研　究　報　告　書

「膜電位の時空間計測における、次世代技術開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月
研　究　者：　筒井　秀和

1．　研究のねらい

脳の中では膨大な数の神経細胞が互いに複雑な回路を構築し、情報の保持や処理等を行い、動物の知的で多様な行動の基礎を作り出している。神経回路を伝播する信号の主要な実態は、細胞膜電位変化という電気信号である。一つ、あるいは少数の細胞であれば、ガラス管微小電極を用いた手法などにより正確な電気活動記録を得ることが出来る。しかしながら、多くの細胞を同時に計測対象とすることは難しい。生き物の中では、生体電気信号は一体どのように扱われているのか、という根源的な問いに迫る事を目指して、細胞の電気活動の時空間動態を計測しようとする試みが行われはじめてから半世紀以上が経つが、生理学における最も本質的な課題の一つであり続けている。

細胞は実際に生体電気信号を巧みに解読して、信号を増幅したり、化学反応を引き起こしたりしている。細胞膜には電圧変化を感知して状態遷移を引き起こす膜蛋白質があり、このような蛋白質を分子の部品として利用する事で、蛋白質性の膜電位プローブを創出し、電気信号の時空間動態を光学的に検出する事が出来る。例えば、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインと、蛍光共鳴エネルギー移動レポータを組み合わせ、電位センサードメインの電位依存的状態遷移をエネルギー移動効率の変化として光学的に検出する事が出来る。この計測原理に基づいて、培養下の単一細胞における単一スパイクを光学的に可視化する事などが可能になってきた（Tsutsui et al., 2008）。しかしながら、実際に動作している神経回路から、十分な精度と堅牢性を兼ね備えた計測を行うには応答感度、速度、光安定性などの点で、さらなる特性の向上が必要である。本研究において、ナノスケールで起きる光物理現象や蛋白質と電場の相互作用に関する知見等を駆使し、膜電位の時空間計測技術の発展に寄与する事を目指した。

2．　研究成果

（1）概要

まず、自身が開発した膜電位プローブ mermaid（Tsutsui et al., 2008）を用いて、ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に「見る」ことに取り組んだ。抗ヒスタミン系の薬物がゼブラフィッシュにいて心機能障害を誘発する事が知られているが、そのような状態での電気的興奮の伝播が、正常時とは異なる様式になっている事が分かり、膜電位光学計測の応用的発展の可能性の一つが示された。次に、設計する蛋白質の電位依存的な光学特性を迅速に評価する手法の開発に取り組んだ。蛋白質の設計において、些細な変異や部分設計の変更がしばしば予期せぬ効果を持つ事があるが、通常の電気生理学的手法は計測効率が必ずしも高くなく、多数の蛋白質の評価には適していない為である。細胞外電場に対する誘起膜電位（field-induced potential）の空間分布を用いる事で、効率的な評価法を

確立する事が出来た。この評価法を用いて、様々な設計の人工蛋白質の挙動を調べていると、電位センサードメインの状態遷移に関した新しい知見が得られた。すなわち、従来まで、電位センサードメインの 4 つの膜貫通セグメント（S1-S4）の内、状態遷移時においては S4 が主要な構造変化を示すと考えられてきたが、S4 のみならず S1 の上流にも匹敵する影響を与える可能性が示された。この可能性は別の詳しい一連の光学的計測によっても支持された。この現象を膜電位の時空間計測に応用する事を試みた。電位センサードメインの S1、S4 に蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）のドナー・アクセプターを配置する事で、膜電位変化により誘起される電位センサードメインの状態遷移を FRET 高速・高感度に検出できる事を見出した。また、遺伝学的にコードできる第 2 高調波発生レポータの開発にも取り組んだ。静電相互作用に基づいた細胞膜配向技術を開発し、哺乳類細胞において2倍波の観察にも成功した。

