

博士論文

論文題目 発生期神経細胞におけるカルシウム動態解析

氏名 上條 諭志

## 論文の内容の要旨

論文題目 発生期神経細胞におけるカルシウム動態解析

指導教員 尾藤 晴彦 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 22 年 4 月入学  
医学博士課程  
脳神経医学専攻  
氏名 上條 諭志

発生期神経細胞において自発的なカルシウム活動が存在することは知られてきたものの、技術的制約によりその時空間パターンは未知の部分が多かった。本研究では発生期神経細胞に選択的に遺伝子導入する技術と膜結合型カルシウムプローブタンパク質を組み合わせることで自発的なカルシウム活動を高感度で可視化した。樹状突起に比べ、軸索ではカルシウムが大きく上昇する傾向が確認された。自発活動は膜電位の影響を受け、ソースとして L 型カルシウムチャネル Cav1.2, 1.3 の両方が主要な役割を果たすことを示唆する結果を得た。また、多細胞でのカルシウム活動比較に使用可能なプローブを作成し、細胞間でカルシウム平均濃度比較を行った。そして以上の結果を解釈するための新たな画像解析手法の導入により、細胞内局所でのカルシウムの詳細な動態解析を可能にした。

## 目次

論文内容の要旨	…1
目次	…2
略称	…6
序論	…9
1.1.発生期神経細胞におけるカルシウムシグナリング	…9
1.2.イメージング系の開発	…10
1.2.1.カルシウムプローブの改良	…10
1.2.2.遺伝子導入手法の改良	…12
1.2.3.イメージング環境の改良	…13
1.2.4.解析法の改良	…14
1.3.研究の方針および目的	…15
方法	…16
2.1.DNA コンストラクション	…16
2.1.1.膜結合型および比較対照とする細胞質型 GCaMP7 の作製	…16

2.1.2.トランスフェクションマーカの作製	…17
2.1.3.Lck-GCaMP-P2A-mCherry-KRasCT の作製	…17
2.1.4.Kir2.1 関連コンストラクトの作製	…18
2.1.5.L 型カルシウムチャネル関連コンストラクトの作製	…19
2.2.子宮内電気穿孔法による遺伝子導入	…20
2.3.トランスフェクションの確認および細胞の調製	…21
2.4.培地の調製	…22
2.5.ライブイメージング	…22
2.6.画像処理	…24
2.7.キモグラフの退色補正およびレシオ画像への変換	…25
2.8.カルシウム活動の時間相関解析	…27
2.9.カルシウム活動の状態分類	…28
2.10.免疫染色および培養細胞への遺伝子導入	…29
2.11.ウエスタンブロッティング	…30
2.12.薬理実験	…31
2.13.統計解析	…31
結果	…33



3.1.膜結合型プローブによる発生期神経細胞カルシウム活動の検出	…33
3.1.1.膜結合型カルシウムプローブ Lck-GCaMP7 の開発	…33
3.1.2.Lck-GCaMP7 によるイメージング例およびキモグラフの作成	…35
3.1.3.種々の GCaMP による発生期神経細胞イメージング	…36
3.1.4.プレーティング直後のカルシウム活動	…37
3.1.5.キモグラフ中の代表的なカルシウム上昇パターン	…38
3.2.キモグラフを用いた自発的カルシウム活動の解析	…40
3.2.1.軸索では樹状突起よりもカルシウム上昇が大きい	…40
3.2.2.自発的カルシウム活動の時間相関解析	…43
3.3.カルシウム上昇のソースの検討	…47
3.3.1.自発的カルシウム活動は細胞外のカルシウムに依存している	…47
3.3.2.膜電位上昇により自発的カルシウム活動を再現できる	…50
3.3.3.発生期神経細胞の自発的カルシウム活動は細胞膜電位に依存する	…52
3.3.4.L 型カルシウムチャネルは自発的カルシウム上昇の重要な源である	…55
3.3.5.内在性カルシウムチャネルの発現の確認	…60
3.3.6.ニモジピン非感受性カルシウムチャネルによる実験	…61
3.4.細胞内平均カルシウム濃度制御機構	…66
3.4.1.細胞内平均カルシウム濃度は連続的に分布している	…66

3.4.2.細胞体の平均カルシウム濃度は L 型カルシウムチャネルにより制御される	…69
考察	…71
4.1.本研究の意義	…71
4.2.L 型カルシウムチャネルを介したカルシウム流入の意義	…73
4.3.樹状突起、軸索で異なるカルシウム制御を受ける意義	…77
4.4.細胞間、細胞内でのカルシウム濃度の比較	…78
4.5.考慮すべき実験系の制約	…79
4.6.今後の展望	…81
表 1 薬剤定量データ	…84
引用文献	…85
図説	…91
謝辞	…142

## 略称

2-APB	2-Aminoethyl diphenylborinate
AM	acetoxymethyl ester
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	analysis of variance
BAPTA	1, 2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent protein kinase
CaMKI $\alpha$	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent protein kinase I alpha
CaMKI $\gamma$	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent protein kinase I gamma
CaMKK $\alpha$	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent protein kinase kinase alpha
Cav1.2	voltage dependent L-type calcium channel alpha C subunit
Cav1.3	voltage dependent L-type calcium channel alpha D subunit
Cav2.2	voltage dependent N-type calcium channel alpha 1B subunit
$\alpha$ 2 $\delta$ 1	voltage dependent L-type calcium channel alpha-2 delta-1 subunit
Cav $\beta$ 3	voltage dependent L-type calcium channel beta-3 subunit
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione
D-AP5	D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid

DIV	day in vitro
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EM-CCD	electron multiplying CCD
FBS	fetal bovine serum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GECI	genetically encoded calcium indicator
GFP	green fluorescent protein
HRP	horse radish peroxidase
IP <sub>3</sub>	Inositol trisphosphate
IUE	in utero electroporation
KCC2	potassium-chloride transporter member 5
K <sub>d</sub>	dissociation constant
Kir2.1	inward rectifier channel Kir2.1
KRasCT	K-Ras C terminus
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MLCK	myosin light chain kinase
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
ORF	open reading frame

P2A	porcine teschovirus-1 2A sequence
PKC	protein kinase C
PVDF	polyvinylidene fluoride
ROI	region of interest
S/N	signal to noise ratio
T2A	Thoseaasigna virus 2A sequence
TRP	transient receptor potential channel
TTX	Tetrodotoxin
WT	wild type

## 1.序論

### 1.1.発生期神経細胞におけるカルシウムシグナリング

発生期神経細胞では外界の刺激に応じて多種の細胞内シグナリングが駆動され、神経突起細胞骨格の再構築を経て機能的な回路形成をすることが知られている (Spitzer et al., 2006)。シナプスが形成される前の神経突起構築の編成は、以降のより精緻な回路形成の基礎となる重要なステップであるが、それを担う分子機構については未解明の部分が多い (図 1)。外界の刺激にはさまざまな種類があり、それを伝える経路も多岐にわたるが、その中でも特に普遍性のあるシグナリング経路の一つにカルシウムシグナルがある。発生期の神経細胞内部においてカルシウム濃度の自発的な変化が存在することは知られていたものの (Tang et al., 2003)、その時空間的パターンや生理的意義については研究がそれほど進んでいなかった。発生期神経細胞の突起内部での自発的なカルシウム上昇動態について極めて情報が不足している理由として、1. 発生期神経細胞のイメージングは主に fura-2 などの小分子型のカルシウムプローブで行われていたため、細い突起の内部で良好な S/N 比で画像取得できなかったこと、2. 雑多なマウス大脳皮質神経細胞の一部集団に選択的に遺伝子導入する方法がなかったこと、3. 神経突起の伸長が起きる環境下でそのまま長時間観察可能なイメージング系がなかったこと、4. カルシウム上昇の時空間的広がり解析する

手法がなかったことなどが挙げられる。先行研究によると神経突起でのカルシウム上昇と軸索伸長には関係があることが示されており (Gomez et al., 1999)、近年もショウジョウバエを用いた系で突起に限局したカルシウム上昇が神経突起の退縮を誘導することが示されている (Kanamori et al., 2013)。当研究室でもカルシウム上昇の下流でカルモジュリン (CaM) と共に活性化すると考えられている CaMK が CaMKI $\alpha$ , CaMKI $\gamma$  のサブタイプ毎にそれぞれ軸索、樹状突起の伸長に関わることを示しており (Ageta-Ishihara et al., 2009)、神経突起内部でのカルシウム制御機構との関係は非常に興味深い。以上の知見より、発生期神経細胞の神経突起内部での局所カルシウム上昇パターンを計測し、その意義を解明することは非常に重要な課題と考えられる。以降の項で今回克服した技術的困難について述べる。

## 1.2. イメージング系の開発

### 1.2.1. カルシウムプローブの改良

前項の 1.1. で述べたように、従来の発生期神経細胞イメージングは fura-2 や fluo-4 などの小分子型カルシウムプローブを用いて実験が行われてきた。小分子型プローブでは、特定の細胞の標識が難しいことに加え、観察前のローディングに伴うイメージング液の交換など細胞に与えるストレスも大きい。現在、小

分子型の他に遺伝子コード型のタンパク質型カルシウムプローブ (GECI) があり、その代表的なものとして、cameleon, GCaMP がある (Miyawaki et al., 1997; Nakai et al., 2001)。いずれも CaM と MLCK 由来の M13 配列がカルシウムの結合に応じて親和性を増し、構造変化することを利用したデザインで、現在の GECI はこれらの二系統に属するものがほとんどである。今回の研究で用いた GCaMP7 は GFP をベースにした GECI で、カルシウムの結合に伴う構造変化により緑色蛍光の輝度が大きく増大することが知られている。近年、さまざまな親和性、ダイナミックレンジを持ったプローブが発表されてきた (Horikawa et al., 2010; Ohkura et al., 2012; Chen et al., 2013)。発生期神経細胞においても GECI の一種である GCaMP を用いた研究が報告されるようになったものの (Hutchins et al., 2011)、細胞質局在型カルシウムプローブに特有の難点があり、神経突起のような非常に細い領域では十分な輝度で画像を取得することができていない。また、神経突起は体積が非常に小さく、細胞体由来の蛍光が突起の蛍光を凌駕してしまう。これらの問題を解決するため、グリア細胞に関する先行研究で使用実績のある Lck-GCaMP3 という膜結合型カルシウムプローブのデザインを参考にした (Shigetomi et al., 2011)。この論文では膜結合型チロシンキナーゼ Lck の N 末端ペプチドを付加することで GCaMP プローブの性能を保ったまま膜局在化することができることが示されている。膜結合型に改変することで局所のプローブ



量は膜存在量に比例するため、突起の太さに関わらず、軸索や樹状突起などの細い神経突起からも S/N 比の良い安定したシグナルが得られるであろうという仮説の下、実験を行った (図 3C, 3D)。

### 1.2.2. 遺伝子導入手法の改良

GECI を用いて、発生期神経細胞のカルシウム変動を見る際の障害として、1. 初代神経細胞への遺伝子導入が困難であること、2. 観察するまでの期間に蛍光タンパク質の十分な発現を得るのが困難であること、3. 蛍光観察に用いる緩衝液中では神経突起の伸展が抑制されることなどが知られている。初代神経細胞への遺伝子導入手法としては、神経細胞を分散した後に電気穿孔法を用いて行うことが一般的であるが、マウスの神経細胞は電気穿孔法に対する刺激に弱く、蛍光タンパク質の発現量、細胞の健全性などの面から実験結果が安定しないことが予備実験によりわかっていた。また、遺伝子導入される神経細胞の種類は原理上全く制御できない。加えて通常の電気穿孔法では、十分に蛍光観察可能なタンパク質発現量を得るのに少なくとも導入後 48 時間程度かかり、観察可能な期間が制限されてしまっていた。子宮内電気穿孔法 (in utero electroporation: IUE) とは、妊娠マウスの子宮内胎児脳室に発現させたい DNA 溶液を注入して電気パルスを加えると、その時期に脳室の辺縁にあった神経細胞に選

択的に遺伝子導入することができるという手法である (Saito et al., 2001; Tabata et al., 2001) (図 2A)。マーカーとして赤色蛍光タンパク質を共発現させることにより、遺伝子導入に成功した細胞集団を緑色励起光の下で確認することができた。子宮内電気穿孔法で予め遺伝子導入をしておくことで、分散培養を行う遺伝子導入 2.5 日後の段階では、導入されたほとんど全ての細胞で蛍光観察を行うのに十分な蛍光輝度が得られた (図 7)。妊娠 15 日目での子宮内電気穿孔法では、将来の脳皮質 2/3 層になる興奮性神経細胞集団に遺伝子導入されることが先行研究から明らかになっている。加えて子宮内電気穿孔法では、子宮内胎児の位置に応じて導入する DNA を変えることで、同腹のコントロールを設けることができる。このようにして調製した神経細胞は通常の電気穿孔法に比べ、細胞が健全で実験回ごとの差が少ないことが観察された。

### 1.2.3.イメージング系の改良

今回の論文のイメージング実験は、全て神経細胞を培養している培地中で行った。一般に神経細胞のイメージングは Tyrode's solution などのイメージング用の特別な細胞外液の下で行われることが多く、その理由として無色透明であり、タンパク質を含まないため薬理実験を行いやすいことが挙げられる。しかし、この種の細胞外液中においては、神経細胞は 2 時間以内に観察に適さない状態

になる上、神経突起伸展、退縮などがほとんど起きないため、発生期の神経細胞突起内部でのカルシウム動態を観察するという目的に Tyrode's solution 等の緩衝液を用いるのは不適であると判断した。培地は *in vivo* の環境を再現するわけではないが、突起伸展を阻害せず、CO<sub>2</sub> を供給し続けさえすれば、細胞は生存し続けることから、神経細胞の発達プロセスを追うにはより適した環境であると考えた (図 2B)。今回撮像に用いた波長域 (励起 460-580 nm, 蛍光 > 510 nm) においては培地に含まれる血清、添加因子の蛍光は低く、障害とはならなかった。

#### 1.2.4.解析法の改良

先行研究における発生期神経細胞でのカルシウム動態解析は、成長円錐や細胞体でカルシウム変動が「存在した」、あるいは成長因子に反応してカルシウムが「上昇した」等の内容が中心で (Tang et al., 2003)、自発的カルシウム上昇の時空間的パターンに注目した研究は少なかった。今回の研究では、突起に沿った ROI を設け、後述のキモグラフを作成することで、カルシウム上昇の時空間的パターンを保ったまま解析を行うことのできる手法を樹立した。またキモグラフを用いることで突起内部でのカルシウム上昇の様子を視覚的にもよりわかりやすい形で表示することが可能となった。

### 1.3.研究の方針および目的

今回作製した膜結合型のカルシウムプローブを用いることで、発生期大脳皮質神経細胞の突起内部において、今までにない高感度でカルシウム変動を検出することが可能となった。この今までに検出されていなかった自発的カルシウム上昇の時間的、空間的な特性についての記述をまず行うことが重要であると考えた。次のステップとして、この時期の自発的カルシウム上昇に樹状突起、軸索間でどのような制御様式の違いがあるかは、樹状突起と軸索の機能分化にも関わる非常に根源的な問題であるため、両者の比較を行った。この問題は当研究室の先行研究の内容である「樹状突起と軸索のそれぞれで異なるカルシウム親和性を持つ CaMK が機能し、突起形成を制御する」という事実とも関連する。その次のステップとして、自発的なカルシウム上昇のカルシウムソースおよび関連分子の特定を目指し、薬理実験や外来遺伝子導入実験を行った。また、今回の膜結合型カルシウムプローブを作製する過程で、細胞間のカルシウム濃度の比較に使用可能なコンストラクトが得られたため、発生期神経細胞でのカルシウム濃度の細胞間差異という今までにあまり検証されていないテーマについても解明を目指した。最後は現在進行中であるが、同定した分子によるカルシウム流入が持つ生理的意義、および疾患との関連を解明するという目標を持って研究に臨んだ。

## 2.方法

### 2.1.DNA コンストラクション

#### 2.1.1 膜結合型および比較対照とする細胞質型 GCaMP7 の作製

GCaMP7 は埼玉大学脳科学融合研究センターの中井淳一先生より分与していただいたものを用いた。先行研究 (Shigetomi et al., 2011) を参考に膜局在シグナルとして膜結合型チロシンキナーゼ Lck タンパク質の N 末端 27 残基に相当する DNA 配列を合成し、発現量を増やすための Kozak 配列を付加し、pCAGpro-C1 プラスミドの CAG プロモーター下流に In-Fusion HD cloning kit (Takara) を用いてサブクローニングすることで pCAGpro-Lck を作製した (図 3A, 3B)。発生期神経細胞内では CMV プロモーターはメチル化を受け、発現が著しく落ちることが知られているので、全てのコンストラクトは胎児脳で発現低下のない CAG プロモーターの下流に配置した。pCAGpro-Lck の Lck N 末端配列の下流に PCR で増幅した GCaMP7 断片を In-Fusion HD cloning kit を用いて連結して pCAG-Lck-GCaMP7 を作製後、シーケンスを確認した。膜結合型と細胞質型の性能比較の目的で、pCAG-GCaMP7 を通常サブクローニング法により作製した。Lck-GCaMP7 の GCaMP7 に相当する部分を、当研究室の先行研究 (井上 et al., 2012) で用いた GCaMP-H および GCaMP 型カルシウムプローブとして評価の確立している GCaMP6m, GCaMP6s (Chen et al., 2013; Looger Lab, Addgene) を

Lck-GCaMP7 と同様の方法で挿入し、pCAG-Lck-GCaMP-H, pCAG-Lck-GCaMP6m, pCAG-Lck-GCaMP6s を作製した。

### 2.1.2. トランスフェクションマーカーの作製

神経突起を可視化するためのマーカーとして、膜結合型赤色蛍光タンパク質を作製した。京都大学大学院・生命科学研究科・生体制御学および医学研究科・病態生物医学講座の松田道行先生に分与いただいた、Rac1 GTPase の FRET 型プローブ Raichu-1011x (Itoh et al., 2002) から、膜局在シグナルとして広く知られている K-Ras タンパク質の C 末端 (CAAX モチーフ) に相当する DNA 配列を XbaI および SalI で切り出し、赤色蛍光タンパク質 mKate2 (pmKate2-C, Evrogen) および mCherry (pmCherry-C1, Roger Tsien lab) の下流に繋げ、それぞれ pCAG-mKate2-KRasCT, pCAG-mCherry-KRasCT とした。mKate2, mCherry について GCaMP の場合と同様に In-Fusion HD cloning kit を用いて、pCAG-Lck-mKate2, pCAG-Lck-mCherry を作製した。以上の 4 種類は全て膜局在したが、その中で明るく、凝集体を形成しない pCAG-mCherry-KRasCT をその後の実験で用いた。

### 2.1.3. Lck-GCaMP-P2A-mCherry-KRasCT の作製

Lck-GCaMP7, mCherry-KRasCT の化学量論比が 1:1 となるようなコンストラクトを作製した。先行研究 (Kim et al., 2011) を参考に、自己開裂ペプチドとしては切断効率の最も優れている P2A を選択した。Lck-GCaMP7, P2A self-cleaving sequence, mCherry-KRasCT を N 末端からこの順で並べ、In-Fusion HD cloning kit を用いて pCAG-Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT を作成した (図 19A)。また、同様の手法で pCAG-Lck-GCaMP-H-P2A-mCherry-KRasCT を得た。

#### 2.1.4.Kir2.1 関連コンストラクトの作製

マウス由来内向き整流性カリウムチャネル Kir2.1 をサブクローニングし、その C 末端に In-Fusion HD cloning kit を用いて P2A-mCherry-KRasCT を付加することで野生型の pCAG-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCT を作製した。比較対照として先行研究 (Ma et al., 2007) で報告のある Kir2.1 のドミナントネガティブ変異体 Kir2.1-V302M をメガプライマー法により作製し、pCAG-Kir2.1-V302M-P2A-mCherry-KRasCT を得た。同時にカルシウムを測定する目的で、Lck-GCaMP7 を N 末端に付加したコンストラクトも作製した。上述の pCAG-Kir2.1-WT (or V302M) -P2A-mCherry-KRasCT コンストラクトの上流に、Lck-GCaMP7-T2A の配列を In-Fusion HD cloning kit を用いて挿入した。相同配列による組換えを防止するため、Lck-GCaMP7 の下流配列には P2A ではなく T2A 配列を用いた。結果と

して、 pCAG-Lck-GCaMP7-T2A-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCT およびその V302M 変異体を得た。

#### 2.1.5.L 型カルシウムチャネル関連コンストラクトの作製

L 型カルシウムチャネルの実験については、ニモジピン非感受性変異体である、 sHA-Cav1.2-T1039Y, HA-Cav1.3-T1033Y を UT Southwestern の Ilya Bezprozvanny 教授から分与していただいた (Zhang et al., 2006)。両者ともラット由来であり、 Cav1.2 については細胞外領域に HA タグが、 Cav1.3 については N 末端に HA タグが挿入されている (図 16B)。また、Cav1.3 の N 末端は先行研究と同様に、Cav2.2 由来の配列とのキメラになっており、Cav1.3 の 53 個のエクソンのうち、4 番目のエクソンの途中で接続されている。また、Cav1.3 の 53 個のエクソンのうち、13-15, 35, 36 番目のエクソンが無いスプライシングバリエントを使用している。これらの配列の 5', 3' 末端を制限酵素で切断し、pCAG-MCS2 に移し替え、pCAG-sHA-Cav1.2-T1039Y, pCAG-HA-Cav1.3-T1033Y を作製し、全長の配列が正しいことをシーケンス反応で確認した。これらのプラスミドは単独で発現させると小胞体などの細胞小器官に集積する傾向があるため、膜発現を改善するとして先行研究 (Xu et al., 2001; Zhang et al., 2006) で用いられている、 $\alpha 2\delta 1$  および Cav $\beta 3$  サブユニットを共発現するためのコンストラクトを下記の要領で作製



した。ウサギ由来  $\alpha 2\delta 1$ , Cav $\beta 3$  プラスミド (Diane Lipscombe Lab, Addgene) から ORF 配列を PCR でサブクローニングし、共発現の効率を上げるために  $\alpha 2\delta 1$ , Cav $\beta 3$  をこの順に P2A 自己開裂配列で結合した。また C 末端には遺伝子導入した細胞がわかるように、T2A 配列を介して赤色蛍光タンパク mCherry-KRasCT を配置した。フラグメントの結合は全て In-Fusion HD cloning kit を用いて行い、pCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT を得た。

## 2.2. 子宮内電気穿孔法による遺伝子導入

イソフルランで軽く麻酔した妊娠 15 日目の ICR マウスにソムノペンチル (共立製薬) を 100 mg/kg 腹腔内注射し、痛覚刺激に対する反応が消失してから手術を開始した。正中を開腹し、2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  に調製したプラスミド溶液を 1-2  $\mu\text{L}$ , Puller (P-97, Sutter Instruments) で自作したガラスピペットにより子宮内胎児の脳室に注入した。脳室への注入の成否は事前に DNA 溶液に溶解しておいた色素により、脳室の形状が浮かび上がることをもって確認した。電気穿孔装置 (ECM 830, BTX) を用いて、3 mm 円形電極, amplitude 45 V, duration 50 ms, interval 1 s の矩形電気パルス を 5 回 $\times$ 2 の合計 10 回加えるというプロトコールで脳室辺縁の神経細胞に遺伝子導入を行った (図 2A 左)。妊娠 18 日目まで胎児を成長させた

後、解剖を行った。全ての動物実験は東京大学の動物実験実施規則に則り、東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。

### 2.3. トランスフェクションの確認および細胞の調製

子宮内電気穿孔法の手術を終え、妊娠 18 日目まで育てた ICR マウスから子宮を摘出した。子宮内のどの胎児に何のコンストラクトを導入したかの手術記録に従って胎児を選別し、断頭後 HANKS (-) (pH 7.4 280 mOsm/kg) 中で胎児脳を氷冷した。解剖中にペン型緑色励起光源と眼鏡型赤色蛍光フィルターを用いて、脳に所望のコンストラクトが導入されているかを、蛍光により確認し、導入が確認された大脳半球を集めて解剖した。嗅球、視床等を取り除き、大脳皮質を回収した後、脳軟膜を剥いで室温、10 分間トリプシン処理を行った。処理後、通常のパスツールピペット、および火炎により口径を小さくしたパスツールピペットで機械的に細胞を分散させた。分散後の細胞を HANKS (-) 中で 3 回懸濁、遠心を繰り返した後、Poly D-lysine コート済みの Glass bottom dish ( $\phi$ 12 mm, No.0, Mattek) に  $2.0 \times 10^5$  cells/dish となるようにプレーティングし、10 分間接着させた後、37°C に保温していた培地を加えて 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した (Bito et al., 1996)。ほとんどの実験では 2 日間培養後、適時に取り出してイメージングを行った。

## 2.4.培地の調製

先行論文に従って培地を調製した (Ageta-Ishihara et al., 2009)。MEM, no Glutamine, no Phenol Red (51200-038, Gibco) 500 mL に対し、FBS (Lot No.FQF9, Hyclone) 50 mL, D-(+)-Glucose 2.5 g, NaHCO<sub>3</sub> 100 mg (nacalai tesque), Transferrin 50 mg (Millipore), Insulin 12.5 mg (Sigma), GlutaMAX<sup>TM</sup> 5 mL (35050-061, Gibco) を加えた。またサプリメントとして先行論文 (Chen et al., 2008) に記載のある、NS21 を 10 mL 添加した。NS21 はサプリメント B-27 の代替品で、事前の条件検討において B-27 含有培地内で培養したマウス初代大脳皮質神経細胞と NS21 含有培地内で培養したマウス初代大脳皮質神経細胞の形態、細胞の健全性に明らかな違いは認められないことを確認した。

## 2.5.ライブイメージング

撮像に用いた光学系を図 2B に示した。神経細胞のライブイメージングには倒立顕微鏡 IX71 (Olympus) を使い、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C に保温したステージインキュベーター (INUB-ZILCS-F1, Tokai Hit) 内で Glass bottom dish のまま行った。良好な S/N 比を得るため、そしてプローブの過剰発現によるアーティファクトを避けるため、プローブの発現量が中等度の細胞を中心に撮像した。また、形態については数本の樹状突起と 1-2 本の軸索を持つ標準的な形態の細胞を中心

に選り、解析時の妨げになるような突起が混み入った神経細胞については画像取得を行わなかった。イメージングの外液は培養中の培地をそのまま用い、薬理実験を行う際には、撮像を継続したまま薬剤添加できるように改造したディッシュの蓋からシリンジを用いて加えた。励起光源にはキセノンランプ光源 (Lambda-DG-4, Sutter Instrument) を用いた。励起フィルターには GCaMP 励起用、mCherry 励起用にそれぞれ FF01-474/23, FF01-575/15 (Semrock) を用い、必要に応じて ND フィルターを光路に挿入して減光した。蛍光の取得を行うためのダイクロイックミラーは緑、赤二色イメージング用の 51019bs (Chroma) を使用し、蛍光フィルターは GCaMP 蛍光用、mCherry 蛍光用にそれぞれ FF02-520/28 (Semrock), ET630/75m (Chroma) を用いた。蛍光フィルターの切り替えは MAC-5000 (Ludl) を用い、制御ソフト AQUACOSMOS (Hamamatsu Photonics) からの制御信号により励起フィルターの切り替えと同期して行った。励起、蛍光フィルター、およびダイクロイックミラーのセットは全ての実験で共通のものを用いた。対物レンズは 60 倍または 100 倍の油浸対物レンズ (Olympus) を用いた。画像取得には C9100-12 EM-CCD カメラ (Hamamatsu Photonics) を用い、ビニングは  $2 \times 2$ 、時間移動平均なし、画像取得領域は  $256 \times 256$  ピクセル、露光時間は 100 ms, あるいは 150 ms で撮像を行った。EM gain は同日の実験、比較が必要な実験の内部で統一した。特に注釈の無い限り撮像間隔は全て 1 s で行った。

撮像中に死んだ細胞およびフォーカスがずれた細胞は以降の解析から除いた。

顕微鏡の全ての操作は制御ソフト AQUACOSMOS により行った。

## 2.6.画像処理

取得した画像のタイムラプスデータを AQUACOSMOS 上で TIFF ファイルに変換した。Image J の拡張版である画像処理ソフト Fiji を用い、必要な場合には StackReg プラグインを用いて xy-alignment を行ったが、ほとんどの場合 (> 90%) には不要であった。その後、画像解析ソフト Metamorph (Molecular Devices) で無細胞領域の輝度を基準に背景減算をした上で、「キモグラフ」の作成を行った。キモグラフの作成手順を図 4, 5 に示した。キモグラフとは線状の ROI の各地点の輝度の経時的变化を二次元マップに表した画像で、この例では、縦軸方向の 1 ピクセルが 1 秒に対応し、横軸方向の 1 ピクセルが 267 nm に相当する (図 4B)。ROI の設定では以下の点に留意した。1. ROI を可能な限り突起に沿って取ること、2. 撮像時間全体で突起が ROI からはみ出さないこと、3. 突起が激しく変形している部分は ROI に含めないことの三点である。ROI 設定作業を補助するために、タイムラプス画像の蛍光輝度の最大値プロジェクション画像を作成し、その画像上で ROI を手動設定した。Lck-GCaMP7 プローブはカルシウム非結合時でも突起の位置を判別するのに十分な蛍光輝度を有する。キモグラフ

上の各空間座標での輝度値は、その空間座標を持つ点を通り、ROI に直交する幅 6 ピクセル分の線分上の輝度平均値をもって代表させた。形態的に樹状突起、軸索に分けられるものについては、樹状突起、軸索を区別して解析を行った。先行研究からこの時期の培養大脳皮質神経細胞は短い数本の樹状突起と、長い 1-2 本の軸索を持つことがわかっている (Ageta-Ishihara et. al., 2009)。細胞体に起始部を持ち、終端が細くなる傾向があるものを樹状突起、相対的に細く突起長が長いもの、細胞体近位での枝分かれが少なく、広がった終端構造を持つもの軸索とした。判定不能なものは神経突起として区別せずに扱った。これ以降の解析は全てキモグラフを基礎として行った。

## 2.7.キモグラフの退色補正およびレシオ画像への変換

**Metamorph** で作成したキモグラフの退色補正を、**Matlab** を用いて以下のように行った (図 5B)。図に示すように、同じ細胞の各神経突起から作成したキモグラフを複数結合し、空間方向にその輝度を平均して、1 × 撮像フレーム数の一次元データ列とした。この蛍光輝度が通常の蛍光タンパク質と同様に経過時間に対して指数関数的な減衰を示すと仮定し、減衰パラメータをフィッティングにより算出して蛍光減衰が無かった場合の輝度  $F(x,t)$  に補正した。退色補正の因子 (実測の蛍光輝度を  $F(x,t)$  に変換するために掛ける因子、指数減衰の逆数) は

1,500 秒 (今回のほとんどの解析における最長期間) 撮像した場合でも 1.2-1.3 程度であることがほとんどで、この操作によって持ち込まれるアーティファクトは少ないと考えられた。次に  $\Delta F/F_0$  を算出する際の基礎となる基底蛍光輝度  $F_0(x)$  の見積もりを行った。各空間地点  $x$  での  $F_0(x)$  の見積もりは非常に困難であるが、経験的にある地点におけるカルシウム上昇時間が撮像時間全体の 80% を超えないことが分かっていたため、各地点での時系列データでの蛍光輝度値の下位 20% の平均を便宜的にその地点での基底蛍光輝度  $F_0(x)$  とした。ここまでの操作で得られた各地点での補正蛍光輝度  $F(x,t)$  から基底蛍光輝度  $F_0(x)$  を減算し、 $F_0(x)$  で除算すると蛍光変化比  $\Delta F/F_0$  が各地点について求まり、キモグラフ間でのカルシウム流入の大小が比較可能となった (図 5B 右)。今回の解析ではカルシウムの基底状態からの増分に着目するために、負の  $\Delta F/F_0$  の値は全て 0 に変換した。キモグラフ内のある空間地点で GCaMP7 のダイナミックレンジを超えた異常な変化値 ( $\Delta F/F_0 > 36$ ) を示した場合は、 $F_0$  の見積もりに失敗して蛍光変化を過大評価しているとしてその空間地点のデータを解析から除外したが、このような地点は突起の端部に極僅かに見られるのみで全地点の 1% にも満たなかった。また、細胞の破片は蛍光輝度が大きく、そのような点が ROI に混入した場合には、キモグラフ上でカルシウム変動の少ない暗線となる。このような蛍光変化を過小評価した地点のデータは全体の地点の 2% 以下であり、客観的な除外基準が設け

づらいこと、解析の大勢に影響を与えないと考えられることから除外処理を行わなかった。解析上の問題として小さな領域からのシグナルを時間平均無しで取得するためノイズが乗りやすい。この問題を解決するため、カルシウムが上昇したとみなす基準に制限を設けた。カルシウム上昇、つまり  $\Delta F/F_0 > 0$  のピクセルにおいても、同一時点で空間方向に 2 ピクセル以下の広がりしか持たないものはノイズと区別できないという理由で解析用の画像からは削除した。撮像間隔が 1 秒の場合、全てのカルシウム上昇は最初のフレームで空間方向に 3 ピクセル ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) 以上の広がりを持つため (図 7B)、この操作は問題無いと考えられた。以上の手順で解析の基礎となる  $\Delta F/F_0$  表示のカルシウム上昇マップを得た。

## 2.8.カルシウム活動の時間相関解析

概略を図 9 に示した。ある地点において  $\Delta F/F_0$  の閾値を定めて、それを上回った場合をカルシウム上昇イベントと定義した (図 9A)。カルシウム上昇イベントがあった時点に基づき、その時点から 1-5 秒後、6-10 秒後のように 5 秒刻みのウィンドウを 75 秒後まで合計 15 区間設けた (図 9B)。各地点でカルシウム上昇イベントは複数回検出されるが、その全てについてイベント 1-5 秒後、6-10 秒後、…、71-75 秒後の区間のカルシウム上昇振幅 ( $\Delta F/F_0$ ) の和を計算した。比較対照として「カルシウム上昇イベントの発生時点と無関係にウィンドウを設け



