実験技術

グルタミン酸伝達を“観る”技術 グルタミン酸スピルオーバーの可視化解析

大久保洋平

要約：グルタミン酸は脳における代表的な興奮性神経伝達物質である。従来からの考え方では、前シナプス終末から放出されたグルタミン酸は、シナプス間隙の中に限局して「点と点」のシナプス伝達を担うものとされてきた。しかしながら近年、グルタミン酸がシナプス間隙から漏れ出しシナプス外領域に拡散することで、非シナプス性伝達が惹起されることを示唆する知見が得られてきている。このグルタミン酸による非シナプス性伝達はグルタミン酸スピルオーバーと呼ばれる。グルタミン酸スピルオーバーは様々な脳機能と病態に関与することが示唆され、新たな創薬標的としても期待される。電気生理学的現象を必ずしも伴わず、また空間的な拡がりを示すグルタミン酸スピルオーバーを解析するためには、グルタミン酸自体を直接可視化する新たな技術が不可欠であった。筆者らは新規に開発された蛍光グルタミン酸プローブ EOS を応用し、脳スライス標本および生体内の脳において、グルタミン酸スピルオーバーを高解像度に可視化することに成功した。これにより、グルタミン酸スピルオーバーが生理的入力で惹起され得ることを初めて示し、またグルタミン酸スピルオーバーの様々な側面について定量的な知見が得られた。グルタミン酸やその他の伝達物質の動態を可視化する蛍光プローブの開発、改良、応用は各地で進められており、今後のさらなる展開が期待される。

1. はじめに

多くのグルタミン酸作動性シナプスは、グリア細胞であるアストロサイトの突起が緊密に巻き付くという特徴的な構造を示す。さらにアストロサイトには、グルタミン酸の再取り込みを担うトランスポーターが豊富に発現している。以上の特徴により、グルタミン酸

のシナプスからの漏れ出しが厳密に防がれているように見える。よってモノアミン伝達物質のようなシナプスの外側への拡散は、グルタミン酸については起こらないと考えるのも無理はない。しかしながら近年、グルタミン酸スピルオーバーが、神経細胞およびグリア細胞を介して様々な脳機能と病態に関与することが示唆され、創薬標的としても期待されている。以下にいくつか例を挙げる。

グルタミン酸スピルオーバーは各種の代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の活性化に欠かせない。前シナプス終末に局在するグループ II mGluR が活性化されると、伝達物質放出確率が低下する。このグループ II mGluR の作動薬については、統合失調症治療薬として研究が進められている(1)。後シナプス側のシナプス間隙外側に局在するグループ I mGluR はシナプス可塑性に関与することがよく知られているが、疾患にも関与することが報告されている。特にグループ I mGluR の拮抗薬が脆弱 X 症候群の治療に有用であることが示唆され、治療薬開発が期待されている(2)。

イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) である NMDA 受容体は、シナプス間隙の内部だけでなくシナプス外領域にも発現しており、グルタミン酸スピルオーバーにより活性化される。興味深いことに、シナプス内 NMDA 受容体の活性化は神経細胞の生存を促す一方、シナプス外 NMDA 受容体の活性化は神経細胞死を誘発する(3)。またシナプス外 NMDA 受容体の活性化は、ハンチントン病発症の引き金になることが示唆されている。さらにアルツハイマー病治療薬であるメマンチンの低用量投与により、シナプス外 NMDA 受容体を選択的に阻害することで、ハンチントン病に対して治療効果が得られることがマウス実験で示されている(4)。

神経細胞とグリア細胞はほとんどの場合直接のシナプス結合を持たないので、必然的にグルタミン酸スピルオーバーを介した伝達が必要となる。アストロサイトは、特に幼弱期において、グルタミン酸に反応して様々な機能（グリア伝達物質の放出、脳血管の収縮と弛緩を制御、等）を惹起することが明らかとなってきた(5,6)。

以上のように定性的な知見が蓄積されていたが、グルタミン酸スピルオーバーに伴うシナプス活動条件、拡散距離、持続時間、濃度等の定量的な解析が実現しておらず、研究の進展が阻まれていた。「点と点」のシナプス伝達ならば、パッチクランプ法でシナプス電流を測定することで一定の情報が得られるが、グルタミン酸スピルオーバーのような時空間的拡がりを示す現象については、伝達物質自体を検出し動態を解析する、イメージング技術が必要となる。本稿では、我々の最近の取り組みの紹介を通じて、神経伝達物質の蛍光イメージング技術の一端を解説したい。

