

令和 4 年 11 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19515

研究課題名(和文) 神経伝導路の機能的同定・可視化を目指す新規手法の開発

研究課題名(英文) Probe development for functional visualization of the neuronal pathway

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロンの神経活動量をGFPの蛍光量に変換し記録する為、(1) プロテアーゼ活性化型GFPと(2) 膜電位感受性プロテアーゼから構成されるプローブの作成を目指した。(1)についてTEVプロテアーゼ活性化型蛍光タンパク質と分割GFPを利用したTEVプロテアーゼ活性化型蛍光タンパク質を並行して作成した。(2)について当初の方針から設計を変更し、新規標識技術により小さな構造変化でプロテアーゼのオン・オフを行えるように設計を変更し、基本となるVSDとTEVプロテアーゼの融合タンパク質を作成、培養細胞や大腸菌内での活性確認に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究計画全体の達成には一定のリスクはあるが、期待される伝導路の同定・可視化の意義は大きく、実現すれば関連分野への革新的な波及効果が予想される。現在得られている研究成果はその為の基礎的要素技術であり、現時点では神経伝導路の可視化へ移る前段階にあるが、プローブの改変とスクリーニングの続行により、目標達成の可能性を広げる所見である。

研究成果の概要(英文)：To functionally visualize the neuronal pathway, we have made trials to generate genetically encoded probe that can convert neuronal activities into fluorescent signals. We have established two prototypic components for this purpose; protease activated fluorescent proteins and voltage sensitive proteases. Screenings for activity optimization of the components are now in progress.

研究分野：細胞生物学、神経科学

キーワード：神経伝導路

1. 研究開始当初の背景

神経系は伝導路の複合体であり、個別伝導路の解明は永く神経解剖学の中心的課題であった。研究開始当時、すでにニューロンの接続形態を網羅的にしらべるコネクトーム解析技術の発達は著しかったが、単に形態的なニューロンの連鎖を検出するのみでなく、連鎖の中でどの要素が機能的意義をもつか同定する手法は見当たらなかった。

私たちはこれまでに主として細胞レベルの現象を対象とする研究(軸索輸送、シナプス関連タンパク質、細胞骨格動態の形態学、分子細胞生物学、電気生理学的解析)に従事してきたが、細胞レベルの知見をネットワークレベルの研究に発展応用する試みとして、特定の個体行動と関連する神経伝導路を可視化する手法開発について構想した。その本体は、次項以降で述べる通り、VSDを利用して新たに構築する神経活動履歴記録プローブである。

神経活動をモニターするためのプローブは研究開始当初すでに各種作成されていたが、イオン濃度、遺伝子発現、細胞内糖代謝等の変化ではなく、電位変化を直接計測できるものは見当たらない状況であった。これらの手法はいずれも間接的な測定であるために、神経活動の有無の判定が困難であった。

このような状況から、私たちは神経活動を直接計測できるVSDを利用したプローブを各ニューロンの軸索において使用することで、長軸索を有する神経伝導路の可視化を企図することとした。

2. 研究の目的

知覚、運動、学習といった個体活動に関連する神経伝導路の同定は、神経科学の究極の目標の一つである。神経伝導路は、機能的に意味を持つニューロンの連鎖によって形成される。形態的なニューロンの連鎖は、色素やウイルス等の軸索トレーサーによって追跡されてきたが、同定されたニューロンの連鎖が神経伝導路として機能的にも意味を有するかどうかは、別途確認する必要があった。一方で、機能的ニューロンの連鎖は古典的には電気生理学的手法により同定されてきたが、網羅的な解析が難しく利用範囲は限られている。また、活動するニューロンが同定できても、形態的な確認とセットでなければ、神経伝導路の確定には至らない。近年ではバイオイメーキング技術の発展により、個体深部までほぼ全ての神経活動をモニターすることで、形態的かつ機能的ニューロンの連鎖の可視化が試みられている。しかしこの手法も、ゼブラフィッシュや線虫など透明で小型の生物にしかな適用できない。

そこで本研究では、特定の個体活動に関連する形態的かつ機能的ニューロンの連鎖(すなわち神経伝導路)を可視化するための遺伝子にコードされたプローブを開発することを目標とした。哺乳類をはじめとする不透明で大型の個体においても神経伝導路を同定可能な普遍的な手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究で開発するプローブは、各ニューロンでの神経活動量をGFPの蛍光量に変換し細胞内に記録するもので、以下の2つの要素で構成される。