た場合」を設定した。予想されるウインドウ内でのカルシウム上昇振幅の和を求める目的で、ブートストラッピングを行った (図 9C)。サンプル抽出はその空間地点で検出されたカルシウム上昇イベントの回数に合わせ、その地点におけるキモグラフ (縦方向のデータに対応) から非復元抽出を行い、擬似データを生成した。この過程を各地点につき 2,000 回繰り返す、期待されるカルシウム上昇振幅の総和を見積もった (図 9D 左)。この擬似データから得られたウインドウ内のカルシウム上昇振幅の総和の期待値で実測のウインドウ内のカルシウム上昇振幅の総和を除算することで、カルシウム上昇イベントがランダムの場合と比較してどの程度濃縮されているかを示すことができ、その濃縮比を **enriched ratio** として定義した (図 9D 右)。一連の操作を突起内部の各地点についてそれぞれ行った後 (図 9E)、カルシウム上昇を検出する閾値を 20%, 40%, 80%, 160%, 320% に変更した場合につき解析を行った。

## 2.9.カルシウム活動の状態分類

キモグラフ上で  $\Delta F/F_0$  が 40% を閾値として、閾値以上のピクセルをカルシウム上昇ピクセルと定義した。各空間地点につき前後 30 秒間の合計 60 秒間でカルシウム上昇ピクセルが 10 秒間以上あったピクセルについては、そのピクセルが

active state にあると定義し、10 秒間以下だったピクセルについては quiescent state にあると定義した。

## 2.10.免疫染色および培養細胞への遺伝子導入

HeLa 細胞を 24-well plastic dish (IWAKI) に  $5.0 \times 10^4$  /well の濃度で撒き、24 時間後に DNA 0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  と X-tremeGENE 9 (Roche) 1.5  $\mu\text{L}/\text{well}$  のコンプレックスを用いて、リポフェクションによる遺伝子導入を行った。40-48 時間後に 4% PFA/PB で室温 20 分間固定し、0.1 M Glycine/PBS 内で PFA を室温 15 分間クエンチした後、サポニンを含む膜穿孔性の Blocking buffer (5% Normal Goat Serum/1% BSA/0.2% Saponin/PBS) で室温 1 時間ブロックした。その後、指定の濃度の一次抗体を含んだ Blocking buffer と 4°C で一日反応させ、0.1 M Glycine/PBS で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した後、指定の濃度の Alexa-conjugated 二次抗体および DAPI を含んだ Blocking buffer で室温 1 時間の二次抗体反応を行った。0.1M Glycine/PBS で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した後、Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc.) を用いて封入した。

神経細胞は子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入したものを 24-well plate 内で 12 mm 径の Poly-D-lysine コートカバーグラス上で培養し、免疫染色した。より成熟した神経細胞に対する遺伝子導入が必要な一部の実験では、初代マウス大脳皮質神経細胞を  $2.0 \times 10^5$  cells/plate の細胞密度で撒き、培養後 DIV 7-9 で

Lipofectamine 2000 (Life Technologies) によって遺伝子導入した。固定から染色の操作については HeLa 細胞の場合と同様に行い、画像取得には Zeiss 社の LSM 510 共焦点顕微鏡を使用した。

## 2.11. ウェスタンブロッティング

遺伝子導入の前日に 6-well plastic plate (IWAKI) に  $6.25 \times 10^5$  cells/dish の細胞密度で HEK293T 細胞を撒き、1.0  $\mu\text{g}$  の DNA と X-tremeGENE 9 (Roche) 3  $\mu\text{L}$  の複合体を用いて遺伝子導入を行った。48 時間後、300  $\mu\text{L}$  の RIPA バッファーで細胞を回収、ソニケーションで細胞を破碎し、細胞の破片を遠心により除き上清 200  $\mu\text{L}$  を回収した。上清のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (Thermo) で測定後、10% メルカプトエタノールを含む、Laemmli Buffer で 10 分間ボイルし、10  $\mu\text{g}/\text{lane}$  となるように 8-10% アクリルアミド-SDS ゲルにロードして電気泳動を行った (Constant voltage: 80 V/stacking gel, 120 V/separating gel)。泳動後、PVDF 膜 (ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$ ) に 30 V の電圧で 4°C 一昼夜転写を行った。タンパク質を転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク TBS 中で室温 2 時間ブロッキングした後、指定の濃度の一次抗体を含む 2.5% スキムミルク TBS 内で 4°C 一昼夜振盪した。TBS-T で 5 分  $\times$  3 回洗浄した後、指定の濃度の HRP 標識二次抗体を含む TBS-T 中で室温 90 分振盪した。TBS-T 内で 5 分  $\times$  3 回洗浄した後、ECL

select (GE healthcare) を用いて化学発光させ、LAS 4000 (Fujifilm) で画像を取得した。

## 2.12.薬理実験

薬理実験に用いた薬剤およびメーカーは以下の通りである。Verapamil hydrochloride, diltiazem hydrochloride, thapsigargin, dantrolene sodium salt (Sigma), 2-APB, nimodipine, D-AP5, CNQX, FPL 64176 (Tocris), TTX (大日本製薬), EGTA (nacalaitesque), EGTA-AM, BAPTA-AM (同仁堂社), ryanodine (Abcam),  $\omega$ -conotoxin MVIIC (ペプチド研究所)。ペプチドを除く全ての薬剤は使用前にソニケーションで溶解を確認し、観察用のディッシュから取った培地に終濃度の 5 倍程度の濃度で溶解させた後、ディッシュ蓋に取り付けた 25 G 翼状針 (テルモ) から 1 mL シリンジにより注入した。

## 2.13.統計解析

データ解析には Matlab 2012b (Mathworks), Excel 2010 (Microsoft)および Prism 4 (Graphpad)を用いた。グラフ作成は Excel 2010 または Prism 4 上で行った。データ間に対応がある群では、正規分布が仮定される群間の比較には **paired-t test** を、正規分布が仮定されない群間の比較には **Wilcoxon signed rank test** を用いた。また、

対応のない群間同士ではそれぞれ unpaired-t test および Mann-Whitney U test を用いた。2 つのパラメータにより二次元的に配置された群間の比較では、2-way ANOVA とそれに続く post hoc の Bonferroni 補正 t 検定を行った。ある群の平均値が仮想値  $\mu$  と異なるかの検定は one sample t test を用いて行った。一部の統計で Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn's multiple comparison test を用いた。

### 3.結果

#### 3.1.膜結合型プローブによる発生期神経細胞カルシウム活動の検出

##### 3.1.1.膜結合型カルシウムプローブ Lck-GCaMP7 の開発

発生期神経細胞の突起内部でのカルシウム変動をイメージングするため、先行論文 (Ohkura et al., 2012) で発表されているタンパク質型カルシウムプローブ GCaMP7 を用いた。GCaMP7 の一次構造は N 末端から M13 配列, EGFP-C 末、EGFP-N 末、CaM の順で構成されており、測定者により幅があるものの、上記の論文によるとカルシウムとの結合解離定数は 250 nM、ダイナミックレンジは 36 倍程度である。Lck-GCaMP7 は GCaMP7 の N 末端に膜型チロシンキナーゼである Lck の N 末端 27 残基を付加したもので、N 末端のメチオニンから 2 番目のグリシンが翻訳中に N-ミリスチル化され、後続のシステイン残基にはパルミトイル化修飾を受けることで細胞膜に不可逆的に挿入される (図 3A, B)。一方、プレニル化され膜局在することが知られている KRas の C 末端ペプチドを付加した GCaMP7 (GCaMP7-KRasCT) は蛍光輝度が非常に低く、顕微鏡下で観察に十分な明るさが得られなかったため Lck-GCaMP7 をこれ以降の実験に用いた。Lck-GCaMP7 のカルシウム感受性が GCaMP7 と全く同じであることは確認していないが、先行研究 (Shigetomi et al., 2011) によると Lck-GCaMP3 は元コンストラクトの GCaMP3 とカルシウム濃度変化に対して、ほぼ同様の蛍光変化特性を

示すため、GCaMP3 に変異を加えた GCaMP7 でもこの対応関係は保たれると予想し、以降の実験を進めた。Lck-GCaMP7 プローブが細胞膜上に均一に分布することは、抗 GFP 抗体による免疫染色で、同時に発現させた膜マーカー mCherry-KRasCT と局在を比較することで確認した (図 19C)。膜結合型プローブと細胞質型プローブの性能比較を行う目的で、Lck の N 末端ペプチドの付いていない GCaMP7 コンストラクトを作成した (図 3C)。Lck-GCaMP7 がカルシウム変動を検出できることの確認は、プローブを発現させた HEK293T 細胞ライセートのカルシウム添加による蛍光輝度変化を確認することにより行った (観察事項 1)。細胞内でのカルシウム検出性能を検討する目的で、遺伝子導入が容易で性能評価が容易な DIV 7-9 の神経細胞および先行研究に倣ってアストロサイトに遺伝子導入したところ、活動電位に伴う細胞全体でのカルシウム上昇、先行研究に報告のあるアストロサイト特異的なカルシウム上昇パターンが観察された (観察事項 2) (Shigetomi et al., 2011)。以上の 2 つの観察事項により、Lck-GCaMP7 のカルシウム検出能力には問題が無いと考えられた。次に当初の目的である突起内部での蛍光輝度について細胞質型の GCaMP7 との比較を行ったものが図 3D である。細胞質型の GCaMP7 では細胞体由来の蛍光が強い一方、末端まで神経突起を追うことが困難であるのに対し (図 3D 左)、膜結合型の Lck-GCaMP7 では突起内部での輝度が相対的に高いため、神経突起末端まで追うことが可能であ

った (図 3D 右)。以上のことから Lck-GCaMP7 は GCaMP7 のカルシウム感知性を保持したまま、突起内部でのイメージングを容易にするプローブであることが示された。

### 3.1.2.Lck-GCaMP7 によるイメージング例およびキモグラフの作成

Lck-GCaMP7 を子宮内電気穿孔法で導入した DIV 2 神経細胞蛍光画像のスナップショットを示す (図 4A)。神経突起内部に限局した Lck-GCaMP7 の蛍光輝度変化が観察され、赤、黄 ROI の拡大図 (図 4B,  $10\ \mu\text{m} \times 7\ \mu\text{m}$ ) を見ると、直径  $1\ \mu\text{m}$  程度の領域からも十分な S/N 比でシグナルが取得できていることが示された。また突起の至る部分で蛍光輝度の高い領域、即ちカルシウム上昇の起きている領域があり、この時期の神経細胞では自発的なカルシウム上昇活動が活発であることが確認された。キモグラフの作成法は方法の項で詳述したので、概要のみに留める。図 4B 左のように樹状突起、軸索を含む神経突起に沿って複数本の ROI を設定し、その内部の蛍光輝度変化を (時間  $\times$  空間) の二次元の画像として表す (図 4B 右)。実際の ROI の設定例が図 5A であり、退色補正、レシオ化を経て  $\Delta F/F_0$  で表示したキモグラフが完成する (図 5B 右)。キモグラフから神経突起の各部位で活発に多源性のカルシウム上昇が起きており、その規模、持続時間ともにバリエーションがあることが観察された (図 5B 右)。



### 3.1.3.種々の GCaMP による発生期神経細胞イメージング

Lck-GCaMP7 は神経突起内部でのシグナル取得に有利であるが、膜に担持したことによるアーティファクトを検出している可能性があるため、それを排除するため、Lck の付いていない GCaMP7 でキモグラフを作成した (図 6A 右, 対照: Lck-GCaMP7 図 6A 左)。ここで想定しているアーティファクトとは、Lck-GCaMP7 内部に含まれるカルモジュリン配列が、膜に担持されることにより、近傍のチャネルの開口およびカルシウム動態に直接影響を与える可能性のことである。実際に膜結合型のカルモジュリンを過剰発現させると、細胞質型と異なり、カルシウムチャネルの開口を抑制するブロッカーとして働くという先行研究が存在する (Yang et al., 2013)。GCaMP7 は神経突起内部での輝度が低く、S/N 比の悪い画像となっているが、キモグラフ上で Lck-GCaMP7 と類似したパターンのカルシウム活動が検出されたため、細胞膜に担持したことにより、Lck-GCaMP7 プローブ自身がチャネルを開口することでカルシウム動態に影響を与えている可能性は低いと判断をした (図 6A)。また MLCK の M13 ペプチドではなく、カルシウムカルモジュリン依存性キナーゼ CaMKK $\alpha$  由来のカルモジュリン結合ペプチドを用いた Lck-GCaMP-H (井上 et al., 2012) を用いたキモグラフ作成を行った (図 6B)。GCaMP-H のダイナミックレンジが小さいため (Fmax/Fmin において、同一測定条件で GCaMP7 の半分以下)、S/N 比の悪い画像

となっているが、突起に限局したカルシウム上昇が検出されている (図 6B)。

Lck-GCaMP7 以外の二種類のデザイン (異なる局在、異なるカルモジュリン結合ペプチド) の GCaMP で同様の活動が検出されたことから、観察された現象がアーティファクトである可能性は低いと考えた。Lck-GCaMP7 より優れた検出感度を持つプローブを探索するため、最近発表された GCaMP6m, GCaMP6s をベースにした Lck-GCaMP6m, Lck-GCaMP6s でのイメージングを試みた (Chen et al., 2013)。GCaMP-6m, GCaMP6s は *in vivo* での活動電位計測に特化したプローブで、6f, 6m, 6s と三種類あり、キネティクスの速い順に f, m, s と名付けられている。ダイナミックレンジも既存の GECI の中で最大のものの一つであるが、今回の比較では、Lck-GCaMP7 に対して  $\Delta F/F_0$  における優位性は認められなかったため (図 6C)、以降の全ての実験を Lck-GCaMP7 を用いて行った。

#### 3.1.4. プレーティング直後のカルシウム活動

子宮内電気穿孔法により遺伝子導入し、分散培養を行うと細胞のプレーティング直後から蛍光観察が可能となる。この特徴を活用し、プレーティングして 4 h, 6 h 後の細胞から 1 秒おきに取得した Lck-GCaMP7 蛍光画像が図 7A である。神経細胞が極性の分化をするよりも前から黄矢頭 (図 7A 最上段) で示すような局所的なカルシウム上昇が見られ、細胞全体に波及するようなカルシウム上昇

も観察された (図 7A 二段目)。神経突起が伸展し始めた細胞でも、図 7A の下二段に黄および橙矢頭で示すように、突起内部に限局したカルシウムの上昇が検出された。このことから Lck-GCaMP7 は突起伸展の最初期に発生するカルシウム上昇の検出にも優れていることが明らかになった。また、小分子型プローブと異なり、事前の薬剤ローディングを必要とせず、長期間の経時的な観察も可能であることから、カルシウム上昇とその後の神経突起形成の関係を研究するためのツールとしても有用であると考えられる。

### 3.1.5.キモグラフ中の代表的なカルシウム上昇パターン

キモグラフ上のカルシウム上昇はどのようなパターンの活動から構成されているか説明する目的で、DIV 2 神経細胞から作成したキモグラフの拡大図を示した (図 7B)。代表的な上昇パターンとして図 7B 左に挙げたような時間的に密集したカルシウム上昇がある。この一連のカルシウム上昇は局所で振動的に起き、図 7B 左から三番目のカラムで顕著であるが、時間的に固まったカルシウム上昇が間隔を空けて繰り返す。一群のカルシウム上昇にも内部構造が存在するよう見え、より小さなカルシウムの上昇の集まりによって構成されていることが示唆される (図 7B 左)。空間方向に隣接するピクセルでも蛍光輝度の変化傾向は一致し、局所でのカルシウム濃度が実際に変動していると考えられた。孤立し

た活動の例を図 7B 右に表示した。キモグラフ上で横方向の輝線として表されるのがカルシウム上昇であり、各一行が 1 秒に対応することから先述の時間的に密集したカルシウム上昇と比較して極めて短い時間の現象である (図 7B 右)。各カルシウム上昇を詳細に観察すると (図 7B 右の左側のカラムの最下部)、活動が検出されたフレームにおいて、活動の中心部に輝度の極めて高い領域があり、時間経過と共に減衰する様子が認められた。この事実は単位的なカルシウム活動は一つの源によって引き起こされることを予想させる。単発のカルシウム上昇ではカルシウムが数秒以内に基底濃度近くまで戻るため、もし、神経細胞での自発的カルシウム上昇がこのような単位成分の集合によって成るといふ仮説を採用するならば、図 7B 左のような時間的に密集したカルシウム上昇では、カルシウムが上昇するような現象が複数回起きている、あるいはきっかけとなるカルシウム上昇を再帰的に増幅するような機構が存在すると予想される (Mikoshiba et al., 2007)。時間的に密集したカルシウム上昇と孤立したカルシウム上昇は互いに入り混じって起きるのではなく、ある程度 (分単位) の時間幅をもって、1. 時間的に密集した活動が起きやすい状態、2. 孤立した活動が起きやすい状態が交代するように思われたため、これを視覚的に示すために、方法の項で述べたような手法を用いてキモグラフ中の活動を active state, quiescent state の二状態に分類した (図 7C)。Active state を赤色で、quiescent state を水色で

表示している。自発的カルシウム上昇がこのようなカルシウム上昇履歴を反映するような活動パターンを示すという仮説は後に図 9, 10 で詳細に検証する。

## 3.2.キモグラフを用いた自発的カルシウム活動の解析

### 3.2.1.軸索では樹状突起よりもカルシウム上昇が大きい

樹状突起と軸索の自発的カルシウム上昇動態が異なるか検討する目的で、キモグラフを ROI 毎に樹状突起、軸索に分け、カルシウム上昇のパターンを比較した。子宮内電気穿孔法で事前に Lck-GCaMP7 を発現させた DIV 2 大脳皮質神経細胞 52 個から自発的カルシウム活動を 1,000 秒間以上計測し、樹状突起 91 本、軸索 85 本の ROI を設けた。同一細胞に由来する ROI は樹状突起、軸索の種別で統合することで、合計して樹状突起 41 細胞分、軸索 47 細胞分のキモグラフを得た。ROI の数が 52 に満たない理由は、樹状突起、軸索の一方しか同定できなかった細胞を含むためである。同一の細胞で樹状突起と軸索の ROI を両方設定できた細胞も 38 個あり、これらの細胞については同一細胞内で樹状突起と軸索のどちらによりカルシウムが流入しやすいかを対応付けて比較した。カルシウム上昇の解析法は、キモグラフ上での  $\Delta F/F_0$  を空間地点毎に加算することにより行った。 $\Delta F/F_0$  の和 (時間的な積分値) はカルシウム上昇量と完全に線形ではないものの、比較的頻繁に用いられている指標である。 $\Delta F/F_0$  の和は撮像時

間が長いほど大きくなるので、単位時間あたりに正規化した。長さについても正規化するため、空間方向にも平均し、単位時間あたり、単位長さあたりのカルシウム上昇量を得た (cumulative calcium elevation と呼ぶ)。樹状突起と軸索とで同一細胞内での対応のない比較を行った結果を図 8A 左に示した。樹状突起に比べて軸索の方が単位時間、単位長さあたりのカルシウム上昇が有意に大きいことが明らかになった (dendrite:  $N = 41$ ,  $\text{mean} = 0.5002$ ,  $\text{SD} = 0.2522$ , axon:  $N = 47$ ,  $\text{mean} = 0.7235$ ,  $\text{SD} = 0.4465$ ,  $P = 0.009$ , Mann-Whitney test)。同一細胞内での対応のある比較が図 8B 左である。こちらでも樹状突起に比べ、軸索でのカルシウム上昇が有意に大きいことが改めて示された ( $N = 38$ , dendrite  $\text{mean} = 0.5033$ , dendrite  $\text{SD} = 0.2594$ , axon  $\text{mean} = 0.7369$ , axon  $\text{SD} = 0.4751$ ,  $P = 0.0005$ , Wilcoxon signed rank test)。軸索と樹状突起でのカルシウム上昇の総和に差が生まれる原因として、軸索の方がカルシウム上昇の最大値が高いという可能性が示唆された。この仮説を検証するため、キモグラフの各空間地点におけるカルシウム上昇  $\Delta F/F_0$  のうち振幅にして上位 5% のみの和を取り、単位長さあたりに正規化したもの同士で比較した。例を挙げれば、ある空間地点でのカルシウム上昇が撮像期間内に 100 回あったと仮定すると、 $\Delta F/F_0$  の上位 5% となる 5 回について  $\Delta F/F_0$  の和を取って比較することになる。樹状突起と軸索での細胞内対応のない比較を図 8A 右に示した。カルシウム上昇の最大振幅においても、軸索の方が樹状突起に比べて有

意に大きいことが示された (dendrite:  $N = 41$ , mean = 1.693, SD = 1.052, axon:  $N = 47$ , mean = 2.649, SD = 1.743,  $P = 0.0023$ , Mann-Whitney test)。図 8B 右に示したように、細胞内での対応のある比較においても、軸索の方が樹状突起に比べて有意に大きなカルシウム上昇を起こすことが確認された ( $N = 38$ , dendrite mean = 1.716, dendrite SD = 1.087, axon mean = 2.709, axon SD = 1.845,  $P = 0.0003$ , Wilcoxon signed rank test)。細胞内で樹状突起と軸索を対応付けられた 38 例については、38 細胞中 27 細胞で軸索でのカルシウム上昇の総和の方が大きく、 $\Delta F/F_0$  上位 5% の平均に関しても、38 細胞中 29 細胞で軸索の方が大きかった。樹状突起および軸索の内部で位置によりカルシウム上昇のパターンが異なるかの検討も試みたが、この時期の樹状突起は短く、近位、遠位での違いは確認できなかった。軸索についても予備的な解析においては、近位、遠位間で顕著なカルシウム上昇頻度、振幅総和の違いは見られなかった (観察事項)。特記事項として、神経突起の近位部に細胞体由来の振幅、持続時間ともに大きなカルシウム上昇が波及する現象が確認されており、神経突起近位部における自発的カルシウム上昇のうち一部は、遠位とは異なると考えられる。以上まとめると、発生期神経細胞の自発的カルシウム活動には樹状突起と軸索との間で差があり、カルシウム上昇の総和は軸索の方が大きいこと、カルシウム濃度上昇の最大値も軸索の方が大きいことが示された。

### 3.2.2.自発的カルシウム活動の時間相関解析

神経細胞の突起内部でのカルシウム自発活動のパターンに時間的な規則性があるか検討する目的で、ある空間地点でのカルシウム上昇後の局所でのカルシウム上昇の増減の度合いを調べた。解析手順は方法の項で図 9 を用いて詳述したので概要のみ述べる。解析はキモグラフ上で行い、キモグラフ上のある空間地点  $x$  でのデータ（縦一列に相当）の内部で、閾値を定め、閾値を超えて  $\Delta F/F_0$  が上昇したものを「カルシウム上昇」と定義する。カルシウム上昇と定義された全ての時点から 1-5 秒後、6-10 秒後のように 5 秒刻みで 75 秒後までウィンドウを設け、そのウィンドウ内での  $\Delta F/F_0$  の総和と（実測カルシウム活動と定義）、カルシウム上昇と関連させず、全くランダムにウィンドウを設定した場合の  $\Delta F/F_0$  の総和（期待カルシウム活動と定義）との比較を行った。カルシウム上昇検出の閾値としては、0, 20, 40, 80, 160, 320%を設定した。0%は閾値を設けないことに相当する。実測カルシウム活動と期待カルシウム活動との比を **enriched index** として樹状突起、軸索ごとに算出した。各ウィンドウでの **enriched index** が 1 より大きければ、その時間ウィンドウではカルシウム活動がランダムの場合に比べて起こりやすいことを示している。神経科学の他分野のアナロジーで言えば、神経細胞の発生するスパイクがランダムに起きているか検証する目的で、スパイクにタイムロックしてその前後の時間ウィンドウに入るスパイク数



のヒストグラムを作成するという作業に似ている。スパイク解析ではイベントの発生が確率的であり、スパイク数の時間分布がポアソン過程に従うと言えるかがランダム性の指標となるが、その手法をカルシウム活動に適応する場合にいくつかの注意点がある。一つはカルシウム活動の検出がスパイク解析の場合と異なり、イベントベースでない点である。スパイクの場合は一つ一つの単位活動はほとんど同じ形状とみなせるのに対し、カルシウム上昇では単位的な活動単位が存在するか自体が不明であるため、イベント発生確率の変化を指標とした抽出による解析はできない。またもう一つの問題点としてカルシウム上昇を検出する際に、必然的に検出に用いるカルシウム活動自身の影響が含まれてしまう点である。例を挙げれば、長さ  $L$  秒のカルシウム上昇があった場合、カルシウム上昇の最初のフレームについて対応するウインドウを設けると、ウインドウの長さにもよるが、残りの  $L - 1$  秒の上昇が後続のウインドウに含まれてしまう。このカルシウム上昇が複数の単位活動ないし、小さな活動の和から構成されている場合には、「カルシウム上昇の履歴が局所での未来のカルシウム上昇確率に影響する」という仮説を検証できると考えられるが、もし、一回の大きなカルシウム上昇から成る場合には自身の活動を検出しているに過ぎない。実際のカルシウム上昇は小さな活動（持続時間：数秒～数十秒）の和から構成されているように見える例が多いが（キモグラフ参照）、客観的に判別する基準

が無い場合、この困難はそのままに解析を進めることとした。つまり、一つのカルシウム上昇の固まり（一つの大きな上昇か複数の小さな上昇の集合かは不明）の平均的な長さに比べて、十分長い時間が経過した後もカルシウム上昇の確率がランダムの場合に比べて高ければ、カルシウム上昇履歴が後のカルシウム上昇に反映されているという解釈である。要約すると、今回行った解析により検証できる仮説は「カルシウムが上昇、あるいは流入するといったイベントの発生確率が局所のカルシウム活動履歴を反映して変動する」といった類のものではなく、より弱い「カルシウム濃度が高いという状態が一つ一つのカルシウム上昇の長さに比べてより長い時間スケールにおいても持続する」という主張である。図 10A, B で示されるように、どの時間ウィンドウにおいても元となるカルシウム上昇の大きさが大きいほど、enriched index が大きいことが観察され、その時間的な減衰の様式は軸索、樹状突起の間で差がない。同一の閾値においては時間が経つほど enriched index が小さくなる（図 10A, "dendrite", 2-way ANOVA (threshold × time), threshold の効果 :  $P < 0.0001$ , time の効果 :  $P < 0.0001$ , post hoc Bonferroni t test : "no threshold vs 20%", "no threshold vs 40%", "no threshold vs 80%", 全てのウィンドウで  $P < 0.05$ , "20 % vs 40%", 1-5, 6-10, ..., 26-30 秒後まで  $P < 0.05$ , それ以降は n.s., "20% vs 80%", 1-5, ..., 66-70 秒後まで  $P < 0.05$ , "40% vs 80%", 1-5, ..., 21-25 秒後まで  $P < 0.05$ ), (図 10B, "axon", 2-way ANOVA (thresh-

old × time), threshold の効果 :  $P < 0.0001$ , time の効果 :  $P < 0.0001$ , post hoc Bonferroni t test : "no threshold vs 20%", 1-5, ..., 41-45 秒後まで  $P < 0.05$ , "no threshold vs 40%", "no threshold vs 80%", 全てのウィンドウで  $P < 0.05$ , "20 % vs 40%", 1-5, 6-10, ..., 26-30 秒後まで  $P < 0.05$ , それ以降は n.s., "20% vs 80%", 1-5, ..., 66-70 秒後まで  $P < 0.05$ , "40% vs 80%", 1-5, ..., 31-35 秒後まで  $P < 0.05$ )。カルシウム上昇イベント直後のウィンドウでは自身の活動が残存するために enriched index が大きいことは自明であるが、検出元のカルシウム活動から 60 秒以上 (平均的なカルシウム上昇の固まりのサイズに比べて十分大きい) 離れたウィンドウでも enriched index は 1 以上の値を示し、ランダムの場合に比べて大きい。この事実に対する可能な説明として、1. カルシウム上昇の中でも特に大きな上昇が 60 秒以上持続して、それが全体の解析結果に影響している可能性、2. カルシウム上昇後に、カルシウムが流入しやすいあるいは増幅しやすい「状態」が何らかの形で履歴として残っている可能性などが考えられる。図 7B で示したような時間的に固まって起きるカルシウム上昇は振動の各ピークを見る限り、その持続時間は数秒程度と 60 秒に比べて短い。1. で全て説明される可能性は否定できないものの、この事実は長いカルシウム上昇も小さなカルシウム上昇の集合である可能性を示唆しており、「状態」が一分程度のスケールで記憶されているという仮説を支持するものである。

カルシウム上昇を検出するための閾値を更に上げた場合に enriched index がより長期に渡って大きくなるかの検討を行ったものが図 10C である。軸索、樹状突起の区別をせずに、閾値を 80%, 160%, 320% に変えて enriched index を算出した。するとカルシウム上昇イベント直後のウインドウでは閾値の変更の効果を反映して三群間でカルシウム上昇量に差がついたものの、図 10A, 10B の比較で見られたような 60 秒以上経った時点でのカルシウム上昇に対しての濃縮効果は有意な差がなかった (図 10C, "neurite", 2-way ANOVA (threshold × time), threshold の効果:  $P < 0.0001$ , time の効果:  $P < 0.0001$ , post hoc Bonferroni t test: "80% vs 160%", 1-5 秒後でのみ  $P < 0.05$ , "80% vs 320%", 1-5, 6-10, 11-15 秒後で  $P < 0.05$ , "160% vs 320%", 1-5 秒後のみで  $P < 0.05$ )。 $\Delta F/F_0$  の検出閾値を 80% から変えた際にイベント直後 15 秒程度でのウインドウでしか差がつかなかったことは、ほとんどの大きな ( $\Delta F/F_0 > 80\%$ ) カルシウム上昇がこの時間スケール内に収まることを示している。

### 3.3. カルシウム上昇のソースの検討

#### 3.3.1. 自発的カルシウム活動は細胞外のカルシウムに依存している

発生期神経細胞における自発的カルシウム活動のカルシウムのソースを検討する目的で、細胞外液のカルシウムを 2 mM EGTA によりキレートした。カルシ

ウム上昇振幅  $\Delta F/F_0$  に変換したキモグラフを図 11A に示した。カルシウム濃度シミュレーションソフト Maxchelator ([maxchelator.stanford.edu](http://maxchelator.stanford.edu)) を用いて細胞外液中の EGTA 非結合型カルシウム濃度を見積もると、培地内の元のカルシウム濃度は 1.8 mM 程度であることから、この条件下では約 5  $\mu$ M 程度と予測された。

EGTA がカルシウムイオンをキレートする際には EGTA のカルボキシル基に部分的に結合していたプロトンが強制的に溶液中に放出されるため、その pH 変化作用が培地の緩衝作用を上回るかどうかを検討した結果、2 mM の EGTA を加えた際の pH 変化は 7.66→7.04 とおよそ 0.6 程度であった。GCaMP の pKa は概ね 7 程度であり、プロトン化型 GCaMP は非蛍光性であるため、pH のコントロールは非常に重要である。pH を変化させないような緩衝液の組成を検討したところ、同時に pH 8.0 の HEPES 1 M を終濃度 20 mM になるように添加することにより EGTA 添加に伴う pH の変化が 0.05 以内に抑えられることがわかった。この条件下では EGTA 添加に伴い細胞突起全域でカルシウム上昇が減弱あるいは消失した (図 11A)。神経突起内部でのカルシウム上昇振幅  $\Delta F/F_0$  の総和の変化を薬剤添加前の平均が 1 になるように正規化し、前後比較したグラフが図 11B である。

刺激後 1-250 秒の区間、251-500 秒の区間の両方で、薬剤添加によりカルシウム上昇の頻度が大きく減少したことが明らかである。また、カルシウムの変動が無い時間での平均蛍光輝度も減少していることから (観察事実)、自発的カルシ

ウム上昇が細胞外のカルシウムに依存していること、また細胞内カルシウム濃度が細胞外からのカルシウムの流入によって維持されていることが示唆された。観察している蛍光変化が実際にカルシウム濃度の変動に依存していることを示す目的で、EGTA-AM あるいは BAPTA-AM を外液に 20  $\mu\text{M}$  加え、15-30 分間プレロードした細胞でのカルシウム上昇を観察した (図 11C, D)。EGTA-AM および BAPTA-AM は細胞膜透過性で細胞膜透過後に細胞内のエステラーゼによりそれぞれ EGTA, BAPTA となり細胞質に保持される。EGTA-AM, BAPTA-AM 処理群では見かけ上の蛍光輝度変化が薬剤非添加時に比べて減少した (比較対照: 図 6A, Lck-GCaMP7)。局所で上昇したカルシウムはキレート剤 (EGTA あるいは BAPTA) とカルシウムプローブ Lck-GCaMP7、細胞に内在するカルシウムバッファーの間で競合的に結合されるため、輝度変化の完全な消失とは至らなかったと推測される。今回の実験に BAPTA-AM と EGTA-AM を用いた理由の一つに、BAPTA と EGTA のカルシウムキレートダイナミクスの違いが挙げられる。BAPTA と EGTA ではカルシウム結合に対する  $K_d$  は同程度 ( $\sim 160$  nM) であるものの、カルシウム捕捉のスピードが異なることが知られており、一般に BAPTAの方が 100 倍程度速いバッファーであると言われている (カルシウムとの結合速度定数:  $k_{\text{onBAPTA}} \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{\text{onEGTA}} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )。この二者の間でカルシウム蛍光輝度変化パターンに差があった場合、即ち BAPTA-AM では蛍光変化が消失

するが、EGTA-AM では消えない場合には、細胞外からの小さなカルシウム流入が細胞内の内在性のタンパク質により感知され、増幅されるような機構の存在が示唆される (Deisseroth et al., 1996)。今回の条件では EGTA-AM, BAPTA-AM とともに同程度の蛍光輝度変化の減弱が見られたため、積極的にそのような機構が存在するとはいえない。細胞外のカルシウム濃度を増加させた場合の変化についても検討した。細胞外液のカルシウム濃度を 1.8 mM→5 mM に上げると、図 11E で示すように、細胞の突起全体でカルシウムが一過性に上昇し、その後 10 分以上の間カルシウム活動の頻度、振幅が上昇することが観察された。細胞外液のカルシウムを上昇させてから  $\Delta F/F_0$  に変化が現れるまでの潜時は細胞ごとに差があったが、ほとんどの場合は右図のように加えてから一分以内であった。この節を要約すると、発生期神経細胞のカルシウム活動の主たるソースとしては細胞外のカルシウムが有力であると考えられる。

