

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06600

研究課題名(和文) 培養シナプスモデルを用いた神経筋接合部の機能構造に関わる分子動態の相関顕微鏡解析

研究課題名(英文) CLEM study for the molecular dynamics of the cultured synapse model of neuromuscular junction

研究代表者

宮澤 淳夫 (Miyazawa, Atsuo)

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：60247252

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)：神経筋肉接合部(NMJ)では、運動神経終末から放出されるアセチルコリンが、筋細胞膜(ポストシナプス)に存在するニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に結合することで、神経の情報が筋肉に伝えられる。効率良く情報伝達するために、nAChRはNMJで集積しクラスターを形成しているが、その機構は未解明な部分が多い。本研究では、クラスター形成機構に関わっていると考えられる筋細胞膜から細胞内小胞へ取り込まれた筋特異的受容体チロシンキナーゼを、光-電子相関顕微鏡解析により検出することができた。また、胚性幹細胞から作製した筋細胞と運動神経の共培養を検討し、運動神経と筋細胞の接合部を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

nAChRが筋細胞膜に集積し始めた時期にある筋細胞内では、電子顕微鏡により検出された小胞中の筋特異的受容体チロシンキナーゼが、nAChR集積機構の一端を担っている可能性が示された。nAChRクラスターの形成は、運動神経から筋肉への効率良い情報伝達に必要不可欠である。この情報伝達の分子機構を明らかにすることは、加齢に伴い神経-筋肉間の情報伝達に問題が生じ、その結果として骨格筋の筋力低下を伴う疾患の予防や治療、リハビリテーションの確立につながる研究である。一般的に筋力低下は、日常生活の質の著しい低下をもたらすことから、予防法や改善法が確立できれば、高齢化社会における重要な社会貢献となる。

研究成果の概要(英文)：At the neuromuscular junction (NMJ), a signal from the brain is transduced to the muscle by acetylcholine, which is released from the pre-synapse of motor neuron and binds to nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) on the post-synaptic membrane of the muscle cell. nAChRs aggregate and form a cluster at the NMJ, contributed to efficient signal transduction. However, the clustering mechanisms remain unclear. In this study we visualized the internalized muscle specific tyrosine kinase on the cytoplasmic vesicles by correlative light and electron microscopy, which is supposed to facilitate the nAChR clustering. We also examined the co-culture of motor neurons and myotube cells differentiated from mouse embryonic stem cells, and found the attachment parts of a motor neuron and a myotube cell, indicating the formation of NMJ.

研究分野：構造生理学

キーワード：アセチルコリン受容体 神経筋接合部 電子顕微鏡 相関顕微鏡観察

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動神経(プレシナプス)から筋細胞(ポストシナプス)への情報伝達の間となる神経筋接合部(NMJ)では、ポストシナプス膜にニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)、足場タンパク質(rapsyn)、筋特異的受容体チロシンキナーゼ(MuSK)等の様々な分子が集まってクラスターを形成し、機能している。申請者らは、NMJのシグナル伝達で中心的な機能分子であるnAChRの三次元構造を、クライオ電子顕微鏡法を用いた結晶構造解析により解析し、分子レベルの構造変化からその機能メカニズムを明らかにしていた(引用文献)。また、NMJで効率の良いシグナル伝達が行われるためには、ポストシナプスで形成される分子クラスターが重要であること、分子クラスターの形成には、nAChRおよびMuSKが細胞膜から細胞内小胞へ取り込まれる必要があることが明らかにされていた。分子クラスターについては、主に培養細胞を用いて光学顕微鏡で調べられてきたため、ナノレベルでの分子局在については不明なままであった。

