細胞。(B)(A)に矢印で示した領域のリアノジンに対する小胞体膜電位応答。蛍光輝度の減少(下向き)が脱分極を示す。(C)erArcLight-ST 及び赤色Ca²⁺プローブ、jRGECO1a を発現する大脳皮質2/3層神経細胞。(D)①のままで示した神経細胞の自発活動(jRGECO1a)と小胞体膜電位応答(erArcLight-ST)。矢印は神経活動と同期して小胞体膜電位が過分極したケース、黒い矢頭は神経活動と同期した小胞体膜電位変動が見られなかったケース。白い矢頭は、自発的なゆっくりとした小胞体膜の過分極を示す。

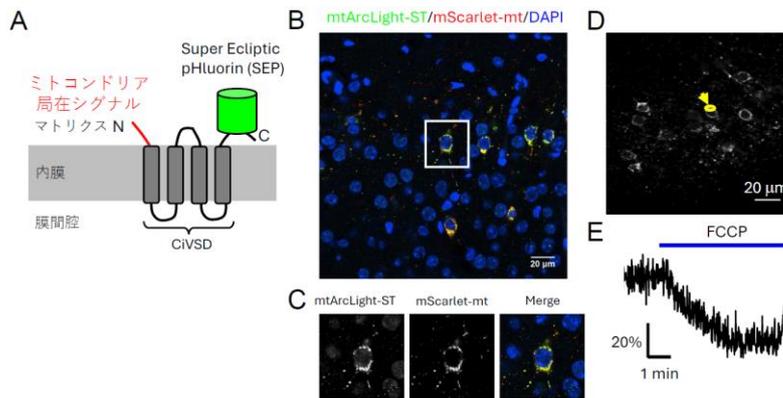


図3. 大脳皮質神経細胞におけるミトコンドリア膜電位動態。(A)ミトコンドリア膜電位プローブ、mtArcLight-STの模式図。(B)erArcLight-STとmScarlet-ERを発現するマウス大脳皮質2/3層神経細胞。(C)(B)の長方形部分の拡大図。(D)mtArcLight-STとmScarlet-mtを発現するマウス大脳皮質2/3層神経細胞。(E)mtArcLight-STを発現する大脳皮質2/3層神経細胞。(E)ミトコンドリア脱共役剤、FCCPに対するミトコンドリア膜電位応答。蛍光輝度の減少(下向き)が脱分極を示す。