

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14329

研究課題名(和文)新規神経ネットワーク形成標識法の開発とその応用

研究課題名(英文)Development of fluorescent probe for visualization of neuronal connectivity and its application

研究代表者

木下 暢暁(KINOSHITA, Nagatoki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：50391933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路の機能解析が細分化を志向する一方で、特定の神経回路を標識、検出できる技術は極めて少ない。本研究において開発された新技術は、緑色蛍光タンパク質の再構成を利用したもので、遺伝学的制御下に標的とする細胞間接続のみを検出できる。また既存の類似手法に比較して飛躍的な高検出感度を実現した。本技術をマウスの神経系に適用したところ、人工培養条件下、生体脳内のいずれにおいてもシナプス接続を標識した。さらに緑色だけではなく、青色、黄色を呈する標識も開発し、同時に複数の神経接続様式を描出可能にした。これまでにない高感度と汎用性を持つ本開発技術は脳機能解明の促進に大きな貢献が期待できる。

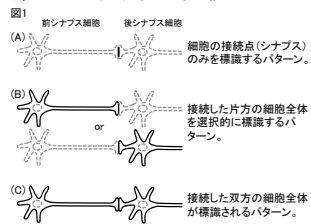
研究成果の概要(英文)：Identification of the specific neuronal connectivity of neural circuits is crucial to reveal precise brain function that governs animal behavior. However, effectively labeling of specific neuronal connections in complicated networks is still quite difficult. Thus, I developed a novel genetically encoded fluorescent indicator for visualizing intercellular connections. This technique reconstituted robust GFP signal specifically at the interface between cell surfaces. Its signal intensity is much higher than that of similar technique previously reported. Application of this technique into the mouse nervous system demonstrated visualization of precise synaptic connectivity in vitro and in vivo. Moreover, I generated color variants of this probe molecule, which enable us to detect multiple convergent connections simultaneously. These results demonstrate that my system has high sensitivity and versatility, which will facilitate the analysis of complicated brain networks in vivo.

研究分野：神経科学

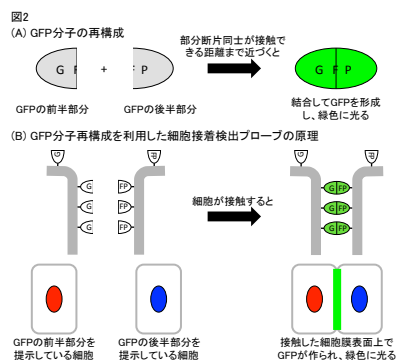
キーワード：蛍光プローブ 神経回路 神経シナプス 可視化技術 細胞間接着

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経回路網の標識、可視化法としては細胞膜に吸着し拡散する物質を用いるものがある。標識シグナル強度が大きく、細胞膜全体に拡散するため標識された神経細胞の同定や形態の把握がし易いが、細胞毒性を持つものが多く、生体で用いることが難しいこと、シナプスを介した接続相手細胞を標識できないもの(図1B)がほとんどで、またそれができるもの(図1C)は二次的三次的に接続した細胞にもシグナルが拡散してゆくため、標的二者間の接続のみを抽出することが困難、などの欠点がある。さらに、遺伝学的な手法が使えないことは現代神経科学においては大きな短所と言える。



(2) 以上の背景から遺伝学的制御下での標識が可能なタンパク質分子(プローブ)を用いた手法が、近年になって少ないながらも開発されてきている。その原理としては、2種類のタンパク質分子をペアで使い、標的とする前シナプス神経細胞に片方のプローブ分子を発現させ、後シナプス神経細胞にもう片方のプローブ分子を発現させる。標的とする二者がシナプス接続するとその接点で前後シナプス細胞に発現させたタンパク質分子が相互作用を起こし、その反応を利用して標識する。標識の特異性は高いが、酵素活性を利用するものは基質をシナプス領域に供給する必要があることが難点であり、本研究課題と同様の蛍光タンパク質の再構成を応用したもの(図2)はシグナルが弱く、特に高等動物での標識はあまり成功しているとは言えない。これら既報のプローブでは、前シナプス細胞専用分子と後シナプス細胞専用分子を用いているが、神経回路内では神経細胞が数珠つなぎになっていること(つまり一つの神経細胞は前シナプス細胞でもあり、後シナプス細胞でもあること)を考えると、多段階のシナプス接続を解析することに難があった。またその標識シグナルの局在はシナプス部位(接点)のみ(図1A)だが、化学標識法のように細胞膜全体を標識するタイプの方が回路の描出に適している場合もある。さらに、蛍光タンパク質を用いるものでは緑色以外の多色な標識の可能性があるにもかかわらず、本研究課題申請