### 3.3.2.膜電位上昇により自発的カルシウム活動を再現できる

前項の結果から、細胞外のカルシウムが発生期神経細胞におけるカルシウム上昇の有力なソースとして考えられたが、そのカルシウム上昇の頻度、振幅が細胞の膜電位により影響を受けるかを検討した。Lck-GCaMP7 を発現した DIV 4 の神経細胞を、スクロースで浸透圧を調整した Tyrode's solution (pH 7.4) の中で

イメージングした。この系においては、今までの DIV 2 神経細胞の培地内のイメージングに比較して自発的なカルシウム活動の頻度は極めて低くなる。その理由として、細胞外に血清因子が存在しないこと、そして培養期間が長くなると自発的カルシウム活動の頻度が減少することが挙げられる (観察事項)。今回の研究で用いた培養系においては、DIV 2 ではほとんどの細胞がまだ活動電位を発生しないが、DIV 4 になると活動電位を発生する細胞が多数になることが観察された。活動電位を発生するような細胞では、活動電位による細胞全体でのカルシウム上昇に局所的なカルシウム上昇がマスクされることと、カルシウムの局所的な上昇頻度そのものが減る傾向にあることが予備実験で観察された。この時期の自発的カルシウム活動の乏しい細胞を用いて、細胞外液のカリウム濃度を 2 mM から 20 mM に上昇させることで、細胞の膜電位を上昇させ、カルシウム活動頻度、上昇振幅に与える影響を調べた。細胞外液のカリウム濃度を上昇させた直後から神経突起全体で蛍光輝度が上昇し、その後 5 分程度の間に至るところで自発的カルシウム活動に似た短い時間のカルシウム上昇が見られた (図 11F)。また、培地内での自発的カルシウム上昇が電位依存性ナトリウムチャンネルに依存しているか検討するため、再び DIV 2 の神経細胞を用い、細胞外にテトロドトキシン (TTX) を 1  $\mu$ M 添加した際の反応を観察した (図 11G)。ここでは三細胞分の結果を示すが、薬剤添加後にカルシウム上昇頻度の明らかな減



少および増加は見られなかった。全ての薬剤実験は後の表 1 に定量データをまとめてある。TTX の実験から活動電位発生前の段階の神経細胞で電位依存性ナトリウムチャンネルが局所での脱分極を発生、あるいは増幅している可能性は低いと考えられる。自発的カルシウム活動が生じない神経細胞でも、細胞膜電位を操作することで類似のパターンを引き起こせることから、実際の自発的カルシウム活動そのものも電位変化の影響を受けている可能性があるという仮説を立て、次の実験を行った。

### 3.3.3. 発生期神経細胞の自発的カルシウム活動は細胞膜電位に依存する

発生期神経細胞の細胞膜電位を操作する目的で内向き整流性カリウムチャンネル Kir2.1 を用いたコンストラクトを作成した (図 12A, 12B)。野生型の Kir2.1 は発生期神経細胞の静止膜電位を下げる目的で、カリウム・塩化物イオン共輸送体 KCC2 と共に広く使われている (Cancedda and Fiumelli et al., 2007)。野生型 Kir2.1 を強制発現した海馬神経細胞では、カリウム電流を透過しない変異型 Kir2.1 を発現した細胞と比較して、平均して静止膜電位が 10 mV ほど過分極側に変化することが知られている (Burrone et al., 2002; Hartman et al., 2006)。ここでは先行研究で報告されている種々の Kir2.1 の機能喪失変異体のうち Kir2.1-V302M をメガプライマー法により作成した (Ma et al., 2007)。この変異体

は心室性不整脈および身体奇形を主徴とする Andersen-Tawil 症候群の原因となる遺伝子変異として知られており、カリウム電流の透過性をほとんど持たない (Bendahhou et al., 2003)。Kir2.1 の機能喪失変異体のうち、膜への発現が損なわれないという特性が今回の実験に適すると考え V302M 変異体を選択した。V302M 変異体は内在性の Kir2.1 に対してドミナントネガティブ体として働くが、この時期の脳皮質神経細胞には Kir2.1 は発現しておらず (Allen brain atlas)、変異体発現による細胞に対しての静止膜電位上昇効果はほぼ無いと考えられる。方法の項で述べた手順で pCAG-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCT および V302M 変異体を作成し、その発現を HeLa 細胞で免疫染色により確認した (図 12C)。細胞小器官への集積が一部見られるものの、mCherry-KRasCT 由来の赤色蛍光、および Kir2.1 の C 末端に付加されている 2A ペプチドを標識する抗体由来の蛍光が膜表面に観察されたことからこのコンストラクトを用いて実験を進めた。細胞膜でのカルシウム濃度変化を同時に観察する目的で方法の項の通りに pCAG-Lck-GCaMP7-T2A-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCT およびその V302M 変異体を作成した (図 12B)。こちらのコンストラクトも HeLa 細胞の免疫染色で発現パターンを確認し、Lck-GCaMP7 由来のシグナルが抗 GFP 抗体を用いて膜上に認められた。また、Kir2.1-P2A と Lck-GCaMP7-T2A のシグナルの和になるが、抗 2A ペプチドの染色も膜上に認められた (図 12D)。このコンストラクトを子宮内電気

穿孔法により、発生期大脳皮質神経細胞に発現させたところ、Lck-GCaMP7 と同様にカルシウムの濃度変化に応じて蛍光変化することが確認された。発現量の低さや T2A 配列付加の影響からか Lck-GCaMP7 に比較して蛍光輝度、変化量は低いものの、Lck-GCaMP7 と同様にキモグラフを作成することができた。代表的なキモグラフが図 13A である。Kir2.1-WT のコンストラクトを発現させた方の細胞では、カルシウム上昇の頻度、振幅ともに低いのに対し、V302M 変異体を発現させた細胞では WT を発現させた時と比較してカルシウム上昇が大きい。定量結果が図 13B-D である。キモグラフ全体でのカルシウム上昇振幅  $\Delta F/F_0$  の総和を単位長さあたりに正規化し、Kir2.1-WT, V302M 間で比較を行った。図 13B では、 $\Delta F/F_0$  に閾値を設けず総和を取って比較したところ、Kir2.1-V302Mの方がカルシウム上昇の総和が大きい傾向があるものの、有意ではなかった (Kir2.1-WT: N = 12, mean = 200.8, SD = 139.8, Kir2.1-V302M: N = 11, mean = 321.9, SD = 182.8, P = 0.053, Mann-Whitney test)。この方法ではノイズも含めたカルシウム濃度の微小な変化の総和を全て検出しているので、より大きな振幅のイベントに注目して、各ピクセルの  $\Delta F/F_0$  が 20%, 40%を超えるものについてのみ振幅の和を取ったものが図 13C, 13D である。こちらの比較では、それぞれ (" $> 20\%$ ", Kir2.1-WT: N = 12, mean = 144.1, SD = 157.4, Kir2.1-V302M: N = 11, mean = 276.8, SD = 198.0, P = 0.061, Mann-Whitney test), (" $> 40\%$ ", Kir2.1-WT: N = 12, mean =

78.41, SD = 134.9, Kir2.1-V302M: N = 11, mean = 194.8, SD = 197.4, P = 0.039, Mann-Whitney test) となり、ある程度大きな ( $\Delta F/F_0 > 40\%$ ) 振幅のイベントは電位依存性であることが示された。最後に全ての細胞での各空間地点でのカルシウム振幅の総和 (キモグラフ上での縦方向の和) を累積度数分布で比較したものが図 13E である。キモグラフの傾向を反映し、Kir2.1-WT を発現させた神経細胞の方ではカルシウム上昇の少ない地点が多い。以上のことから、細胞膜電位が発生期神経細胞の突起内部でのカルシウム上昇に影響を与えていることが推察される。なお、関連して蛍光タンパク質型細胞膜電位プローブ ArcLight (Jin et al., 2012) を用いてイメージングによって電位変化の検出を試みたが、明らかな電位変化は見られなかった。

#### 3.3.4.L 型カルシウムチャネルは自発的カルシウム活動の重要な源である

細胞外から電位変化に伴ってカルシウムを流入させる機構がいくつか考えられるが、経路同定のためのスクリーニング薬理実験を行った。大きく分けてカルシウムチャネル (L 型、P/Q 型、N 型、TRP)、NMDA 受容体、AMPA 受容体、細胞内ストアなどを狙った薬理実験を行った。前項までの実験から細胞内ストアは直接のカルシウム上昇経路ではないと考えられるが、カルシウム上昇に振動的なパターンが存在したため、再帰的なカルシウム上昇を担う候補分子とし

て、よく知られている  $IP_3$  経路、および骨格筋でカルシウム流入とカップルすることが知られており、神経系にもサブタイプが発現しているリアノジン受容体について阻害剤を用いて実験した。薬剤の効果判定は、キモグラフのパターン変化および薬剤添加前と添加後とでカルシウム上昇振幅の総和に有意差があるかの検定により行った。結果は図 14, 15 および表 1 にまとめた。

まず、電位依存性カルシウムチャネルのブロードな阻害剤として塩化カドミウムを用いた。通常の使用濃度はカドミウムイオン  $100 \mu\text{M}$  程度であるが、培地内の金属結合タンパク質の影響からか  $100 \mu\text{M}$  では反応があまり見られなかったため、 $500 \mu\text{M}$  まで終濃度を増やした。カドミウムの添加により突起全体でカルシウム上昇頻度が減少、あるいは一過性に増加した後減少し、電位依存性カルシウムチャネルを介したカルシウム流入の存在が示唆された (図 14A, 表 1)。一部の細胞ではカドミウムの添加後に突起内部でのカルシウム濃度が上昇しているが、先行研究によると、細胞外部へのカドミウム添加により細胞内のカルシウムホメオスタシスが変化することが知られているため、今回の現象も説明可能である。カドミウムの実験はスクリーニングとしては適当だが、使用濃度が高濃度であるため、選択的 L 型カルシウムチャネルの阻害剤であるニモジピン (Hockerman et al., 1997)、ジルチアゼムおよびベラパミルを用いた実験を行った。ニモジピン  $10 \mu\text{M}$ 、ジルチアゼム  $200 \mu\text{M}$  は有意にカルシウム上昇の総和を減少

させることがわかった (図 15A, C, 表 1)。ベラパミル 100  $\mu\text{M}$  については阻害の特異性が低いこととカルシウム電流阻害の開口依存性が顕著であることから 2 例の結果を載せるに留めた。この中でニモジピンが最も特異性の高いブロッカーであること、また L 型カルシウムチャネルのニモジピン非感受性変異体を使用可能であることから、以降ニモジピンを用いた実験を重点的に行った。

神経突起に設定した ROI からキモグラフを作成し、10  $\mu\text{M}$  のニモジピン添加直前 10 分間の  $\Delta F/F_0$  の総和と添加後 5 分後から 15 分後までの 10 分間の  $\Delta F/F_0$  の総和との比をカルシウム上昇の変化の指標とした。代表的なキモグラフを図 15A に、27 個の細胞をプールした結果を図 15C に示す。発生期神経細胞のカルシウム活動は時間的に一定ではないため、ある 10 分間と別の 10 分間とを比較した場合に、そのカルシウム上昇振幅の比にはバラつきがあるものの、集団としての平均は 1 である。この事実を利用して、薬剤添加前、添加後のカルシウム上昇振幅の総和の比が 1 と有意に異なるかの one sample t 検定を行った。大半の細胞でニモジピンの添加により、突起でのカルシウム上昇量が減少した (N = 27, mean = 0.5220, SD = 0.4652, one sample t-test による 1 との比較  $P < 0.0001$ )。活動が完全になくなるような細胞はほとんどなく、ニモジピン感受性のカルシウム上昇は発生期神経細胞の主要なカルシウム流入源と言えるものの、全てを説明することはできない。ニモジピンに対しての感受性は Cav1.2 の方が Cav1.3 よ

りも鋭敏であることが知られているが (Xu et al., 2001)、今回用いたニモジピンの濃度は先行研究での使用濃度の中でも濃く、ほとんど全ての L 型カルシウムチャネルを阻害できていると考えられる。考慮しなければならない点として、ニモジピンのカルシウムチャネル阻害は開口依存的であるため、観察期間内で 100%の阻害にまで至るかは不明であるが、ニモジピンを加えて十分時間が経った細胞においても自発的なカルシウム上昇の成分は残るという観察結果を得ていることから、L 型カルシウムチャネル以外のカルシウム上昇成分も存在すると考えられる。先行研究で発生期神経細胞に対してニモジピンと同系統のジヒドロピリジン型阻害薬ニフェジピンによる L 型カルシウムチャネルの遮断により、条件によって神経突起長を延長あるいは退縮させる方向に影響が出ることが示されており (Tang et al., 2003; Hutchins et al., 2008)、L 型カルシウムチャネルによるカルシウム流入が発達段階で何らかの生理的意義を持っていることが示唆される。

一方で観察している発生期神経細胞に機能的な L 型カルシウムチャネルが存在することの薬理的裏付けとして、L 型カルシウムチャネルのアクティベーターである FPL 64176 を用いた実験を行った。FPL 64176 は L 型カルシウムチャネルの開口確率、開口時間を共に延長するとされており、薬剤添加によりチャネルが過分極側でも開口しやすくなることが知られている (McDonough et al.,

2005; Kunze et al., 1992)。25  $\mu\text{M}$  の FPL 64176 添加前 5 分間と添加直後 5 分間、およびその次の 5 分間の  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  の総和の比を比較した。代表的なキモグラフを図 15B, 11 個の細胞をプールした結果を図 15D に示した。FPL 64176 の添加に伴い、概ね 80% 程度 (8/11) の細胞でカルシウム流入量の増加が見られた (N = 11, one sample t-test による 1 との比較 "0-5 min" mean = 2.027, SD = 1.463, P = 0.0423, "6-10 min" mean = 1.892, SD = 1.213, P = 0.0350)。以上の事実から機能的な L 型カルシウムチャネルが発生期神経細胞に存在することが薬理的に確認された。

L 型カルシウムチャネル以外のカルシウム流入源等関連分子の寄与を調べた薬剤スクリーニング結果を以下に簡潔に述べる。全ての定量結果は表 1 にまとめた。P/Q, N 型カルシウムチャネルのブロードな阻害剤であると考えられている  $\omega$ -conotoxin MVIIC を終濃度 20  $\mu\text{M}$  で加えた場合特に変化は見られなかった (図 14F)。TRP および  $\text{IP}_3$  受容体の阻害剤である 2-APB を 10, 100  $\mu\text{M}$  で加えた場合 (図 14C)、TRPC3 チャネルの阻害剤である Pyr3 20  $\mu\text{M}$  も効果が見られなかった (表 1)。グルタミン酸経路の寄与を調べるために、CNQX および D-AP5 をそれぞれ終濃度 10  $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  で加えた場合もカルシウム上昇への効果は無かった (図 14D, E)。最後に細胞内ストアがカルシウム流入の増幅に寄与しているか検討する目的で、小胞体のカルシウムストアを枯渇させるサブシガルジンおよびリアノジン受容体の阻害剤であるダントロレン, リアノジンを用いた。ダントロレ



ンは薬剤の蛍光性により GCaMP 由来の蛍光を取得することが困難であったため解析から除外した。サプシガルジン 10  $\mu\text{M}$  添加 (図 14B) 群では薬剤の添加により、有意にカルシウム上昇振幅の総和が減少することが明らかになった (表 1)。サプシガルジンによりカルシウム上昇振幅が減少することは、細胞内のカルシウムストアが補助的にカルシウム振幅を増大させている可能性を示唆する。一方でリアノジン 20  $\mu\text{M}$  (表 1) 添加前後でカルシウムの上昇振幅の総和に変化はなかった。今回の実験では効果が見られなかった薬剤も自発的カルシウム上昇にマイナーな役割を果たしている可能性はあるものの、主たるカルシウム流入経路は L 型カルシウムチャネルであることが明らかになった。

### 3.3.5. 内在性カルシウムチャネルの発現の確認

発生期大脳皮質神経細胞において、L 型カルシウムチャネルが自発的カルシウム上昇に重要な役割を果たすことは薬理的に明らかになったものの、この時期の将来 2/3 層になる興奮性神経細胞にどのような L 型カルシウムチャネルのサブタイプが発現しているかは詳しく分かっていなかった。L 型カルシウムチャネルには Cav1.1-1.4 までの 4 種類のサブタイプがあり、そのうち、Cav1.1, 1.4 はそれぞれ筋肉、網膜特異的であることが分かっていたため、残りの Cav1.2, 1.3 についてウサギ由来の特異的抗体 (Alomone labs) を用いて免疫染色を行った。

Cav1.2, 1.3 は成マウスでは大脳皮質全体に広く発現していることが知られており、成マウス脳切片および外来性に発現させた Cav1.2, 1.3 に対する免疫組織染色では先行研究と一致する染色像が得られた。発生期神経細胞での発現を確認する方法としては pCAG-mCherry-KRasCT を子宮内電気穿孔法で導入した大脳皮質神経細胞を PDL コートしたカバースリップ上で培養し、DIV 2 で固定、一次抗体濃度 (1:500)、二次抗体濃度 (1:200) で染色を行った。図 17A, B に示すように、Cav1.2, 1.3 共に発生期神経細胞に存在することが明らかになった。特に Cav1.2 は細胞体のみならず、軸索、樹状突起にも広く分布していることが確認された。一方の Cav1.3 は少ないながらも発現が確認され、細胞体、神経突起近位部に集積していることが明らかになった。

### 3.3.6. ニモジピン非感受性カルシウムチャネルによる実験

発生期神経細胞に L 型カルシウムチャネル Cav1.2, 1.3 の両方が発現していることが示されたが、Cav1.2, Cav1.3 どちらの寄与が大きいかを検証するために後述する pharmacological knockout の手法を用いた (He et al., 1997; Dolmetsch et al., 2001; Zhang et al., 2006)。Cav1.2, 1.3 の神経系における機能の違いについては、Cav1.2 のノックアウトマウスが致死的となるのに対し、Cav1.3 のノックアウトマウスでは聴覚の神経回路に異常をきたすものの、それ以外の神経系に主だっ

た異常は見られないこと (Seisenberger et al., 2000; Hirtz et al., 2011)、Cav1.2, Cav1.3 は脱分極に伴う開口の電位依存性が異なっており、Cav1.3 の方がより過分極側の膜電位でも開くこと等が知られている (Xu et al., 2001)。pharmacological knockout の概念図を図 16F に示した。Cav1.2 あるいは Cav1.3 のジヒドロピリジン結合部位のスレオニン残基にニモジピン非感受性となるチロシン変異 (図 16B, Cav1.2-TY: T1039Y, Cav1.3-TY: T1033Y) を導入したチャンネルを外来性に発現させた状態でニモジピンを作用させると、内在性のニモジピン感受性 L 型カルシウムチャンネルはブロックされるのに対し、外来性の変異型チャンネルは影響を受けない。この変異型チャンネルは先行研究により、野生型のチャンネルと同じ機能、開口特性を持っていることが分かっているので、外来性に導入したチャンネルがその細胞内においてどのような機能を持ちうるか調べることができる。この手法はノックダウン法と相補的な実験であるが、通常のノックダウン法に対しての利点は、薬剤添加の前後で比較できるため、もともとの自発的カルシウム活動の頻度という変動の大きなパラメータに依らず、薬剤に対する反応を見ることで純粋に導入したチャンネルの効果を調べることができること、疾患変異を導入したチャンネルがどのようなカルシウムの上昇パターンを引き起こすか調べることが可能なこと等が挙げられる。実際の実験での解釈を考えると、ニモジピン非感受性変異体を導入した細胞において、ニモジピン添加に伴うカル

シウム上昇の減少幅がコントロール群に比べ小さければ、外来性に発現させたチャンネルは神経細胞内でカルシウム流入源として機能しうると考えられる。このロジックの下、Cav1.2-TY, Cav1.3-TY を用いて実験を行った。外来性に発現させた Cav1.2-TY および Cav1.3-TY には抗体標識のできる HA タグがそれぞれドメイン II の S5-H5 ループの細胞外側、N 末端に挿入されており (以降 sHA-Cav1.2-TY および HA-CAv1.3-TY と呼ぶ)、抗 HA 抗体による免疫染色によりチャンネルの発現を確認できる。ライブイメージング中にはチャンネルの発現を確認できないため、共発現した蛍光タンパク質の発現があれば、チャンネルも同時に発現していると仮定して実験を行った。先行研究から L 型カルシウムチャンネル Cav1.2, Cav1.3 のみを外来性に発現した場合、膜への発現が不十分であり、 $\alpha 2\delta 1$  および  $\beta 3$  サブユニットを共発現させてやることで、Cav1.2 および Cav1.3 と 1:1:1 で複合体を形成し、膜発現が改善することがわかっている。今回の実験では Lck-GCaMP7, sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TY,  $\alpha 2\delta 1$ , Cav $\beta 3$ , mCherry-KRasCT の 5 種類のタンパク質を共発現させる必要があり、共発現効率を上げるため  $\alpha 2\delta 1$ , Cav $\beta 3$ , mCherry-KRasCT を自己開裂ペプチドで繋いだ pCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT を作成した (図 16A)。免疫染色の結果を図 16C 左に示した。 $\alpha 2\delta 1$ , Cav $\beta 3$  の局在はそれぞれ膜、細胞質であり、抗 2A ペプチド抗体では、細胞膜と細胞質全体が標識されており、C 末に繋いだ mCherry-KRasCT 由来のシグ

ナルが細胞膜に確認される。開裂効率をより正確に評価するためにウェスタンブロッティングを行い、こちらも抗 2A 抗体で標識を行った結果  $\alpha 2\delta 1$ , Cav $\beta 3$  に対応する位置にバンドが確認された (図 16E)。分解産物や未切断産物に対応する分子量のバンドは検出されなかった。 $\alpha 2\delta 1$  のバンドがやや薄く見えるのは膜局在による可溶化の効率、PVDF 膜への転写効率の両者によるものと考えれば大きな矛盾はないと考えられる。実際にカルシウムチャネルの発現がうまく行っていることを確認するため、pCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT と sHA-Cav1.2-TY あるいは HA-Cav1.3-TY との 1:1 での共発現を子宮内電気穿孔法により行い、細胞膜を透過させて抗 HA 抗体により標識を行った (図 16D)。先行研究と同様に細胞小器官への集積も見られたものの、細胞膜上にもカルシウムチャネルが発現していた。このコンストラクトを用い pCAG-Lck-GCaMP7, pCAG-sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TY, pCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT を 3:1:1 で混合したプラスミド溶液を同腹マウス胎児に子宮内電気穿孔法で導入した。比較対照としてコントロール群では pCAG-sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TY の代わりに空のコンストラクトである pCAGpro-C1 を発現させた。トレース可能な神経突起全てに ROI を設け、薬剤添加前のカルシウム流入量を単位長さ、単位時間あたりに正規化して整理したものが図 18A である。薬剤添加前に突起全体に広がるような大きなカルシウム上昇 (一分以上) が生じた細胞はカルシウ

ム上昇の由来が異なると考え解析から除外した。基底状態での単位長さ、時間あたりの活動は sHA-Cav1.2-TY < control < HA-Cav1.3-TY の順に増加した (Kruskal-Wallis test  $P = 0.0233$ , control:  $N = 10$ , mean = 0.7042, SD = 0.3566, sHA-Cav1.2-TY:  $N = 10$ , mean = 0.5024, SD = 0.2301, HA-Cav1.3-TY:  $N = 15$ , mean = 0.8265, SD = 0.2667, “sHA-Cav1.2-TY vs HA-Cav1.3-TY”, Dunn’s multiple comparison test,  $P < 0.05$ )。HA-Cav1.3-TY を発現させた細胞で sHA-Cav1.2-TY 群に比べカルシウム流入が多いことは、これまでの Cav1.3 の方が Cav1.2 に比べ過分極側の膜電位でも開口しやすいという知見と合致している。

一方で、ニモジピン添加後 5-15 分の 10 分間の  $\Delta F/F_0$  の総和を添加前 10 分間の  $\Delta F/F_0$  の総和で割った値を比較した (図 18B)。コントロール群ではニモジピン添加により 30%程度にカルシウム流入量が減弱しているのに対し、sHA-Cav1.2-TY, HA-Cav1.3-TY を発現させた細胞では、有意な減少および増加はなかった (one sample t-test による 1 との比較, control:  $N = 10$ , mean = 0.3118, SD = 0.2291  $P < 0.0001$ , sHA-Cav1.2-TY:  $N = 10$ , mean = 0.8920, SD = 0.6743,  $P = 0.6245$ , HA-Cav1.3-TY:  $N = 15$ , mean = 1.343, SD = 0.6937,  $P = 0.0762$ )。外来性の sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TY を発現させた細胞では、ニモジピン非感受性のカルシウム流入の占める割合が増えていることが明らかとなった。sHA-Cav1.2/HA-

Cav1.3-TY を発現させた一部の細胞でニモジピンが通常通り効いているのは、共発現の効率および発現量が関係している可能性が考えられる。以上のことから発生期神経細胞において外来性の sHA-Cav1.2-TY および HA-Cav1.3-TY はいずれもカルシウムを流入させる能力があることが示された。今までの知見では細胞の静止膜電位付近では L 型カルシウムチャネルが開くのに十分なだけの電位変化はないと考えられていたが、発生期神経細胞において、L 型カルシウムチャネルが確率的に開口しうることを pharmacological knockout 法により構成的に示すことができた。

### 3.4.細胞内平均カルシウム濃度制御機構

#### 3.4.1.細胞間平均カルシウム濃度は連続的に分布している

発生期神経細胞のイメージングにより、細胞突起内部でのカルシウム上昇の頻度に細胞間の差が見られたため、それに伴って細胞間のカルシウム濃度に差があるかを比較する目的で pCAG-Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT を作成した (図 19A)。このコンストラクトは Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT タンパク質を P2A 自己開裂ペプチドにより繋げたものであり、Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT を共に発現させた場合と異なり、タンパク質の分子数において Lck-GCaMP7:mCherry-KRasCT=1:1 の化学量論比が必ず保たれる。これまでの実

験では Lck-GCaMP7:mCherry-KRasCT がプラスミドの濃度比で 4:1 となるように遺伝子導入を行ったが、各細胞間でのプラスミドコピー数、タンパク質分子数には変動があり原理上揃えることができなかった。このコンストラクトにおいては、化学量論比が保たれているため、Lck-GCaMP7 由来の蛍光輝度値を mCherry-KRasCT の蛍光輝度値で除算することで細胞間でのカルシウム濃度比較が可能となる。前提条件として Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT の局在に偏りが無いことが必要であるため、HeLa 細胞および子宮内電気穿孔法で事前に遺伝子導入した発生期神経細胞で検討したところ、mCherry-KRasCT の分布と抗 2A 抗体 (Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT は切断後、Lck-GCaMP7-P2A を生じ、C 末の P2A をタグとして使用可能) の標識蛍光パターンがよく一致していることから、局所での Lck-GCaMP7-P2A と mCherry-KRasCT の比は一定に保たれていると考えられた (図 19B)。抗 GFP 抗体を用いた場合も同様の結果を得た (図 19C)。最後に切断効率を見積もるために HEK293T 細胞に Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT を発現させ、ライセートを作成し、抗 2A 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、完全切断に一致する分子量のところのみに Lck-GCaMP7-P2A 由来のバンドが見られた (図 16E)。ここまでの結果から Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT は細胞内で P2A ペプチドが効率よく切断され、Lck-GCaMP7-P2A および mCherry-KRasCT として、それぞれ膜に挿入される



こと、および両タンパク質の局在に違いがないことが示された。また Lck-GCaMP7-P2A は神経細胞で実際に機能し、Lck-GCaMP7 と同様にキモグラフを作成できることも確認した。

細胞間でのカルシウム濃度比較をした結果を示す。まず、今までの実験で行っていたように pCAG-Lck-GCaMP7 と pCAG-mCherry-KRasCT との比が 4:1 となるように発現させた発生期神経細胞の細胞体に ROI を設け、細胞小器官に相当する高輝度の領域がある場合にはその部分を避けた。時々刻々と変化する Lck-GCaMP7 の 200 秒間の緑色蛍光輝度平均値と mCherry-KRasCT の赤色蛍光輝度値との比を取り G/R ratio と定義した。この値はある期間で平均的に細胞体ほどの程度カルシウムが入っていたかの指標として使えると考えられる。mCherry-KRasCT と Lck-GCaMP7 の輝度は概ね比例関係にあることが確かめられ、子宮内電気穿孔法での共発現系では複数のプラスミドの遺伝子導入効率は極めて高く、二種のプラスミドからの発現量もよく相関することが示された (図 19D, N = 32)。

pCAG-Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT 群では Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT の分子数が 1:1 であることが保証されているため、より正確に細胞の基底状態のカルシウム濃度を評価できると考えられる。一部死にかけの細胞からのデータと考えられる外れ値はあるものの、概ね Lck-GCaMP 輝度と mCherry-

KRasCT 輝度との間には比例関係がある (図 19E, N = 31)。細胞ごとの G/R ratio を累積分布関数としてグラフ化した。G/R 比 1.5 付近を中心とし、1.0-2.5 程度の間には全体の 80%以上の細胞が入った (図 19F)。この値は光学系に依存するため単独では意味が無いが、同じ設定で撮像したもの同士では比較できると考えられる。以上のことから、平均の細胞体カルシウム濃度を反映していると考えられる G/R ratio には細胞間で差があり、G/R ratio にして概ね 2.5 倍程度の広がりがあることが明らかになった。先行研究から成熟海馬神経細胞の静止状態のカルシウム濃度は 50-100 nM 程度と見積もられているため、当研究室で開発された GCaMP-H を用いると (井上 et al., 2012)、細胞間でのカルシウム濃度の違いをより明確に示すことができると考え、GCaMP7 と同様の方法で Lck-GCaMP-H-P2A-mCherry-KRasCT をの作製を行ったが、GCaMP-H は元々の蛍光輝度が低く、P2A の付加により更に暗くなってしまったことから十分な S/N 比でデータ取得することができなかった。

#### 3.4.2.細胞体の平均カルシウム濃度は L 型カルシウムチャネルにより制御される

pCAG-Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT を発現した発生期神経細胞の平均カルシウム濃度に L 型カルシウムチャネルの拮抗薬、作動薬がどのような作用を持つかを比較したのが図 19G である。それぞれの細胞を、mock, 10  $\mu$ M ニモジ

ピン, 25  $\mu$ M FPL 64176 で処理し、15-30 分後に蛍光画像を 300 秒間取得し、G/R ratio を計算し、同一回に行った mock の G/R ratio 平均で除算することで正規化しグラフ化した (“mock”, N = 45, mean = 1.000 (定義より), SD = 0.4086, “FPL 64176”, N = 45, mean = 1.458, SD = 0.6824, “nimodipine”, N = 39, mean = 0.7558, SD = 0.4643 Kruskal-Wallis test, P < 0.0001, “mock vs FPL 64176”, P < 0.01, “mock vs nimodipine”, P < 0.05)。FPL 64176 処理群ではコントロール群に比べて平均の G/R ratio が有意に上昇している。一方でニモジピン処理群ではカルシウム濃度が下がる細胞が多数見られたものの、一部の細胞ではカルシウム濃度が mock 処理群と同程度であった。この実験では細胞体に ROI を設けているため、ニモジピンにより細胞へのカルシウム流入が減少した細胞でも、細胞小器官からのカルシウム放出など別経路で細胞内のカルシウム濃度が維持された可能性が考えられる。近年、静止状態の神経細胞内でのカルシウム濃度にも勾配があることを示唆する報告があり、このプローブは FRET 型のカルシウムプローブと同様に、そのような問題に取り組むための有用なツールと考えられる。また、樹状突起や軸索の間にカルシウム濃度の違いが存在するか検証するためにも使用可能であると考えられる。

## 4.考察

### 4.1.本研究の意義

本研究の要点を箇条書きの形でまとめる。重要なものを図 20 にまとめた。

- 膜結合型カルシウムプローブと子宮内電気穿孔法を組み合わせた新規イメージング方法の開発により、今までにない感度で長期間神経突起内部のカルシウム動態を解析することが可能となった。
- 自発的カルシウム活動は神経突起の至るところで起き、規模も持続時間も様々である。活動の一部は振動的であり、カルシウムが上がりやすい「状態」が記憶されているかのようにふるまう。
- 軸索における自発的カルシウム活動は樹状突起のものより累積カルシウム上昇量、カルシウム上昇振幅の最大値ともに大きい。
- 発生期神経細胞の自発的カルシウム活動のカルシウムソースは主に細胞外液のカルシウムであり、細胞膜電位による影響を受けるものの、電位依存性ナトリウムチャネルの寄与は小さい。ニモジピン感受性であることから L 型カルシウムチャネルの関与が示唆される。
- FPL 64176 の薬理実験および免疫組織染色実験により、発生期神経細胞には機能的なカルシウムチャネルが存在することがわかった。更に外来性のニモジピン非感受性カルシウムチャネル sHA-Cav1.2-TY, HA-Cav1.3-TY の発現に

よって自発的カルシウム活動のうちニモジピン非感受性の成分が増えることから、L型カルシウムチャネル Cav1.2, 1.3 の両方が発生期神経細胞においてカルシウムを流入させる能力があることを構成的に示した。

- Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT の発現量が 1:1 になるようなプローブを製作し、細胞間でのカルシウム濃度の比較が容易になった。発生期神経細胞でも平均カルシウム濃度に細胞間の差異があることがわかった。このプローブを応用して、神経細胞内部でのカルシウム濃度勾配や、細胞間比較といった興味深い諸問題へ取り組むことができる。