2. 従来のグルタミン酸動態解析法

グルタミン酸の動態解析には、これまで電気生理学的手法が主に用いられてきた。神経細胞やアストロサイトへパッチクランプ法を適用し、iGluRやトランスポーターを介した電流を測定することで、間接的にグルタミン酸を検出することができる。またiGluRを異所的に発現させた細胞やパッチ膜（snifferと呼ばれる）を用いた研究も行なわれてきた。しかし空間的拡がりを持つグルタミン酸スピルオーバーに対して、空間解像が困難な電気生理学的手法を適用することは、まさに氷山の一角を捕捉するに過ぎない状況であった。その他、グルタミン酸代謝酵素を用いてその代謝反応を電気的および光学的に検出する方法や、マイクロダイアリシスによる検出法等も存在するが、空間解像が達成できない、組織への侵襲性が大きい、感度が低すぎる等の問題があった。以上の状況は、グルタミン酸以外の伝達物質においても同様である。この状況を打破すべく、我々を含め複数のグループが、蛍光グルタミン酸プローブの開発と応用を進めてきた。

3. タンパク質型蛍光グルタミン酸プローブの開発

まず蛍光共鳴エネルギー移動（Förster/Fluorescence resonance energy transfer：FRET）を応用したプローブが開発された。FRETとは、一方の励起された蛍光分子（ドナー）からもう一方の近接した蛍光分子（アクセプター）にエネルギーが移動する現象で、そのエネルギー移動効率は蛍光分子間の距離に

大きく依存する。これを応用して、コンフォメーション変化や分子間の距離を、ドナーとアクセプターの蛍光強度比の変化として検出することが可能になる。FRET型グルタミン酸プローブは、大腸菌由来のグルタミン酸結合タンパク質の両端に、それぞれシアン蛍光タンパク質（ドナー）と黄色蛍光タンパク質（アクセプター）を融合した構造となっている。グルタミン酸の結合により結合タンパク質のコンフォメーションが変化し、これにより蛍光タンパク質間の距離が増え、FRETが起こり難くなるという挙動を示す。ほぼ同様の設計のプローブが、2つのグループから発表されている(7,8)。これらのプローブにより、細胞レベルの解像度でグルタミン酸動態を可視化することが初めて可能となった。しかしこれらのプローブではシグナルの変化率が限られていたため、蛍光イメージングの容易な培養細胞への応用が主であった。分散培養された神経細胞においてではあるが、グルタミン酸スピルオーバーの可視化が報告されている(8)。

また最近、グルタミン酸結合タンパク質と蛍光タンパク質の円順列変異体を融合させたプローブが新たに開発された(9)。グルタミン酸の結合により円順列変異体の構造が最適化され、蛍光強度が上昇する設計となっている。高いシグナル変化率を示しており、マウス生体内の脳でのイメージングにも成功したことが併せて報告されている。グルタミン酸スピルオーバー可視化への応用はまだ報告されていないが、今後の展開が期待される。

上記のようなタンパク質型プローブの利点としては、各種ベクターや遺伝子工学により遺伝子を導入することで、目的の細胞選択的かつ持続的なプローブ発現が、容易に実現されることである。さらに、シグナル配列の付加による局在の制御も可能である。一方、蛍光タンパク質はその発色団が安定した β バレル構造に包まれており、蛍光強度を大きく変化させるようなプローブを得るには、一般的に多大な労力が必要となる。具体的には、リガンド結合部位、蛍光タンパク質とその円順列変異体、それらをつなぐリンカー部位、以上の要素の配置などについて、多数のバリエーションを作製して、スクリーニングする必要がある。FRET型プローブについては、蛍光タンパク質の β バレル構造の立体障害ゆえに、大きなFRET効率を得ることが難しいことも留意される。

4. ハイブリッド型蛍光グルタミン酸プローブ EOS

グルタミン酸スピルオーバーに関しては、アストロサイトを含めたシナプス構造が重要であり、これが保

たれている脳スライス標本や生体内の脳で実験を行うことが不可欠である。このような標本での観察に資する、高輝度・高変化率のプロープを実現するため、東京大学の廣瀬らは、グルタミン酸結合タンパク質と小分子の蛍光色素からなる、ハイブリッド型プロープという独創的なアプローチを採用した(10)。生命の進化によって生み出されたタンパク質の理想的なリガンド選択性と高親和性、ならびに蛍光小分子の大きな蛍光強度変化の両者を生かそうという発想である。