２）詳細

研究テーマ 1. ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態

ゼブラフィッシュは、遺伝子操作技術が確立されている事、幼魚では細胞や組織の観察が生きたまま可能な事、発生が速く進む事、飼育コストが比較的安い事、等々のモデル脊椎動物としての利点を持ち、それらは心臓研究においても発揮されてきた。また、近年は、損傷後に再生がおきる事や、個体を用いた大規模スクリーニングへの適合性などのユニークな点にも注目されてきている。開発してきた膜電位プローブ、mermaid を用いて、ゼブラフィッシュ心臓の電気活動を非侵襲的に「見る」ことを試みた。まず、心筋細胞で特異的に mermaid を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ cmlc2::Mermaid を得た。標本には受精後 70-80 時間後の胚を用いた。ガラスボトムディッシュ上に寒天で小さな凹みをつくり、その中で泳がせ、腹側から観察した。この時期の胚の泳ぎは間欠的であるため、無麻酔、非拘束という極めて生理的な状態で心臓の膜電位動態を見る事が出来た。収縮サイクルにおいて、最初の脱分極は心房と血管の境界部付近で起こり、それが心室へと伝播していくようなレシオ画像の時系列が見えた。偽陽性信号を調べるために、Mermaid D129R というネガティブコントロールプローブを発現したトランスジェニックゼブラフィッシュも同様に作成した。心収縮を観察すると、今度はほとんどレシオ変化がみられず、cmlc2::Mermaid のレシオ変化の大部分は膜電位を反映したものであるとわかった。アステミゾールという、第二世代のヒスタミン H1 受容体拮抗薬がある。QT 延長などの副作用を持つことが明らかとなり市場撤退した薬物で、ゼブラフィッシュに投与した場合も心臓の機能障害を引き起こす事が知られている（但し、薬理作用も同一かについてはまだ解明されていない）。アステミゾール投与が膜電位動態に与える影響を調べた。投与前は前述同様、心房-血管の接合部から心室に膜興奮の正常な伝播が観察された。アステミゾール投与後、心室の収縮が欠如している状態においては、驚くべき事に、最初の電気的興奮が、心房、心室の境界付近で発生し、心房方向に逆伝播しているような結果が得られた。投与前の正常な収縮サイクルでは、心房-心室境界部、及び、心室での蛍光レシオのピーク時間は、心房でのピーク時間に比べて、それぞれ、57 ± 6.2 ミリ秒、及び、85 ± 6.2 ミリ秒 “遅れて”いた。これに対し、アステミゾール投与後の、心室収縮が阻害されている心臓では、52 ± 4.9 ミリ秒、及び 95 ± 4.3 ミリ秒“進んで”いた（n=5, 平均値 ± 標準誤差）。このように、mermaid を用いた膜電位イメージング技術を用いて、ゼブラフィッシュの心

臓の薬剤誘発性心機能障害における異常な興奮伝播のモードが明らかとなった。前述のように、ゼブラフィッシュの心臓は、心臓機能に関わり、哺乳類のものと相同性の高い重要な分子を多く発現しながら、低コスト、高い透明性、遺伝子操作性、マイクロウェルに収まる“小さ
さ”、などを兼ね備えた優れた材料である。また、損傷後の再生が起きる事は特有の現象で、興味深い。拍動している心臓の電気発動を“見える”ようにすることで、心臓の生理、発生、薬理学の発展につながることが期待された（Tsutsui et al., 2010）。

研究テーマ 2.　光学信号の高速評価法の確立

細胞外に電場をかけることで誘起される “field-induced potential (ΔΨ)” の空間分布を利用することで、電気生理学的な計測を行うことなく、候補プローブの定量的な特性を効率的に調べる手法を確立した。解析には、ほぼ球形の N2a 細胞を用い、電場印加に対する光学信号の電極との角度依存性を用いる。ここで、実際の電位センサードメインが「感じる」のは、ΔΨではなく、静止膜電位＋ΔΨであるが、細胞ごとの静止膜電位のばらつきが問題となった。安定的に内向き整流性・チャネルを発現する細胞株を作ることで、この問題を解決することが出来た。single shot で、電位依存性や細大応答などが、約 10mV 以下の誤差範囲のもと、効率的に解析できるようになった。この方法を用いる事で、例えば、電位センサードメイン上において、膜電位プローブの応答性を向上させるアミノ酸変異などが発見された（Tsutsui et al., 2014）。

研究テーマ 3.　電位センサードメインの状態遷移機構

従来、電位センサードメインが、その構造変化を伝える主要な部位は S4 の下流と考えられていたが、S1 の上流に FRET レポータを付加したコンストラクトの光学信号を本研究で開発した手法を用いて解析したところ、予想に反して、電場印加に応じて FRET 効率の変化が検出された。同様の結果はツメガエル卵母細胞の発現系でも得られた。さらに同様の現象は、FRET レポータではなく、テトラメチルローダミン（TMR）の環境依存性に基づく計測法によっても観察され、一般的に観察される現象であることを示していた。これらの結果は、電位センサードメインの状態遷移による構造的摂動は S1 の上流にも及びうる事を初めて示すものであり、電位依存性チャネルの動作原理を考える上でも重要な知見となり得る（Tsutsui et al., 2013）。