発生期神経細胞でのカルシウムイメージングで樹状突起、軸索でのカルシウム制御に差があると示したことは、軸索、樹状突起のパターン形成に更なる可能性を付与できたと考えられる。今回の知見と当研究室で過去に発表した、軸索、樹状突起で異なる種類の CaMK (軸索: CaMKI $\alpha$ , 樹状突起: CaMKI $\gamma$ ) が機能していること (Ageta-Ishihara et al., 2009)、CaMKI $\alpha$ , CaMKI $\gamma$  が異なるカルシウム親和性を持ち活性化されるということ、具体的には 10  $\mu$ M CaM 存在下で maltose binding protein を基質としたアッセイ系において、CaMKI $\alpha$  の方がより高濃度 ( $\mu$ M レンジで最大活性を持ち、カルシウム依存的な活性変化幅も大きい。) のカルシウム濃度で活性化されるのに対し、CaMKI $\gamma$  が活性化するのに必要なカルシウム濃度はより低い (数十 nM レンジで既に最大活性の 50%ほどの活性を持

つ) という事実 (鈴木 et al., 2011) と符合し、非常に興味深い。細胞が成熟してくるとこのような突起内部でのカルシウム上昇の頻度が減少してゆくという観察結果、また成熟神経細胞の軸索でのカルシウム上昇は活動電位に伴う電位依存性カルシウムチャネルの開口、および神経前終末に存在するカルシウムチャネルの確率的な開口がメインとなるという事実から、局所のカルシウム上昇を制御する発達的な仕組みが神経細胞には備わっていると予想される。L型カルシウムチャネルがサブタイプ毎に発生期神経細胞の神経細胞においてどのような生理的意義を持つのか、今後 Cav1.2, Cav1.3 の pharmacological knockout および knockdown 実験によって確かめたいと考えている。また、今回作成した pCAG-Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT は、Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT が 1:1 で発現するプローブであり、細胞内での分子数の比が 1:1 であることが保証されており、細胞間でのカルシウム濃度比較がより容易になった。また、今回の論文では活用できていないが、原理的には長期間 (数日) のイメージングも可能であることから、カルシウム活動の履歴がその後の形態変化、遺伝子発現にどのような影響を与えるかというのも大変興味深いテーマである。

#### 4.2.L型カルシウムチャネルを介したカルシウム流入の意義

L 型カルシウムチャネルを介したカルシウム流入が発生期神経細胞に与える影響について記述した論文としては、先述したニモジピンによる神経突起延長の効果を検討したのものがある。しかし今回の外来性サブユニットの発現実験で示された通り、発生期神経細胞では Cav1.2, Cav1.3 とともにカルシウム流入の能力を持つことから、今までのようなサブユニットを区別しない L 型カルシウムチャネル阻害剤による実験だけでは不十分なことがわかった。例数は少ないものの、電気生理による知見の通り Cav1.3 を発現させた細胞の方が Cav1.2 を発現させた細胞に比較してカルシウム流入能力が高いことが示唆された。このことは L 型カルシウムチャネルのサブタイプ毎に、神経突起に与える効果が異なることを予想させる。現在までに Cav1.2 と Cav1.3 を区別する方法として、今回用いた pharmacological knockout 法他に、薬剤による区別、阻害タンパク質、ノックダウンおよびノックアウトマウスといった手法が存在する。薬剤ではイスラジピンが Cav1.3 に対して比較的選択性があるものの、Cav1.2 も阻害することが知られており (Lipscombe et al., 2004)、近年開発された Cav1.3 選択的阻害剤は評価がまだ確立していない (Kang et al., 2012)。ごく最近発表されたカルシウムチャネル阻害タンパク質は、カルシウムチャネルと結合するタンパク質を強制的に膜挿入することで、チャネルの立体構造に変化をもたらし、開口特性を変化させるというデザインである (Yang et al., 2013)。リンカーの長さを調節することで

ブユニットの選択性を変えたり、薬剤により一過性に膜移行させたりすることが可能で、将来的に発展する可能性はあるものの、現時点で Cav1.2, Cav1.3 を区別するだけの選択性のあるコンストラクトは知られていない。即ち、現時点で Cav1.2, Cav1.3 を区別する最も有用な方法は本研究でも用いた pharmacological knockout および、ノックダウン、ノックアウトの系である。中でも現在得られた知見をノックダウンの系で確認することは、内在性のチャネルの寄与を確定させる意味で非常に重要と考えられる。発生期のカルシウム流入は突起形成だけでなく、神経細胞移動や遺伝子発現にも重要と考えられるため (Komuro et al., 1998; Dolmetsch et al., 2001)、シナプス形成以前での継続的、確率的なカルシウム流入がこのような現象について与える影響もとても興味深い。L型カルシウムチャネル Cav1.2 のカルシウム流入特性を変化させる (カルシウム電流を増加させる) いくつかの変異は自閉症を伴う Timothy 症候群の原因となることが知られており、発生期の神経発達と自発的カルシウム流入パターンの関係は今後取り組むべき課題の一つである。近年は Cav1.3 のカルシウム電流を増大させる変異も疾患の関連遺伝子として見つかっており (Scholl et al., 2013)、興味深いトピックであると考えられる。L型カルシウムチャネルがなぜ局所的に開口するのかというのも重要な問題点である。今回の結果は膜電位依存的な現象であることを示唆するが、開口のシナリオは複数考えられ、単純にチャネル自身の確率的な



開口の可能性もあれば、血清因子、GABA などの上流因子により局所的に小さな電位変化が起きている可能性も考えられる。今回測定の対象としたカルシウム上昇は、時間相関解析の結果から、軸索でも樹状突起でもカルシウムが上昇しやすいという「状態」が持続する可能性がある。このふるまいを説明するための機構がいくつか考えられる。1. カルシウムチャネルへの修飾により、開口特性が変化すること、2. 局所での  $IP_3$  振動などの機構が駆動されカルシウム流入が増幅されること、3. 他のタンパク質 (G タンパク質等) との相互作用により、カルシウムチャネル自身の開口特性が変化することなどが考えられる。

2. に関しては現在細胞内の  $IP_3$  レベルを下げるとされている、東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室の飯野正光先生から分与いただいた 5-phosphatase (Laxminarayan et al., 1994; Hirose et al., 1999) を用いた実験を行ったが、明らかな傾向は見られていない。3. は G タンパク質の上流となる分子は多様であるため、有力な機構であると考えられる。実際に他の細胞種では Cav1.3 が G タンパク質を介した制御を受けることがわかっている (Scholze et al., 2001)。今回の実験では検出できなかったものの、電位プローブの進歩により、局所のカルシウムチャネルを開くような神経突起に限局した電位変化が確認される可能性はある。最後に Cav1.2, Cav1.3 は成熟した大脳皮質神経細胞において異なるクラスティングパターンを示すことが知られており (Vacher et al., 2008)、

発生期神経細胞においても今回見られたような局在の違いが観察された。その分布の違いが、樹状突起、軸索、細胞体などでのカルシウム上昇パターンの違いにつながっているという仮説も考えられる。

#### 4.3. 樹状突起、軸索で異なるカルシウム制御を受ける意義

軸索の方が樹状突起に比べて累積カルシウム上昇量、カルシウム上昇振幅最大値ともに大きいという今回の知見は、樹状突起と軸索において異なる下流分子群が活性化される可能性を示唆する。樹状突起と軸索では細胞骨格をはじめとする各種分子が全く異なった様式で分布することが知られているが、局在による機能分化に加え、カルシウム上昇の違いによりさらなる機能的な分化が付け加わる可能性がある。候補分子として CaMK のようなカルシウム感受性キナーゼ、カルシニューリンなどのカルシウム依存性ホスファターゼなどが考えられる。特に当研究室でも研究されている CaMK 群は良い候補分子である。神経突起の形成に重要と思われている CaMKI $\alpha$  や CaMKI $\gamma$  はこの時期から発現しており (Takemoto-Kimura et al., 2003, 2007; Ageta-Ishihara et al., 2009)、CaMKI $\alpha$ , CaMKI $\gamma$  はそれぞれ軸索、樹状突起の伸展に寄与し、その最大活性を発揮するための至適カルシウム濃度は CaMKI $\alpha$  > CaMKI $\gamma$  である (鈴木 et al., 2011)。軸索のカルシウム流入 > 樹状突起のカルシウム流入であることを考えると、局在の制

御に加えて、CaMKI $\alpha$  や CaMKI $\gamma$  がカルシウム濃度によっても軸索と樹状突起の分化に寄与しているという仮説が立てられる。この仮説の検証には、実際に局所の CaMKI $\alpha$  および CaMKI $\gamma$  の活性と自発的カルシウム上昇との関係を測定すれば良いが、当研究室では既に活性変化に伴い、レシオ値が変化する CaMKI の YFP-CFP 型のプローブを有しており、カルシウムとその他の FRET プローブからのシグナルを同時に取得する方法も確立しているため (藤井 et al., 2008; 井上 et al., 2012; Fujii et al., 2013)、今後の検討課題の一つであると考える。

#### 4.4.細胞間、細胞内でのカルシウム濃度の比較

今回作成した Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT プローブにより、細胞間でのカルシウム濃度について比較することが可能となった。細胞内部での比較は Lck-GCaMP7 のカルシウムとの解離定数が 250 nM 程度であり、静止状態の成熟神経細胞の細胞内カルシウム濃度が概ね 50-100 nM 程度と見積もられているため、カルシウム濃度の変化を検出するには親和性が低すぎることを予想される。先行研究で使用された解離定数が 70 nM 前後の GCaMP-H を応用することでこの問題の解決を図ったが、蛍光輝度が減弱してしまい定量にまでは至らなかった。発生期神経細胞の細胞内部でもカルシウム濃度が異なるかという問題は非常に重要な課題である。静止状態でのカルシウム濃度に細胞内部でも勾配

があった場合、実験の一部解釈を変えなければならない。今回の実験ではキモグラフを作成する際に、各地点において Lck-GCaMP7 輝度が下位 20% の時系列データの平均を用いることで  $F_0$  を定義した。これは樹状突起でも軸索でも静止状態のカルシウム濃度は同程度であろうという仮定に基づいているが、これは未だかつて検証されたことはない。軸索、樹状突起の見かけ上の  $F_0$  をそれぞれ  $F_{0a}$ ,  $F_{0d}$  とする。もし、軸索の方が樹状突起に比べて基底カルシウム濃度が低いという関係 ( $F_{0a} < F_{0d}$ ) があれば、軸索の  $\Delta F/F_0$  の過大評価につながるため、軸索への「カルシウム累積上昇量が大きい、最大上昇振幅が大きい」という主張は、「軸索の方がカルシウム濃度の変動が大きい」という主張に修正しなければならない。一方で軸索の基底カルシウム濃度の方が高い場合 ( $F_{0a} > F_{0d}$ ) は、軸索と樹状突起のカルシウム上昇の差を過小評価していたことになる。いずれの場合においても、軸索と樹状突起での基底カルシウム濃度を比較しておくことは、実験結果の正確な解釈に必要な喫緊の課題と考えられるため、優先順位の高い実験である。必要に応じて数十 nM のレンジで働くレシオメトリック型の FRET プローブによる計測も考慮に入れるべきであろう (Horikawa et al., 2010)。

#### 4.5. 考慮すべき実験系の制約

今回の実験系の特徴として、子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入をしておき十分な遺伝子発現を達成した上で分散培養を行い培地内で観察すること、カルシウム活動を検出するためのプローブとして膜結合型の Lck-GCaMP7 を用いたことが挙げられる。発生期神経細胞が生体内で置かれている環境と培地では外液の環境に大きな相違がある。血清濃度の低い外液や緩衝液中では自発的カルシウム活動の頻度が低くなるため、血清成分が何らかの役割を果たしている可能性は否定できない。子宮内電気穿孔法の特徴を活かして培地内でスライスイメージングを行った際は、撮像系の制限により、十分なスピード、倍率で画像取得できなかったものの、突起に限局したカルシウム上昇が観察された (観察事項)。出生数日後の個体からのイメージングは、その前後に比べて非常に困難であるが、今後内視鏡イメージングなどの技術が進歩した場合 (Ziv et al., 2013)、シナプス形成以前のカルシウム自発的上昇が生体脳内部でも見える可能性がある。突起に限局した自発的なカルシウム上昇を今回のカルシウム活動計測の弱点として、Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT の輝度比がそのままカルシウム濃度に対応付けられない点が挙げられる。ほとんどの実験で使用した Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT の比が一定しないタイプの実験デザインでは、G/R の値そのものに意味はない。絶対的なカルシウム濃度を知らうと思えば、実験が終わるたびにイオノフォアなどで Lck-GCaMP7 の最大輝度値を確定させる必要がある。

古典的なレシオメトリック型カルシウムプローブ Fura-2 や FRET 型レシオメトリックプローブである YC3.6 などでは、バックグラウンドからの誤差による幅はあるものの、基本的には一つのレシオ値が一つのカルシウム濃度に相当する。単色型カルシウムプローブの必ず付随する問題点であるが、今回の実験では  $F_0$  を基準とした相対評価であることに留意する必要がある。今回使用したプローブのうち、Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT のように分子数の比が一定に保たれているようなデザインのプローブでは、原理上カルシウム濃度と G/R 値を一対一対応させることができるはずである。しかし、広い発現量領域で Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT が同程度の膜挿入を示すかは未知である。Lck-GCaMP7 と mCherry-KRasCT を別々に発現させた時よりは改善されているものの、その点が細胞間での基底カルシウム濃度比較の欠点であると考えられる。細胞間での比較にはレシオを取る両分子の局在が真に同じであることが保証されている、YC3.6 のような FRET 型プローブを用いるのが望ましい場面もあると考えられる。

#### 4.6. 今後の展望

自発的カルシウム活動は発生期神経細胞において見られる極めてダイナミックな現象であるが、背後には複雑な分子機構があることが想像される。軸索と

樹状突起で異なる制御を受ける等、その機能面においても興味深い。この現象の生理的意義が何であるかについては、未だ検討の余地が多く残されているが、Cav1.2, Cav1.3 の生理機能面での違いや Timothy 症候群などの疾患との関連、樹状突起と軸索との静止状態カルシウム濃度の違いなどすぐに取り組むことのできる重要な課題があり、その解決に注力する予定である。特に Timothy 症候群の疾患変異体 (Cav1.2-G402S/G406R) は既に作成しており、pharmacological knockout 法と組み合わせることで、変異体チャネルを介したカルシウム上昇がどのように異常で発生期にどのような表現型をもたらすか検討している。更に近年、Cav1.3 による神経異常を伴う疾患群も報告されてきており、その変異もカルシウムチャネルの開口特性を伴うものであることから大変興味深い。キモグラフを用いた方法では、今まで抽出不可能であったさまざまなパラメータを取得することができ、その中にはかつて記述されていなかったようなデータもあるので、組織化して整理、表示する作業も必要である。このような自発的カルシウム活動が *in vivo* でどの程度保たれていて、機能を持っているかという点も非常に興味深い。出生直後の個体でのイメージングは難しいが、内視鏡イメージングや二光子顕微鏡の技術的進歩により可能となるかもしれない。*in vivo* においても局所の L 型カルシウムチャネルを介したカルシウム流入による突起の形態制御がされていたり、軸索と樹状突起とで自発的カルシウム活動や基底

カルシウム濃度に差があったりすることが確認されれば、本研究は発生期の神経細胞の突起形成およびカルシウム動態の理解に大きく資すると考えられる。



表 1 薬剤定量データ

薬剤名	濃度	N	0-5 min	SD	P value	N	5-15 min	SD	P value	除外した細胞	備考
thapsigargin	10 $\mu$ M	8	<b>62.0%</b>	35.0%	<b>0.0197</b>	8	<b>47.0%</b>	40.0%	<b>0.0075</b>	0/8	
$\omega$ -conotoxin MVIIc	20 $\mu$ M	10	137.0%	67.0%	0.1186	10	143.0%	106.0%	0.2339	3/13	*1
ryanodine	20 $\mu$ M	6	119.0%	49.0%	0.3822	6	125.0%	66.0%	0.3965	4/10	*1
diltiazem hydrochloride	200 $\mu$ M	7	<b>21.0%</b>	23.0%	<b>0.0001</b>	7	<b>7.0%</b>	16.0%	<b>&lt;0.0001</b>	0/7	
verapamil hydrochloride	100 $\mu$ M	2	160.0%	11.0%	-	2	44.0%	4.0%	-	0/2	
calcium chloride	5 mM	4	255.0%	164.0%	0.1549	4	327.0%	231.0%	0.1442	0/4	
high potassium	20 mM	2	601.0%	325.0%	-	2	221.0%	265.0%	-	0/2	*2
TTX	1 $\mu$ M	8	124.0%	55.0%	0.2482	4	69.0%	68.0%	0.4365	0/8	*1
2-APB	10 $\mu$ M	1	70.0%	-	-	1	74.0%	-	-	0/1	
2-APB	20 $\mu$ M	1	66.0%	-	-	1	58.0%	-	-	0/1	
2-APB	100 $\mu$ M	2	153.0%	1.0%	-	2	80.0%	31.0%	-	0/2	
D-APV	50 $\mu$ M	4	138.0%	101.0%	0.5041	2	106.0%	62.0%	-	1/5	*1
CNQX	10 $\mu$ M	5	85.0%	59.0%	0.6086	5	117.0%	59.0%	0.5638	1/6	*1
Pyr3	20 $\mu$ M	4	133.0%	60.0%	0.36	3	126.0%	53.0%	0.4833	0/4	
PD153035	10 $\mu$ M	3	80.0%	15.0%	0.1419	3	66.0%	23.0%	0.1219	0/3	
ANA-12	50 $\mu$ M	3	107.0%	11.0%	0.4085	3	74.0%	27.0%	0.232	0/3	
cadmium chloride	500 $\mu$ M	9	125.0%	94.0%	0.4514	9	144.0%	160.0%	0.4385	1/10	*3
EGTA	2 mM	4	<b>3.0%</b>	1.6%	<b>&lt;0.0001</b>	4	<b>0.2%</b>	0.3%	<b>&lt;0.0001</b>	0/4	*4

\*1 細胞全体で大きなカルシウム上昇 (1 min 以上継続) した細胞を除いた。

\*2 この実験のみ DIV4 の神経細胞を用い、Tyrode 緩衝液中で行っている。

\*3 カルシウムの流入は減少したが、静止状態の細胞内カルシウム濃度上昇が起きた。

\*4 この実験では刺激後 1-250, 251-500 秒後との比を取っている。

## 引用文献

著者名、タイトル、掲載雑誌名、巻、頁、発刊年の順に記した。

- 1.N. Ageta-Ishihara, S. Takemoto-Kimura, M. Nonaka, A. Adachi-Morishima, K. Suzuki, S. Kamijo, H. Fujii, T. Mano, F. Blaeser, T. A. Chatila, H. Mizuno, T. Hirano, Y. Tagawa, H. Okuno, H. Bito, Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* 29, 13720-13729 (2009)
- 2.S. Bendahhou, M. R. Donaldson, N. M. Plaster, M. Tristani-Firouzi, Y. H. Fu, L. J. Ptacek, Defective potassium channel Kir2.1 trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *J Biol Chem* 278, 51779-51785 (2003)
- 3.H. Bito, K. Deisseroth, R. W. Tsien, CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87, 1203-1214 (1996)
- 4.J. Burrone, M. O'Byrne, V. N. Murthy, Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature* 420, 414-418 (2002)
- 5.L. Cancedda, H. Fiumelli, K. Chen, M. M. Poo, Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 27, 5224-5235 (2007)
- 6.T. W. Chen, T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, D. S. Kim, Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295-300 (2013)
- 7.Y. Chen, B. Stevens, J. Chang, J. Milbrandt, B. A. Barres, J. W. Hell, NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. *J Neurosci Methods* 171, 239-247 (2008)
- 8.K. Deisseroth, H. Bito, R. W. Tsien, Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16, 89-101 (1996)

- 9.R. E. Dolmetsch, U. Pajvani, K. Fife, J. M. Spotts, M. E. Greenberg, Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294, 333-339 (2001)
- 10.H. Fujii, M. Inoue, H. Okuno, Y. Sano, S. Takemoto-Kimura, K. Kitamura, M. Kano, H. Bito, Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKIIalpha and calcineurin. *Cell Rep* 3, 978-987 (2013)
- 11.T. M. Gomez, N. C. Spitzer, In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397, 350-355 (1999)
- 12.K. N. Hartman, S. K. Pal, J. Burrone, V. N. Murthy, Activity-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 9, 642-649 (2006).
- 13.M. He, I. Bodi, G. Mikala, A. Schwartz, Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and electrophysiological study. *J Biol Chem* 272, 2629-2633 (1997)
- 14.J. J. Hirtz, M. Boesen, N. Braun, J. W. Deitmer, F. Kramer, C. Lohr, B. Muller, H. G. Nothwang, J. Striessnig, S. Lohrke, E. Friauf, Cav1.3 calcium channels are required for normal development of the auditory brainstem. *J Neurosci* 31, 8280-8294 (2011)
- 15.G. H. Hockerman, B. Z. Peterson, B. D. Johnson, W. A. Catterall, Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 361-396 (1997)
- 16.K. Horikawa, Y. Yamada, T. Matsuda, K. Kobayashi, M. Hashimoto, T. Matsu-ura, A. Miyawaki, T. Michikawa, K. Mikoshiba, T. Nagai, Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 7, 729-732 (2010)
- 17.B. I. Hutchins, K. Kalil, Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J Neurosci* 28, 143-153 (2008)
- 18.B. I. Hutchins, L. Li, K. Kalil, Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Dev Neurobiol* 71, 269-283 (2011)

- 19.R. E. Itoh, K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, M. Matsuda, Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 22, 6582-6591 (2002)
- 20.L. Jin, Z. Han, J. Platasa, J. R. Wooltorton, L. B. Cohen, V. A. Pieribone, Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron* 75, 779-785 (2012)
- 21.T. Kanamori, M. I. Kanai, Y. Dairyo, K. Yasunaga, R. K. Morikawa, K. Emoto, Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Science* 340, 1475-1478 (2013)
- 22.S. Kang, G. Cooper, S. F. Dunne, B. Dusel, C. H. Luan, D. J. Surmeier, R. B. Silverman, CaV1.3-selective L-type calcium channel antagonists as potential new therapeutics for Parkinson's disease. *Nat Commun* 3, 1146 (2012)
- 23.J. H. Kim, S. R. Lee, L. H. Li, H. J. Park, J. H. Park, K. Y. Lee, M. K. Kim, B. A. Shin, S. Y. Choi, High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6, e18556 (2011)
- 24.H. Komuro, P. Rakic, Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations. *J Neurobiol* 37, 110-130 (1998)
- 25.J. M. Kralj, A. D. Douglass, D. R. Hochbaum, D. Maclaurin, A. E. Cohen, Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nat Methods* 9, 90-95 (2012)
- 26.D. Lipscombe, T. D. Helton, W. Xu, L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 92, 2633-2641 (2004)
- 27.D. Ma, X. D. Tang, T. B. Rogers, P. A. Welling, An andersen-Tawil syndrome mutation in Kir2.1 (V302M) alters the G-loop cytoplasmic K<sup>+</sup> conduction pathway. *J Biol Chem* 282, 5781-5789 (2007)

- 28.J. S. Marvin, B. G. Borghuis, L. Tian, J. Cichon, M. T. Harnett, J. Akerboom, A. Gordus, S. L. Renninger, T. W. Chen, C. I. Bargmann, M. B. Orger, E. R. Schreiter, J. B. Demb, W. B. Gan, S. A. Hires, L. L. Looger, An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods* 10, 162-170 (2013)
- 29.K. Mikoshiba, IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 102, 1426-1446 (2007)
- 30.A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887 (1997)
- 31.J. Nakai, M. Ohkura, K. Imoto, A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137-141 (2001)
- 32.M. Ohkura, T. Sasaki, J. Sadakari, K. Gengyo-Ando, Y. Kagawa-Nagamura, C. Kobayashi, Y. Ikegaya, J. Nakai, Genetically encoded green fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators with improved detectability for neuronal Ca<sup>2+</sup> signals. *PLoS One* 7, e51286 (2012)
- 33.T. Saito, N. Nakatsuji, Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev Biol* 240, 237-246 (2001)
- 34.U. I. Scholl, G. Goh, G. Stolting, R. C. de Oliveira, M. Choi, J. D. Overton, A. L. Fonseca, R. Korah, L. F. Starker, J. W. Kunstman, M. L. Prasad, E. A. Hartung, N. Mauras, M. R. Benson, T. Brady, J. R. Shapiro, E. Loring, C. Nelson-Williams, S. K. Libutti, S. Mane, P. Hellman, G. Westin, G. Akerstrom, P. Bjorklund, T. Carling, C. Fahlke, P. Hidalgo, R. P. Lifton, Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet* 45, 1050-1054 (2013)
- 35.A. Scholze, T. D. Plant, A. C. Dolphin, B. Nurnberg, Functional expression and characterization of a voltage-gated CaV1.3 (alpha1D) calcium channel subunit from an insulin-secreting cell line. *Mol Endocrinol* 15, 1211-1221 (2001)
- 36.C. Seisenberger, V. Specht, A. Welling, J. Platzter, A. Pfeifer, S. Kuhbandner, J. Striessnig, N. Klugbauer, R. Feil, F. Hofmann, Functional embryonic cardiomyocytes

after disruption of the L-type  $\alpha_1C$  (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275, 39193-39199 (2000)

37.E. Shigetomi, X. Tong, K. Y. Kwan, D. P. Corey, B. S. Khakh, TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 15, 70-80 (2012)

38.N. C. Spitzer, Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444, 707-712 (2006)

39.H. Tabata, K. Nakajima, Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* 103, 865-872 (2001).

40.S. Takemoto-Kimura, N. Ageta-Ishihara, M. Nonaka, A. Adachi-Morishima, T. Mano, M. Okamura, H. Fujii, T. Fuse, M. Hoshino, S. Suzuki, M. Kojima, M. Mishina, H. Okuno, H. Bito, Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI $\gamma$ . *Neuron* 54, 755-770 (2007).

41.S. Takemoto-Kimura, H. Terai, M. Takamoto, S. Ohmae, S. Kikumura, E. Segi, Y. Arakawa, T. Furuyashiki, S. Narumiya, H. Bito, Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CaMKI $\gamma$ , a novel membrane-anchored neuronal  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). *J Biol Chem* 278, 18597-18605 (2003).

42.F. Tang, E. W. Dent, K. Kalil, Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci* 23, 927-936 (2003)

43.F. Tang, K. Kalil, Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *J Neurosci* 25, 6702-6715 (2005).

44.H. Tsutsui, S. Karasawa, Y. Okamura, A. Miyawaki, Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat Methods* 5, 683-685 (2008)

- 45.H. Vacher, D. P. Mohapatra, J. S. Trimmer, Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* 88, 1407-1447 (2008)
- 46.W. Xu, D. Lipscombe, Neuronal Ca(V)1.3 $\alpha$ (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21, 5944-5951 (2001)
- 47.W. Xu, D. Lipscombe, Neuronal Ca(V)1.3 $\alpha$ (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21, 5944-5951 (2001)
- 48.T. Yang, L. L. He, M. Chen, K. Fang, H. M. Colecraft, Bio-inspired voltage-dependent calcium channel blockers. *Nat Commun* 4, 2540 (2013)
- 49.H. Zhang, Y. Fu, C. Altier, J. Platzer, D. J. Surmeier, I. Bezprozvanny, Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3 neuronal L-type calcium channels: differential targeting and signaling to pCREB. *Eur J Neurosci* 23, 2297-2310 (2006)
- 50.Y. Ziv, L. D. Burns, E. D. Cocker, E. O. Hamel, K. K. Ghosh, L. J. Kitch, A. El Gamal, M. J. Schnitzer, Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. *Nat Neurosci* 16, 264-266 (2013)
- 51.井上昌俊 博士論文「長期記憶をコードするシナプスから核への神経情報伝達動態解析」
- 52.鈴木敢三 博士論文「発達期大脳皮質神経細胞の樹状突起形成におけるカルシウム/カルモデュリン依存性蛋白リン酸化酵素 I $\gamma$  活性化の分子機構の解明」
- 53.藤井哉 博士論文「ポストシナプスにおける分子動態の総合イメージング」

# 図 説



## 図1 発生期神経細胞のカルシウム活動を取り巻く問題

発生期神経細胞の神経突起内部では自発的なカルシウム活動が起こることが以前より知られていたが、プローブの性能等の技術的制約により、その時空間パターンや樹状突起と軸索での制御機構の違いなどはわかっていなかった。また、自発的カルシウム活動のソースやカルシウム活動の果たす機能についても不明な部分がある（赤枠内の課題）。膜結合型GCaMPとキモグラフ（後述）をベースとした新しい解析手法によりこの課題に取り組むことができる（青枠内の方法）。

## 発生期大脳皮質神経細胞

樹状突起

### **QUESTION**

局所的な自発的Ca<sup>2+</sup>活動の

- 時空間パターンはどうなっているか？
  - Ca<sup>2+</sup>の源と活動の生理的意義は？
  - 樹状突起と軸索で制御は異なるか？
- よくわかっていない

膜結合型のGCaMP  
キモグラフに基づいた解析

### **NEW METHODS**

軸索

## 図2 発生期大脳皮質2/3層神経細胞への遺伝子導入方法 および画像取得に用いた光学系の説明

### A: マウス胎児脳への子宮内電気穿孔法の概略

妊娠15日目ICRマウスを麻酔下開腹し、子宮内胎児の脳室にガラスピペットを用いてDNA溶液を注入する。注入後、電気穿孔装置を用いて amplitude 45 mV, duration 50 ms, interval 1 s のパルスを一セット、合計10回加える（左図:赤矢印はDNAが引き寄せられる方向であり、紙面左側の脳室にプラスミド溶液が注入されているとすると、紙面左上の皮質（+極側）に遺伝子導入される）。妊娠18日目まで飼育後、解剖し大脳半球を取り出す。トランスフェクションマーカの赤色蛍光タンパク質の蛍光を頼りに、遺伝子導入された半球を回収、分散し、PDLコートしておいたガラスボトムディッシュ上で培養する（右図）。

### B: 画像取得に用いた光学系

キセノンランプ光源DG-4からの励起光は減光用のNDフィルターおよび、GCaMP用、mCherry用の励起フィルターを通過後、対物レンズを通じ、サンプル中の蛍光タンパク質を励起する。サンプル中の蛍光タンパク質から発せられた蛍光は、ダイクロイックミラーで反射され、観察用の光路に進む。励起フィルター切り替えと同期した蛍光フィルター切り替えをMAC5000により機械的に行い、蛍光フィルターを通過した蛍光は最終的にEM-CCDカメラC9100-12へと到達する。

サンプルは東海ヒット製のステージインキュベーター内で37°C, 5% CO<sub>2</sub>の環境を保ちながら観察した。サンプルをインキュベーター内に置いたまま薬剤添加できるように、ガラスボトムディッシュの蓋に翼状針を取り付けた薬剤添加装置を取り付けてイメージングし、全ての撮像はAQUACOSMOSの制御下で行った。

励起光源: DG-4

励起フィルター: GCaMP 474/23 nm, mCherry 575/15 nm

ダイクロイックミラー: 51019bs

対物レンズ: 60 × 油浸レンズ

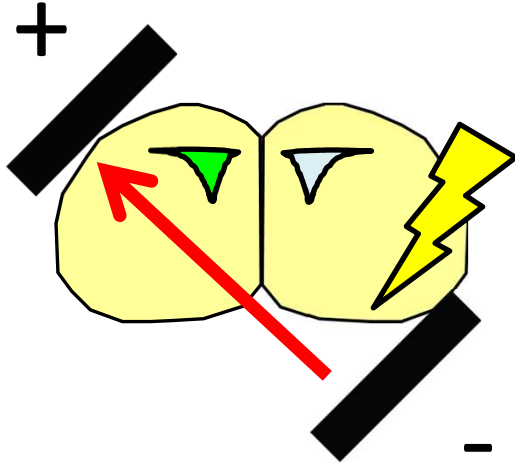
蛍光フィルター: GCaMP 520/28 nm, mCherry 630/75 nm

