

動的細胞内シグナルの可視化研究

Imaging Study of Dynamic Cellular Signaling

飯野 正光 (Iino, Masamitsu)

東京大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

本研究では、Ca²⁺と関連シグナルについて、シグナル分子可視化法と新たに開発する Ca²⁺シグナル抑制法を有機的に結合し、時空間的枠組みの中でシグナル伝達を明らかにする。これまでにシナプス可塑性、シナプス維持機構、Ca²⁺オシレーション機構、グリア細胞による神経突起伸長促進機構などについて、新たなシグナル機構を明らかにした。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：細胞内情報伝達、ニューロン・シナプス機能

1. 研究開始当初の背景・動機

生命の基盤となる細胞機能は、構成する分子群の相互作用によって担われており、それをシグナル分子が「時間的」および「空間的」枠組みの中で制御している。シグナル分子の時間的・空間的動態を解析することは重要だが困難であり、21世紀生命科学の主要な研究課題となっている。このためには、多方面からの研究手法を総合的に駆使することが必要であり、とりわけシグナル分子の可視化法は、時空間的枠組みを理解する上で極めて強力な方法論である。

2. 研究の目的

本研究では、Ca²⁺シグナルとそれに関連するシグナル伝達系に焦点を絞り、シグナル分子可視化法と新たに開発する分子遺伝学的 Ca²⁺シグナル抑制法を有機的に結合して、時空間的な枠組みの中でシグナル伝達を明らかにする。更にこの解析法を切り口として、Ca²⁺シグナル制御を受ける未知細胞機能の解析を強力に推進する。

3. 研究の方法

当研究室で開発した可視化プローブ (IP₃, NO, 小胞体内腔 Ca²⁺, グルタミン酸など) と、高度な光学顕微鏡法を用い、シグナル伝達の時空間解析を進める。特に、小脳プルキンエ細胞におけるシナプス伝達機構について分子基盤を追究する。また、組織特異的に IP₃-Ca²⁺シグナル系をマウスで抑制し、その意義を細胞・組織・個体レベルで詳細に解析する。

4. これまでの成果

1) シナプス強度の活動依存的維持機構

小脳平行線維→プルキンエ細胞シナプスには、電気的な信号を受け渡すイオンチャネル型グルタミン酸受容体の他に代謝型グルタミン酸受容体が存在する。特異的 IP₃加水分解酵素発現により、代謝型グルタミン酸受容体下流の IP₃シグナル機構を抑制したところ、平行線維終末からのグルタミン酸放出低下によるシナプス伝達効率の低下が観測された。さらに、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が逆行性シグナルとして関与することが示された (図1)。すなわち、代謝型グルタミン酸受容体は、シナプスの活性化状態をモニターしてシナプスの機能維持に関与している。

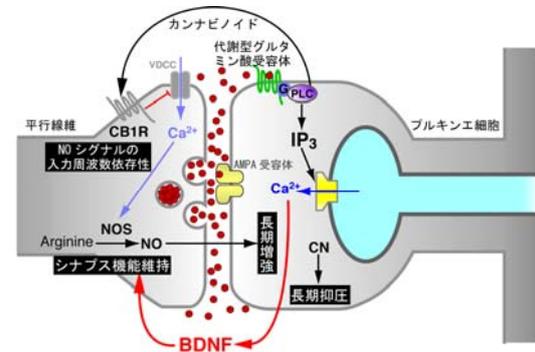


図1. 小脳平行線維→プルキンエ細胞シナプスにおいて本研究により明らかにされたシグナル伝達

2) シナプス可塑性の分子機構

平行線維→プルキンエ細胞シナプスには運動学習に関連する可塑的变化が見られる。まず、一酸化窒素 (NO) シグナルと可塑性の関係を追究した。新規 NO プローブ

(HBR-GFP) を用い、平行線維由来 NO シグナルの可視化に成功した。ガス性シグナル分子である NO は産生部位から数百 μm 程度拡散すると考えられていた。しかし、可視化により、NO はシナプス特異的なシグナルとして機能することが明らかになった。さらに、NO シグナル強度は平行線維刺激周波数に対して二相性に依存し 1 Hz において最高強度がえられ、高周波数刺激では内因性カンナビノイドを介した逆行性シグナルにより NO シグナルは低下する (図 1)。しかも、NO はシナプス伝達の長期増強を起し、これにも同様なシナプス特異性と刺激周波数依存性があることを明らかにした。加えて、同シナプスにおいてカルシニューリンが長期抑圧形成に関与することを明らかにした (図 1)。