研究テーマ 4. 高速・高感度型の膜電位プローブ mermaid2 の開発

テーマ 3 で得られた電位センサードメインに関する新しい知見を元に、S1 の上流、S4 の下流にそれぞれ FRET ドナー・アクセプターを配置することで、高速・高感度型の膜電位プローブ mermaid2 を開発した。Mermaid2 の信号は、mermaid に比べて、信号変化量で1．8倍、時定数で7．7倍向上していた。このようにして得られた新たなプローブ mermaid2 を用いる事で、時間平均加算することなく、150Hz までのスパイク列において個々のスパイクを分解する事、単一スパイクのみならず閾値下の膜電位現象も捉える事、そしてマウス大脳皮質における聴覚刺激に対する応答を可視化する事に成功した（Tsutsui et al., 2013）。

研究テーマ 5.　蛍光蛋白質の細胞膜への配向制御と第 2 高調波発生

第 2 高調波発生とは光電場に対する物質の非線形分極に基づく現象の一つであり、入射光の 2 倍の振動数（半分の波長）の光が発生する現象である。非線形分極を起こす有機化合物色素などで染色する事により、細胞膜−細胞質界面からの第 2 高調波発生が検出でき、さらにその発生効率は膜電位依存的である事などがこれまでに報告されてきた。しかしながら、哺乳類細胞に遺伝学的に導入可能な第 2 高調波発生レポータはこれまで開発されてこなかった。第 2 高調波は中心対称性が破れた領域でのみ信号が発生するという性質があり、効率的に発生させるためには非線形感受率を持つ蛋白質を配向させる必要がある。本研究では、低分子 GTP 結合蛋白質の一種である Kirsten Ras4B (K-Ras4B)の静電相互作用による膜局在メカニズムを蛍光蛋白質(mVenus)に応用し、配向制御と第 2 高調波の検出に成功した。膜電位依存性を示す事は出来なかったが、蛍光蛋白質群は多様な非線形感受率を持つ事が知られている。これらに着目する事で、また表面の静電特性をより精密に制御する事で膜電位依存性が得られる可能性もあると考えている（Jinno et al., 2014）。

3. 今後の展開

1）開発した膜電位プローブを行動中の動物の神経活動記録へと応用していく事、2）プローブの高速・高感度化、そして 3）新規の膜電位計測原理の探索、に積極的に取り組みたい。例えば、研究機関中、原生動物から哺乳類に至るさまざまな動物種から電位センサー蛋白質のコレクションを行ってきた。この中には、本研究で用いたホヤ電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインより、プローブへの応用という観点でより理想的な特性を持つものが存在する可能性がある。今回開発した細胞外電場を用いたプローブ分子の高速評価法は、そのようなスクリーニングに適用出来る。また、電位センサーの状態遷移がどのような機構で起きるのか、分光計測を組み合わせて、より深いレベルでの理解を目指す事も目指していく。

4. 評価

（1）自己評価

（達成状況） さきがけ研究開始時に、6 個の研究テーマを設定した：

A： プローブの大規模スクリーニング系の構築

B： “photostable FRET pair”の開発

C: 多種多様な電位センサードメイン蛋白質コレクションの構築

D: FRET 型膜電位プローブ分子の創出、

E: SHG 型膜電位プローブ分子の創出

F： 遺伝子導入動物における実証実験

この全てに取り組む事が出来、それぞれにおいて一定の進展があった。A については計画していた酵母ではなく、哺乳類細胞に電場を印可するアプローチに変更し、結果を論文に発表した（Tsutsui et al., BBA Biomemb.、2014） 。B に関しては 3 倍程度光安定なレポータ分子を得る事ができた。 C に関しては、20 種類以上の遺伝子クローンニングを完了した。これらは今後の研究の重要なリソースとなる。D、F に関しては、高速・高感度型の膜電位プローブ（Mermaid2）を開発しマウスの大脳皮質に導入し、聴覚応答の記録を行った（Tsutsui et al., J. Physiol., 2013）。E に関しては、SHG レポータを開発するところまで至ったが、明確な電位依存性はまだ確認できていない（Jinno et al., 2014）。しかし哺乳類細胞で機能する蛋白質の SHG