具体的には、iGluRであるAMPA受容体のグルタミン酸結合ドメインを単離し、そのリガンド結合ポケットに環境感受性(周囲の極性分子の存在により蛍光強度が変化する性質)を持つ蛍光色素を標識した(図1A)。グルタミン酸結合に伴うコンフォメーション変化により、アミノ酸側鎖の配向変化や水分子の排除等により蛍光色素周囲の極性環境が変化し、それにより蛍光強度が変化することを期待している。蛍光色素の種類や標識部位等を変えた候補分子を作製し、それらをスクリーニングした。そしてグルタミン酸の結合に依存して蛍光強度が大きく上昇するプロープを得ることに成功し、これを glutamate (E) optical sensor (EOS) と命名した(図1A, B)。

我々はこのEOSを用いることで、グルタミン酸スパルオーバーを高解像度で可視化できると考え研究に着手した(11, 12)。光学顕微鏡の解像度を考慮すると、グルタミン酸スパルオーバーを通常のシナプス伝達と区別して検出するためには、EOSをシナプス外領域に選択的に固定する必要がある。小分子を利用したプロープの標本への導入と局在化は、上記のタンパク質型プロープのように容易ではなく、高輝度・高変化率とのトレードオフとなる。しかし我々は以下に示すように比較的単純な方法によりこれを解決した。

脳組織においては、細胞外空間のほとんどをシナプス外領域が占めており、シナプス間隙内部はわずかな割合に留まっている。よって細胞外に均一にEOSを固定できれば、そのほとんどはシナプス外に局在すると期待された。そこでまず、脳スライスをビオチン標識試薬とインキュベーションすることで、細胞外に面している一級アミンに対して網羅的にビオチンを標識した。そしてあらかじめ作製しておいたストレプトアビジンとEOSの複合体(ストレプトアビジンの4つのビオチン結合部位の複数にEOSが結合しているが、1つ以上の結合部位が空いているもの。ストレプトアビジンとビオチン標識済みEOSの混合比を最適化して作製する。)をインジェクションした。この結果、図1Cに示すような形でEOSが細胞外空間に面して固定

図1 ハイブリッド型蛍光グルタミン酸プロープ EOS

(A) EOS の模式図。AMPA 受容体の細胞外ドメイン (S1S2) を膜貫通部位から単離し、リガンド結合部位近傍に環境感受性蛍光色素を標識した。(B) 二種類の EOS の反応曲線。グルタミン酸に対して非常に高い親和性と蛍光変化率を示す。(C) ビオチン-ストレプトアビジン結合を用いた EOS の固定化法。B: ビオチン, SA: ストレプトアビジン。(D) 小脳スライスに固定化した EOS。神経細胞の樹状突起がシルエット状に見える。(E) 免疫電子顕微鏡法による、EOS の詳細な局在解析。シアン色は前シナプス終末、ピンク色は後シナプス側スバインを示す。抗体に標識された金コロイド粒子が、EOS の局在を示す。細胞外空間に比較的均一に金コロイド粒子が観察されたが、シナプス間隙の内部にはほとんど存在しなかった。(文献 11 より改変)

化された。固定化された EOS の局在を蛍光顕微鏡で観察すると、神経細胞の樹状突起がシルエット状に見える、細胞外空間に均一に EOS が局在していることが確認できた(図 1D)。さらに詳細な局在を、免疫電子顕微鏡法で解析した。その結果、固定化された EOS の大部分はシナプス間隙の外部に存在し、シナプス内部にはごくわずかしかな存在しないことが明らかとなった(図 1E)。よって、固定化した EOS によりグルタミン

酸スピルオーバーを選択的に可視化できることが確認された。EOSの作製方法や固定方法の詳細については、既報を参照されたい(10, 11)。

5. グルタミン酸スピルオーバーの可視化解析

急性脳スライス標本において、神経線維刺激に伴うEOSの蛍光強度変化を、二光子顕微鏡で観察した。二光子顕微鏡法の詳細については誌面の都合により割愛するが、今回の実験で求められるような μm オーダーの解像度を脳スライス標本で実現するためには、欠くことのできない蛍光顕微鏡法である。生理的な発火頻度・回数で刺激された神経線維の走向と一致して、EOSの蛍光強度上昇が観察された(図2)。つまりグルタミン酸スピルオーバーを直接観察することに成功した。図に示した小脳以外にも、大脳皮質および海馬スライスでの観察に成功している。グルタミン酸スピルオーバーの可視化成功により、これまで十分に解析できなかった特性について、直接的に解析することが可能となった。

まずグルタミン酸スピルオーバーの加算特性を検証した。グルタミン酸スピルオーバーは、連続放出により時間方向で加算され、また近傍のシナプスからの放出により空間方向でも加算が起こる。よってシナプス活動の時間的空間的密度とグルタミン酸スピルオーバーの関係を明らかにすることが研究の第一歩となる。まず時間方向の加算については、100 Hzでの連続刺激