生きた細胞を観察できる光学顕微鏡法と、個々の分子を観察できる電子顕微鏡法とを連携させた相関顕微鏡観察は、NMJの形成という細胞レベルの生命現象と、その生命現象の基盤となっている分子メカニズムを直接関連付けて解析できる優れた観察法である。相関顕微鏡観察においても、タンパク質の局在を解析するためには、タンパク質分子の標識を行うことが必要不可欠である。光学顕微鏡観察のための標識法として普及している蛍光タンパク質タグは、遺伝的に標識することにより、生細胞中で確実に標識できる標識法である。申請者らは、蛍光タンパク質タグに相当する電子顕微鏡観察用の標識として、メタロチオネイン3分子を連結したメタロチオネインタグを開発し、これまでに、NMDA受容体の足場タンパク質であるPSD-95に標識を施して、カドミウムイオンを含む培養液で培養することにより、PSD-95の細胞内局在を電子顕微鏡で観察できることを示していた(引用文献)。しかしながら、メタロチオネインに結合するカドミウムの数が7原子に限られるため、検出感度が十分とは言えず、この標識により検出可能な分子は、高密度に集積するタンパク質に限定されていた。

また、NMJのポストシナプスモデルとして、マウス筋原細胞であるC2C12細胞から分化させた筋管細胞がよく用いられてきたが、マウス胚性幹細胞(ES細胞)にスペルミンを添加して培養することにより、一部の細胞が筋管細胞に分化することが新たに報告されていた(引用文献)。ES細胞から形成される筋管細胞は、単層のC2C12細胞とは異なり、多層シート状でかつインスリン応答性があることから、C2C12細胞由来筋管より分化が進んでいると考えられる。しかしながら、スペルミン添加による筋管細胞への分化メカニズムは明らかにされておらず、スペルミンで分化する胚様体も一部に限定されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の3つの目標を掲げた。本研究課題の中核となる第1の目標としては、NMJにおいて重要な機能を果たす2つの膜タンパク質:nAChRとMuSKに着目し、細胞膜と細胞内小胞での局在を相関顕微鏡法を用いて解析することである。NMJの成熟に伴った機能性膜タンパク質のターンオーバーやリサイクルの解析を進め、細胞の微小環境における膜タンパク質の機能発現制御に関する理解を深める。第2の目標は、光学顕微鏡およびクライオ電子顕微鏡法を用いた相関顕微鏡法に利用可能な、固定後の標識操作を必要としない、電子顕微鏡用の標識法の改良である。メタロチオネインタグの検出感度を上昇させ、rapsynに適用できるようにする。そして、第3の目標は、ES細胞から分化させた筋管細胞と運動神経を用いて、培養NMJモデルを作製することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) GFP融合 rapsyn 発現筋管細胞の培養

GFP融合 rapsyn が定常的に発現するように遺伝子組み換えを行ったC2C12細胞を、カーボン蒸着した、グリッドと番号の刻まれたカバーガラス上で、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地(DMEM)で培養した。100%コンフルエントになったら、5%のウマ血清を含むDMEMに交換し、さらに3日間培養し、筋管細胞へ分化させた。

#### (2)メタロチオネインタグ融合 rapsyn 発現筋管細胞の培養

メタロチオネインタグ融合 rapsyn が定常的に発現するように遺伝子組み換えを行ったC2C12細胞を、GFP融合 rapsyn 発現C2C12細胞と同様に培養した。筋管細胞へ分化したら、培地に10 $\mu$ Mの硝酸銀を添加して20分インキュベート後、PBSで洗浄した。10 $\mu$ M硫化ナトリウムを添加して20分インキュベート後、PBSで洗浄し、5%のウマ血清を含むDMEMに戻し、agrin(東京都健康長寿医療センター研究所・重本和宏博士提供)を添加して、さらに16時間培養を行った。

#### (3)nAChRとMuSKの金コロイド粒子標識と蛍光観察

分化させた筋管細胞の培養液に抗nAChRラット抗体Fabと抗MuSKマウス抗体(東京都健康長寿医療センター研究所・重本和宏博士提供)Fabを添加して、1時間培養した。DMEMで洗浄後、

