

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08584

研究課題名(和文) シナプス伝達効率の調節に伴うMunc13-1ナノクラスターの時空間動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of spatiotemporal dynamics of Munc13-1 nanoclusters associated with synaptic transmission

研究代表者

並木 繁行(Namiki, Shigeyuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：90452193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経のシナプス伝達は、シナプス分子が形成するナノメートルスケールの分子集合体(ナノアセンブリ)によって制御を受けていることが最近明らかになってきた。本研究では、シナプス分子のナノアセンブリの時空間動態を可視化解析できる生細胞超解像イメージング技術の開発に取り組んだ。単一分子局在化法を測定原理とする超解像顕微鏡法に適した特性を持つ蛍光プローブ技術を開発し、さらに顕微鏡システムの光学系を最適化することで、生きた細胞で超解像イメージングを行うことに成功した。本研究で開発した生細胞超解像イメージング技術は神経科学のみならず多様な分野の生物学研究への適用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能分子が集合して形成されるナノアセンブリに関する研究は、神経科学分野のみならず多様な分野の生物学研究で重要視されている。本研究成果はシナプス機能制御の背景にある分子メカニズムにメゾスコピックな視点から理解を達成するという意義を有している。今後、多くの生体分子が形成するナノアセンブリの性質を詳細に理解するためには、生きた標本でナノアセンブリの様子を観察することができる超解像顕微鏡法が必要になる。本研究成果はこのような技術的要請に応え、多様な細胞機能の背景にある分子メカニズムの理解を目指す研究に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：It has recently become clear that central nervous system synaptic transmission is regulated by nanometer-scale molecular assemblies (nanoassemblies) formed by synaptic molecules. In this study, we developed a live cell super-resolution imaging technique that can visualize and analyze the spatiotemporal dynamics of nanoassembly of synaptic molecules. By developing a fluorescence probe technology that has characteristics suitable for super-resolution microscopy using the single molecule localization method, and further optimizing the optical system of the microscope system, super-resolution imaging was successfully performed in living cells. The live cell super-resolution imaging technology developed in this research can be expected to be applied not only to neuroscience but also to biological research in various fields.

研究分野：薬理学

キーワード：超解像顕微鏡法 シナプス分子 蛍光プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢シナプスの伝達効率調節の分子機構

中枢神経シナプスでのシナプス伝達の効率はシナプス後部による調節に加え、シナプス前部ではシナプス小胞の開口放出によって放出された神経伝達物質であるグルタミン酸の放出量によっても調節される。放出されたグルタミン酸はシナプス後部のグルタミン酸受容体を活性化し、シナプス伝達が成立する。これまでにシナプス小胞の開口放出に参与する分子が 20 種類以上同定され (Südhof TC. Neuron, 2012) この成果は 2013 年の Südhof のノーベル生理学・医学賞の受賞にもつながっている。シナプス伝達の性質や背景の分子メカニズムについては主に電気生理学的アプローチによって進められてきたが、依然としてシナプス小胞の開口放出がどのような分子メカニズムによって調節されているのかは不明な点が多い (Regehr WG, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012)。特にシナプス小胞の開口放出部位の近傍で分子がどのように配置されてシナプス伝達効率の調節を実現しているのかという分子の空間情報についての知見が不足しており、シナプス伝達効率の変化の背景にある分子メカニズムの完全理解には至っていない。

研究代表者らはこれまでにシナプス前部のシナプス小胞の開口放出部位の分子実体の解明を目指して研究を進めてきた。研究代表者らが開発したグルタミン酸の蛍光イメージング技術によって開口放出されたグルタミン酸の精密計測と開口放出関連分子の超解像顕微鏡による解析から、シナプス小胞の放出部位の数と Munc13-1 分子がシナプス前部で形成する 50nm 程度の大きさの分子クラスター (Munc13-1 ナノクラスター、右図) の数が極めて良く一致することを明らかにした。また、シナプス小胞の開口放出に必要な Syntaxin 分子が Munc13-1 ナノクラスターと共局在していること、Munc13-1 のノックダウンによって Syntaxin はシナプス前部への集積能を失うことを発見し、Munc13-1 ナノクラスターがシナプス小胞の開口放出部位の分子実体の一部であることを明らかにした。今後は、シナプス分子のナノスケールの構造とシナプス伝達効率との関係を明らかにする研究の推進が必要である。