図2 EOSによるグルタミン酸スピルオーバーの可視化

小脳スライスにおいて、平行線維を刺激した際に惹起されたEOSの蛍光強度上昇。シグナルの分布と刺激された平行線維の走向が一致している。(文献11より改変)

時に、刺激回数に応じたEOSシグナルの上昇が観察された(図3A)。そして二回以上の連続刺激が検出可能なシグナルを惹起するのに必要であった。よってグルタミン酸スピルオーバーには、高頻度の放出による加算が必要であることが明らかとなった。

空間方向の加算については、まず単独の軸索を刺激した際には、有意なEOSシグナルは観察されなかった。次に軸索の束を刺激したところ、刺激される軸索の本数・密度に応じて、局所的なEOSシグナルが観察され

図3 グルタミン酸スピルオーバーの特性

(A) 時間方向の加算。二回以上の連続刺激によりEOSシグナルが惹起された。(B) 空間方向の加算。刺激される神経線維の本数・密度(シナプス電流の大きさから推定、横軸)に応じて、EOSシグナル(縦軸)が増大した。(C) 周囲への拡散。EOSシグナルをラインスキャンイメージングで解析した。縦方向が空間的拡がり、横方向が時間経過を示す。多数回の連続刺激により、周囲への拡散が観察されたが、距離は数 μm に留まった。(D) グルタミン酸濃度の定量。連続刺激により、 μM 以上の濃度が数十ミリ秒持続した。(文献11より改変)

た(図3B). 空間方向の加算については, グルタミン酸スピルオーバーの拡散距離も重要な因子である. グルタミン酸スピルオーバーは, 通常の条件では周囲への明確な拡がりを示さず, 刺激回数を多数回にすることでようやく数 μm の拡散が観察された(図3C). よって, 発火している軸索束の外側においては, 有意なグルタミン酸濃度上昇はほとんど起こらないと考えられる. 広い範囲に拡散するモノアミン伝達物質とは, この点で大きく異なるものであると言える.

次にグルタミン酸スピルオーバーの濃度を定量した. EOS シグナルのタイムコースからも自明であるが, グルタミン酸濃度はミリ秒オーダーで変動しており, EOS-グルタミン酸相互作用は定常状態にはない. よって検量線を用いるような, 定常状態を前提とする定量は適用できない. そこで, あらかじめ測定しておいた EOS-グルタミン酸相互作用の結合および解離速度定数を用いて, EOS の蛍光強度時系列をデコンボリューションすることで, グルタミン酸濃度時系列を求めた(図3D). これにより, μM 以上の濃度で, 数十ミリ秒滞留するグルタミン酸動態が明らかになった. このようなグルタミン酸動態は, NMDA 受容体 ($\text{EC}_{50} \approx 2 \mu\text{M}$) や mGluR ($\text{EC}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$) を活性化するのに十分である. 一方 AMPA 受容体 ($\text{EC}_{50} \approx 500 \mu\text{M}$) を活性化するには不十分である. よって NMDA 受容体や mGluR が担うグルタミン酸スピルオーバー依存性伝達は, EOS シグナルが観察されたような範囲において成立するが, AMPA 受容体が担う伝達は, 空間的に非常に限局した高濃度部位, つまりシナプス間隙内部に限られると考えられる.

以上より, 複数の空間的に近接したシナプスが高頻度同期発火することで, その局所で有意なグルタミン酸スピルオーバーが惹起されることが明らかになった(図4). つまりグルタミン酸スピルオーバーによる伝達は, このように時間的空間的にクラスター状のシナプス活動が最小単位となっており, また遠距離の相互作用には関与せず局所での伝達に留まると推測される.

6. 生体内でのグルタミン酸スピルオーバー

上記で見たように, シナプス活動の時間的空間的密度がグルタミン酸スピルオーバーの重要な決定因子である. よって, スライス標本等での実験において, 刺激電極を用いてグルタミン酸スピルオーバーを惹起する際には注意が必要となる. すなわち, 強力な刺激により非生理的な時空間密度のシナプス活動が惹起され, それにより生理的には起こるはずのないグルタミン酸スピルオーバーを観察してしまうという可能性である.

図4 時空間的シナプス活動クラスターにより惹起されるグルタミン酸スピルオーバー

シナプス活動(グルタミン酸放出)の時間的空間的密度が一定の条件を超えた局所において, 十分なグルタミン酸の滞留がシナプス外領域で起こる.