5nm の金コロイド粒子が結合した抗ラット IgG 抗体および 10nm の金コロイド粒子が結合した抗マウス IgG 抗体を添加してさらに 1 時間培養した。DMEM で洗浄した後、agrin を添加し、蛍光顕微鏡 (AXIO observer、Carl Zeiss) を用いて rapsyn に融合させた蛍光タンパク質のタイムラプス観察を行った。

#### (4) メタロチオネインタグ融合 rapsyn 発現筋管細胞の蛍光観察

Agryn を添加して 16 時間培養した細胞を 2%パラホルムアルデヒドで固定、PBS で洗浄後、Alexa488 結合 -bungarotoxin を添加して、1 時間インキュベートし、PBS で洗浄した。蛍光顕微鏡 (AXIO observer) を用いて、蛍光標識された nAChR を観察した。

#### (5) 電子顕微鏡観察用試料調製

蛍光観察後、2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液で 1 時間固定した。PBS および水で洗浄後、2% 四酸化オスミウムで後固定し、水洗後、50%、70%、80%、90%エタノール水溶液に順次置換し、さらに、100%エタノール、酸化プロピレンに置換した。50% Epon812 / 酸化プロピレン、70% Epon812 / 酸化プロピレンに置換後、100% Epon812 に置換し、プログラムオープンを用いて、Epon812 を重合させた。重合後、カバーガラスを剥がし、目的部位をトリミング後、ウルトラミクロトーム (EM UC6、ライカマイクロシステムズ) で、厚さ 200nm の超薄切片を作製した。超薄切片は銅グリッド上に回収し、ウラン・鉛染色を行った。

#### (6) 電子顕微鏡観察

金コロイド粒子で標識した試料については、走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM6701F、日本電子) を用いて、反射電子像を撮影し、蛍光観察でラブシン由来の蛍光が検出された部位を同定した。その後、透過型電子顕微鏡 (TEM) (JEM2100、日本電子) を用いて、倍率を上げて、同定された蛍光検出部位を Shotmeister (システムインフロンティア) でモニタージュ撮影した。

メタロチオネインタグで標識した試料については、走査型電子顕微鏡 (JSM6701F) を用いて、反射電子像を撮影し、nAChR 由来の蛍光が検出された部位を同定した。その後、透過型電子顕微鏡 (JEM2100) で、倍率を上げて観察した。

#### (7) ES 細胞由来筋管細胞と ES 細胞由来運動神経の共培養

カバーガラスを入れ、コラーゲンゲルを流し込んで固めた 12 ウェルプレートに、Hanging Drop 法を用いてマウス ES 細胞から作製した胚様体を載せて、筋管分化用培地 (15% FBS、1mM ピルビン酸ナトリウム、1×NEAA、1×Nucleoside solution、0.1mM メルカプトエタノール、1×penicillin / Streptomycin solution を含む DMEM) で、1 ~ 2 日おきに新鮮な培地に交換しながら培養を続けた。10 日後に、2mM スペルミンを添加し、添加 24 時間後に、スペルミンを含まない筋管分化用培地に交換し、位相差顕微鏡 (CX41、オリンパス) で分化状態を観察しながら、さらに 30 ~ 40 日間培養を続け、筋管細胞に分化させた。筋管細胞の近傍に、レチノイン酸と Smoothed agonist 存在下で、7 日間浮遊培養した胚様体を載せ、共培養用培地 (10% KSR、2mM GlutaMAX、7.5mM グルコース、1×penicillin / Streptomycin solution、0.1mM メルカプトエタノール、10ng/mL GDNF、20ng/mL CNTF、10ng/mL BDNF を含む DMEM/F12) に適宜交換しながら、2 週間程度培養を続けた。

