

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07040

研究課題名(和文)細胞間コミュニケーション可視化のための新規発光性プローブの開発

研究課題名(英文)Development of luminescent probe for inter-cellular communications

研究代表者

齊藤 健太 (SAITO, Kenta)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60374659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では代表的な細胞間コミュニケーションである神経シナプスを可視化する指示薬の開発を行った。シナプス前、後膜に特異的に局在する分子を利用し、それぞれの外部に蛍光・発光性を有する分子を提示させた。まず培養細胞でそれぞれが密着した部分で作る擬似的なシナプスでのシグナルを観ることによって指示薬の最適化を行った。最適化した指示薬をマウス胎児から調製した神経細胞に発現させたところ、前細胞の軸索と後細胞の樹状突起が交差する箇所ですべてのシグナルが観察された。タイムラプス観察によりシグナルができる場所と消失も観察された。光遺伝学的手法により、観られたシグナルでシナプス前部から後部へのシグナル伝達を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this research, I have developed the functional probe to visualize neural synapse, which is a typical inter-cellular communication in multi-cellular organisms. By using the molecules specifically localizing in pre- or post-synapse, fluorescent or bio-luminescent molecules were exposed in synapse. Probe was optimized by assessing the signal strength at contact sites between probe expressing culture cells. The optimized probe successfully visualized the synapse in mouse hippocampal primary culture neurons. Signal formation and dis-formation were seen in time-lapse imaging. Synaptic signal transduction from pre- to post-synapse at signal site was confirmed by optogenetics.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞間相互作用 神経シナプス

1. 研究開始当初の背景

(1) 個体や組織のように多細胞からなるシステムを理解するためには、細胞間の接続情報を理解する事が必須である。神経シナプスや免疫シナプスに代表される細胞間の接続はその接続相手や接続強度が一定ではなく、状況に応じて時々刻々と変化していくと考えられている。

(2) 代表的な細胞間相互作用として、多細胞生物の神経系が知られる。神経系は神経回路の複合体であり、その全容解明は永らく神経科学の中心的課題である。神経系の解明は神経細胞同士の結合状態(シナプス)をマッピングすることで達成される。そのため、半世紀前から現在まで電子顕微鏡による解析が主流であり、30年以上前に線虫(*C. elegans*)で連続切片から合計約7000に及ぶ全シナプスが同定された。しかし高等動物では神経細胞が桁違いに多くなり、大きさ・形状も多岐に渡る。そのため最新の人工知能技術を駆使しても、どの細胞間由来のシナプスカを連続切片から自動追跡するのは難しく、未だに全解析には至っていない。

(3) 一方、遺伝子導入により特定細胞間のシナプスを可視化するプローブが近年に開発されている。これはシナプス形成部位を、シナプス接着因子の結合として検出するものである。最初に、分割 GFP が再構築して蛍光性になる事を利用し、シナプス部位で接着因子の結合を検出するプローブが報告された(以降、分割 GFP 法: Feinberg et al. *Neuron* 2008; 論文の中では GRASP)。その後も同様の原理で動作するプローブが数報あり、最初に報告の合った分割 GFP 法と比べて発現量を少なくしても高い SN 比で観察できる利点などがある。

(4) しかしこれら既存のプローブは、ある時期(一定期間)のシナプスを静的に可視化するだけで、経時変化を追えない。一方、実際にはシナプスは動的なものであり、個体発生や学習に伴いその位置・強度が調整される。よって、既存のプローブでシナプスの動的な情報を得るには、網羅的に各発生時期の個体(または、異なる学習をした個体)をサンプルとして準備しなければならず、高等動物では作業量が膨大となる。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、細胞間相互作用の研究には新規プローブの開発が必須であると考えられる。そこで、本研究では細胞間相互作用を可視化するプローブの開発、特に神経シナプスを動的に可視化するプローブの開発を試みた。

3. 研究の方法

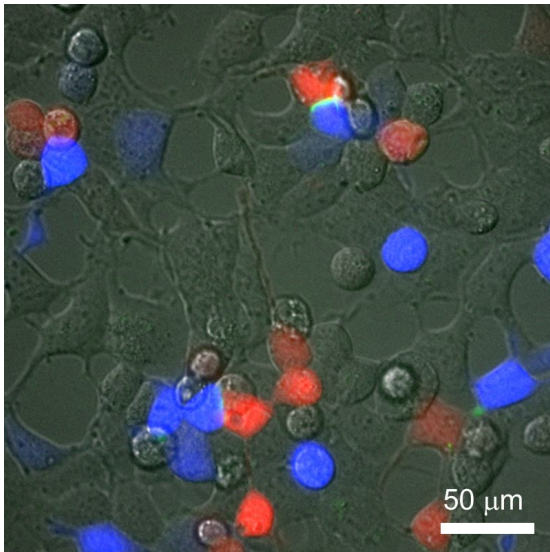
(1) 指示薬を発現させる細胞としては、293細胞及びマウス初代海馬培養細胞を用いた。遺伝子導入法としては、293細胞には Lfectamine2000、マウス初代海馬培養細胞にはエレクトロポレーション(Nepa21, ネットパジーン)を用いた。エレクトロポレーションでは細胞密度・遺伝子濃度・培地・電圧・パルス等の条件を検討し、60%以上の導入効率、80%以上の生存率で遺伝子導入ができることが確認できた。

