

奨励金No.1499

脳内オキシトシン絶対濃度変化の実時間測定法の開発

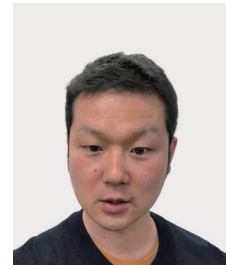
稲生 大輔

大阪大学大学院医学系研究科 特任講師（常勤）

Development of a fluorescent sensor for real-time quantitative recording of oxytocin dynamics in the brain

Daisuke Ino

Osaka University Graduate School of Medicine, Lecturer



脳の細胞外では数百種類にわたる分子が情報伝達を介在すると想定されているが、生きた脳内における局所動態は未だ不明な点が多く、その計測法の開発は強く求められている。本研究では、“幸せホルモン”と呼ばれる神経ペプチド オキシトシンに対する蛍光センサー MTRIA_{OT}の開発を行った。オキシトシン受容体と蛍光タンパク質のキメラ分子に対して指向性分子進化をほどこし、超高感度センサーの開発に成功した。本センサーを生きたマウスの脳に導入し、生体内におけるオキシトシンの脳内動態をリアルタイムで捉えることを試みた。興味深いことに、刺激の種類や動物の行動パターンに依存して、脳内のオキシトシンシグナルは多様な動態を示すことが明らかとなった。

Oxytocin (OT), a hypothalamic neuropeptide that acts as a neuromodulator in the brain, orchestrates a variety of animal behaviors. However, the relationship between brain OT dynamics and complex animal behaviors remains largely elusive, partly because of the lack of a suitable technique for its real-time recording in vivo. Here, we describe MTRIA_{OT}, a G-protein-coupled receptor-based green fluorescent OT sensor that has a large dynamic range, suitable affinity, ligand specificity for OT orthologs, minimal effects on downstream signaling and long-term fluorescence stability. By combining viral gene delivery and fiber photometry-mediated fluorescence measurements, we demonstrate the utility of MTRIA_{OT} for real-time detection of brain OT dynamics in living mice. MTRIA_{OT}-mediated measurements indicate variability of OT dynamics depending on the behavioral context and physical condition of an animal. MTRIA_{OT} will likely enable the analysis of OT dynamics in a variety of physiological and pathological processes.

1. 研究内容

1-1. 超高感度蛍光オキシトシンセンサー MTRIA_{OT}の開発（図1）

細胞外オキシトシンの結合により、明るさが大きく変化する蛍光センサーの開発を行った。センサーのデザインとしては、オキシトシン受容体の細胞内ループに cpGFP が挿入されたキメラタンパク質を採用することにした。高感度なオキシトシン感知を達成するには、センサータンパク質の細

胞膜への強い局在が重要となってくる。まず6種の脊椎動物（ヒト、マウス、ニワトリ、ヘビ、カエル、メダカ）のオキシトシン受容体の細胞膜への局在を解析した。広く生物実験に用いられる培養細胞である HEK293T 細胞に発現させたところ、メダカのオキシトシン受容体をもっとも強い細胞膜局在を示すことが明らかとなった。そこでメダカのオキシトシン受容体をセンサーの骨格として、蛍光センサーの開発を進めることにした。まず最

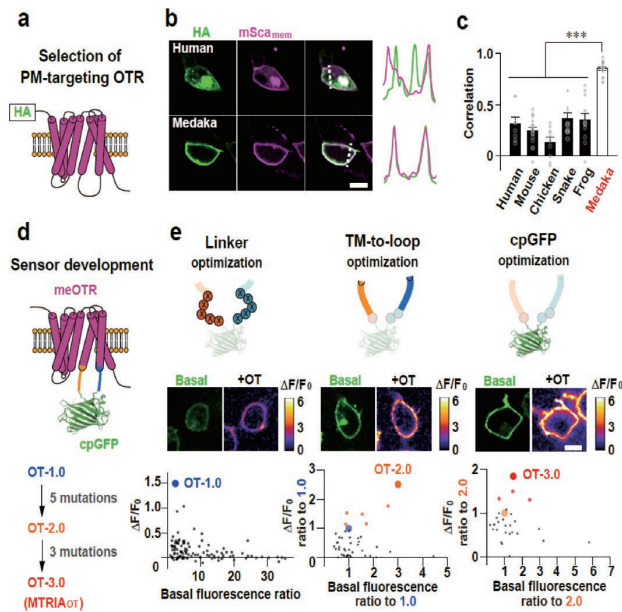


図1：超高感度蛍光オキシトシンセンサー MTRIA_{OT}の開発

a-c、細胞膜に強く局在するオキシトシン受容体のスクリーニング。メダカ由来のオキシトシン受容体が最も強い細胞膜への局在を示した。

d-e、3段階の変異導入によるセンサースクリーニング。リンカー部位、膜貫通ヘリックス、cpGFP内部配列にそれぞれランダム変異を加え、作製した変異体センサーのスクリーニングを行った。最終産物を MTRIA_{OT} と名付けた。