蛍光フィルター切り替え装置: MAC5000

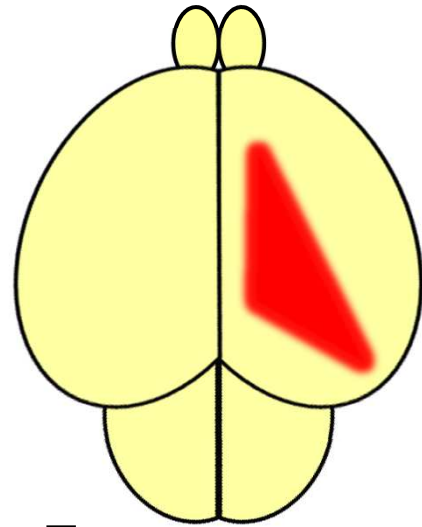
カメラ: EM-CCD C9100-12

A

振幅 45 mV, 長さ 50 ms,  
間隔 1s x10 セット

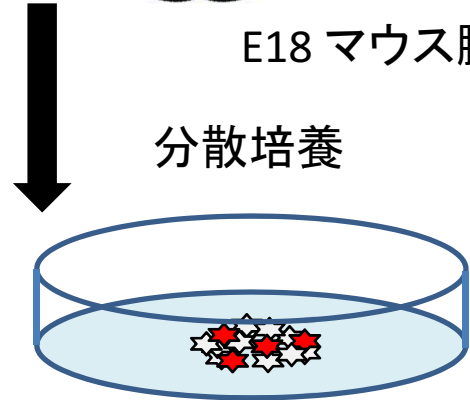


将来の  
大脳皮質2/3層に  
選択的な遺伝子導入

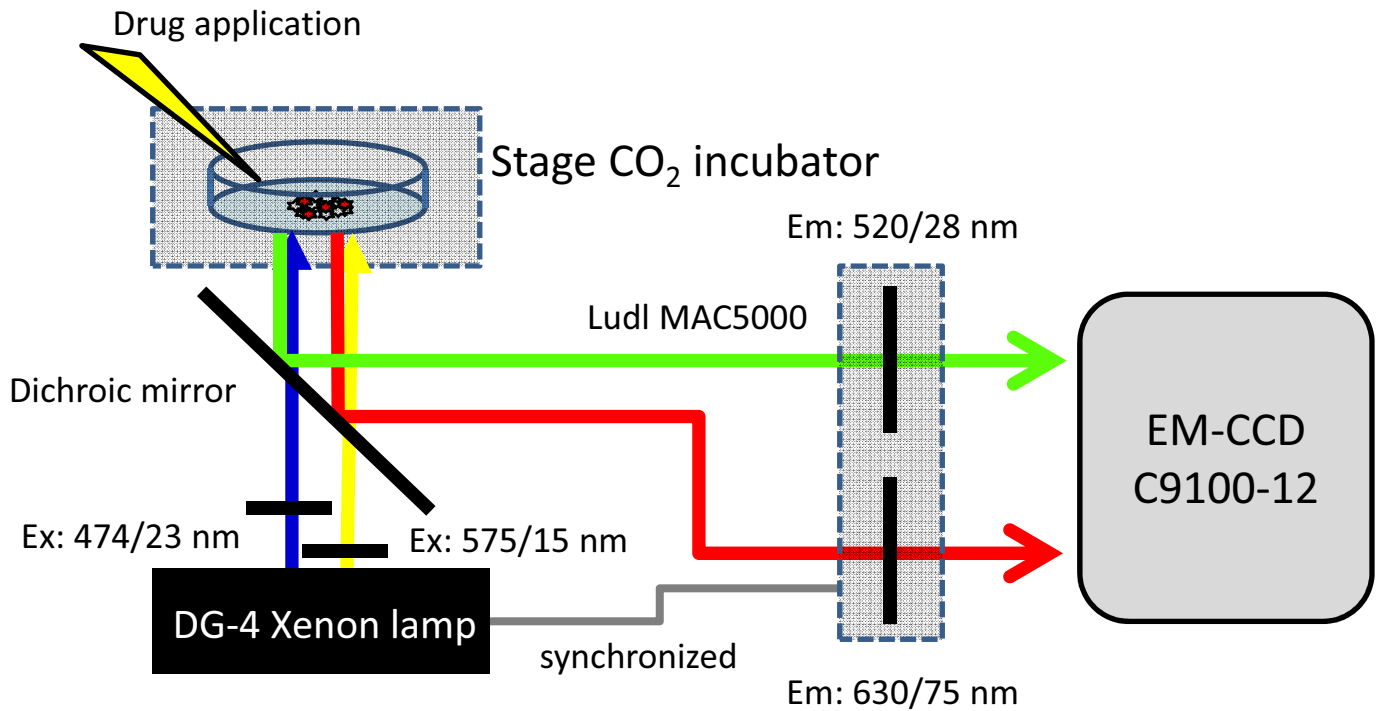


E18 マウス脳

分散培養



B



### 図3 Lck-GCaMP7の構造と利点

#### A: LckのN末端ペプチド27残基のアミノ酸配列

翻訳中に青字のグリシン残基においてN-ミリスチル化修飾を受け、赤字のシステイン残基においてもパルミトイル化修飾を受けることで細胞膜に不可逆的に局在する。

#### B: Lck-GCaMP7の一次構造

N末端側からLckのN末端配列, MLCK-M13配列, EGFP C-half, EGFP N-half, CaMの順に並ぶ。

#### C: 細胞質型、膜結合型GCaMP7の比較

左: 神経突起におけるGCaMP7発現模式図。軸索に直交する二重破線部での断面を示す。

右: 左図二重破線部での断面の模式図。細胞質型のGCaMP7では分子数が局所の体積に比例するのに対し、膜結合型のLck-GCaMP7では分子数が局所の表面積に比例する。緑の楕円はGCaMP7分子のイメージ。

#### D: 発生期神経細胞における細胞質型、膜結合型GCaMP7の蛍光像

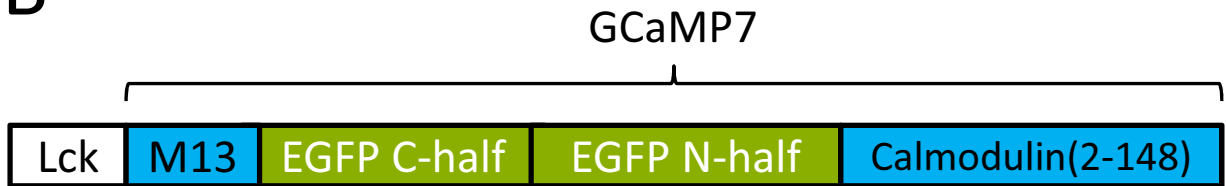
左: pCAG-GCaMP7を子宮内電気穿孔法で発現させたDIV 2神経細胞、  
右: 同様にpCAG-Lck-GCaMP7を発現させたDIV 2神経細胞 (スケールバー 20  $\mu\text{m}$ )

A

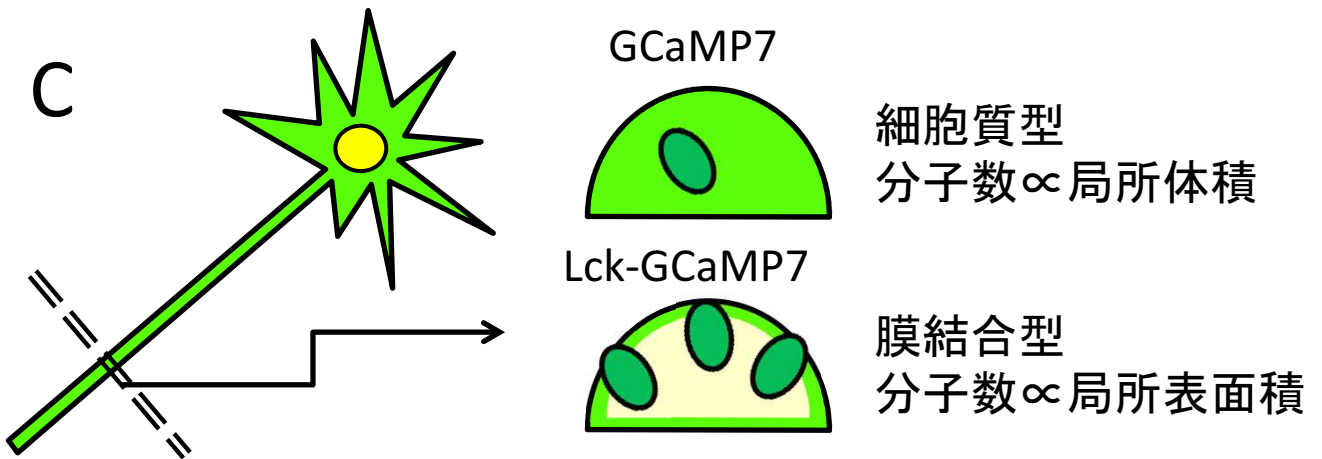
MGCGCSSNPEDDWMENIDVCENCHYPD

(G:N-myristoylation, C:palmitoylated cysteine)

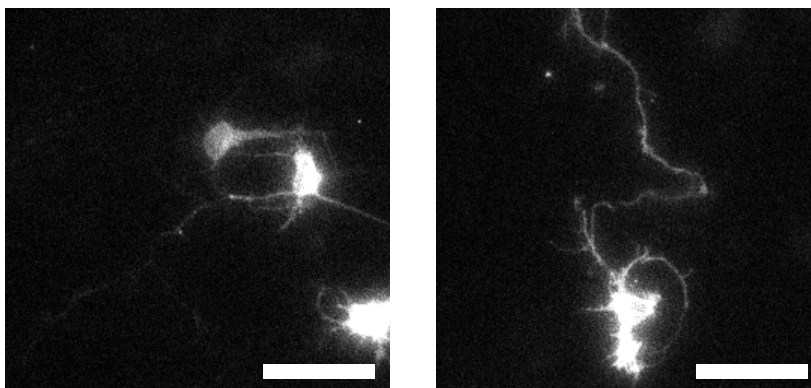
B



C



D



GCaMP7

Lck-GCaMP7

## 図4 Lck-GCaMP7による発生期神経細胞イメージング例とキモグラフの概念図

### A: DIV 2神経細胞におけるLck-GCaMP7イメージングの実例

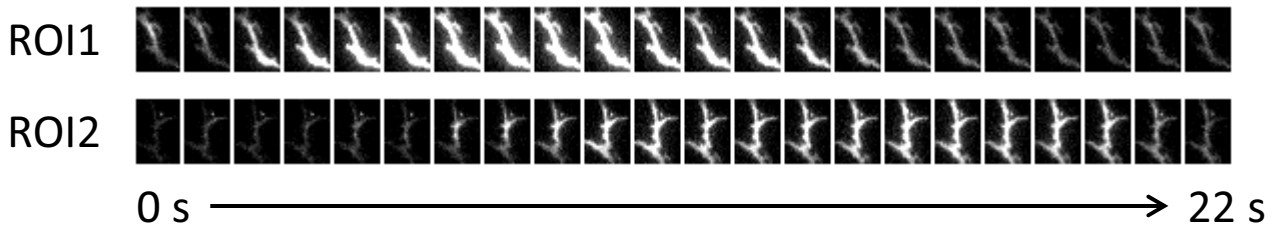
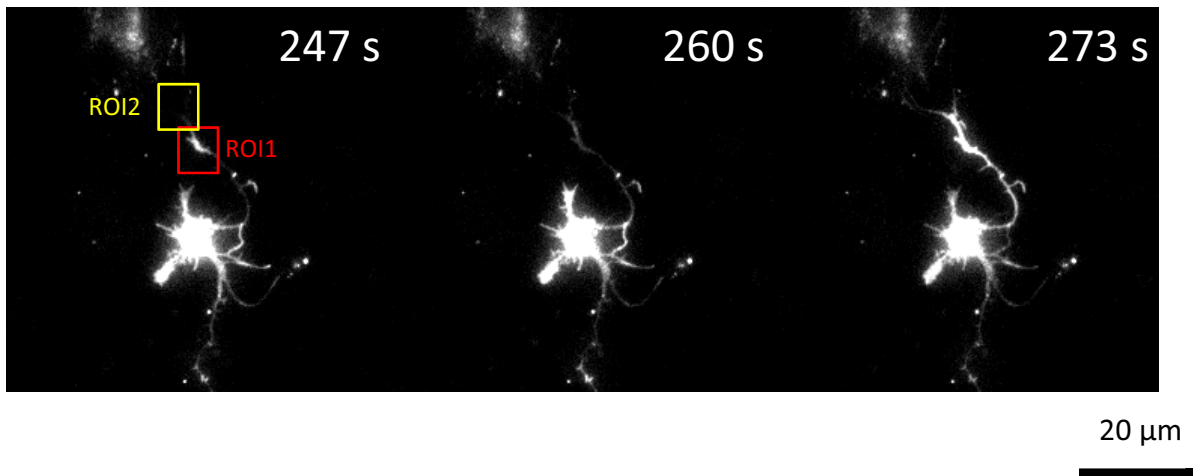
上図: ライブイメージングからのキャプチャー画像  
13秒おきに三枚のLck-GCaMP7蛍光画像を示す。赤枠、黄枠が下図のROI1, ROI2である。

下図: 拡大図  
設定したROIの内部の蛍光変化を抜き出したもの。1秒おきの画像を左から右に並べている。

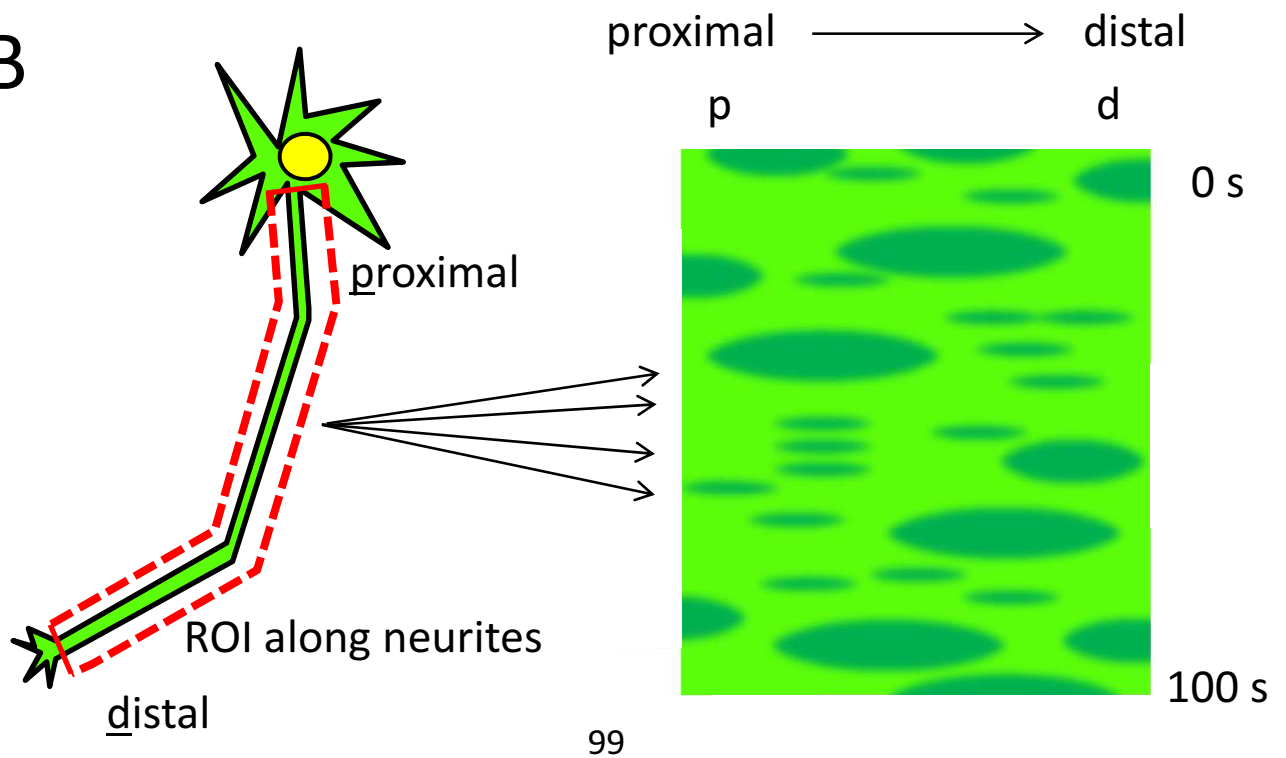
### B: キモグラフの概念図

神経細胞の突起に沿って折れ曲がったROIを設ける。各ROIには方向性があり、ROI内部では常に近位から遠位に向かうように設定する (proximal → distal)。ROIには六ピクセル分の幅があり、撮像期間全体を通じて突起がROIからはみ出さないように設定した。撮像期間中の各時点でのROI内部での蛍光輝度が一次元データ (図では横方向に対応) として得られるので、それを時系列順に縦方向に並べると、蛍光輝度の時空間パターンを表すことができる (縦軸: 時間、横軸: 空間座標)。これを「生きモグラフ」と呼ぶ。右図は「生きモグラフ」の概念図で、ここでは緑が濃いほど蛍光輝度が大きいことを示す。このプローブがGCaMPであったとすると、同じ地点 (縦方向) で見た場合に輝度が高いほどカルシウム流入が多いといえるが、局所のプローブ存在量が異なり、このままでは地点間の比較ができないため、図5で示すような加工が必要となる。

A



B





## 図5 キモグラフの作成方法の説明

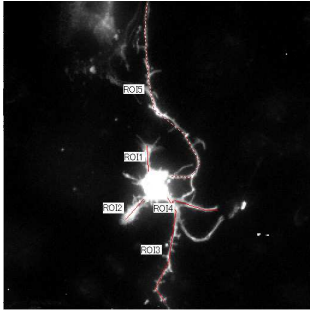
### A: 実際のROI設定例

図のように神経突起（軸索、樹状突起両者を含む）に沿ってROIを設定する。それぞれのROIの内部では、左側が近位になるような向きになるように方向付けする。

### B: 解析に用いるキモグラフへの加工

一つの神経細胞の複数の突起から作成した左図の「生キモグラフ」を結合し、その蛍光輝度が時間的な指数減衰に従うと仮定して補正する。各空間地点 $x$ における補正後の蛍光輝度値下位20%の平均を $F_0(x)$ とする。この値 $F_0(x)$ は空間地点毎に異なる値である。求めた各地点 $x$ の $F_0(x)$ を元に、地点 $x$ での蛍光輝度 $F(x)$ を $\Delta F/F_0 = (F(x) - F_0(x))/F_0(x)$ の式によりレシオ化する。この時、 $\Delta F/F_0$ が負の値を示す点についてはその値を0に置き換えて解析に進んだ。この加工が済んだ画像を「キモグラフ」と呼ぶ（縦軸: 時間、横軸: 空間座標）。上の青矢印はキモグラフを生成するのに使った各突起を示す。一本の矢印が一本の突起に相当し、矢印の先側が遠位。番号は各ROIに対応。

A



無細胞領域の蛍光輝度をもとに背景減算  
神経突起に沿ってROIを設定する

25  $\mu$ m

B



生のキモグラフ

ROI番号



画像を結合し、  
指数関数的な減衰  
を仮定して退色補正

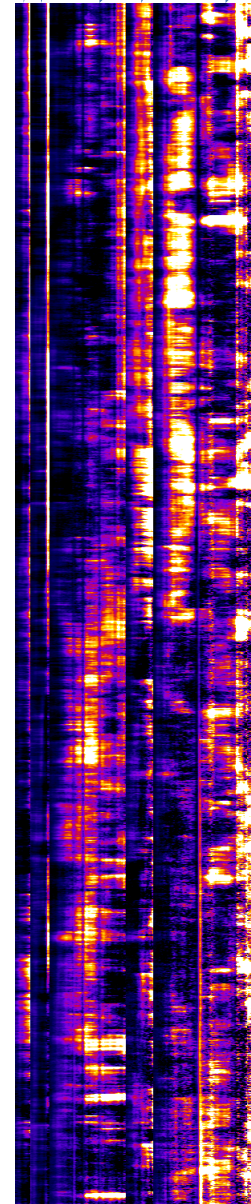
地点xの蛍光輝度  
下位20%の平均  
を $F_0(x)$ と定義

$\Delta F/F_0 =$   
 $(F(x) - F_0(x))/F_0(x)$   
の式でレシオ化

1 min  
20  $\mu$ m

101

1 2 3 4 5  
→ → → →



キモグラフ

$\Delta F/F_0$   
200%  
0%

1 min  
20  $\mu$ m

## 図6 種々のカルシウムプローブを用いたキモグラフの作成 (DIV 2大脳皮質神経細胞)

A: Lck-GCaMP7 (膜結合型) およびGCaMP7 (細胞質型) で作成したキモグラフの比較

B: Lck-GCaMP-H (CaMKK $\alpha$ のCaM結合ペプチドを使用したカルシウムプローブ) で作成したキモグラフ

C: Lck-GCaMP6mおよびLck-GCaMP6sで作成したキモグラフ (スケールバー、カラーバーは全て共通)

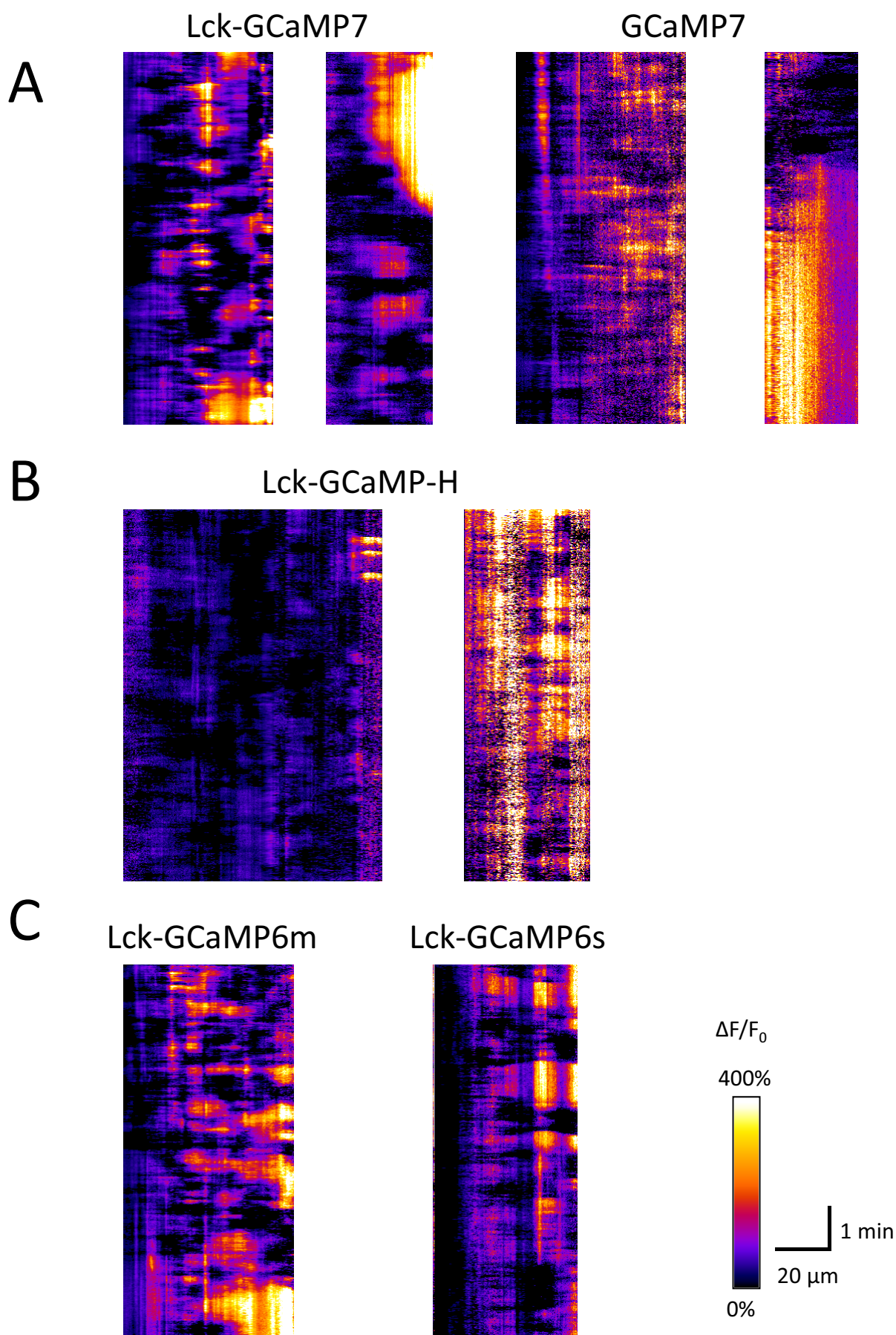


図7 プレーティング4時間後, 6時間後の細胞での自発的カルシウム活動およびDIV 2神経細胞の代表的なカルシウム上昇パターン

A: プレーティング4時間後, 6時間後の神経細胞でのLck-GCaMP7イメージング

上図: 4時間後の細胞。矢頭はカルシウムが上昇する部分を示す。

下図: 6時間後の細胞。矢頭はカルシウムが上昇する部分を示す。

B: Lck-GCaMP7を発現したDIV 2神経細胞のキモグラフ拡大図

左図: 時間的に密集して発生したカルシウム上昇

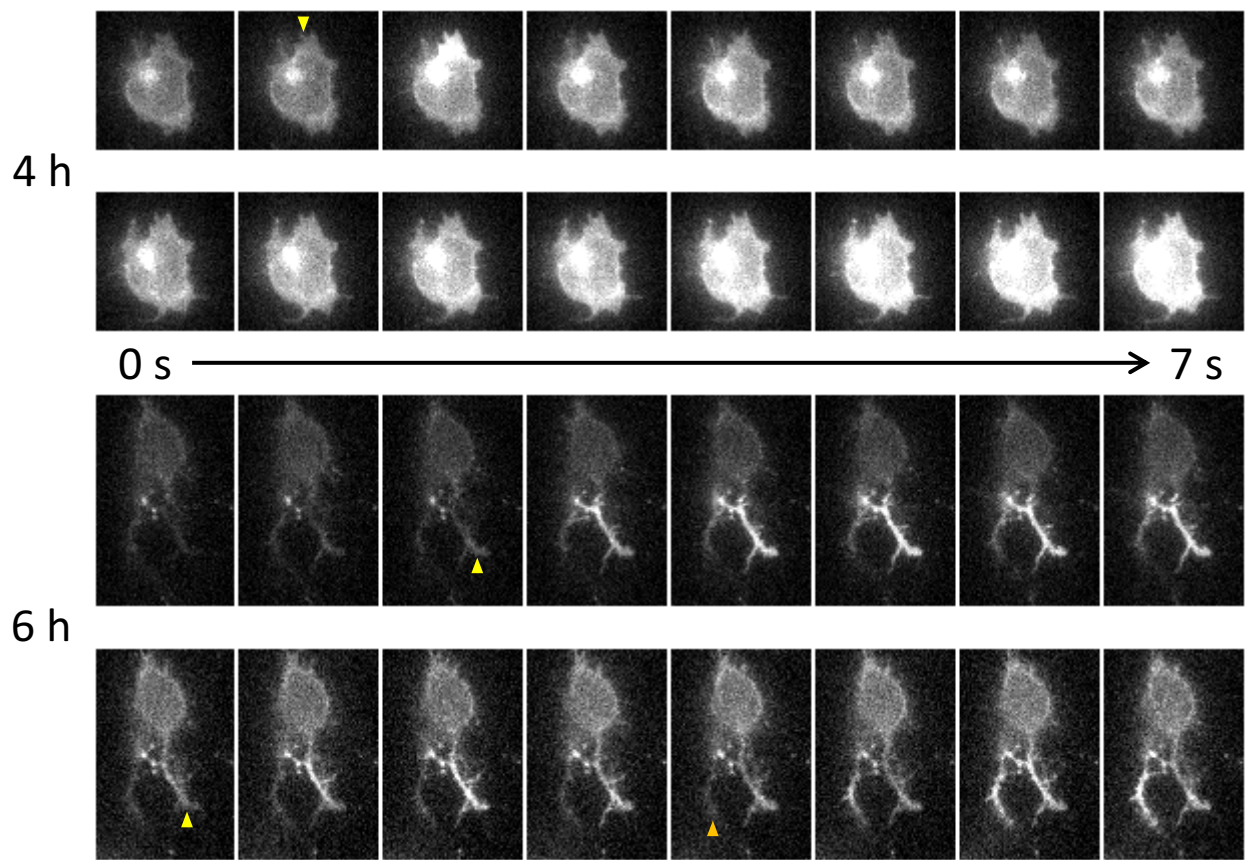
カルシウム濃度が局所で振動的に変化する様子を示す。

右図: 孤立したカルシウム上昇

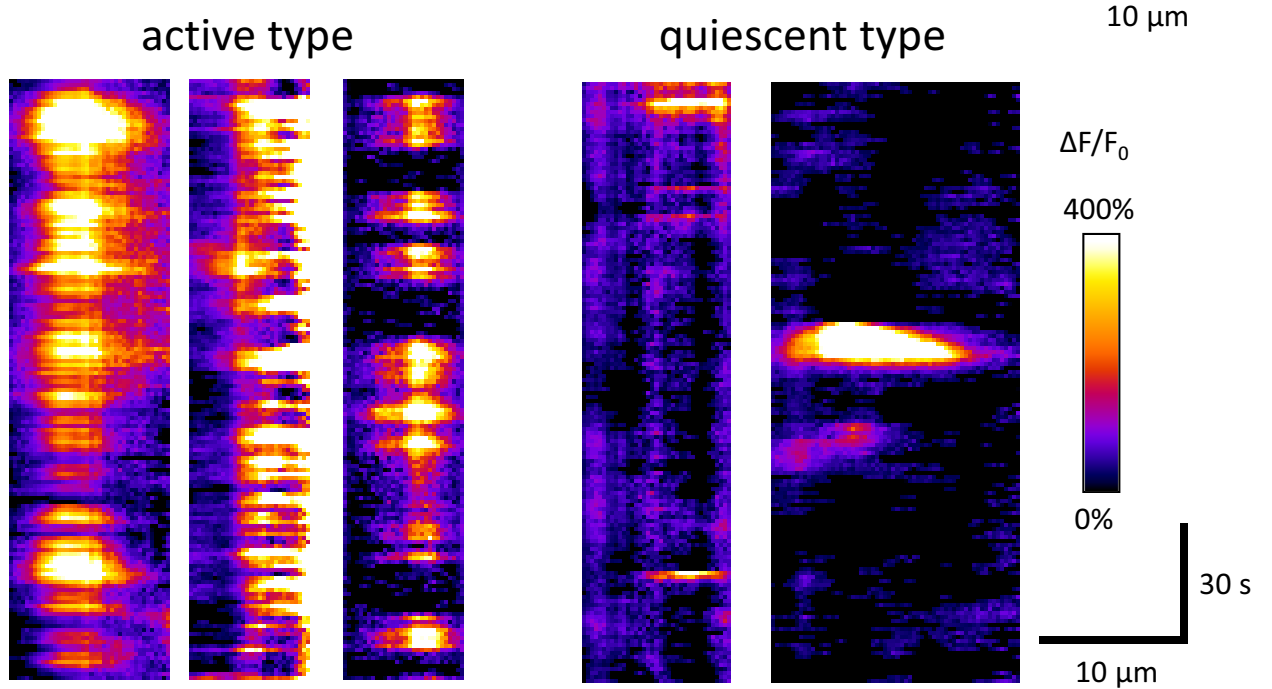
カルシウム濃度の振動のない例を示す。



A



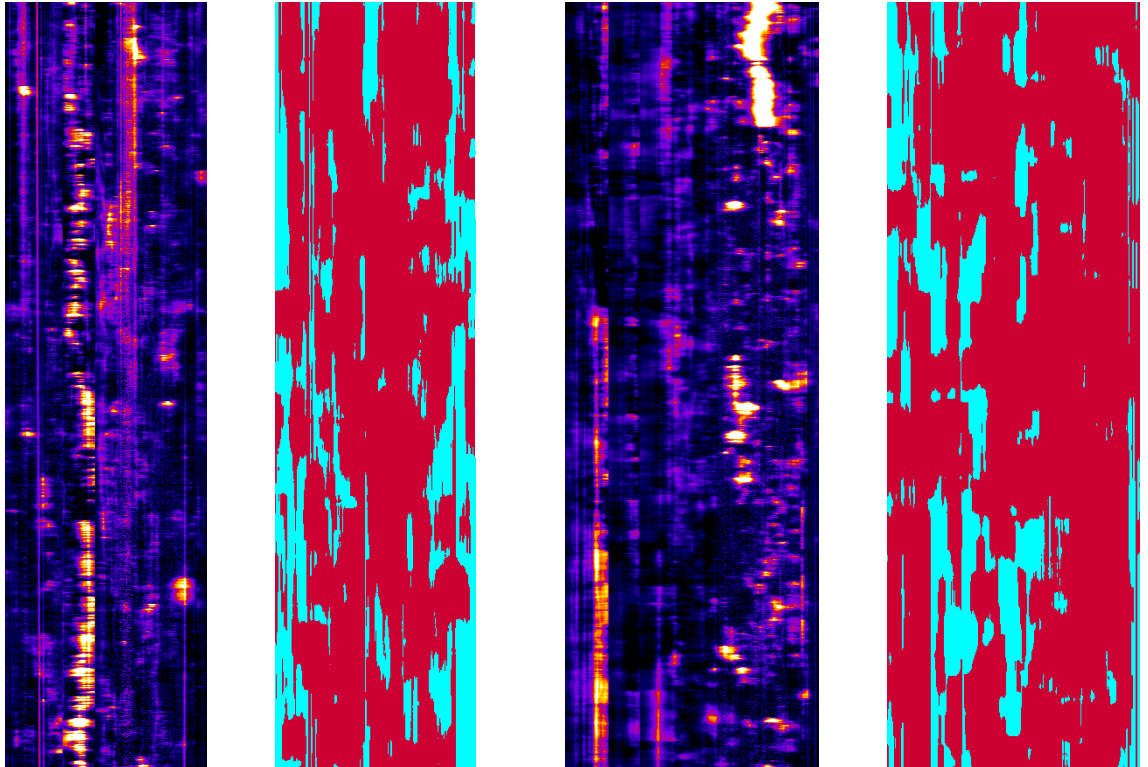
B



## 図7 プレーティング4 時間後, 6 時間後の細胞での自発的カルシウム活動およびDIV 2神経細胞の代表的なカルシウム上昇パターン

C: カルシウムが時間的に集中して流入する期間があることを示す図  
DIV 2神経細胞から取得したキモグラフに対し、カルシウム上昇の閾値を40%に設け、直近60秒間に10秒間以上の上昇がある場合をactiveとして赤で、10秒に満たない場合をquiescentとして水色で示した。二細胞分のデータを示す。

C



Red: active state  
Blue: quiescent state

$\Delta F/F_0$

400%



0%

1 min

20  $\mu\text{m}$



## 図8 樹状突起、軸索でのカルシウム上昇量比較

### A: 細胞間でのカルシウム上昇量比較

左図: DIV 2神経細胞樹状突起、軸索間での単位長さ、単位時間あたりカルシウム上昇量の比較

(各点が各細胞の平均値に対応: 横棒は全体の平均値)

(dendrite:  $N = 41$ ,  $\text{mean} = 0.5002$ ,  $\text{SD} = 0.2522$ , axon:  $N = 47$ ,  $\text{mean} = 0.7235$ ,  $\text{SD} = 0.4465$ ,  $P = 0.009$ , Mann-Whitney test)

右図: DIV 2神経細胞樹状突起、軸索間でのカルシウム上昇振幅上位5%の平均の比較

(各点が各細胞の平均値に対応: 横棒は全体の平均値)

(dendrite:  $N = 41$ ,  $\text{mean} = 1.693$ ,  $\text{SD} = 1.052$ , axon:  $N = 47$ ,  $\text{mean} = 2.649$ ,  $\text{SD} = 1.743$ ,  $P = 0.0023$ , Mann-Whitney test)