(2) 観察は主に電動倒立顕微鏡(Ti-E, Nikon)にて行った。対物レンズとしては主に、40倍ドライ NA0.75 または 60倍油浸 NA1.40 を用いた。シグナル検出は Andor iXon3 EM-CCD または、Andor Zyla-4.2plus sCMOM を用いた。蛍光観察および光刺激実験では、Lumencore LightEngine を光源として用いた。

4. 研究成果

(1) まず、分子間 BRET (bioluminescence resonance energy transfer) を利用したシナプス可視化指示薬の作成を行った。これは分子デザインとして、シナプス前細胞にカイアシ蛍光タンパク質 (GLuc)、後細胞に低分子リガンドと特異的に結合するタンパク質 (HaloTag) を利用し赤色蛍光色素をシナプス部位に提示するものである。まずは神経接着因子の細胞外ドメインにそれぞれを結合し、これを基本となる分子として培養細胞発現用プラスミドベクターに導入した。293細胞に発現させ、それぞれがきちんと細胞外に提示されるかどうか確認をおこなった。赤色蛍光色素は HaloTag 結合型とし、HaloTag が発現した後に培地に添加し1時間程度37度でインキュベートする事で結合させ、その後に培地中の余分を洗浄した。GLucの方は基質である coelenterazine の添加により、赤色蛍光色素の方は励起光を与えてイメージングを行ったところ、それぞれ発現させた293細胞の細胞膜で発光・蛍光が確認できた。また、マウス初代海馬培養細胞に指示薬を発現した際に GLuc、赤色蛍光色素が細胞外に提示される事を確認することができた。

(2) 次に指示薬の汎用性を高める観点から、発光性だけでなく蛍光性の指示薬開発に取り組んだ。シナプス前、後膜それぞれに特異的に局在する接着因子を蛍光分子と融合させた。この指示薬をそれぞれ発現した293細胞同士が密着した部分で作る擬似的なシナプスでのシグナルを確認できた(次の画像において、青色はシナプス前細胞に発現させた BFP、赤色はシナプス後細胞に発現させた RFP、緑色は作成した指示薬、に由来する蛍光シグナルを示す)。



(3) 単離したマウス胎児海馬神経細胞に上記の指示薬をそれぞれ発現させ、神経細胞同士が形成するシナプスを観察できるかどうか試みた。結果的に、2種の神経細胞間がシナプスを作る領域にシグナルが観察できた。ここで、観察されたシグナルが本当にシナプスに由来するかどうかを確認する必要がある。そこで、神経シナプスマーカー（シナプス前膜：シナプトフィジン、シナプス後膜：ホーマー1）との共発現を行った。結果として、観察されているシグナルとこれらシナプスマーカーが共同存在しているのが確認できた。

(4) さらに、観察されているシナプスが機能的なシナプスであるかどうかを確かめた。方法としては、シナプス前細胞に光遺伝学ツールの一つであるチャンネルロドプシンを発現させ、シナプス後細胞にはカルシウムイオン指示薬を発現させる。もし、シナプスとして観察されている箇所がシナプスとしての機能があれば、光刺激によりシナプス前細胞からの神経伝達物質の放出が起こる。シナプス後細胞で神経伝達物質が受容できれば、それに伴うカルシウムイオン上昇が確認できる。条件検討に時間を要したが、上記の予測どおり、光刺激に伴いシナプス後細胞でのカルシウム上昇が確認された。培養細胞レベルでは良好な結果が得られているため、今後は主に、個体レベルで指示薬の有効性を確認する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

(1) A. Takai, M. Nakano, K. Saito, R. Haruno, M.T. Watanabe, T. Ohyanagi, T. Jin,

Y. Okada, T. Nagai

“Expanded palette of Nano-lantern for real-time multi-color luminescence imaging.”

Proceedings of the National Academy of Sciences USA

Vol.112 p.4352-4356 (2015), 査読有

<https://doi.org/10.1073/pnas.1418468112>

(2) M. Yamanaka, K. Saito, N.I. Smith, Y. Arai, K. Uegaki, Y. Yonemaru, K. Mochizuki, S. Kawata, T. Nagai, K. Fujita

“Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent protein imaging.”

Journal of Biomedical Optics

Vol.102, p.101202 (2015), 査読有

<https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.10.101202>

(3) K. Saito, T. Nagai

“Recent progress in luminescent proteins development.”

Current Opinion in Chemical Biology

Vol.27, p47-51 (2015), 査読有

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.029>

[学会発表](計 1 件)

齋藤健太、寺田純雄

神経シナプスの動態を可視化する新規プロトタイプの開発

第123回日本解剖学会総会・全国学術集会

2018年3月30日、日本医科大学、東京都武蔵野市

[図書](計 1 件)

T. Nagai, K. Horikawa, K. Saito, T. Matsuda

“Genetically encoded Ca^{2+} indicators; expanded affinity range, color hue and compatibility with optogenetics.”

Application of Genetically Encoded Indicators to Mammalian Central Nervous System, Frontiers in Molecular Neuroscience

p38-42 (2018)

DOI:10.3389/978-2-88919-804-7

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 健太

(SAITO, Kenta)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60374659

(3)連携研究者

寺田 純雄

(TERADA, Sumio)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授
研究者番号：00262022