

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06209

研究課題名（和文）個体レベルでの神経シナプス時空間動態解析のための基盤技術開発

研究課題名（英文）A new approach to studying neuronal synaptic connections in vivo

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・講師

研究者番号：60374659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：高等動物の中枢神経系シナプスのマッピングは生物学・医学的に大きな意義をもたらす。本研究は、生きた動物でシナプスを動的に可視化する手法の開発を目的とし、プローブ開発から個体への導入・イメージングまでを行った。プローブは培養細胞で有効性を確認し、高等動物への応用を見据えながら、まずは扱いが容易でシナプス研究の環境が整った線虫を対象とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経シナプス可視化に関して、培養細胞レベルではPre/Postの結合が無くなる変異体との差ができた。そのため、培養細胞レベルでの一定の有用性は示している。一方で個体では発現量の調整が難しく、有意なデータを得るところまでは行かなかったのは今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：The mapping of synapses in the central nervous system of higher animals is of great biological and medical significance. This study aimed to develop a method for dynamically visualizing synapses in living animals, and conducted a study from probe development to individual introduction and imaging. The probe was first tested for efficacy in cultured cells, and then applied to nematodes, which are easy to handle and have an established environment for synapse research, with an eye on the application to higher animals.

The results showed that the probe was able to visualize synapses in living nematodes in real time. This suggests that the developed method can be used to dynamically visualize synapses in living higher animals, which will provide important information for understanding the function of the central nervous system.

研究分野：生物物理学

キーワード：蛍光イメージング 神経シナプス可視化

1. 研究開始当初の背景

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。これは神経細胞同士の結合状態(シナプス)を全てマッピングすることで達成される。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か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。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; 論文ではGRASP)。同原理のプローブが数報あった後、昨年に、分割した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)によるプローブが報告された(以降、**分割HRP法**: Martelli et al. *Nature Biotech.* 2016)。分割HRP法は酵素反応を利用する性質からシグナルの積算ができ、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。そのため分割GFP法では不可能であった、微小な領域に点在するシナプスまでが観察できる。

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。申請者はシナプスを動的に可視化するプローブがあればこの状況を回避できると考えた。これを開発するにあたり、まず既存のプローブが有する問題点を以下の通り考察した。

分割GFP法: 再構築した分子が非常に安定なため、解離しなくなってしまう。

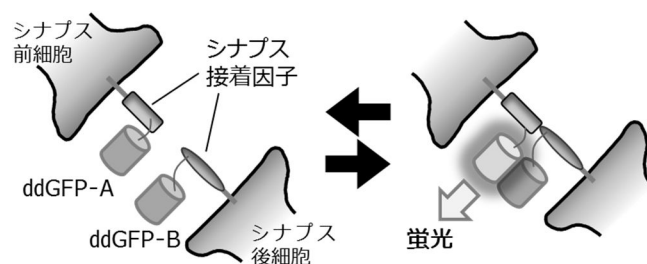
分割HRP法: H_2O_2 など一連の化学薬品処理が必要なため、固定試料しか観察できない。

ヘテロ2量体時のみ蛍光性になる緑色蛍光タンパク質 ddGFP (dimerization dependent GFP; Ding et al. *Nature Meth.* 2015) を利用しこれらの問題を解決する方法に至った。ddGFP はDsRed を元に開発され、A・B のペアで働く。その他の性質を以下2つにまとめる。

単量体ではA・Bともに無蛍光性だが、両者が近接しヘテロ2量体を形成すると、Aが蛍光性となる。A・Bともにホモ2量体は形成しない。

ヘテロ2量体化とその解離は可逆的かつ速やかに起こる。 K_d は $\sim 10 \mu M$ で、接着因子の結合・解離(K_d は $\sim 5 nM$)を阻害しない。

プローブは右図のように、シナプス接着因子を介してシナプス前・後膜の細胞外に ddGFP-A・B を提示するものである。シナプス結合(図右)に際し蛍光性に、シナプス解離(図左)に際し無蛍光性に、可逆的に切り替わる。



2. 研究の目的

生きた動物内でシナプスを動的に可視化する基盤技術を開発する。具体的には開発中の上記プローブを応用し、最も扱いが容易でシナプス研究の環境が整った線虫個体で、シナプス再編・可塑性の経時的可視化を行う。

3. 研究の方法

線虫発現用プローブの作成

本プローブは、シナプスの前・後細胞膜に局在する接着因子ニューレキシン(NRX)・ニューロ

リジン (NLG) と、ddGFP-A・B との融合タンパク質である。現在のプローブで用いているラット NRX・NLG は、線虫 NRX・NLG とドメイン構造の保存性が高く、置き換えは容易である。前述の分割 GFP 法では、静的ではあるが線虫 NLG を利用してシナプスを可視化しており、置き換えによる問題の可能性は低いと考える。