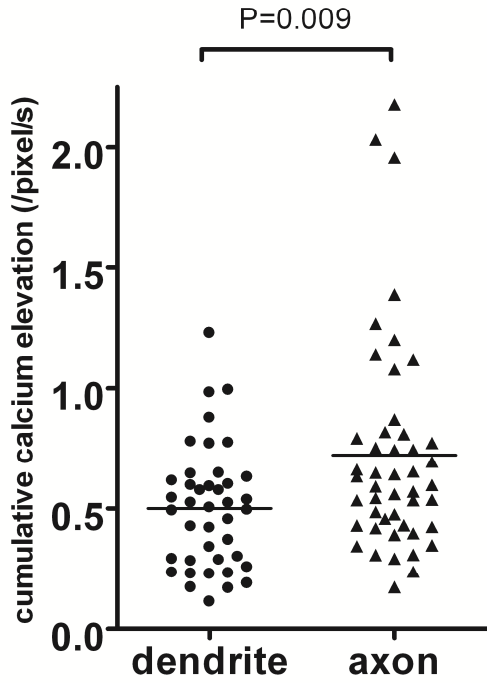
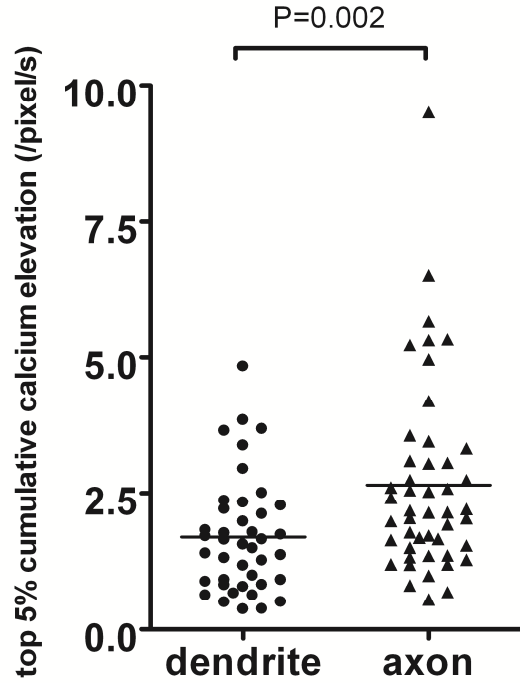
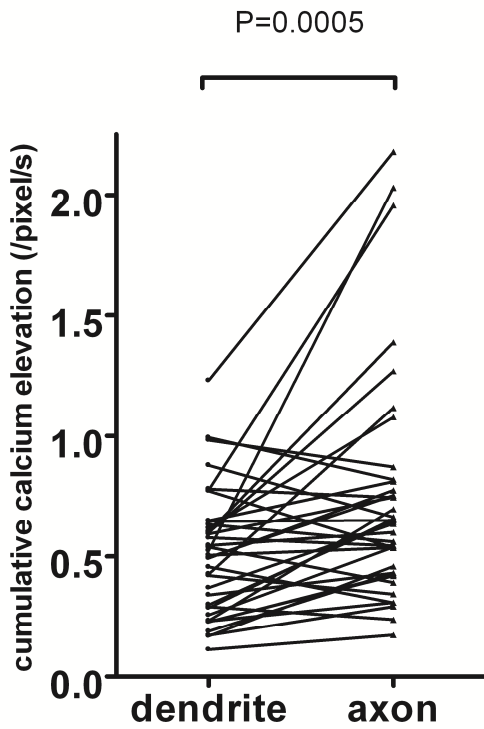
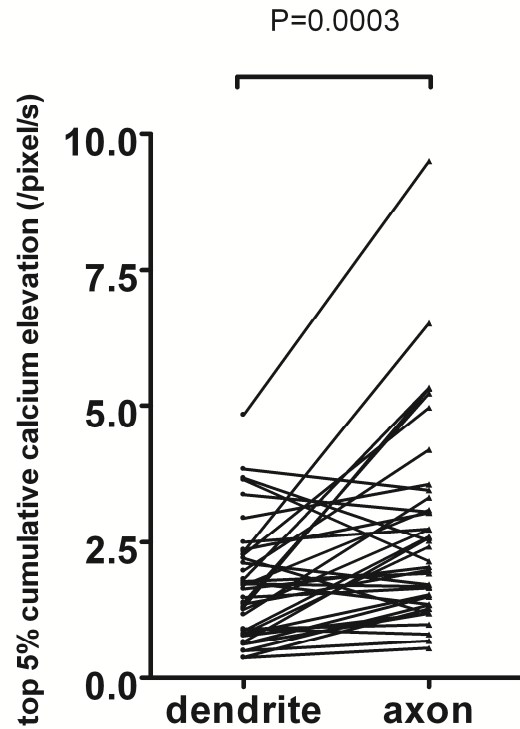
### B: 同一細胞内でのカルシウム上昇量比較

左図: DIV 2神経細胞での単位長さ、単位時間あたりカルシウム上昇量の比較 (線で結ばれた二点は同一細胞の樹状突起、軸索のペアを示す。横棒は全体の平均値)

( $N = 38$ ,  $P = 0.0005$ , Wilcoxon signed rank test)

右図: DIV 2神経細胞でのカルシウム上昇振幅上位5%の平均の比較 (線で結ばれた二点は同一細胞の樹状突起、軸索のペアを示す。横棒は全体の平均値)

( $N = 38$ ,  $P = 0.0003$ , Wilcoxon signed rank test)

**A** $\text{Ca}^{2+}$  elevation dendrite vs axontop 5%  $\text{Ca}^{2+}$  elevation dendrite vs axon**B** $\text{Ca}^{2+}$  elevation dendrite vs axontop 5%  $\text{Ca}^{2+}$  elevation dendrite vs axon

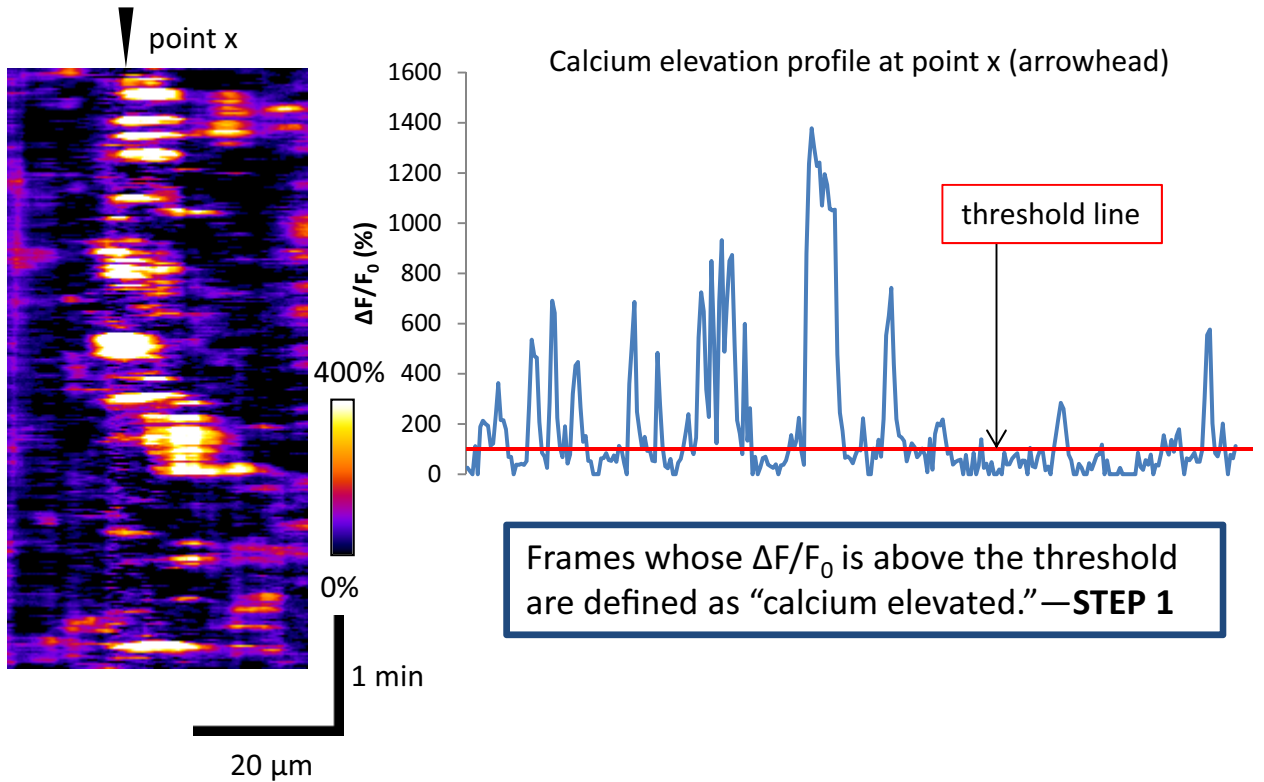
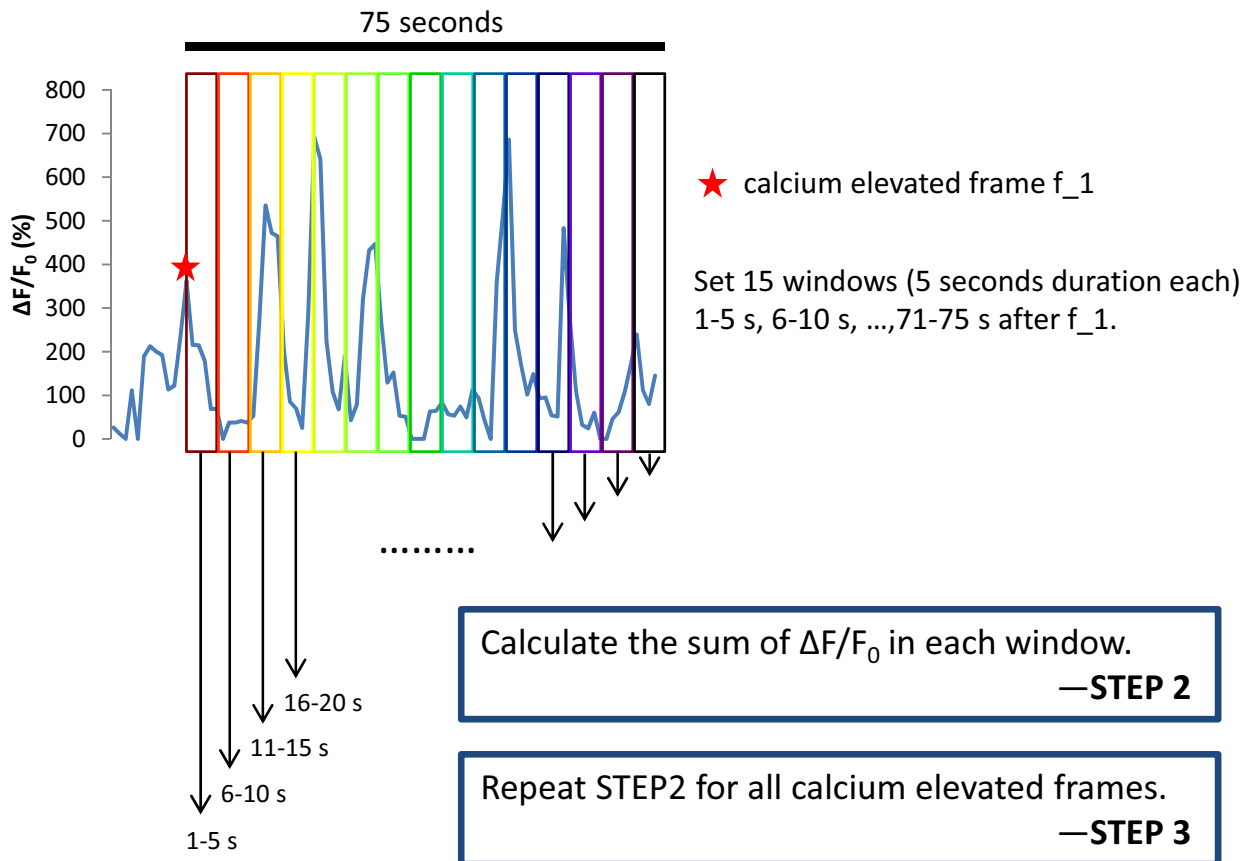
## 図9 時間相関解析の方法

### A: 地点xにおけるカルシウム上昇フレームの検出

キモグラフ（左図）からある地点xでのカルシウム上昇の時系列データを取得する。 $\Delta F/F_0$ に閾値を設定し、閾値以上に上昇したフレームを「カルシウム上昇」と定義する（手順1）。

### B: カルシウム上昇に対応したウインドウの設定とウインドウ内 $\Delta F/F_0$ の和の算出

手順1で検出されたそれぞれのカルシウム上昇フレームにつき、その1-5秒後、6-10秒後、…、71-75秒後というように5秒刻みのウインドウを15個設ける。例で示すように赤星印で示されたカルシウム上昇フレームを基準とし、各色で示した5秒刻みのウインドウを設け、その内部での $\Delta F/F_0$ の和を計算する（手順2）。この操作をある地点で検出されたN回のカルシウム上昇フレームに対して繰り返し、地点xについてのカルシウム上昇フレームの1-5秒後、6-10秒後、…、71-75秒後のそれぞれのウインドウ内での $\Delta F/F_0$ の和の平均値を算出する（手順3）。

**A****B**

## 図9 時間相関解析の方法（続き）

C: カルシウム上昇と対応のないウインドウの設定とウインドウ内  $\Delta F/F_0$  の和の算出

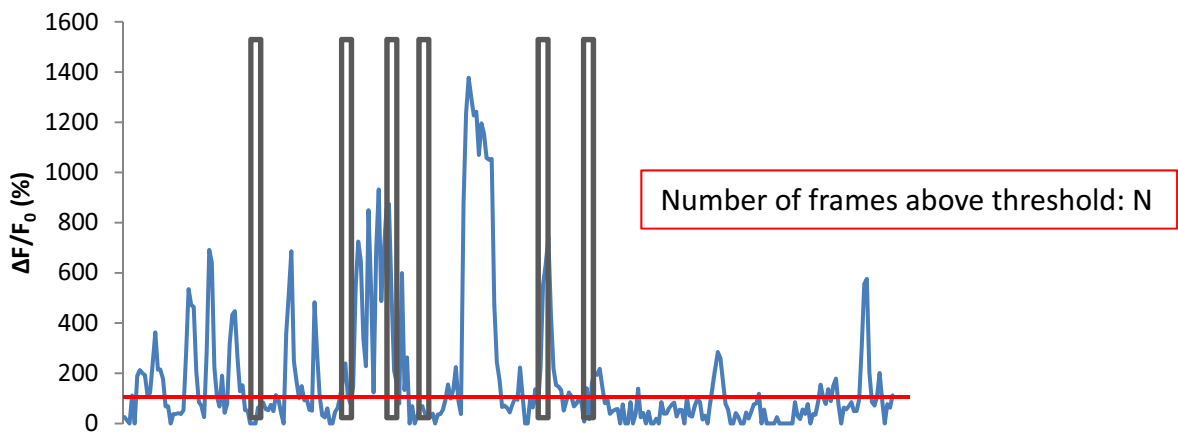
手順3で計算されたカルシウム上昇後のウインドウ内の  $\Delta F/F_0$  平均値は実測値であるが、カルシウムイベントの起きた時間に関係なくウインドウを設定した場合に期待される平均値を算出する。手順1で検出されたカルシウム上昇フレーム数が  $N$  であったとすると、カルシウム上昇の有無に関係なく、全フレーム数  $N_0$  枚中  $N$  枚をランダムに選択し、それぞれのフレームから5秒間のウインドウを設け、内部の  $\Delta F/F_0$  の和を計算して平均の  $\Delta F/F_0$  を見積もる。この作業を2000回繰り返し期待される平均値とする（手順4）。

D: カルシウム上昇の濃縮比の算出

手順4まででカルシウム上昇に対応して設定したウインドウでの実際の観測値と、カルシウム上昇に対応させない場合に期待される観測値が計算された。（実測値/期待値）を計算すると、ランダムな場合に比べてどの程度カルシウムが上昇しやすいかの指標となる。これを **enriched ratio**（濃縮比）と定義する（手順5）。ある地点  $x$  についての濃縮比を右図に示す。この地点ではウインドウ番号5番（21-25秒後に相当）までカルシウム流入がランダムの場合より1.5倍以上上昇しやすくなっている。

E: 全空間地点への拡張

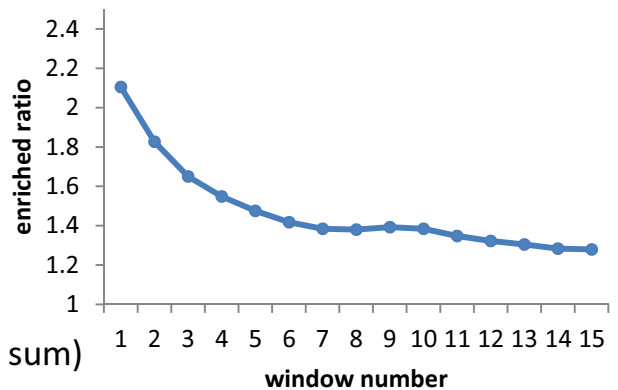
手順5までで、ある地点  $x$  におけるカルシウム活動濃縮比を算出することができた。この手順1-5をキモグラフ上の全ての空間地点について繰り返す（手順6）。

**C**

Set 'N' 5-second windows at random without complete overlap. Repeat this 2,000 times and calculate the expected sum of  $\Delta F/F_0$ .—STEP 4

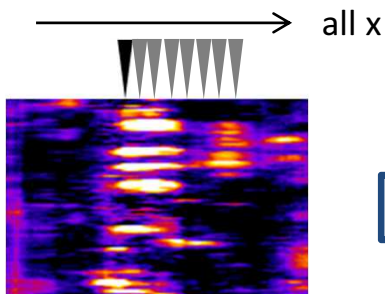
**D**

(Observed sum)

 $l_1, l_2, l_3, l_4, l_5, l_6, l_7, l_8, l_9, l_{10}, l_{11}, l_{12}, l_{13}, l_{14}, l_{15}$   
 —STEP 3


Enriched ratio = (observed sum)/(expected sum)

Enriched ratio is defined as observed sum divided by expected sum.—STEP 5

**E**

Repeat STEP 1-5 for all points.—STEP 6

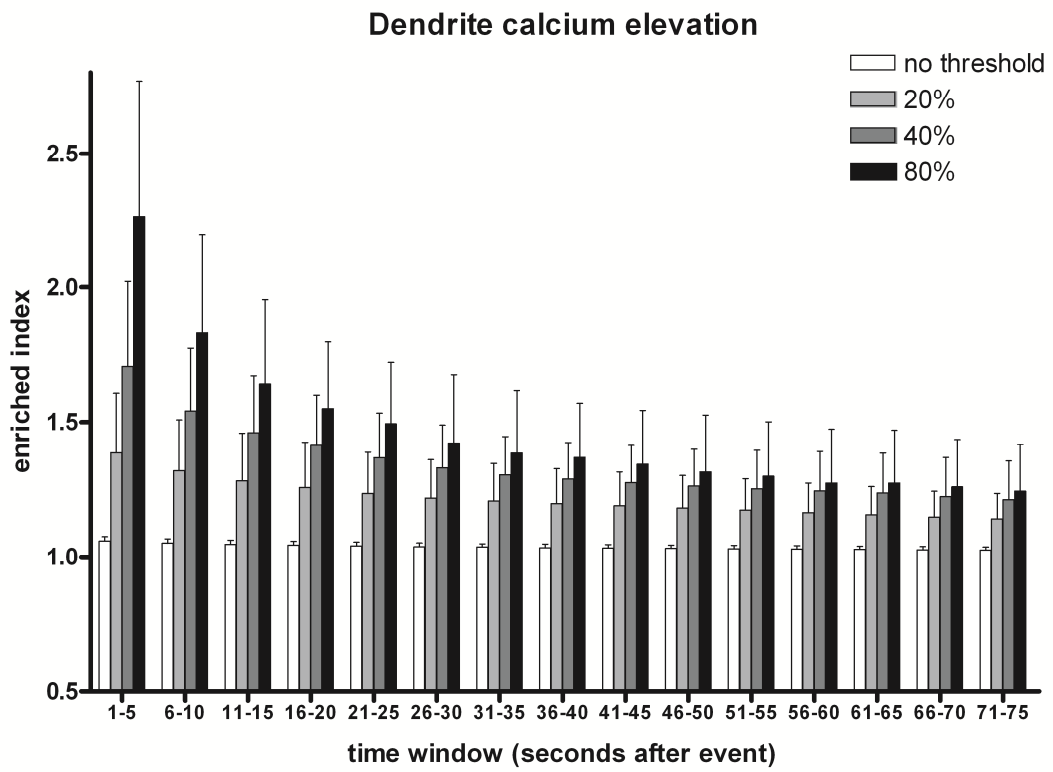
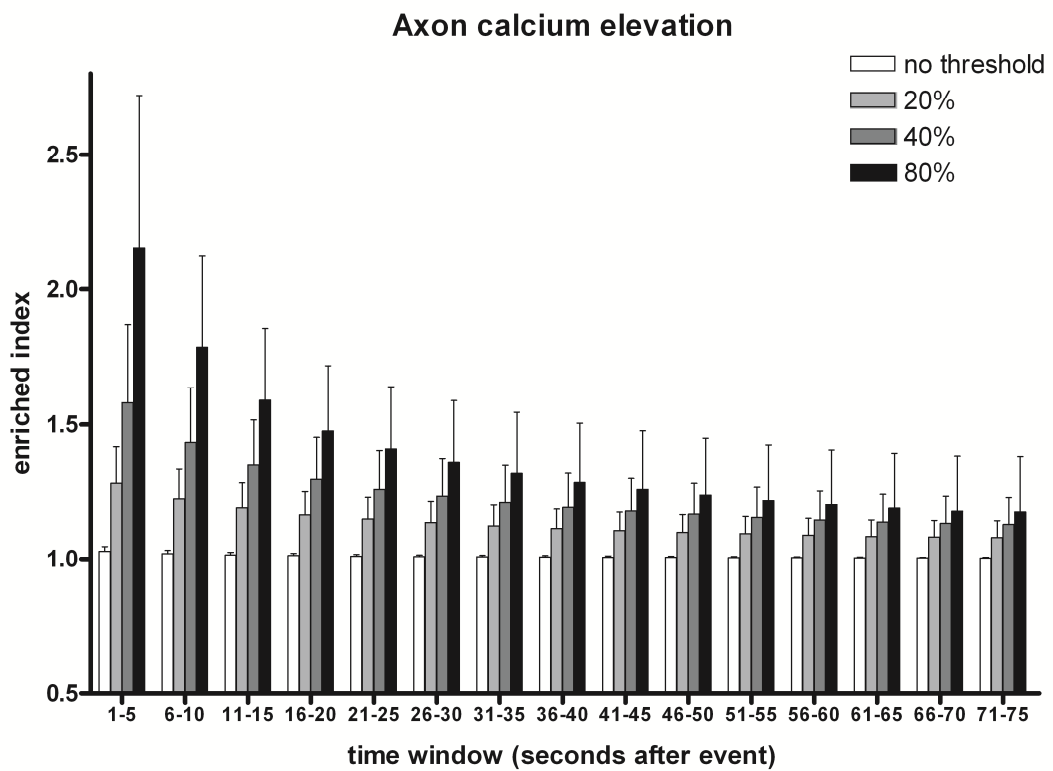
## 図10 時間相関解析の結果

### A: 樹状突起でのカルシウム上昇の時間相関

一つの細胞から得られた樹状突起内のカルシウム活動濃縮比を地点毎に全て平均し、樹状突起ROIで各ウインドウ毎の平均濃縮比を算出した。各細胞の平均値をさらに平均し、平均値と標準偏差を表示した。no threshold, 20%, 40%, 80%はカルシウム上昇を検出する際に設けた閾値。(N = 41, "dendrite", 2-way ANOVA (threshold × time), thresholdの効果:  $P < 0.0001$ , timeの効果:  $P < 0.0001$ , post hoc Bonferroni t test: "no threshold vs 20%", "no threshold vs 40%", "no threshold vs 80%", 全てのウインドウで $P < 0.05$ , "20 % vs 40%", 1-5, 6-10, ..., 26-30 秒後まで $P < 0.05$ , それ以降はn.s., "20% vs 80%", 1-5, ..., 66-70 秒後まで $P < 0.05$ , "40% vs 80%", 1-5, ..., 21-25 秒後まで $P < 0.05$ )

### B: 軸索でのカルシウム上昇の時間相関

Aと同様に、軸索内のカルシウム活動濃縮比を地点毎に全て平均し、軸索ROIで各ウインドウ毎の平均濃縮比を算出した。各細胞の平均値をさらに平均し、平均値と標準偏差を表示した。(N = 47, "axon", 2-way ANOVA (threshold × time), thresholdの効果:  $P < 0.0001$ , timeの効果:  $P < 0.0001$ , post hoc Bonferroni t test: "no threshold vs 20%", 1-5, ..., 41-45 秒後まで $P < 0.05$ , "no threshold vs 40%", "no threshold vs 80%", 全てのウインドウで $P < 0.05$ , "20 % vs 40%", 1-5, 6-10, ..., 26-30 秒後まで $P < 0.05$ , それ以降はn.s., "20% vs 80%", 1-5, ..., 66-70 秒後まで $P < 0.05$ , "40% vs 80%", 1-5, ..., 31-35 秒後まで $P < 0.05$ )

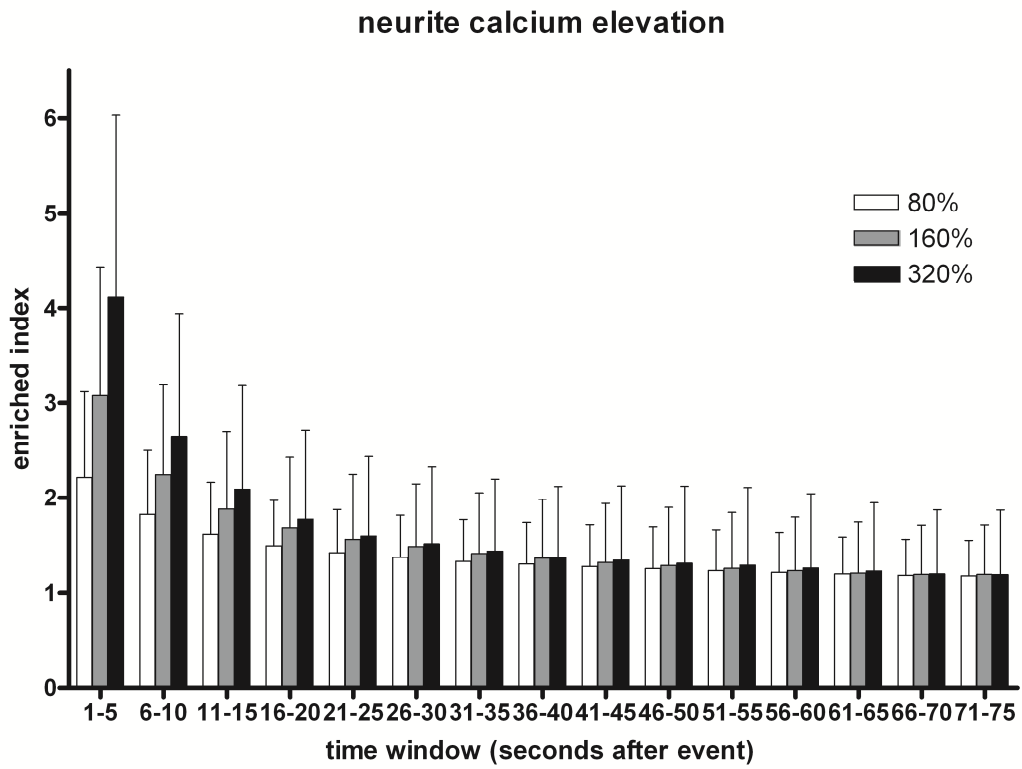
**A****B**



## 図10 時間相関解析の結果（続き）

C: より大きな閾値に対してのカルシウム上昇の時間相関  
軸索・樹状突起の区別なく、カルシウム上昇の閾値を80%, 160%,  
320%に変更した。(N = 52, "neurite", 2-way ANOVA (threshold × time),  
thresholdの効果:  $P < 0.0001$ , timeの効果:  $P < 0.0001$ , post hoc Bonferroni t  
test: "80% vs 160%", 1-5 秒後でのみ $P < 0.05$ , "80% vs 320%", 1-5, 6-10,  
11-15 秒後で $P < 0.05$ , "160% vs 320%", 1-5 秒後のみで $P < 0.05$ )

C



## 図11 カルシウムキレート剤および細胞外液の変化に対するカルシウム活動の反応性

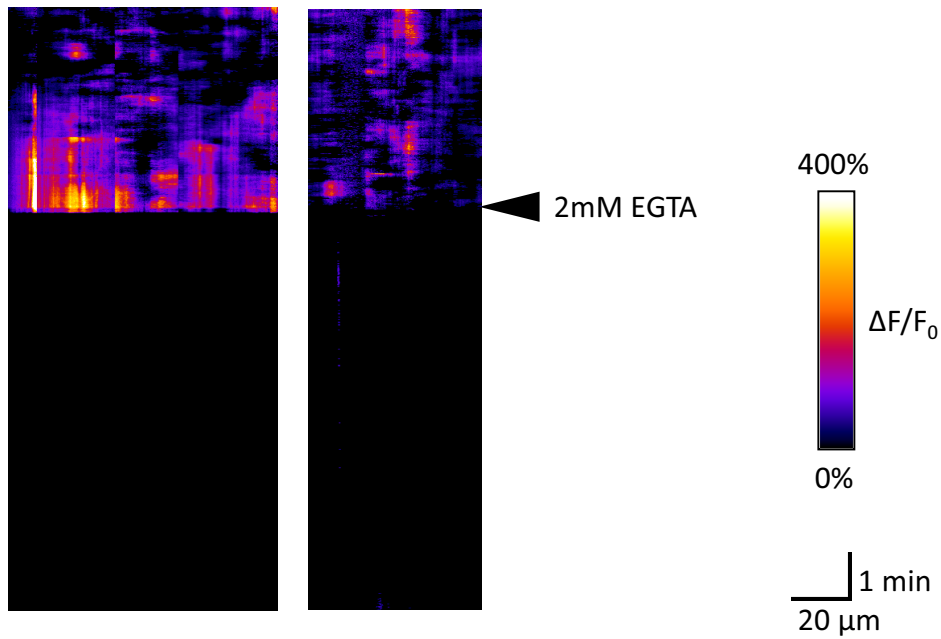
A: Lck-GCaMP7を発現させたDIV 2神経細胞に対し、終濃度2 mMのEGTAを細胞外液に添加した際のカルシウム活動の変化の代表例。

B: 2 mM EGTAに対するLck-GCaMP7輝度変化の定量  
EGTA添加前250 秒間の $\Delta F/F_0$ の総和を基準に、添加後1-250 秒、251-500 秒のそれぞれ250 秒間のキモグラフ上での $\Delta F/F_0$ の総和との比を示した (N = 4, one-sample t test による1との比較, "1-250 s" mean = 0.032, SD = 1.463, P < 0.0001, "251-500 s" mean = 0.0017, SD = 0.0033, P < 0.0001)。

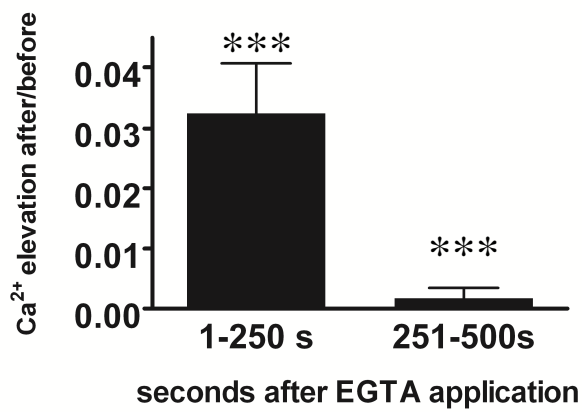
C: 20  $\mu$ M BAPTA-AMをプレロードした細胞でのキモグラフ表示は $\Delta F/F_0$ である。

E: 20  $\mu$ M EGTA-AMをプレロードした細胞でのキモグラフ表示は $\Delta F/F_0$ である。

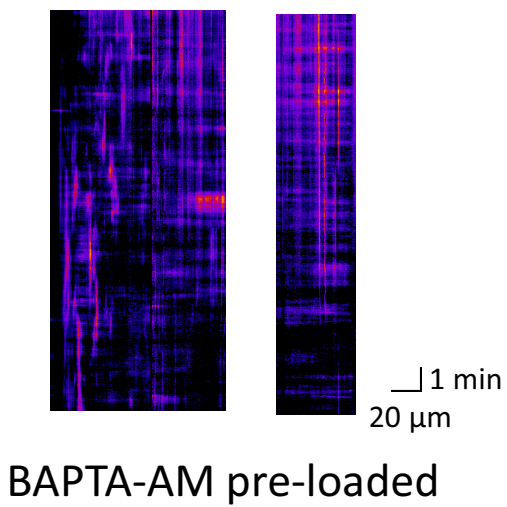
A



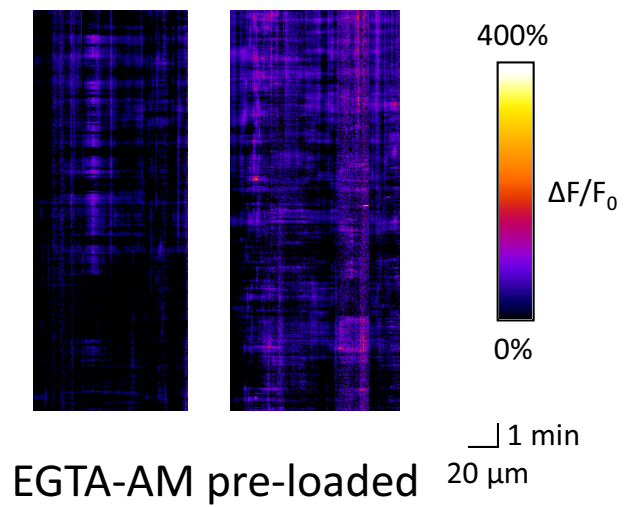
B



C



D



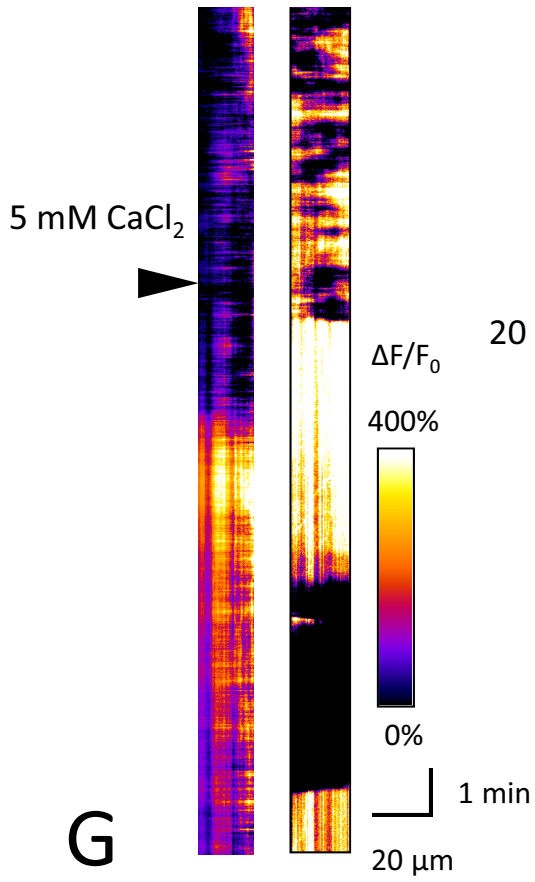
## 図11 カルシウムキレート剤添加および細胞外液の変化に対するカルシウム活動の反応性（続き）