時にはそういった多色化を応用した高次な接続様式(多価接続、多段階接続など)を描出できるシステムは存在しなかった。

(3) 比較的巨視的な神経回路網の投射接続様式はほぼ記述され尽くしてきており、現在はより微細な回路の発見や、個々の行動を担う特定の回路の同定と機能解析に神経科学研究の焦点が移行してゆく中、遺伝学的制御が可能で、より高感度に、多様な接続様式の解析に対応できる標識手法の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

「研究開始当初の背景」で述べた通り、既存の神経回路標識法にはいくつかの難点があるためその多くを解消できる新技術の開発が本研究課題の主眼である。具体的には、遺伝学的制御が可能であること、既存技術に比べて高感度であること、前後シナプスのどちらも標識できること、必要に応じて標識シグナルの分布をシナプス接合点のみであったり、接続した神経細胞全体を描出したりできること、様々な色の組み合わせによって多様な接続様式の検出が可能であること、である。

3. 研究の方法

(1) 標識用プローブ分子の開発。主に平成27年度では、まず様々なプローブ分子の候補を作製し、それぞれの分子の特性を評価検討した。

①細胞膜相互作用部分の検討。

細胞の接触を検出するためにはプローブ分子を膜タンパク質として細胞表面に提示する必要がある。その様式としては膜貫通型とGPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型があるが、そのどちらがより効率よくプローブ分子を細胞表面に提示できるか検討した。

②緑色蛍光タンパク質(GFP)の切断部位の最適化。

GFPは2分割してもその部分断片が十分に近づくと結合し、GFP1分子を再構成して蛍光を発する。この現象自体は報告例が多数あり、GFPの分割部位についても再構成効率の高い部位の候補は分かっている。本プローブにおいてそのうちのどれが最適かを検討した。

③多色化の検討。

GFP分子はその色調変異体を数多く持ち、例えば青色蛍光タンパク質(BFP)黄色蛍光タンパク質(YFP)などがある。これらの色調変異は特定の部分のアミノ酸の変化に依存することが分かっている。このことを本プローブシステムに応用すれば、部分断片の組み合わせ方に依存的な多色化が可能になると予測した。この組み合わせ依存的な多色化は複雑な神経細胞接続様式を描出でき、本技術の有用性汎用性を飛躍的に高めると考えられることからその実現について検討した。

(2) 神経シナプス標識の実践。平成28年

度では、それ以前に作製したプローブ分子を実際に神経系に応用し、シナプス接続を検出できるのか検討した。

①初代培養系における検討。

遺伝子導入の容易さと観察のしやすさから、海馬神経細胞の初代分散培養系でシナプス接続を検出できるか検討した。

②生体内における検討。

本技術は生体内の複雑な接続様式を検出することを目標としている。しかしながら、まずは新技術の性能を確認するため比較的明瞭な神経回路において想定される接続を検出できるかを試した。マウス脳における視床-大脳皮質回路について検討したが、その回路を選択した理由は、接続様式に関する知見が豊富で新技術の標識の効率や信頼性を評価しやすいこと、大脳皮質への遺伝子導入は子宮内電気穿孔法などで容易であること、視床と大脳皮質は比較的距離が離れており、本技術で使用する2種類のプローブ分子の混合が起きにくいこと、が挙げられる。なお視床への遺伝子導入はアデノ随伴ウイルス(AAV)の脳定位注入法を用いた。

4. 研究成果

(1) 特長のある新規神経回路標識プローブの開発。

①細胞膜相互作用部分の検討。

膜貫通型とGPIアンカー型についてどちらが本システムに適しているかを検討したところ、GPIアンカー型の方が効率良く細胞表面に蛍光タンパク質分子を提示できそうであることが分かった(図3)。膜貫通型タンパク質は極めて多くの種類があるためこの傾向は絶対的とは言えないが、従来の膜タンパク質プローブは

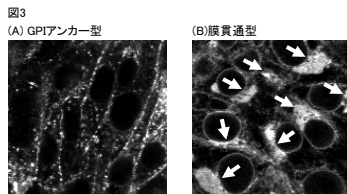
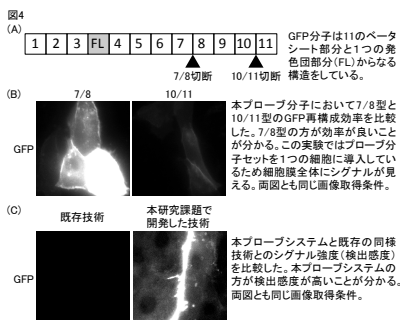


図3 膜貫通型にしたプローブ分子は細胞内の小胞体やゴルジ体にとどまっているもの(矢印)の方が多いため、GPIアンカー型ではほとんどが細胞膜に提示されている。

②GFPの切断部位の最適化。

GFP分子は11のベータシート部位と1つの発色団部位からなっている(図4A)。再構成系プローブ作製におけるGFP切断部位としていくつか報告があるが、ベータシートの番号で表示すると7/8(7番目と8番目のベータシートの間で切断)、8/9、10/11に大別される。このうち既報の神経標識プローブは全て