- (1) プロテアーゼ活性化型 GFP
- (2) 膜電位感受性プロテアーゼ

(1) プロテアーゼ活性化型 GFP は、基質特異性の極めて高いプロテアーゼの認識配列をGFP内に持つ。発現した段階では認識配列が立体構造形成を邪魔して無蛍光性であるが、認識配列が切断されると立体構造を形成し蛍光性になる。次に(2) 膜電位感受性プロテアーゼは、ニューロンの脱分極により構造が大きく変化するVSDの膜電位感受性ドメインを基本骨格とする。分割したプロテアーゼ活性のオン/オフが、膜電位変化に応じて可逆的に切り替わるように融合タンパク質を設計・構築する。

これらの要素技術が確立した段階で、神経伝導路のイメージングに進む。具体的には薬剤依存的に誘導されるプロモータを利用し、トランスジェニックマウスを作成し、代表的な入力系神経伝導路である視覚伝導路の同定、可視化を達成目標とした。

4 . 研究成果

(1) プロテアーゼ活性化型 GFP の作成

アポトーシスに関わる重要なプロテアーゼ(カスパーゼ3)を検出するための同様の GFP がいくつか報告されており、それらを転用することとし、認識特異性の高い TEV プロテアーゼの認識配列につき、前後のリンカー配列の最適化を行った。具体的にはプロテアーゼ認識部位前後のリンカーについて、その長さや配列が異なるプライマーを設計し、SLiCE 法によりスクリーニング用のライブラリ構築し、大腸菌株 XL10-Gold に形質転換したところ、1000 以上のコロニーが得られた。プロテアーゼの発現の有無を制御する為、BL21(DE3)を使用し、大腸菌の電気穿孔法実験により、同様の形質転換に成功した。

また、上述の TEV プロテアーゼ活性化型蛍光タンパク質をベースとした開発と並行して、分割 GFP を利用した TEV プロテアーゼ活性化型蛍光タンパク質 (FlipGFP) を利用したものの可能性も考慮し、両者を並行して作成した。FlipGFP はケージ化されており、TEV プロテアーゼの認識配列を然るべき箇所へ挿入することで、TEV プロテアーゼ依存的にアンケージできる。現在プローブの活性変化、性能比較の選択を実行中である。

(2) 膜電位感受性プロテアーゼの作成

計画遂行上予想される難所は、膜電位感受性プロテアーゼの開発であったが、予想以上に開発に難渋した。使用する VSD 分子の刺激時の構造変化がプロテアーゼの酵素活性を制御する為には小さく、別途独自の工夫を加える必要があることが判明したためである。

そこで、研究開始当初の方針から設計を変更し、研究室内で別プロジェクトとして開発が進んでいた別途標識技術を援用して分子デザインをやり直すこととした。これはタンパク質やペプチドを蛍光タンパク質に固く結びつける技術である。蛍光偏光測定の際に、蛍光タンパク質の向きを固定した状態で対象に標識する為の開発された。VSD は脱分極によって、C 末端の S4 領域 (ヘリックス) が 60 度回転しながら細胞質側に 5 Å 移動する。この移動・回転はそれほど大きくはないが、この標識技術を利用することで小さな構造変化でプロテアーゼのオン・オフを行うことを考慮した。その基本的構造を考案し、基本となる VSD と TEV プロテアーゼの融合タンパク質を作成し、培養細胞や大腸菌内での活性確認に成功した。

膜電位による VSD 構造変化は非常に小さく、さらに、シグナル伝達カスケードのように多段階で TEV プロテアーゼの活性化を増幅する方法も検討した。実際のスクリーニングは、TEV プロテアーゼ活性化型蛍光タンパク質の目処が付いた段階で入る予定であったが、多くの候補から迅速にスクリーニングする実験系も確立する必要が生じており、これについては大腸菌のコロニーでスクリーニングを行う方法と、酵母で行う方法を検討中である。

上述の経過により、現時点でプローブの改変とスクリーニングは続行中であり、神経伝導路の可視化へ移る前段階にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	川岸 将彦 (Kawagishi Masahiko) (60323606)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	齊藤 健太 (Saito Kenta) (60374659)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	佐藤 啓介 (Sato Keisuke) (60644044)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関