適な cpGFP 挿入部位の決定を行った。メダカのオキシトシン受容体の K240-I268 の間への cpGFP を挿入時に細胞膜局在を保持しつつオキシトシン応答を示すことがわかった。本タンパク質をプロトタイプセンサーとし、ランダム変異を加えることでセンサー感度の進化を試みた。HEK293T 細胞を用いた顕微鏡下でのスクリーニングにより、本スクリーニングを通じ、オキシトシンに対し、最大約 8 倍もの蛍光強度変化を示す超高感度蛍光オキシトシンセンサー MTRIA_{OT} の開発に成功した。

1-2. MTRIA_{OT} を用いた食事に関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定 (図2)

アデノ随伴ウイルスを用いてマウス脳内に MTRIA_{OT} を導入し、ファイバーフォトメトリー法により行動化のマウスにおける脳内オキシトシン

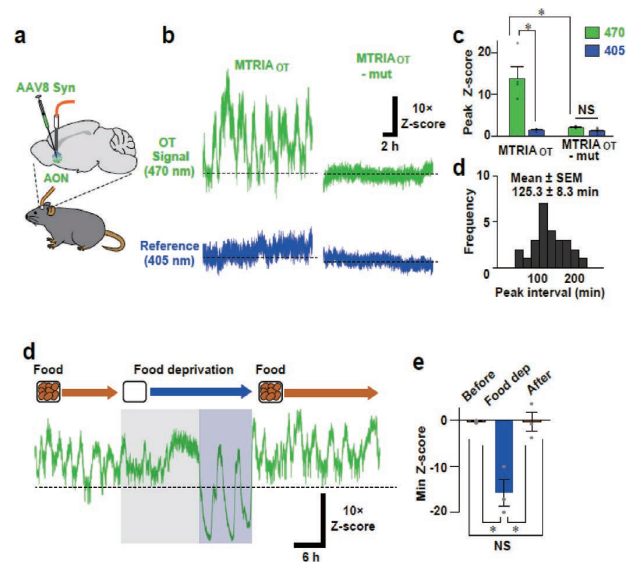


図2：食事に関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定

a-c、MTRIA_{OT} を用いた *in vivo* 脳内オキシトシン動態測定。脳内でオキシトシンが約 2 時間周期で振動していること（オキシトシン振動）を発見した。

d-e、絶食による脳内オキシトシン動態の変動。絶食中にオキシトシン振動の波形が乱れること（オキシトシン乱流）を発見した。

応答を測定した。成体マウスを給餌・給水条件下でケージ内を自由行動させたところ、オキシトシンの一過性情報が約 2 時間周期で振動様に発生することが判明した。われわれはこの現象を“オキシトシン振動 (oxytocin oscillation)” と名付けた。興味深いことにオキシトシン振動は、マウスが食事を行うタイミングと同期していることが明らかとなった。では、オキシトシン振動の発生に食事は必要なのであろうか？ 本命題を検証するために、絶食時にオキシトシン振動への影響が観察されるか否かを解析した。驚くべきことに、絶食後約半日において、脳内オキシトシン応答は消失せず、振動の振幅が大きく変動した。この乱れたオキシトシン応答をわれわれは“オキシトシン乱流 (oxytocin turbulence)” と名付けた。オキシトシン乱流は、再び給餌を行うことで消失し、再び正常なオキシトシン振動が発生することから、オキシトシン乱流は絶食時特異的な脳内信号であることが確認された。興味深いことにオキシトシン乱

流発生中のマウスの行動は、心が乱されたようにケージ内を暴れまわることも明らかとなった。すなわち、脳内のオキシトシン振動の乱れは、空腹による心の乱れをコードする信号となっている可能性が推測される。

1-3. MTRIA_{OT}を用いた老化と関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定（図3）

ホルモンの動態は加齢により変動する可能性が示唆されているが、脳内のオキシトシン動態がどのように変化するかについては、まだ知見が限られている。そこで、様々な週令のマウス（2カ月、6カ月、1年、2.5年）からの脳内オキシトシン応答の測定を fiber photometry により行った。すると2カ月齢において、約2時間周期であったオキシトシン振動が、加齢とともに頻度が減少していき、2.5年齢では約1日周期まで減少することが明らかとなった。すなわち、オキシトシン振動の減少は脳の加齢と何らかの形でリンクしている可能性が推測される。