E: 細胞外のカルシウム濃度を5 mMに上昇させた際の反応  
DIV 2のLck-GCaMP7発現神経細胞に対し外液のカルシウム濃度を1.8 mM → 5 mMに上昇させた。代表的な例を示す。矢頭は薬剤添加の時刻を示す。

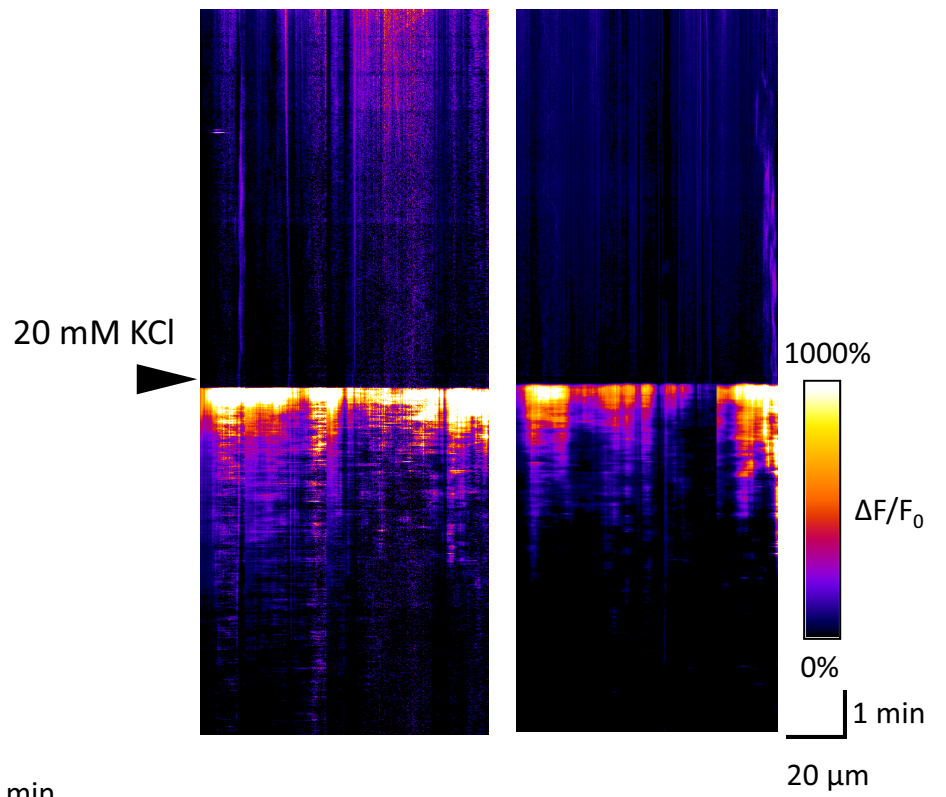
F: 細胞外のカリウム濃度を20 mMに上昇させた際の反応  
DIV 4のLck-GCaMP7発現細胞をTyrode液中でイメージング後、矢頭で示した時点で外液のカリウム濃度を20 mMに上昇させた。表示は $\Delta F/F_0$ である。

G: 1  $\mu$ M TTXに対する反応  
図の黒矢頭の点で終濃度1  $\mu$ MとなるようTTXを加えた際の反応。表示は $\Delta F/F_0$ である。

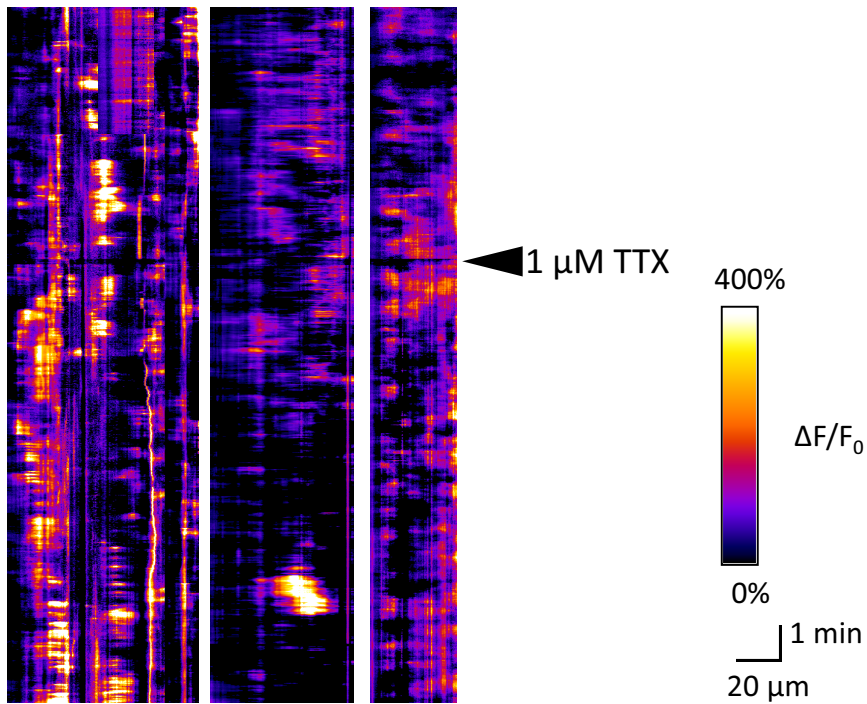
E



F



G



## 図12 Kir2.1関連コンストラクトの構造および細胞内局在

### A: Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCTの一次構造

N末端からKir2.1, P2A, mCherry, KRasCTの順に並ぶ。ハサミ印の部分でP2A自己開裂ペプチドによりKir2.1-P2AおよびmCherry-KRasCTへと切断される。mCherry-KRasCTはC末端にプレニル化を受けて膜挿入される。

### B: Lck-GCaMP7-T2A-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCTの一次構造

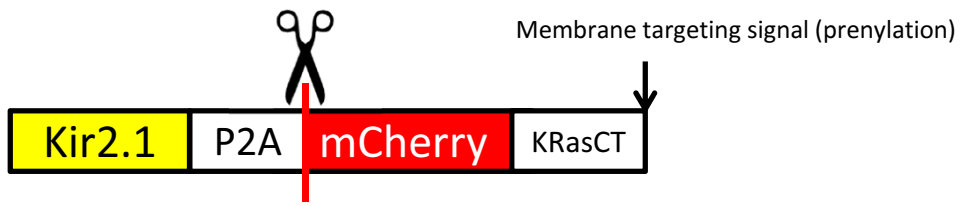
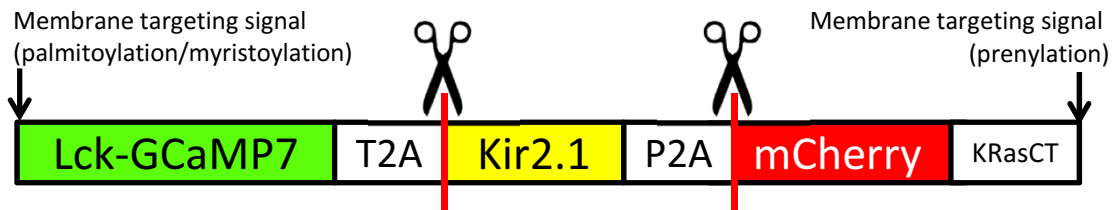
Aで示したコンストラクトのKir2.1上流にLck-GCaMP7がT2A自己開裂ペプチドを介して配置されている。ハサミ印の部分でT2A, P2A自己開裂ペプチドによりLck-GCaMP7-T2A, Kir2.1-P2AおよびmCherry-KRasCTへと切断される。

### C: Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCTおよびそのV302M変異体の細胞内局在

HeLa細胞にpCAG-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCT (上段) およびそのV302M変異体 (下段) を発現させたものを1st Ab: anti-2A peptide rabbit polyclonal antibody (1:500), 2nd Ab: Alexa-647 conjugated anti-rabbit IgG (1:1000) で免疫染色した (赤チャンネル: mCherry, 黄チャンネル: anti-2A, 青チャンネル: DAPI, スケールバー 20  $\mu$ m)。

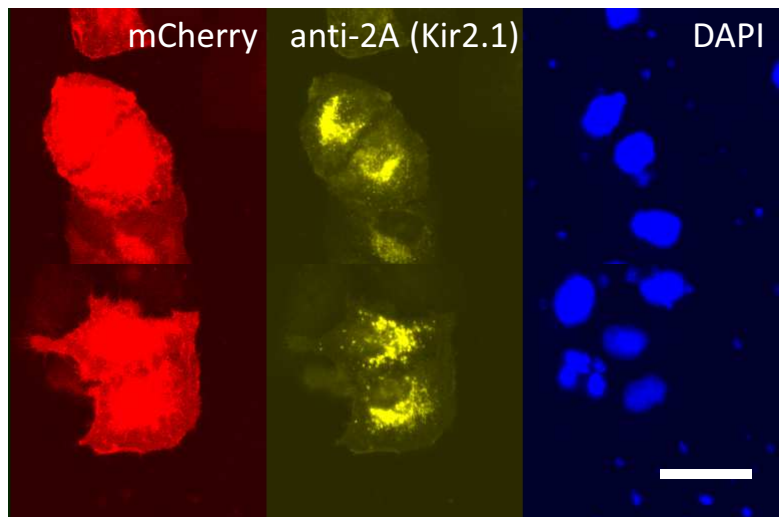
### D: Lck-GCaMP7-T2A-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCTおよびそのV302M変異体の細胞内局在

HeLa細胞にpCAG-Lck-GCaMP7-T2A-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCT (上段) およびそのV302M変異体 (下段) を発現させたものを1st Ab: anti-2A peptide rabbit polyclonal antibody (1:500), anti-GFP rat monoclonal antibody (1:500), 2nd Ab:Alexa-647 conjugated anti-rabbit IgG (1:1000), Alexa-488 conjugated anti-rat IgG (1:1000) で免疫染色した (緑チャンネル: anti-GFP, 赤チャンネル: mCherry, 黄チャンネル: anti-2A, スケールバー 20  $\mu$ m)。

**A****B****C**

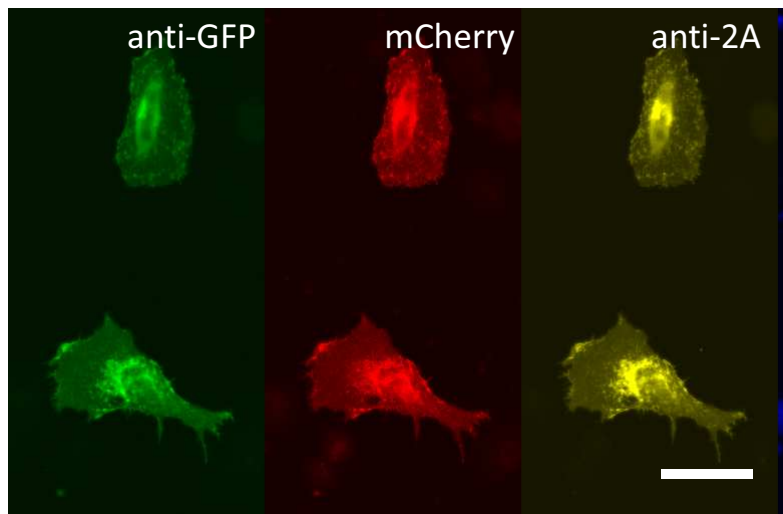
pCAG-Kir2.1-WT-  
P2A-mCherry-KRasCT

pCAG-Kir2.1-V302M-  
P2A-mCherry-KRasCT

**D**

pCAG-Lck-GCaMP7-  
T2A-Kir2.1-WT-  
P2A-mCherry-KRasCT

pCAG-Lck-GCaMP7-  
T2A-Kir2.1-V302M-  
P2A-mCherry-KRasCT





## 図13 Lck-GCaMP7-T2A-Kir2.1-WT-P2A-mCherry-KRasCTおよびその変異体V302M発現細胞でのカルシウム活動

A: DIV 2神経細胞でのカルシウム活動代表例

DIV 2神経細胞からキモグラフを作成した。代表例を二例ずつ示す。  
(Kir2.1-WT: N = 2, Kir2.1-V302M: N = 2) 表示は $\Delta F/F_0$ である。

B: 単位長さ辺り累積カルシウム上昇量 (WT vs V302M)

各地点毎に $\Delta F/F_0$ の総和を取り、空間方向に平均したものをWT, V302M間で比較。各点は細胞ごとの平均値、横棒は群全体の平均値。  
(Kir2.1-WT: N = 12, mean = 200.8, SD = 139.8, Kir2.1-V302M: N = 11, mean = 321.9, SD = 182.8, P = 0.053, Mann-Whitney test)

C:  $\Delta F/F_0 > 20\%$ のピクセルに限定した単位長さ辺り累積カルシウム上昇量 (WT vs V302M)

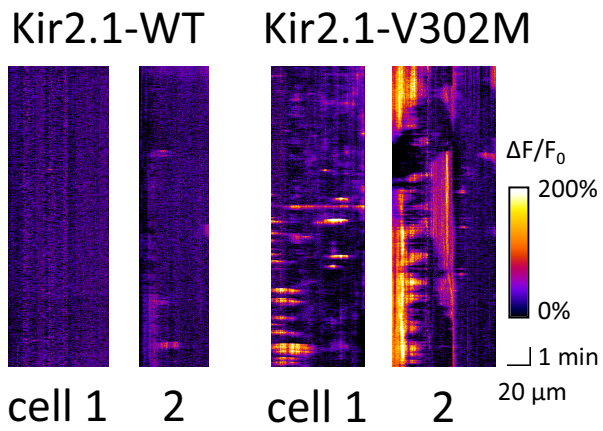
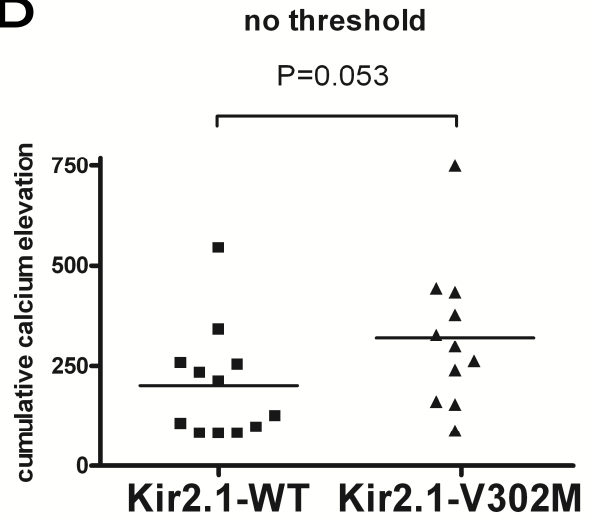
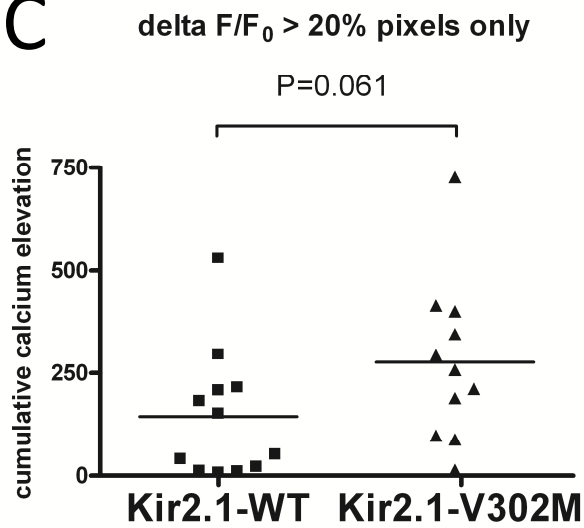
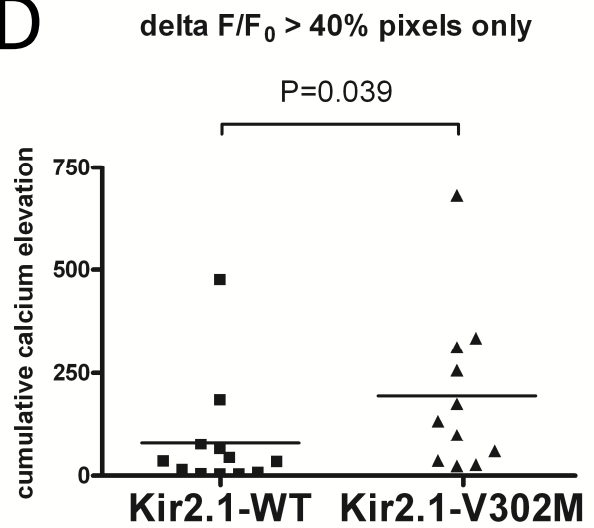
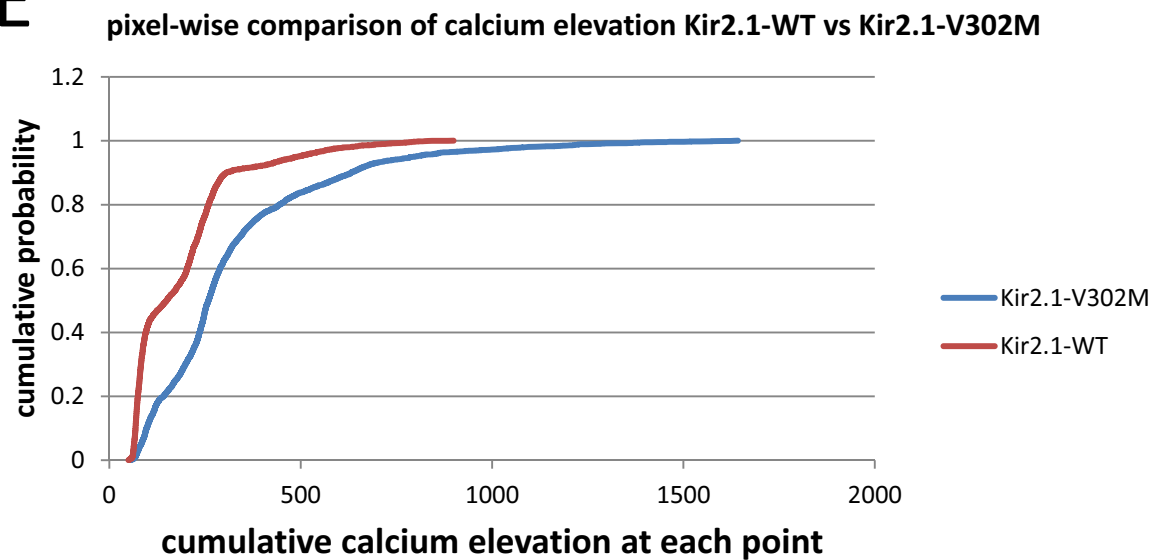
$\Delta F/F_0 > 20\%$ のピクセルに限定して、各地点毎に条件を満たすピクセルの $\Delta F/F_0$ の総和を取り、空間方向に平均したものをWT, V302M間で比較。各点は細胞ごとの平均値、横棒は群全体の平均値。(Kir2.1-WT: N = 12, mean = 144.1, SD = 157.4, Kir2.1-V302M: N = 11, mean = 276.8, SD = 198.0, P = 0.061, Mann-Whitney test)

D:  $\Delta F/F_0 > 40\%$ のピクセルに限定した単位長さ辺り累積カルシウム上昇量 (WT vs V302M)

同様に $\Delta F/F_0 > 40\%$ のピクセルに限定したものをWT, V302M間で比較。各点は細胞ごとの平均値、横棒は群全体の平均値。(Kir2.1-WT: N = 12, mean = 78.41, SD = 134.9, Kir2.1-V302M: N = 11, mean = 194.8, SD = 197.4, P = 0.039, Mann-Whitney test)

E: 各地点毎の累積カルシウム上昇量の分布比較

各地点毎の累積カルシウム上昇量を細胞ごとに平均せず、そのまま累積分布関数として表示した。(Kir2.1-WT: N = 12, Kir2.1-V302M: N = 11)

**A****B****C****D****E**

## 図14 カルシウムソースを絞り込むための薬理実験

細胞は全てDIV 2のLck-GCaMP7発現細胞である。スケールバー、カラーバーはキモグラフの右下のものが対応する。一つのキモグラフが一つの細胞に対応する。

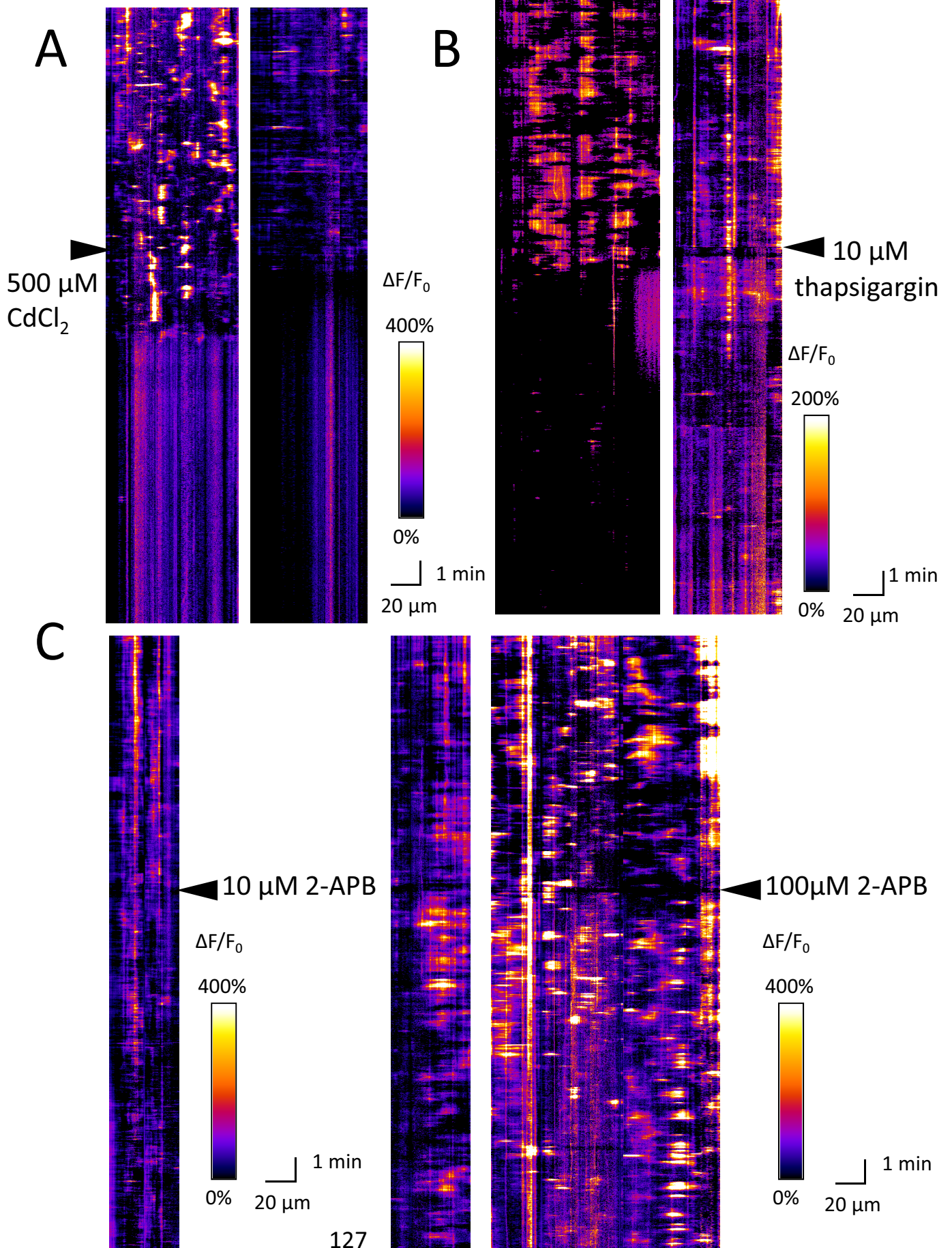
A: 細胞外液に500  $\mu\text{M}$ の塩化カドミウムを添加した際の反応の代表例

B: 10  $\mu\text{M}$ のthapsigarginを添加した際の反応の代表例

C: 2-APBを添加した際の反応の代表例

左図: 10  $\mu\text{M}$

右図: 100  $\mu\text{M}$



## 図14 カルシウムソースを絞り込むための薬理実験 (続き)

細胞は全てDIV 2のLck-GCaMP7発現細胞である。スケールバー、カラーバーはキモグラフの右下のものが対応する。

D: 細胞外液に10  $\mu$ MのCNQXを添加した際の反応の代表例

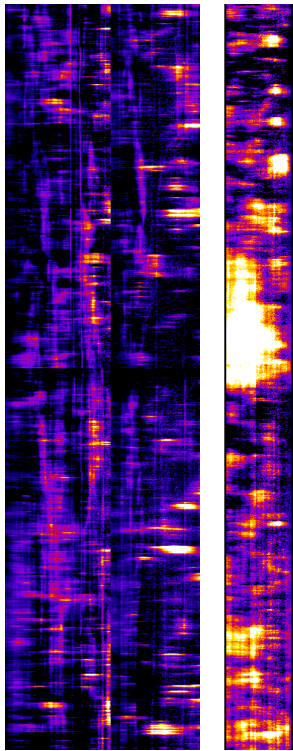
E: 50  $\mu$ MのD-AP5を添加した際の反応の代表例

F: 20  $\mu$ Mの $\omega$ -conotoxin MVIICを添加した際の反応の代表例

G: 200  $\mu$ Mのdiltiazemを添加した際の反応の代表例

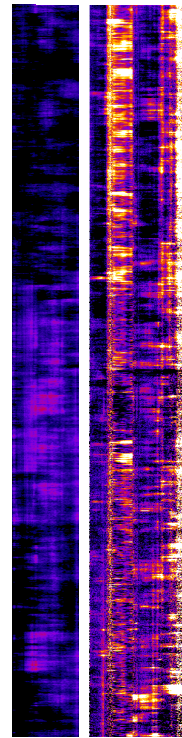


D



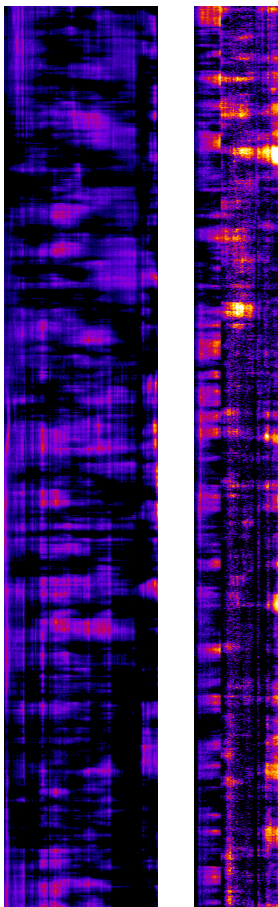
10  $\mu$ M  
CNQX

E



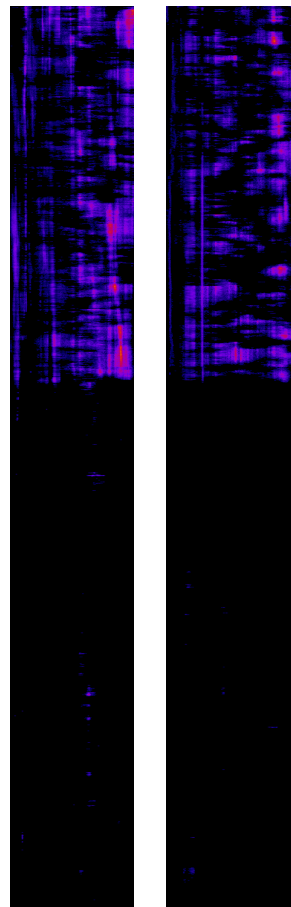
50  $\mu$ M  
D-AP5

F

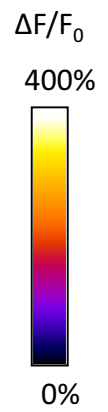


20  $\mu$ M  
 $\omega$ -conotoxin  
MVIIC

G



200  $\mu$ M  
diltiazem



1 min  
20  $\mu$ m

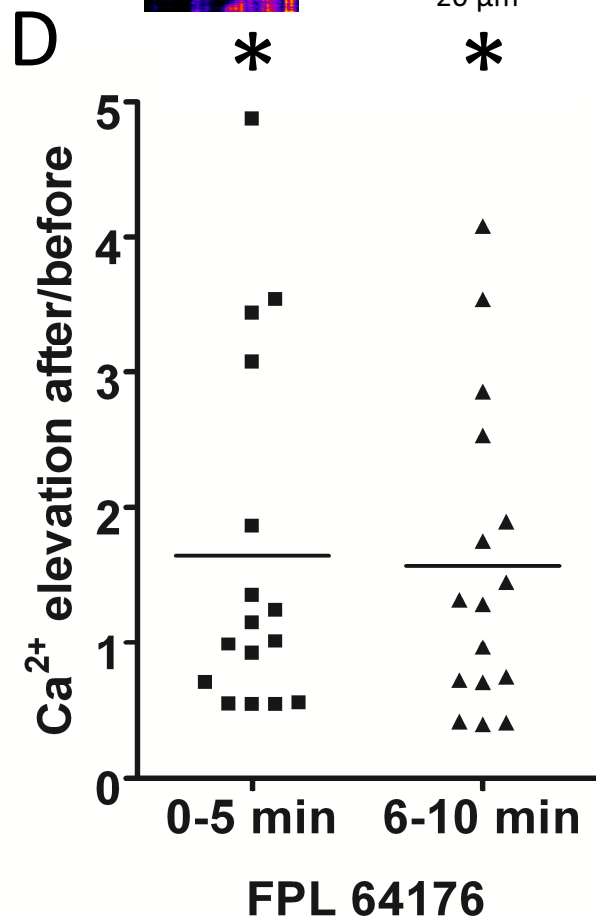
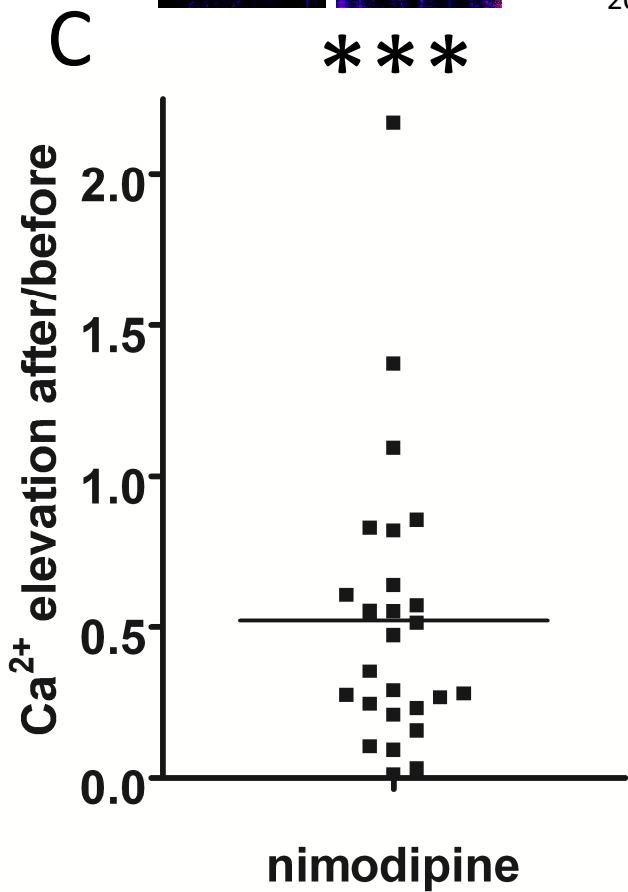
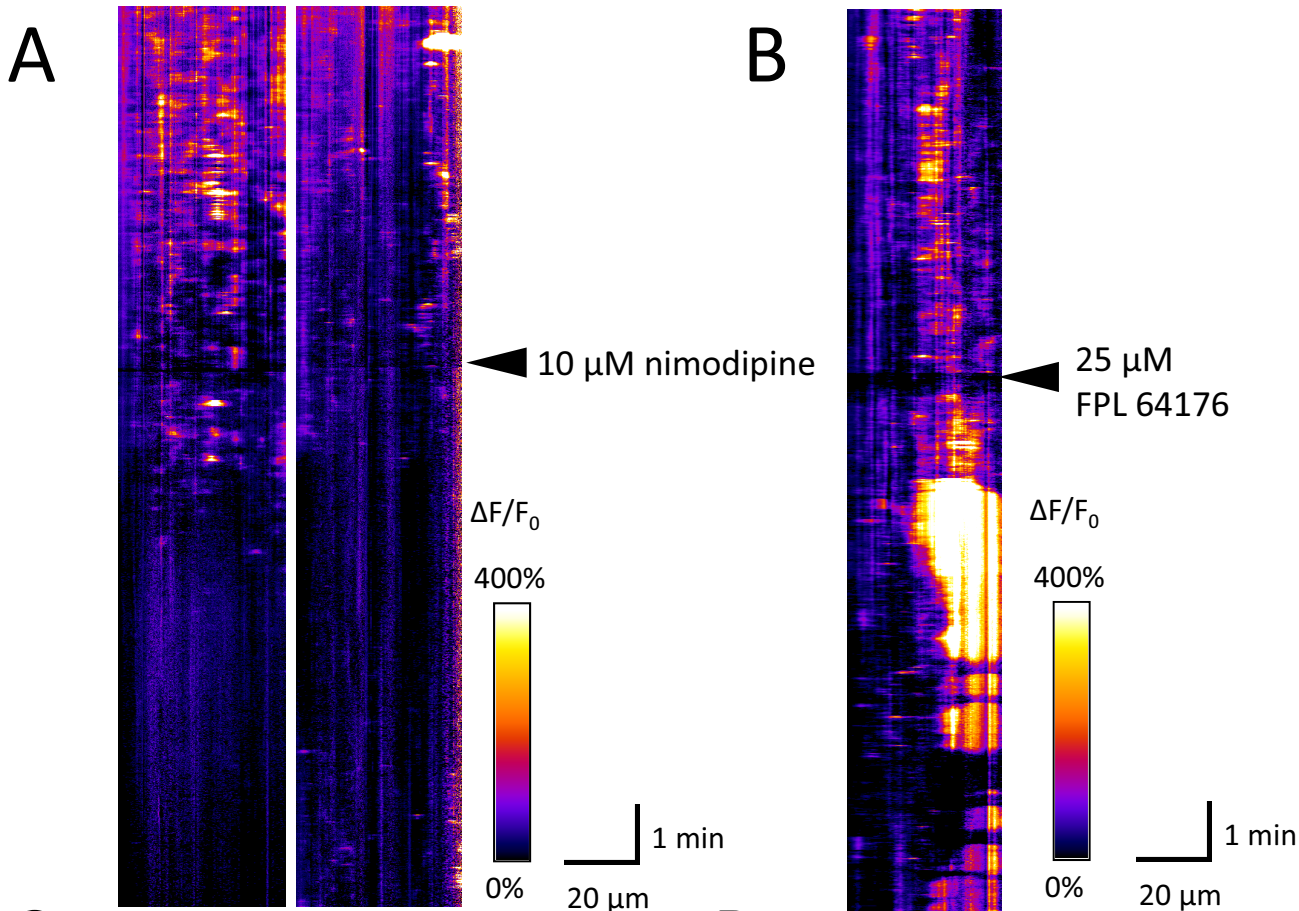
## 図15 10 $\mu\text{M}$ ニモジピンおよび25 $\mu\text{M}$ FPL64176 によるカルシウム活動変化