シナプス形成の可視化

線虫は各発生段階でどの細胞同士がどこにシナプスを形成するか情報が蓄積されている。そこで、まず発生期の既知のシナプス形成に対して本手法を適用する。

神経-筋シナプスの形成 神経-筋シナプスは一部に特有の構造・分子機構を有するも、基本的には神経-神経シナプスと共通しており、観察が容易なためシナプス形成・再編の研究に古くから利用されてきた。線虫では運動神経 HSN と陰門筋の神経-筋シナプス形成が観察しやすく、分割 GFP 法の報告でもこのシナプスが可視化されている。本手法で HSN-陰門筋シナプスの形成プロセスを可視化し、過去の観察結果と一致することを確認する。

線虫では特定のシナプスを欠失または異所発現する変異株が作られデータベース化されている。HSN のシナプス形成に関わる変異株では、HSN-陰門筋シナプスの大部分が欠損し、代わりに体壁筋とシナプスを作る。この異常シナプスの形成プロセスを可視化し、野生型で可視化したシナプスが HSN-陰門筋シナプスに特異的であることの確証を得る。以降の実験でも該当シナプスを欠失・異所発現する変異体を観察し、野生型と比較し本来のシナプスに特異的なシグナルが得られていることを逐一確認する。

神経-神経シナプスの形成 刺激応答に関する神経回路の介在神経 AVA は、運動神経 DA, VA に投射している。これも分割 GFP 法で可視化が報告されている。本手法で可視化した場合も、シナプスの箇所が過去の報告と一致することを観察する。

観察手法の最適化

線虫個体の観察について、十分な蛍光シグナルが確保されている場合は共焦点顕微鏡が用いられる。今回のプローブはその特性上、微弱な蛍光シグナルを検出する必要がある。本プローブを線虫個体で観察するのに最適な観察系として、光シート顕微鏡を用いることを考えた。市販品は高額なため、現有する蛍光倒立顕微鏡のステージ部分に励起光学系を設計・構築した。

4. 研究成果

まず線虫で発現させるために既存プローブの線虫での発現を試みた。これは線虫プロモータを含む発現ベクターへの載せ替えだけでなく、既存プローブのタンパク質を線虫由来タンパク質へ置き換える作業や、線虫コドンへ置き換える作業も含んでいる。線虫への遺伝子導入は、倒立微分干涉顕微鏡下にて線虫の生殖巣へのマイクロインジェクションにより行った。そのための、針を作るプラー、針の先端を削るグラインダー、顕微鏡下で針を操作するマニピュレータはラボで現有していた。使用経験はなかったが操作はそれほど難しくなく、予想よりもスムーズに実験を進められた。まず始めに発現量が高いプロモータとして、大壁筋に発現する myo-3 を用い、置き換えた各遺伝子の発現をそれぞれ確認した。また、線虫コドンへの置き換えをせずに発現を試みたところ、発現が観られたため、これまで培養細胞で使用していた蛍光タンパク質、プローブのコドンのままで使用することができた。コドン最適化がほぼ必要なかったのも順調に研究が進展した原因と考えている。

次に Pre/Post のプローブに異なる 2 種のプロモータを使い、隣り合う細胞同士に発現させた。相互作用すると考えられる部位でのシグナルを確認することもできた。インジェクターに関してはミネラルオイル方式のタイプを現有していたが、液漏れ等で操作が難しかったため空圧式を購入したところ、非常に楽にインジェクションできるようになり、予想以上に早く実験を遂行することができた。

いくつかのプロモータの組み合わせを試して、神経-筋肉細胞間の相互作用 (ニューロマスキュラー) に起因するシナプスや、神経-神経細胞間のシナプス部位でシグナルを確認することができた。既存していた培養細胞用のプローブと、それを線虫由来タンパク質に置き換えたものの両方でシグナルが確認されている。

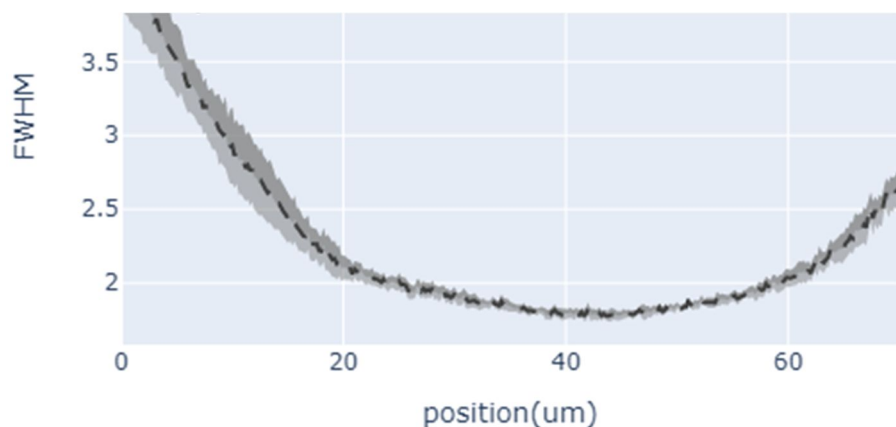
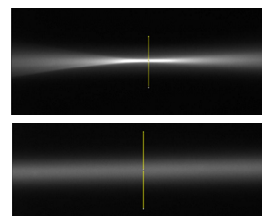
線虫でシナプスをタイムラプスするにあたり、線虫を非侵襲的に静止させるための方法が必要になる。調査の結果、そのための方法としては線虫がギリギリ入る程度の細溝が掘られたシリコン性のデバイスや、固化性のポリマーを用いて物理的に束縛する方法が有効であると考えられるあるいは、光遺伝学により撮像中に線虫の動きを完全に静止することができることもわかっ