3) グルタミン酸シグナルの可視化解析

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の可視化プローブを新たに作製し、小脳スライス標本のグルタミン酸動態測定に応用することに成功した (北米神経科学会等で発表)。中枢神経シナプスの活動状況を解析する全く新しい方法として大きなインパクトを与えると考えられる。

4) アストロサイト・神経細胞相互作用

アストロサイトにおける自発 Ca^{2+} オシレーションの機能的意義を検索するため、 IP_3 加水分解酵素をアストロサイトに導入して Ca^{2+} オシレーションを止め、神経伸長に対する影響を解析した。その結果、自発 Ca^{2+} オシレーションは、アストロサイト表面の分子発現を制御することにより、神経伸長を維持していることが明らかとなった。

5) Ca^{2+} オシレーション形成機構の解明

Ca^{2+} オシレーションは Ca^{2+} シグナルの効率化に役立っている。しかし、 Ca^{2+} 濃度が振動する機序は明らかでなかった。タンパク質性 Ca^{2+} インジケーターを新たに作製し、小胞体およびミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度と細胞質 Ca^{2+} 濃度を比較することに成功した。これにより、小胞体から放出された Ca^{2+} は一旦ミトコンドリアに移動し、その後徐々に放出される。これが引き金となって、周期的に小胞体から Ca^{2+} 放出が繰り返されるメカニズムが明らかになった。

6) 細胞間接触情報としての Ca^{2+} 雷光

細胞間接触部位にのみ見られる全く新しいタイプの Ca^{2+} シグナル“ Ca^{2+} lightning” (Ca^{2+} 雷光) を発見した。さらに、 Ca^{2+} 雷光は、 Ca^{2+} 依存性チロシンリン酸化酵素 PYK2 を活性化して細胞の葉状仮足の退縮を誘導することを明らかにした。 Ca^{2+} 雷光は、細胞間の接触を検知するメカニズムとして機能していると考えられる。

5. これまでの進捗状況と今後の計画

研究は計画通りに進行しており、予想外の研究成果も得られている。今後は、当初計画を推進するとともに、新たな成果に基づくグルタミン酸イメージング、アストロサイト・神経細胞相互作用機構解析、生体内脳シグナルイメージングなどの新規研究テーマについても強力に研究を推進したい。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Kanemaru, K, Okubo, Y, Hirose, K. & **Iino, M**: Regulation of neurite growth by spontaneous Ca^{2+} oscillations in astrocytes. **J. Neurosci.** 27, 8957-8966, 2007.
- 2) Fujiwara, A, Kakizawa, S & **Iino, M**: Induction of cerebellar long-term depression requires activation of calcineurin in Purkinje cells. **Neuropharmacology** 52, 1663-1670, 2007.
- 3) Namiki, S, Sakamoto, H, Iinuma, S, **Iino, M** & Hirose, K: Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission. **Eur. J. Neurosci.** 25, 2249-2259, 2007.
- 4) Kakizawa, S, Kishimoto, Y, Hashimoto, K, Miyazaki, T, Furutani, K, Shimizu, H, Fukaya, M, Nishi, M, Sakagami, H, Ikeda, A, Kondo, H, Kano, M, Watanabe, M, **Iino, M** & Takeshima, H: Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. **EMBO J.** 26, 1924-1933, 2007.
- 5) Hashido, M, Hayashi, K, Hirose, K & **Iino, M**: Ca^{2+} lightning conveys cell-cell contact information inside the cells. **EMBO Rep.** 7, 1117-1123, 2006.
- 6) Furutani, K, Okubo, Y, Kakizawa, S & **Iino, M**: Postsynaptic inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains presynaptic function of parallel fiber-Purkinje cell synapses via BDNF. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 103, 8528-8533, 2006.
- 7) Ishii, K, Hirose, K & **Iino, M**: Ca^{2+} shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca^{2+} oscillations. **EMBO Rep.** 7, 390-396, 2006.
- 8) Namiki, S, Kakizawa, S, Hirose, K & **Iino, M**: NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. **J. Physiol.** 566, 849-863, 2005.
- 9) Hashimoto, A, Hirose, K & **Iino, M**: BAD detects coincidence of G2/M Phase and growth factor deprivation to regulate apoptosis. **J. Biol. Chem.** 280, 26225-26232, 2005.

ホームページ等

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>