超解像顕微鏡法によるシナプス分子の解析

シナプスでの分子配置をナノメートルスケールの空間解像度で解析する場合は既存の光学顕微鏡の空間解像度の限界を超えた超解像顕微鏡、とりわけ単一分子局在化法を測定原理とする STORM 法や PALM 法が有望である (Small AR et al. Annu Rev Phys Chem. 2014)。単一分子局在化法では細胞内の解析対象分子を蛍光標識抗体や蛍光タンパク質を介して蛍光標識し、標識した蛍光色素や蛍光タンパクをまばらに明滅させる。蛍光輝点の中心位置を決定し、マッピングしていく作業を数万枚の画像について繰り返すことによって 1 枚の超解像イメージを再構成する。PALM 法では標的タンパク質と光活性制御蛍光タンパク質との融合タンパク質を細胞に発現させ、光照射による蛍光のスイッチングすることで蛍光明滅を実現するものであり、生細胞への適用が可能である。しかしながら PALM 法は蛍光タンパク質を利用するため、1 分子の蛍光タンパク質が退色するまでに放出する光子数が少ない。そのため、蛍光の輝点が暗く、輝点の中心位置の決定精度が不足し、空間解像度が低下する場合が多い。このような現状から、生きた細胞に適応可能な超解像顕微鏡法の開発が求められている。

2. 研究の目的

生きた神経細胞のシナプス前部でシナプス分子の超解像イメージングを可能にする超解像顕微鏡技術の開発を目的とする。また開発した生細胞超解像イメージング技術を実際に生きた神経細胞に適用し、シナプス分子の時空間ダイナミクスの精密計測を実現する。