た。近年に報告されているものがあつたので必要な光遺伝学的ツールを入手し、それが線虫で働くことも確認できた。これをタイムラプスイメージングに応用する予定でいる。また、発生初期ではプローブの発現量が低く、十分な明るさが得られないこともわかつた。そこで、L1 幼生から L2 幼生への成長過程で確認するはずだつた、シナプスの組み換え観察に並行して、より遅い時期 (L3 幼生から アダルト) にかけてシナプスが変化するものを探し、この観察を試みることにしている。

光シート顕微鏡は共焦点顕微鏡並の分解能を持ち、微弱シグナルを検出するために検出側の対物レンズを高 NA のものを使用することを考えた。このためには、Water Dipping タイプの水浸レンズ (NA0.8~1.1) を利用することが良い。将来的に観察光学系にもリレー系を利用する可能性を考慮して倒立顕微鏡ベースの光シート顕微鏡を設計した。倒立型で Water Dipping タイプの水浸レンズを利用するために、水漏れしないようなチャンバを設計し、アクリル樹脂の貼り合わせ、あるいは全体を 3D プリントして試作した (図: 光シートが入射する面はカバーガラス、他はアクリルできている。対物レンズとの接触面はシリコン系のグリースあるいは接着剤で水漏れを防いでいる)。顕微鏡の制御は micromanager および python にて行う。線虫を断層観察するピエゾステージは 70um 範囲をクローズドループで制御可能、かつ、micromanager および python にて制御可能なものとして piezoconcept 社の HS1.70 を選定した。



構築した光シート顕微鏡の評価はまず、フルオレセイン溶液を光シートで撮影することで行つた。励起光は 488nm のレーザーを光源としている。図の左から光シートが入射し右に抜けている。上は光シートの厚み、右は光シートの幅がわかるように撮影した。より定量的な評価としては、光シートに対して 45 度に設置したカバーガラスで光シートを検出対物レンズ側に反射し、光シート自体の断面図を撮影することで行つた。カバーガラスは前述のピエゾステージで制御し 70um の範囲で断面図をスキャンし評価することができる。断面図の FWHM (平均値 ± SD) は右図の通りになつた。最も光シートが薄くなる箇所は



44.60um の地点で、1.77um であつた。この値のルート 2 倍の厚みになる 2 点距離を confocal parameter と呼び、シートの長さを示す。この結果では 55.60um 程度となつていた。過去の光シートの報告と照らし合わせても十分な薄さと長さを持った光シートとなつていた。今後は蛍光ビーズを測定して検出対物レンズと組み合わせた評価を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 N. Nakai, K. Sato, T. Tani, M. Kawagishi, H. Ka, K. Saito, S. Terada	4. 巻 556
2. 論文標題 Development of nanobody-based POLARIS orientation probes enabled multi-color/multi-target orientation imaging in living cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBRC	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.088	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 Sugizaki A, Sato K, Chiba K, Saito K, Kawagishi M, Tomabeche Y, Mehta S, Ishii H, Sakai N, Shirouzu M, Tani T, Terada S	4. 巻 118
2. 論文標題 POLARIS, a versatile probe for molecular orientation, revealed actin filaments associated with microtubule asters in early embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2019071118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2019071118	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 該当する

1. 著者名 Nakai N, Sato K, Tani T, Saito K, Sato F, Terada S.	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetically encoded orientation probes for F-actin for fluorescence polarization microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 359-368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfz022	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 齊藤健太	4. 発行年 2021年
2. 出版社 NTS出版	5. 総ページ数 628
3. 書名 生体ひかりイメージング 基礎と応用	

1. 著者名 齊藤健太	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 9
3. 書名 発光イメージング実験ガイド	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗原結合タンパク質と蛍光タンパク質または蛍光標識されるタグタンパク質との融合タンパク質	発明者 寺田純雄/佐藤啓介/ 中井紀/齊藤健太/川 岸将彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/7568	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗原結合タンパク質と蛍光タンパク質または蛍光標識されるタグタンパク質との融合タンパク質	発明者 寺田 純雄、佐藤 啓介、中井 紀、齊 藤 健太、川岸 将	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-034315	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

https://www.tmd.ac.jp/topics_detail/id=53903

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------