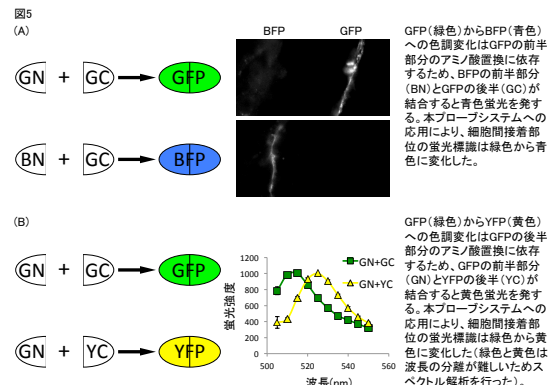


10/11型である。本システムにおいてこれらを比較検討した結果、10/11型よりも7/8型の方が再構成効率が高いことが分かった(図4B)(8/9型は7/8型にわずかに劣る)。この結果はこれまでのプローブシステムにおいても切断部位の選択を最適化することで、検出感度が向上する可能性を示しており、類似の検出技術の設計に貢献するものと考えている。

①、②に加えて各機能部位の分子構造の調整を行った結果、最終的に既存の同様技術に対して10倍以上の検出感度の向上を達成した(図4C)。またこの過程において、予測していなかった成果として、シグナル分布の多様性を獲得できた。詳細は「④その他」に記載。

③多色化の検討。

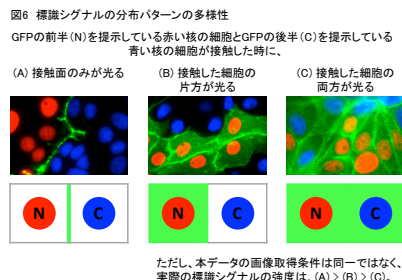
GFP分子を基本として、緑色以外の色調変化をもたらす既知のアミノ酸置換を導入し検討した結果、本プローブシステムでも異なる色調を示すものの作製に成功した(図5)。BFP型では1-7番ベータシート部分のアミノ酸置換によって、YFP型では8-11番ベータシート部分のアミノ酸置換によって色調が変化した。このことは単に多色になったというだけではなく、その組み合わせ依存的な色調変化によって接続の選択性や多段階接続の同時検出といった高次多様な接続性の検出が可能になることを意味し(図7)、神経回路網解析を飛躍的に促進することが期待される。



④その他。

シグナル分布の多様化。

②でも触れた通り、様々な分子構造を試験する過程で、シグナル分布の異なるものが得られてきた(図6)。実験前には細胞間接着部位のみにシグナルが見られると考えられたが、実際には2つのプローブ分子を発現している細胞間で、ある程度GFP再構成シグナルが拡散している組み合わせが多く観察された。プローブの分子構造と2分子の組み合わせを調整すると、細胞間接着部位のみを標識するものに加えて、接着した片方の細



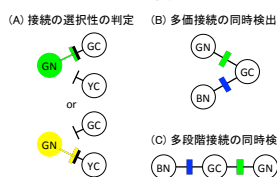
ただし、本データの画像取得条件は同一ではなく、実際の標識シグナルの強度は、(A) > (B) > (C)。

胞膜全体、接着した両方の細胞膜全体、を標識するものが得られた。シグナル強度は拡散の度合いに反比例したが、タンパク質分子プローブであるにもかかわらず、化学標識法のように細胞全体の形態を描出できることは接続に参与した神経細胞の検出を容易にし、本システムの汎用性を大きく増大させると考えられる。

プローブ分子の互換性。

神経接続標識に関わる既報のタンパク質分子プローブは前後シナプス局在膜タンパク質を応用している。このことはシナプスのみを標識するという意味では合目的であるが、他方では、生体内でシナプス新生に関わる分子を応用した場合には、本来生じない場所に人工的にシナプス形成を誘引する可能性がある。また前後シナプス専用分子を規定してしまうことは、一つの神経細胞は神経回路網内では前シナプス細胞でもあり後シナプス細胞でもあることを考えると、多段階接続の検出を困難にしてしまう。本プローブ分子はそのほとんどの部分脊椎動物細胞が持たない人工的なタンパク質にしており、生理現象に影響するような分子間相互作用を起こす可能性が低い。また前後シナプスに限定的に局在するものではないため、1つの神経細胞の入力を受ける後シナプスと出力先で形成する前シナプスの両方を同時に検出するこ

図7 本研究課題において開発された標識システムにより可能になると考えられる多様な接続様式の例



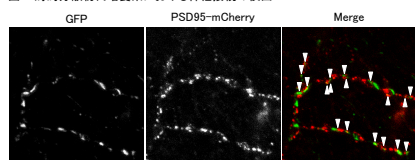
とが可能である(図7C)。このことも本システムの汎用性を大きく増大させる特徴と考えられる。