A: 10  $\mu\text{M}$  ニモジピンに対する代表的な反応例  
矢頭の時点で10  $\mu\text{M}$  ニモジピンを添加

B: 25  $\mu\text{M}$  FPL 64176に対する代表的な反応例  
矢頭の時点で25  $\mu\text{M}$  FPL 64176を添加

C: 10  $\mu\text{M}$  ニモジピンによる累積カルシウム上昇量の変化  
薬剤添加後5-15分の10分間の累積カルシウム上昇量を、薬剤添加直前10分間の累積カルシウム上昇量で割ったものをafter/beforeとして表示。各点が細胞一つに対応する。横棒は平均値を表す。(N = 27, one-sample t test による1との比較, mean = 0.5220, SD = 0.4652, P < 0.0001)

D: 25  $\mu\text{M}$  FPL 64176による累積カルシウム上昇量の変化  
薬剤添加後0-5分および5-10分の5分間の累積カルシウム上昇量を、薬剤添加直前5分間の累積カルシウム上昇量で割ったものをafter/beforeとして表示。各点が細胞一つに対応する。横棒は平均値を表す。(N = 11, one-sample t test による1との比較, "0-5 min" mean = 2.027, SD = 1.463, p = 0.0423, "6-10 min" mean = 1.892, SD = 1.213, P = 0.0350)





## 図16 Cav関連コンストラクトの構造および細胞内局在と pharmacological knockout法の概念図

A:  $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCTの一次構造

N末端から $\alpha 2\delta 1$ , P2A, Cav $\beta 3$ , T2A, mCherry-KRasCTの順に並ぶ。T2A, P2A自己開裂ペプチドによりハサミ印の部分で切断され、 $\alpha 2\delta 1$ -P2A, Cav $\beta 3$ -T2A, mCherry-KRasCTを生じる。 $\alpha 2\delta 1$ -P2A, mCherry-KRasCTは膜へ、Cav $\beta 3$ -T2Aは細胞質へと局在する。

B: sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYの構造 (Zhang et al., 2006から改変)

sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3はHAタグの挿入位置を除き、互いに相同な構造を持つため共通の図で示す。Cav1.2/1.3はN末端、C末端共に細胞質側に存在し、24回膜貫通領域のうち17回目の膜貫通領域に存在するニモジピン結合部位に、ニモジピン非感受性となるThr→Tyrの変異が入っている (赤星印、Cav1.2-TY: T1039Y, Cav1.3-TY: T1033Y)。Cav1.2には11回目と12回目の膜貫通領域の間には細胞外側から標識できるようにHAタグ (黄四角) が挿入されている。またCav1.3はN末端がCav2.2とのキメラになっており、その最N末端にHAタグが挿入されている。

C:  $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCTおよびsHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYの細胞内局在

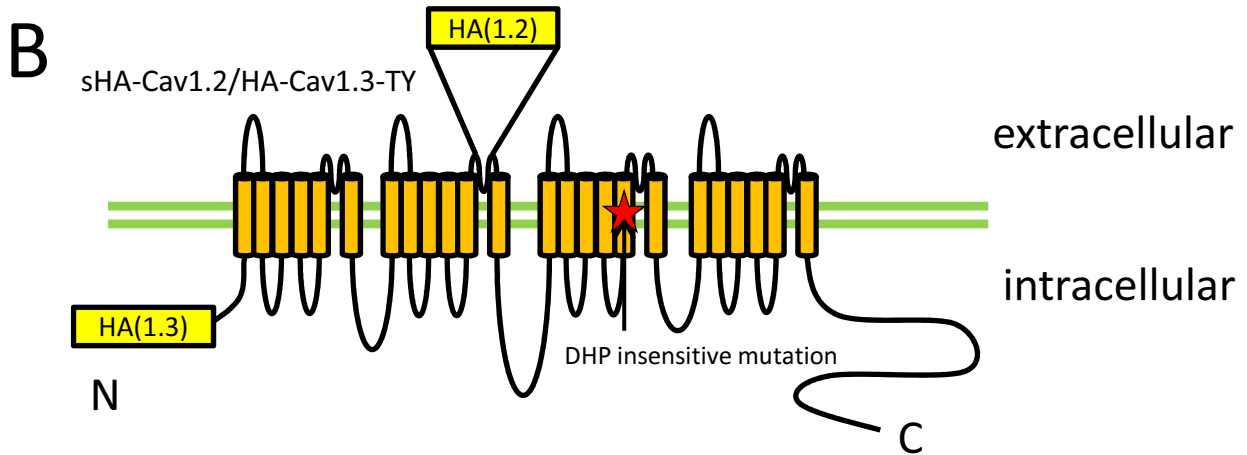
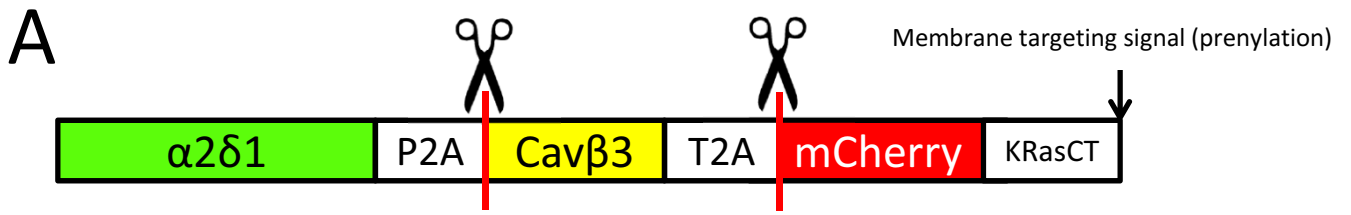
HeLa細胞にpCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCTを発現させた免疫染色像

1st Ab: anti-2A rabbit polyclonal antibody (1:500), 2nd Ab: Alexa-488 conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:5000) で染色 (上段)、mCherry-KRasCTの蛍光像 (下段) (スケールバーは 20  $\mu$ m)

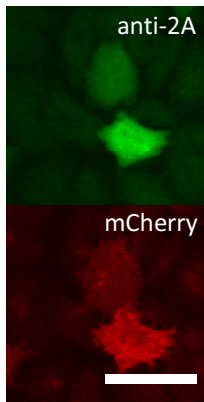
D: sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYの神経細胞内局在

DIV 2神経細胞に子宮内電気穿孔法でpCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT, pCAG-sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYを1:1で発現させた免疫染色像

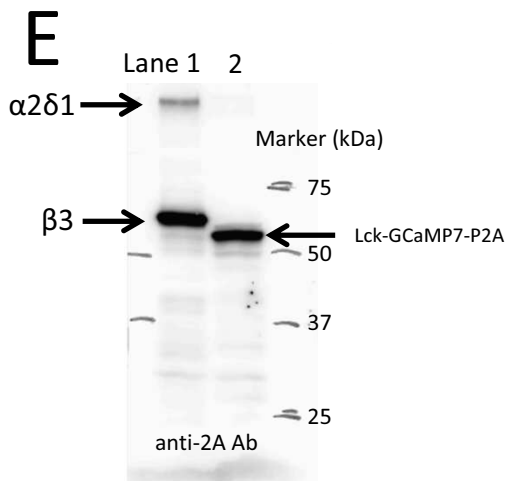
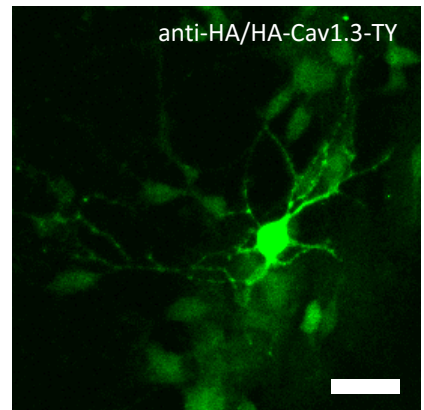
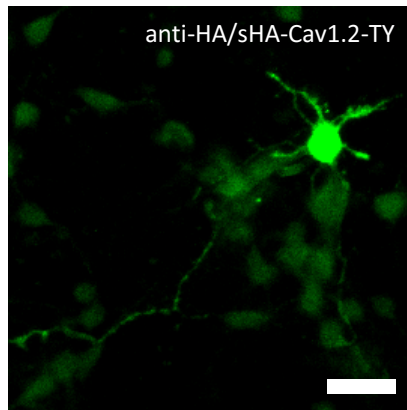
1st Ab: anti-HA rat monoclonal antibody (1:500), 2nd Ab: Alexa-488 conjugated anti-rat IgG antibody (1:100) で染色 (スケールバーは 20  $\mu$ m)



**C** pCAG- $\alpha 2\delta 1$ -P2A- $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT

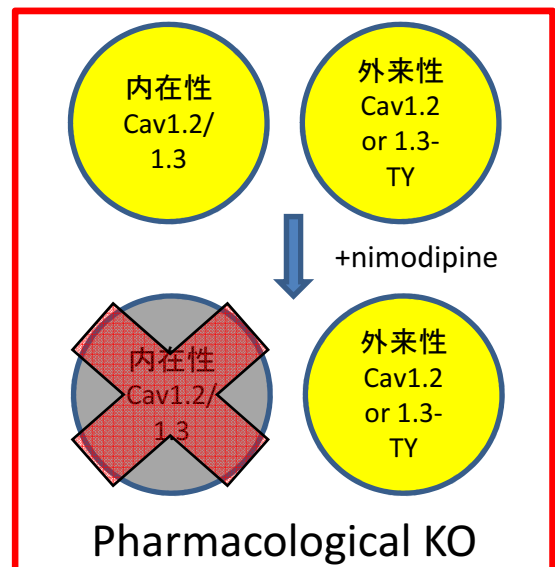


**D**



Lane 1:  $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT  
Lane 2: Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT

**F**



## 図16 Cav関連コンストラクトの構造および細胞内局在と pharmacological knockout法の概念図 (続き)

E:  $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCTおよびLck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCT (図19参照)の切断効率評価

HEK293T細胞に $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCT, Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTを発現させ、ウエスタンブロッティングを行った。1st Ab: anti-2A rabbit polyclonal antibody (1:2000), 2nd Ab: HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) Lane 1が $\alpha 2\delta 1$ -P2A-Cav $\beta 3$ -T2A-mCherry-KRasCTで、 $\alpha 2\delta 1$ -P2A ( $\approx 130$  kDa), Cav $\beta 3$ -T2A ( $\approx 65$  kDa)に対応するバンドを示した。Lane 2はLck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTで、Lck-GCaMP7-P2Aに対応する ( $\approx 60$  kDa)のバンドが見られた。(一番右: 分子量マーカー)

F: pharmacological knockout法の原理

ニモジピン非感受性チャネルを外来性に発現した状況下で、ニモジピンにより内在性のL型カルシウムチャネルをブロックすることで、外来性に発現させたサブタイプの機能のみを分離して解析できる。

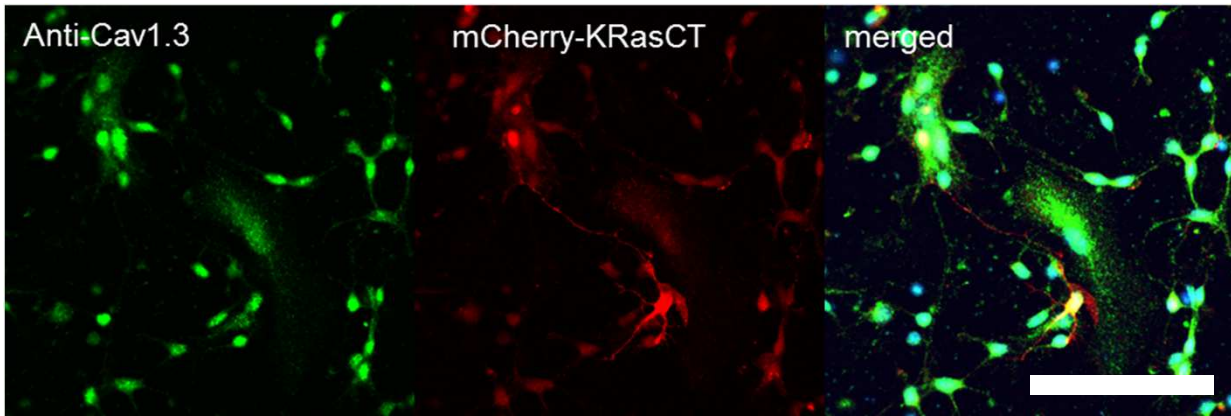
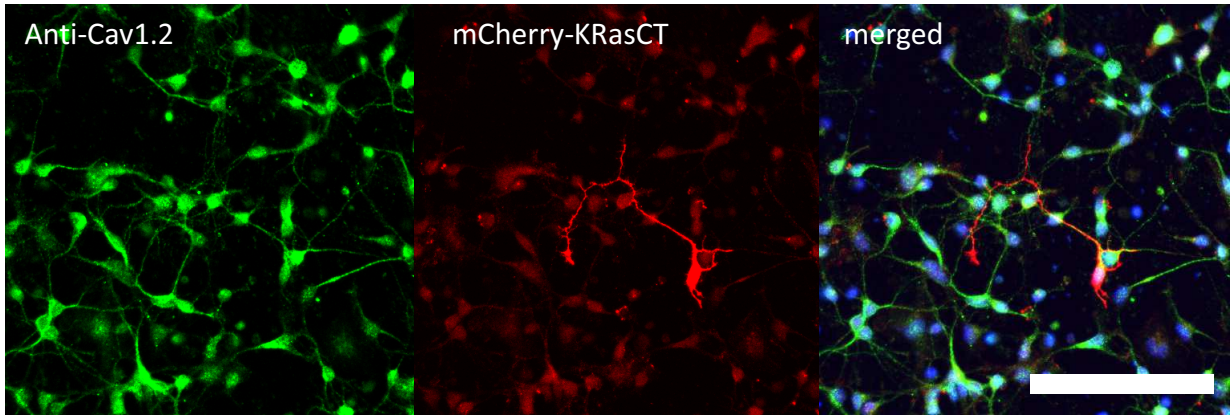
## 図17 発生期大脳皮質神経細胞における内在性カルシウムチャネルの発現確認

A: DIV 2 大脳皮質神経細胞の内在性カルシウムチャネル免疫染色  
子宮内電気穿孔法を用いてmCherry-KRasCTで標識した大脳皮質神経細胞を上段: anti-Cav1.2 (1:500), 下段: anti-Cav1.3 (1:500)で一次抗体反応、二次抗体Alexa-488 conjugated anti-rabbit IgG (1:200)で標識。スケールバーは 100  $\mu$ m

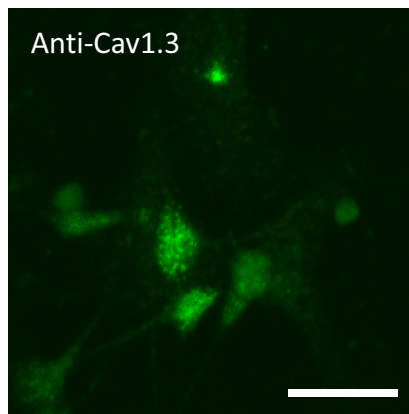
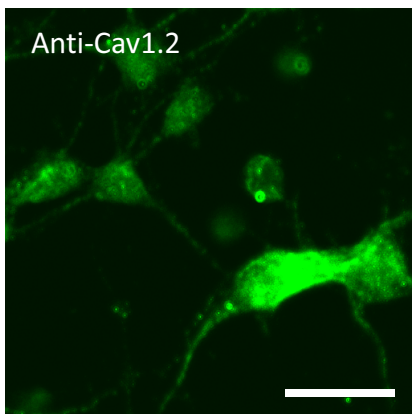
B: 強拡大図

左: anti-Cav1.2, 右: anti-Cav1.3

A



B



## 図18 sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYを用いた薬理実験によるCav1.2, Cav1.3の機能的区別

A: 外来性カルシウムチャネル発現によるカルシウム上昇量の変化  
DIV 2の神経細胞に子宮内電気穿孔法でpCAG-Lck-GCaMP7, pCAG- $\alpha$ 2 $\delta$ 1-P2A-Cav $\beta$ 3-T2A-mCherry-KRasCT, pCAG-sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYをそれぞれ3:1:1となるように発現させた。コントロール群ではpCAG-sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYの代わりにpCAGpro-C1を遺伝子導入した。キモグラフ上での単位長さ、単位時間あたりの累積カルシウム上昇量を各細胞ごとに表示した。横棒は平均値 (Kruskal-Wallis test  $P = 0.0233$ , control:  $N = 10$ , mean = 0.7042, SD = 0.3566, sHA-Cav1.2-TY:  $N = 10$ , mean = 0.5024, SD = 0.2301, HA-Cav1.3-TY:  $N = 15$ , mean = 0.8265, SD = 0.2667, “sHA-Cav1.2-TY vs HA-Cav1.3-TY”, Dunn’s multiple comparison test,  $P < 0.05$ )

B: 外来性にニモジピン非感受性カルシウムチャネル発現をさせた神経細胞に対しての10  $\mu$ Mニモジピンの効果  
Aと同じ細胞に10  $\mu$ Mのニモジピンを添加し、添加前10分間と添加後5-15分の10分間の累積カルシウム上昇量の比を取ったものをafter/beforeとして縦軸に表示した (one sample t-testによる1との比較, control:  $N = 10$ , mean = 0.3118, SD = 0.2291  $P < 0.0001$ , sHA-Cav1.2-TY:  $N = 10$ , mean = 0.8920, SD = 0.6743,  $P = 0.6245$ , HA-Cav1.3-TY:  $N = 15$ , mean = 1.343, SD = 0.6937,  $P = 0.0762$ )



## 図19 Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTの構造および細胞内局在とそれを用いた細胞間カルシウム濃度比較

### A: Lck-GCaMP7-P2A-KRasCTの一次構造

N末端からLck-GCaMP7, P2A, mCherry-KRasCTの順で並ぶ。P2A自己開裂ペプチドのC末端側（ハサミ印）で開裂し、Lck-GCaMP7-P2AおよびmCherry-KRasCTを生じる。Lck-GCaMP7-P2A, mCherry-KRasCTは共に膜に挿入される。

### B: Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTを発現したHeLa細胞の免疫染色

1st Ab: anti-2A peptide rabbit polyclonal antibody (1:500) anti-GFP rat monoclonal antibody (1:500), 2nd Ab: Alexa-647 conjugated anti-rabbit IgG, Alexa-488 conjugated anti-rat IgG (1:5000) で免疫染色した (左: anti-GFP, 中: mCherry-KRasCT, 右: anti-2A)

### C: Lck-GCaMP7/mCherry-KRasCT (4:1) (上段) およびLck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTを発現させた (下段) 神経細胞の免疫染色

1st Ab: anti-GFP rabbit polyclonal antibody (1:500), 2nd Ab: Alexa-488 conjugated anti-rabbit IgG (1:1000) で免疫染色した。(左: anti-GFP, 右: mCherry-KRasCT) (スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ )

### D, E: Lck-GCaMP7/mCherry-KRasCTを4:1で発現させた (図19D) およびLck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTを発現させた (図19E) DIV 2神経細胞でのLck-GCaMP7, mCherry-KRasCT輝度値のプロット

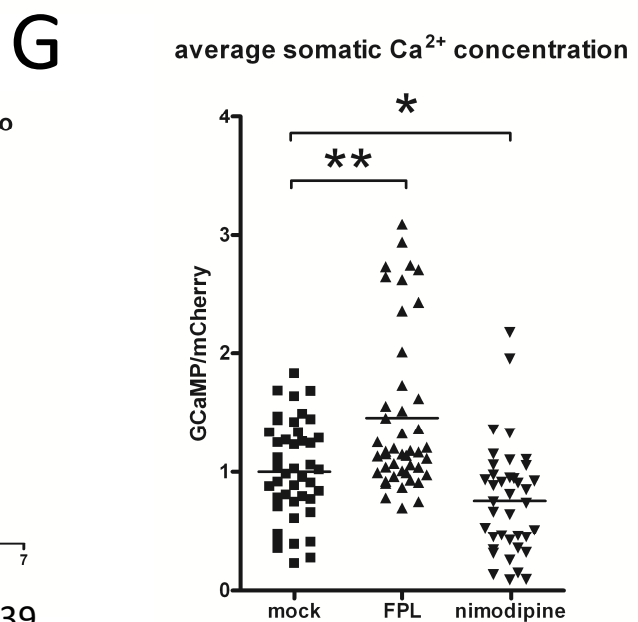
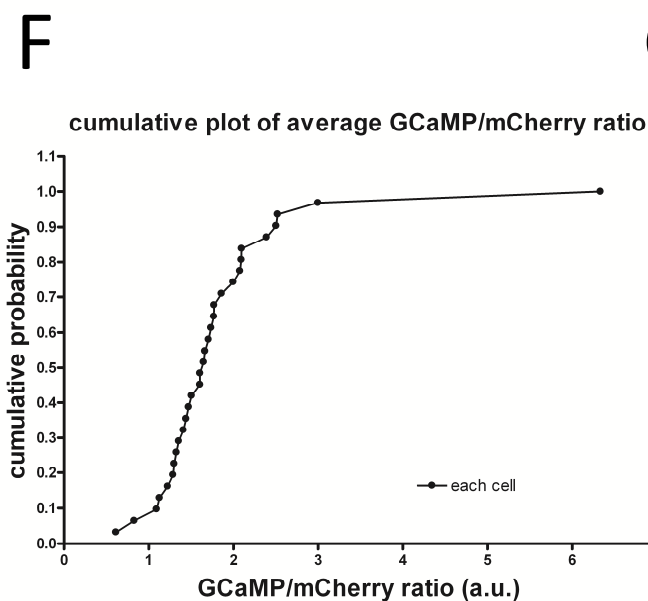
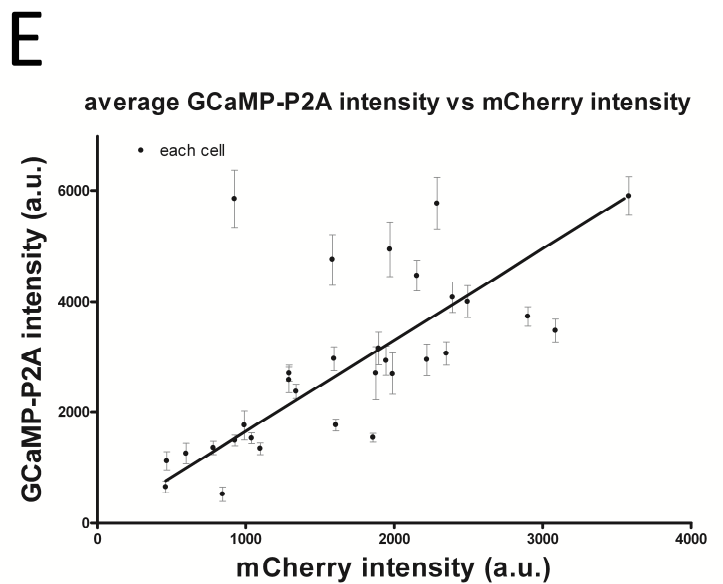
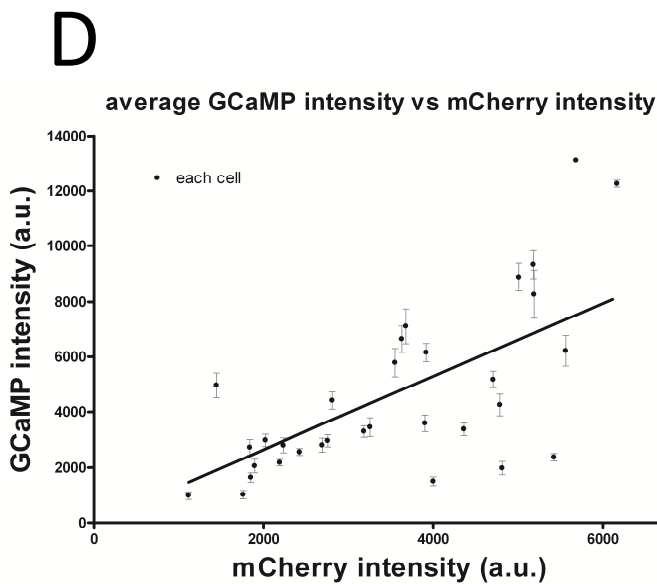
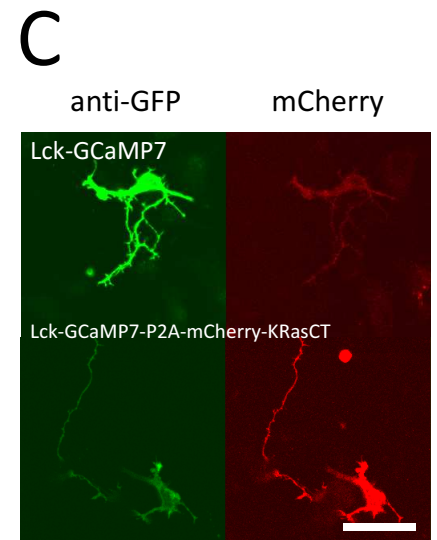
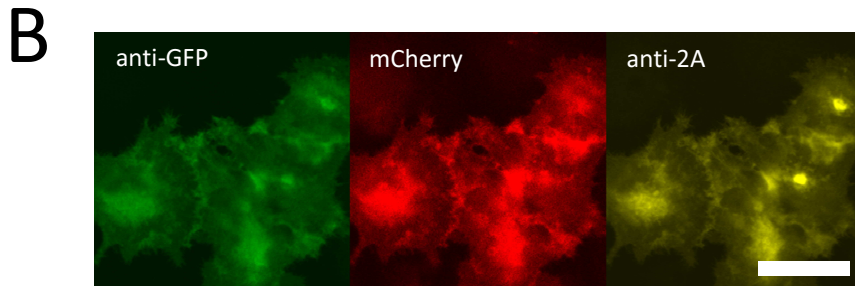
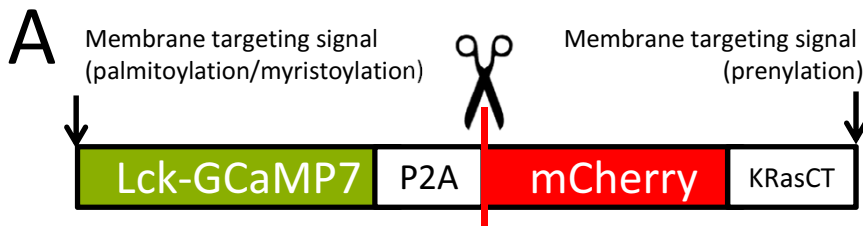
各点が一つの細胞における200秒間のLck-GCaMP7輝度平均値、上下のバーは標準偏差である (N = 32, N = 31)。データ群を線形近似した直線を重ねて示してある。縦軸: Lck-GCaMP7輝度、横軸: mCherry-KRasCT輝度

### F: Lck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTを用いて計測した発生期神経細胞の細胞間カルシウム濃度比較

撮像期間中のLck-CaMP7輝度の平均値をmCherry輝度で除算した値をG/Rとして横軸に取り、累積分布関数を描いた (N = 31)。

### G: 薬剤が細胞体平均カルシウム濃度に与える影響

DIV 2の神経細胞にLck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTを発現させ、無処理群、10  $\mu\text{M}$  ニモジピン処理群、25  $\mu\text{M}$  FPL 64176処理群で、Eと同様の方法で300秒間の細胞体の平均カルシウム濃度を算出した。横棒は各群の平均値





## 図20 本研究のまとめ

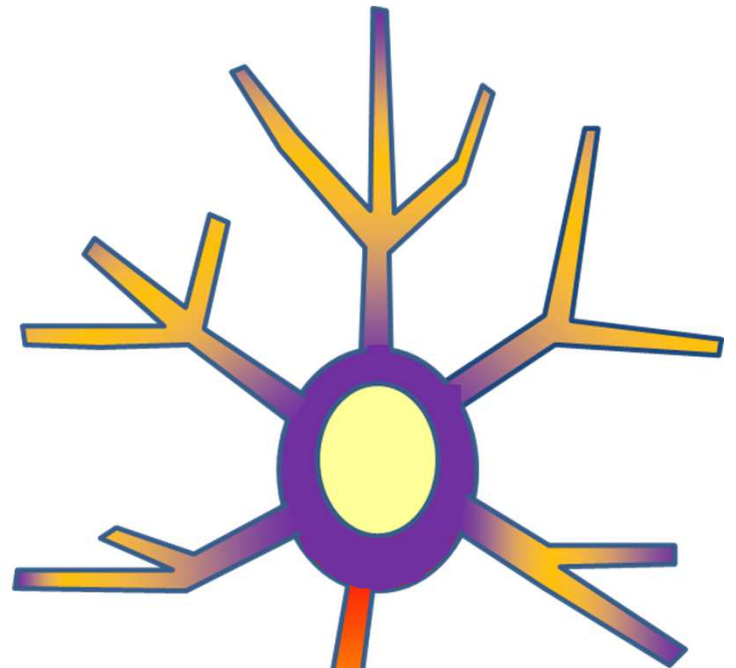
今回の研究で可能になったことを簡単にまとめる。膜結合型カルシウムプローブと子宮内電気穿孔法とを組み合わせることで、発生期神経細胞の突起で起こっている多種多様な自発的カルシウム活動をより詳細に解析できるようになった。キモグラフを用いた解析により、カルシウムが上昇しやすい「状態」が記憶されている可能性を示した。自発的カルシウム活動の多くは細胞外液のカルシウムに依存しており、膜電位が過分極側に変化すると頻度が減少する膜電位依存的現象である。ニモジピンやFPL 64176の薬理実験の結果および外来性sHA-Cav1.2/HA-Cav1.3-TYを用いた実験から、L型のカルシウムチャンネルが発生期の自発的なカルシウム上昇に強く関わっていることが示唆された。累積カルシウム上昇量と最大カルシウム上昇量の双方で、軸索が樹状突起を上回ることを示した。そして、今回開発したLck-GCaMP7-P2A-mCherry-KRasCTプローブは、細胞間、細胞内でのカルシウム濃度の比較を可能にする有用なツールであると考えられる。

# SUMMARY

## 発生期大脳皮質神経細胞

Ca<sup>2+</sup>上昇が低い↓  
CaMKI $\gamma$ ?

樹状突起



発生期神経細胞における自発的Ca<sup>2+</sup>上昇は

- 細胞外のCa<sup>2+</sup>に依存している
- 細胞膜電位依存的な現象である
- L型Ca<sup>2+</sup>チャネルが主な源 (Cav1.2, 1.3)
- 最大振幅、累積上昇ともに軸索で大きい

Ca<sup>2+</sup>上昇がより高い↑  
CaMKI $\alpha$ ?

軸索

細胞体の平均Ca<sup>2+</sup>濃度は  
細胞ごとに異なる。

細胞内でも勾配がある可  
可能性→今後の課題

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、いつも大変根気強く指導をしてくださった尾藤晴彦教授、竹本・木村さやか助教、そして京都大学大学院・医学研究科・メディカルイノベーションセンター・奥野浩行特定准教授に心からの感謝を申し上げます。

毎日の生活や研究の場面で私をサポートしてくださった神経生化学教室の皆様そしてOBの方にもこの場を借りまして改めて御礼を申し上げたいと思います。特に藤井哉博士、井上昌俊博士、石井雄一郎博士にはイメージングをはじめとしてさまざまな相談に乗っていただきました。心より感謝しております。

最後になりましたが、常に私を支えてくれた友人、家族の皆様にも感謝の意を表したいと思います。皆様本当にありがとうございました。