グルタミン酸スピルオーバーが生理的なシナプス活動, すなわち生体内での感覚入力等により惹起されるかについては, これまで検証する術が無く解明が待ち望まれていた.

そこで麻酔下のラット大脳皮質に図1と同様にして EOS を固定し, *in vivo* での観察を試みた. 本実験では大脳皮質の体性感覚野という比較的大きな領域を観察する必要があったため, 広視野の蛍光実体顕微鏡で観察を行なった. 観察部位を覆う頭蓋骨は除去し, カバーガラスを接着することで観察窓を作製した. 周囲の頭蓋骨には金属プレートが強固に接着しており, このプレートをボルト留めすることにより顕微鏡下に固定した. 後肢足底をブラシで刺激することで, 体性感覚入力を惹起したところ, 体性感覚野の後肢対応領域で明瞭な EOS シグナルが観察された(図5A). よって生理的なシナプス活動により, *in vivo* で確かにグルタミン酸スピルオーバーが惹起されることが明らかとなった. さらに, 無刺激条件下において, EOS の蛍光強度について有意な変動が観察された(図5B). これは脳の自発活動により, グルタミン酸スピルオーバーが惹起されていることを示すものである.

以上の成果は, グルタミン酸スピルオーバーの理解という点に留まらず, 興奮性シナプス伝達の時空間動態を, *in vivo* で直接イメージングできることを示す成果でもある. よって, 今後 EOS が脳機能イメージングの新たなモダリティとして応用されることが期待される.

7. おわりに

二光子顕微鏡を筆頭とする光学技術と高性能プロンプの開発を両輪とする, 近年の蛍光イメージング技術

図5 生体内大脳皮質におけるグルタミン酸スピルオーバー
(A) 麻酔下のラットの後肢足底を刺激し、体性感覚入力を惹起したところ、大脳皮質の対応領域でEOSシグナルが観察された。
(B) 無刺激条件下、自発活動によるグルタミン酸スピルオーバー。無反応性の対照用プローブ(Y711A-EOS)と比較して、EOS(L401C-EOS)は有意な変動を示した。(文献11より改変)

の発展により、脳組織において様々なシグナル分子の動態を可視化することが可能になってきている。しかし神経伝達物質については、電気生理学による解析が大きな成果を示してきたこともあり、イメージング法開発は道半ばである。アセチルコリンについては、 M_1 受容体と蛍光 Ca^{2+} プローブを同時発現させたsniffer細胞を脳に埋め込む方法が報告されているが(13)、より侵襲性が低くまた精細な空間解像を達成する方法が望まれる。ドパミンについては、類似構造を持った蛍光トレーサー(ドパミンと同様に小胞への取り込みおよび放出等の振る舞いをする)が開発されている(14)。またEOSのようなハイブリッド型プロー

ブという戦略を、グルタミン酸以外の伝達物質に対しても応用することは十分可能であると考えられ、今後の開発が期待される。伝達物質を直接“観る”研究が発展することで、従来の電気生理学ではアプローチできなかった現象が解き明かされていくことを期待したい。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学 飯野正光教授、ならびにEOSをいち早く供与してくださった同神経生物学 廣瀬謙造教授に深く感謝申し上げます。また、本稿の執筆の機会を与えてくださった委員の皆様へ御礼申し上げます。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 日吉哲明, 他. 日薬理誌. 2012;140:111-115.
- 2) Bear MF, et al. Trends Neurosci. 2004;27:370-377.
- 3) Hardingham GE, et al. Nat Neurosci. 2002;5:405-414.
- 4) Milnerwood AJ, et al. Neuron. 2010;65:178-190.
- 5) Haydon PG, et al. Physiol Rev. 2006;86:1009-1031.
- 6) Sun W, et al. Science. 2013;339:197-200.
- 7) Okumoto S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:8740-8745.
- 8) Hires SA, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:4411-4416.
- 9) Marvin JS, et al. Nat Methods. 2013;10:162-170.
- 10) Namiki S, et al. Eur J Neurosci. 2007;25:2249-2259.
- 11) Okubo Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:6526-6531.
- 12) Okubo Y, et al. J Physiol. 2011;589:481-488.
- 13) Nguyen QT, et al. Nat Neurosci. 2010;13:127-132.
- 14) Gubernator NG, et al. Science. 2009;324:1441-1444.

著者プロフィール

大久保洋平 (おおくぼ ようへい)

東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学, 講師, 博士(医学)。

◇1999年東京大学理学部卒業, '05年東京大学大学院医学系研究科卒業, '06年同助手, '11年より現職。◇研究テーマ: 中枢神経系におけるシグナル分子動態の可視化解析。◇趣味: 山登り, スキー, 自転車。