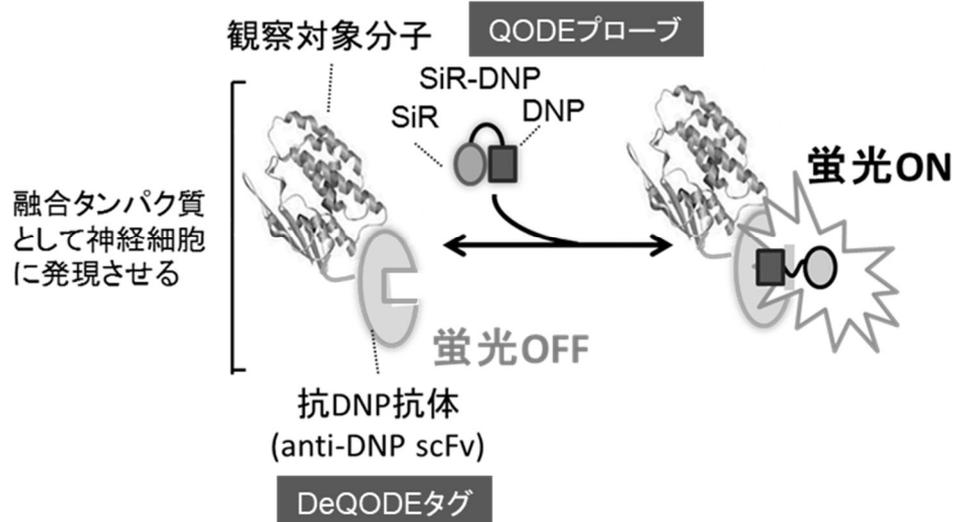
3. 研究の方法

生きた神経細胞での超解像イメージング系の確立

生きた細胞でシナプス分子のナノクラスターの可視解析が可能な超解像イメージング系を確立する。ここでは生きた細胞での単一分子局在化法での超解像イメージングが可能な PALM 法とともに研究代表者らが開発した DeQODE 法を採用し、PALM 法より一層空間解像度が高い超解像イメージングにも挑む。PALM 法による超解像イメージの取得のために観察対象のシナプス分子と光活性制御タンパク質との融合タンパク質を神経細胞で発現するウイルスベクターを作製した。光活制御蛍光タンパク質は、光活性化型、波長シフト型、活性化反復型の蛍光タンパク質の中からシナプスでの PALM イメージングに適したものを試験的な PALM イメージングを行いつつ選定した。選定にあたっては超解像イメージの空間解像度を左右する 1 分子の蛍光タンパク質が退色するまでに放出する光子数やタンパク質の細胞内での安定性、蛍光 ON/OFF のスイッチングカインティクスなどを指標にした。

DeQODE 法では、細胞内に可視化対象の分子との融合タンパク質として発現させた抗消光団一本鎖抗体(DeQODE タグ)に対して、消光団と蛍光物質を共有結合させた細胞膜透過性の化合物(QODE プローブ)が結合した際に蛍光明滅プローブの蛍光消光が解除され、初めて蛍光性となる仕組みを利用する(下図)。ここで一本鎖抗体と細胞内に存在する蛍光明滅プローブが可逆的かつ繰り返し結合・解離することで、蛍光の目滅が期待できる DeQODE 法による蛍光明滅を利用した超解像イメージの取得のために観察対象分子と抗 DNP scFv (anti-DNP scFv: DeQODE タグ)との融合タンパク質を培養細胞で発現するレンチウイルスベクターを作製し、DeQODE 法に適切な発現量となるように細胞へ感染させるウイルス量を最適化した。また、発現した融合タンパク質を高いシグナル/ノイズ比で蛍光標識できるように QODE プローブの標識条件を最

DeQODE法によるライブセル超解像イメージング



適化した。

PALM 法及び DeQODE 法による超解像イメージングを行う際の光学系の最適化も行った。観察対象の分子に由来する 1 分子蛍光シグナルとバックグラウンド蛍光の比が最も高くなるように励起・蛍光波長にフィットした光学フィルターや半導体レーザーの選定をした。

生細胞内でのシナプス分子動態の解析

PALM 法と DeQODE 法によって、生細胞でのナノクラスターの時空間動態を観察するのに十分な蛍光輝点像が得られるのか検証した。実際に DeQODE 法で生細胞超解像イメージングが可能であることを検証するために、細胞内オルガネラをやシナプス分子対象としたイメージングを実施し、空間分解能や時間分解能、イメージング可能な期間

を評価した。。

4. 研究成果

生きた神経細胞での超解像イメージング系の確立

シナプスの細胞内での微細配置を顕微鏡によるイメージングに供するための標本作製条件の最適化が順調に進んだ。種々のシナプス分子の哺乳類細胞での発現コンストラクトを作製した。また神経細胞へのシナプス関連分子の発現のためにレンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを発現し、これらの発現効率や細胞内局座についての評価を行った。

蛍光の ON/OFF スwitchングによって得られた蛍光輝点の位置情報から細胞内分子の微細配置を観察できる超解像顕微鏡法である蛍光分子局在化法を可能にする DeQODE 法の開発にも取り組んだ。蛍光消光団と蛍光団からなる化合物が抗消光団抗体と結合することで蛍光消光が解除され、蛍光が ON になる仕組みを培養細胞で評価した。抗消光団抗体の培養細胞内での発現量や用いる化合物の種類、励起光の強度等によって蛍光分子局在化法に最適な蛍光輝点の密度や蛍光 ON の持続時間を調節できることが確認できた。また、シナプス関連分子を含む複数の分子と抗消光団抗体との融合タンパク質の発現コンストラクトを作製し、培養の神経細胞や非神経細胞に遺伝子導入により発現させたところ、それぞれの分子に期待された細胞内での分布を示すことが確認できた。