(2) 神経系における標識の実践。

①初代培養系における検討。

マウス海馬初代分散培養系において、電気穿孔法を用いて2つのプローブ分子を別々の神経細胞に導入発現させ、その2種類の神経細胞を共培養した。非拡散型プローブ分子セットを用い、後シナプス局在タンパク質(PSD-95)に赤色蛍光タンパク質(mCherry)を融合したものをシナプスマーカーとして共発現させた。結果としてプローブの標識シグナルとシナプスマーカーの共局在が確認できたことから、本プローブシステムがシナ

図8 海馬分散初代培養系における神経接続の検出



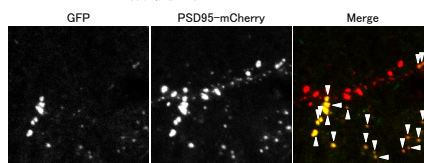
GFP画像は本プローブシステムの標識シグナル、つまりGFPの前半部分(GN)を遺伝子導入された神経細胞とGFPの後半部分(GC)を遺伝子導入された神経細胞との接触部位において再構成(GN+GC)されたGFPを示し、PSD95-mCherry画像はGNまたはGCを遺伝子導入された神経細胞の全てのシナプス部位を示す。シナプス部位における標識シグナル(両者の共局在)が多数認められ、その場所を重ね合わせ画像(Merge)において矢頭で表示。

②生体内における検討。

生体マウス脳に対してプローブ分子の片方を子宮内電気穿孔法で大脳皮質に導入発現

させ、もう片方の分子をAAVの脳定位注入法を用いて視床に導入発現させた。非拡散型プローブ分子セットを用い、後シナプス局在タンパク質(PSD-95)に赤色蛍光タンパク質(mCherry)を融合したものをシナプスマーカーとして共発現させ、大脳皮質におけるシナプス接続を標識できるか検討したところ、プローブの標識シグナルとシナプスマーカー両者の共局在が確認できた。このことから、本プローブシステムは生体内にける神経細胞のシ

図9 マウス脳における神経接続の検出



GFP画像は大脳皮質における本プローブシステムの標識シグナル、つまりGFPの前半部分(GN)を遺伝子導入された大脳皮質神経細胞とGFPの後半部分(GC)を遺伝子導入された視床神経細胞との接触部位において再構成(GN+GC)されたGFPを示し、PSD95-mCherry画像はGNを遺伝子導入された大脳皮質神経細胞の全てのシナプス部位を示す。シナプス部位における標識シグナル(両者の共局在)が多数認められ、その場所を重ね合わせ画像(Merge)において矢頭で表示。

ナプス接続の検出に実用できることが示された(図9)。

③その他

遺伝子組換えマウスの作製。

本プローブシステムの生体内での応用に際して、より再現性の良いデータを容易に得られるよう、各プローブ分子を遺伝学的に組み込んだマウスを作製した。またその遺伝子発現を遺伝子組換えタンパク質(Cre)依存的にすることで、発現の時期や部位(細胞種)を任意に制御できるようにした。この遺伝子組換えマウスの作製により、本プローブシステムの関連分野における学術的利便性は大きく向上するものと考えられる。

(3) まとめ

本研究課題において開発された新規神経回路標識システムは既存同様技術に比して非常に高い検出感度を示し、さらに色調やシグナル分布パターンにもこれまでにない多様性を有している。そしてその標識の実用性も確認できたことから、本技術は今後、これまで困難であった希少な神経回路や複雑な神経接続様式の発見やメカニズムの解明に活用が期待される。さらに、本プローブ分子はそれ自体では神経細胞特異的な要素を持たない。このことは非神経細胞間の相互作用、つまり、すべての細胞間接触の検出について応用可能であることを示唆している。従って、本研究課題の成果は神経科学に限らず、細胞間相互作用に関わる様々な生物学研究についても貢献が期待できるものと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 木下 暢暁, Delineation of neuronal connectivity employing intercellular GFP

reconstitution method: GRAPHIC、第10回神経発生討論会、2017年03月10、11日、秋保リゾートホテルクレセント（宮城県仙台市）

② 木下 暢暁、Delineation of neuronal connectivity employing intercellular GFP reconstitution method: GRAPHIC、第39回日本神経科学大会、2016年07月22日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

③ 木下 暢暁、Development of fluorescent probe for visualization and isolation of specific neural circuits、第38回日本神経科学大会、2015年07月29日、神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 暢暁 (KINOSHITA, Nagatoki)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：50391933

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

宮脇 敦史 (MIYAWAKI, Atsushi)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号：80251445

下郡 智美 (SHIMOGORI, Tomomi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号：30391981

(4) 研究協力者

()