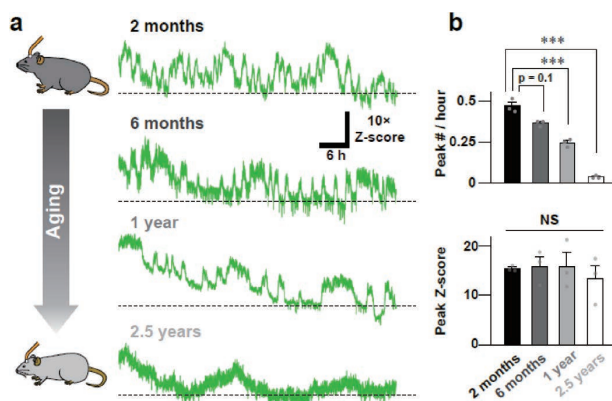


図3：老化と関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定

a-b、様々な週令・月齢のマウス脳からのオキシトシン動態測定を行うことで、老化により脳内のオキシトシン振動の周期が減少していくことを発見した。

1-4. 定量的蛍光オキシトシンセンサーの開発（図4）

まず、がオキシトシンの結合依存的に蛍光寿命

変化を示すかを解析した。MTRIA_{OT}を293T細胞に発現させ、100 nMのオキシトシンを作用させたところ約0.7 nsの蛍光寿命変化が観察された。すなわち、MTRIA_{OT}自体にオキシトシン結合依存的な蛍光寿命変化能が存在することが判明した。そこで、様々な領域を改変した変異体を作製したところ、ある変異体において、野生型よりも蛍光寿命変化幅が大きくなることが明らかとなった。

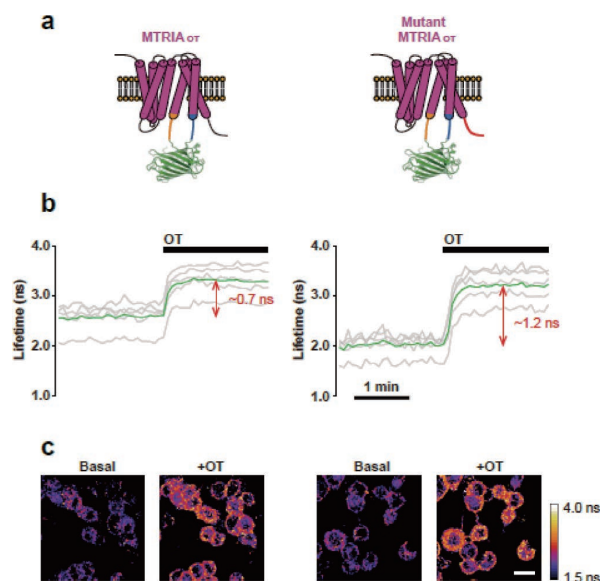


図4：定量的蛍光オキシトシンセンサーの開発

a-b、MTRIA_{OT}（左）と変異型MTRIA_{OT}（右）の蛍光寿命変化計測結果

1-5. 考察

今回われわれは、生きた動物の脳内からオキシトシン動態をリアルタイムで計測することを実現する世界初の手法開発に成功した。本手法を用いた計測により、脳内のオキシトシン信号はFMラジオのように振動していることが明らかとなった。また詳細な解析から、脳内の振動様のオキシトシン信号は食と深くかかわる可能性が示唆された。すなわち、正常な給餌状態では脳内では、オキシトシンは一定（2時間周期）の規則的な信号を刻んでいるのに対し、飢餓状態では信号の波形が大きく乱れるという新規現象が見えてきた。また、われわれは加齢によりオキシトシン振動の周期が

減少していくことも明らかにした。これは脳の老化となんらかの関連が推測される。詳細の解明はこれからというところである。なお、これらの結果をまとめた論文は、学会等で公表を得ているほか、昨年 Nature Methods 誌に採択される¹⁾ など、生命科学分野に大きな反響を与えている。さらに最近では、蛍光寿命変化型のオキシトシンセンサーについても開発に成功しつつある。蛍光寿命型センサーによる定量的な計測が in vivo で可能となれば、脳内オキシトシン濃度変化の定量的な理解がさらに進むであろう。

measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain、Neuro2022 (第45回日本神経科学大会)、2022年6月30日-7月3日、沖縄コンベンションセンター・宜野湾市立体育館・ラグナガーデンホテル、沖縄

2. 発表(研究成果の発表)

1) 論文発表(査読あり)

Daisuke Ino*, Yudai Tanaka, Hiroshi Hibino, and Masaaki Nishiyama: A fluorescent sensor for real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain, Nature Methods, 19, 1286-1294, 2022 *Corresponding author

2) 学会発表

稲生大輔、可視化により探る多様な細胞外シグナル動態、生理研研究会、シナプス研究会 2022、2022年12月8日-9日、生理学研究所、岡崎、招待講演

稲生大輔、Development of Fluorescent Sensors for Real-Time Measurement of Oxytocin and the other Neuromodulators、JPW2022 (第96回日本薬理学会年会)、2022年11月30日-12月3日、パシフィコ横浜、横浜

稲生大輔、可視化により見えてきた複雑な脳内オキシトシン動態、生理研研究会、細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線、2022年9月15日-16日、生理学研究所、岡崎

稲生大輔、A fluorescent sensor for real-time