蛍光プローブ技術の開発と合わせて、生細胞での高速蛍光画像取得に適した顕微鏡システムの整備を進め、これまでに高速 EM-CCD カメラを複数台設置して様々な細胞の厚さにも対応して高速かつ高精細な超解像イメージングを行う顕微鏡ハードウェアのセットアップを完了した。

PALM 法や DeQODE 法で用いる分子タグの細胞内での発現条件の最適化により蛍光明滅分子タグを培養細胞内で発現させ、生きた細胞内で惹起した蛍光明滅を用いて実際に単一分子局在化法による超解像イメージングが可能かどうかを調べた。その結果、PALM 法ではナノクラスターの時空間動態を精密に解析するには輝点の光量が不足していることが分かった。それに対し、DeQODE 法では、シリコンローダミンの蛍光を ON にした際に十分に明るい輝点を得られることが分かった。そこで、DeQODE 法を用いたテストとして、細胞内小器官に DeQODE タグを発現させたところ、標的の細胞内小器官での蛍光明滅を確認することができ、超解像イメージを数 10 秒の時間分解能で得ることができた。この成果は今回開発した蛍光分子タグによる蛍光明滅が生きた細胞内で長時間にわたって可能であることを示すものである。これによって、これまで困難であった生きた培養細胞内の分子を観察対象とした単一分子局在化法による超解像イメージング法が可能になった。

生細胞内でのシナプス分子動態の解析

高速で蛍光明滅が可能な DeQODE タグと QODE プローブの組み合わせを用いて、実際に生きた神経細胞での超解像イメージングに取り組んだ。培養海馬神経細胞に観察対象のシナプス分子と DeQODE タグの融合タンパク質を発現させるために、レンチウイルスやアデノ随伴ウイルスの発現ベクターを作成した。これらのウイルスベクターを用いて、培養神経細胞内に発現させた融合タンパク質の細胞内の局在を神経細胞の形態と対応付けて確認し、DeQODE タグを付加した際に内在性の標的タンパク質と同様の局在を示すかどうか調べた。また、発現した融合タンパク質を高いシグナル/ノイズ比で蛍光標識できるように QODE プローブの種類や濃度など標識条件を最適化した。

ここまでに最適化した標本の作製条件と顕微鏡のセットアップを用いて、生きた培養海馬神経細胞でシナプス分子の超解像イメージングを行い、超分子アセンブリの時空間動態を観察することができた。本研究の成果は今後シナプス伝達に關与する多くのシナプス分子のナノメートルスケールの微細な配置の時空間動態の解析のみならず、中枢での神経伝達以外の多様な細胞機能に關与する分子群の微細配置の時空間動態の解析

への適用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpapa N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Hirose K. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nat Neurosci. | 6. 最初と最後の頁 41-49 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-017-0041-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Onishi T, Sakamoto H, Namiki S, Hirose K | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 The Altered Supramolecular Structure of Dopamine D2 Receptors in Disc1-deficient Mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 1692 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-20090-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林新九郎, 大久保洋平, 並木繁行, 浅沼大祐, 廣瀬謙造 |
| 2. 発表標題 長時間1分子蛍光イメージング技術の開発とそのシナプス分子イメージングへの応用 |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 磯野有希, 浅沼大祐, 大久保洋平, 並木繁行, 廣瀬謙造 |
| 2. 発表標題 近赤外領域におけるカルシウム蛍光イメージングのための新規タグツールの開発 |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小島佑介、浅沼大祐、岡本紘幸、並木繁行、廣瀬謙造 |
| 2. 発表標題 近赤外蛍光 in vivoイメージングのためのケミカルタグツールの開発 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|