レポータの開発自体、これまでにないものであり、その点にも学術的な価値があると考えられる。この他、心臓の膜電位動態の可視化（Tsutsui et al., J.Physiol., 2010）、電位センサー蛋白質の状態遷移に関する研究（Tsutsui et al., Biophys. J 2013）についても取り組む事が出来た。状態遷移機構の理解は未解決な重要な課題であり、今後も実験手技をより洗練させ、例えばセグメントの回転運動を直接的に検出する事などにも引き続き取り組みたい。

（研究の進め方）さきがけの人件費で雇用した全3名の研究補助員が非常に活躍してくれて、研究の遂行にあたってなくてはならない存在であった。内 2 名は、研究開始にあたってはほぼ未経験の状況であったが、様々な手技を取得し、さきがけ後は、新たな研究環境で活躍している、またはしていく予定となっている。人財育成という点においても少しでも貢献できているとしたら、非常に嬉しく思う。

（波及効果）

膜電位の時空間計測技術は、学術的な有用性のみならず、創薬関連化合物のスクリーニングという点で、社会還元ができる可能性を持つ。細胞膜の電気的興奮性を担う膜蛋白質は多くの疾患とも深く関係して、これらは重要な創薬のターゲットであるにもかかわらず、薬の開発効率は可溶化蛋白質をターゲットとしたものに比べてとても低いという問題がある。可溶化蛋白質であれば水溶液中で化合物との結合や機能阻害・促進を比較的容易に並列計測する事が出来るが、膜蛋白質では必ずしも容易ではない。膜電位センサーの性能向上により、低コスト・高スループットで光学的に創薬関連化合物をスクリーニングする系を提案・構築できる可能性がある。さまざまな研究者と密接な情報交換を行う事で、画期的な薬物副作用の評価や新薬の創出に貢献できる可能性がある。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

神経回路を駆け巡る神経信号は伝達物質と細胞膜電位によって担われている。後者はこれまでに電気生理学的手法により解析されてきたが、複雑な回路を構成する多数の細胞とその空間分布を一挙に観測することには限界があり、光学計測法に期待が集まっている。本研究はこの点に着目したもので、蛋白質性の膜電位プローブの作動原理の根本に立ち返って応答速度と感度および安定性に優れたプローブの創出を目論んだものである。すでに手にしていた mermaid プローブを用いて生きたゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に撮像できることを実証したのち、膜電位プローブの特性を効率よく迅速に評価できる誘起膜電位の空間分布を利用した独自の評価システムを確立した。これを用いることにより、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインと蛍光共鳴エネルギー移動レポータドメインとを組み合わせて電位変化をエネルギー移動効率の変化として光学的に検出できるプローブ候補をスクリーニング評価し、センサードメインの機能様式に関する発見を介して新しい高速高感度プローブに近づけたことは高く評価される。今後プローブ特性のさらなる改良と完成、および in vivo 神経活動記録への適用が十分に期待できる。これまでに着実に成果を論文として報告しているが、特許出願も期待できると思われる。

５．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Tsutsui et al., Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. J. Physiol. (2010). 588, 2017-2021.
2. Tsutsui et al., Optically Detected Structural Change in the N-Terminal Region of the Voltage-Sensor Domain. Biophys. J. (2013). 105:108-115.
3. Tsutsui et l., Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase. J. Physiol., (2013), 591, 4427-4437.
4. Tsutsui et al., Rapid evaluation of a protein-based voltage probe using a field-induced membrane potential change. BBA- Biomembranes, (2014), 1838, 1730-1737.
5. Jinno et al., Engineering a genetically-encoded SHG chromophore by electrostatic targeting to the membrane. Front. Mol. Neurosci. (2014) doi: 10.3389/fnmol.2014.00093.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0　件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

Tsutsui, H.　FRET sensing of transmembrane voltage.　（招待）
New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms
Cold Spring Harbor Laboratory Asia meeting
Sozhou, China, Aug 20-23, 2013

Tsutsui, H. Rapid evaluation of a protein based voltage probe using the filed-induced membrane potential
Optical Measurements of Membrane Potential Symposium
－A Merocyanine 540 Celeblation
Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA, Aug 2-4, 2013

Tsutsui, H.　FRET sensing of transmembrane voltage.　（招待）
Gordon Research Conference on Bioelectrochemistry
Lucca, Italy, July 1-6, 2012

Tsutsui, H.　FRET Probing of Membrane Voltage （招待）
Janellia Farm Voltage Imaging Workshop
Janellia Farm Research Campus, USA, Nov 1-7; 2009