#### (8) 共培養細胞の蛍光観察

Alexa555 結合 -bungarotoxin を添加して、1 時間インキュベートし、PBS で洗浄後、氷冷メタノールで固定した。Tween 20 を加えた PBS で洗浄後、Blocking One でブロッキングし、抗シナプトフィジン抗体を添加して 1 時間インキュベートした。Tween 20 を加えた PBS で洗浄後、Alexa488 結合抗マウス IgG 抗体を添加して 1 時間インキュベートした。Tween 20 を加えた PBS で洗浄後、カバーガラスの縁に沿ってコラーゲンゲルを切り取り、VECTASHIELD Mounting medium H1000 with DAPI (Vector Laboratories) で封入し、蛍光顕微鏡 (Axio Plan 2、Carl Zeiss) で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 相関顕微鏡法を用いた nAChR と MuSK の分子動態解析

C2C12 細胞から分化させた筋管細胞の培養液に、本来、プレシナプスから放出される、ポストシナプスの分子クラスター形成促進因子である agrin を添加すると、nAChR や MuSK、rapsyn を含む分子クラスターが数時間で形成される (図 1)。その一方で、この培養系では、プレシナプスが存在せず、除神経された NMJ に相当する状態であるため、分子クラスターは形成後、数時間で崩壊する。分子クラスター形成時も崩壊時も、細胞膜に存在する nAChR と MuSK が細胞内小胞に取り込まれることが知られているが、それらのナノメートルレベルでの局在は明らかにされていない。そこで、nAChR および MuSK が取り込まれた一つひとつの細胞内小胞に着目して、分子クラスター形成時と崩壊時に、細胞膜から取り込まれた nAChR と MuSK の個々の分子の局在を、ナノメートルレベルで解析することにした。

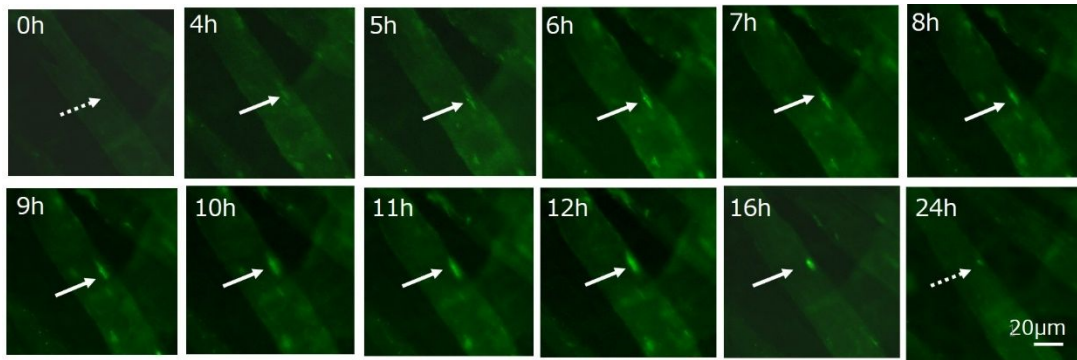


図 1. GFP 融合 rapsyn 発現筋管細胞のタイムラプス観察

矢印で示した部位の rapsyn を含む分子クラスターは、agrin 添加後 4 時間で出現して大きくなった（形成）後、16 時間後以降には小さくなった（崩壊）。

細胞表面から細胞内小胞へ取り込まれた nAChR と MuSK の分子局在を解析するために、細胞表面に存在している nAChR と MuSK を、それぞれ大きさの異なる金コロイド粒子で免疫標識した。分子クラスターの形成と崩壊のタイミングは、細胞ごとに異なっているため、agrin 添加後、培養を続けながら、蛍光タイムラプス観察を行い、クラスターの大きさの変化をモニターした。個々のクラスターが形成中か崩壊中かを確認した上で固定し、超薄切片を作製した。図 2 のように、電子顕微鏡で蛍光が観察されたクラスター位置を同定し、形成中、崩壊中のクラスターの細胞膜直下に存在する小胞中に取り込まれた nAChR および MuSK の局在を観察した。

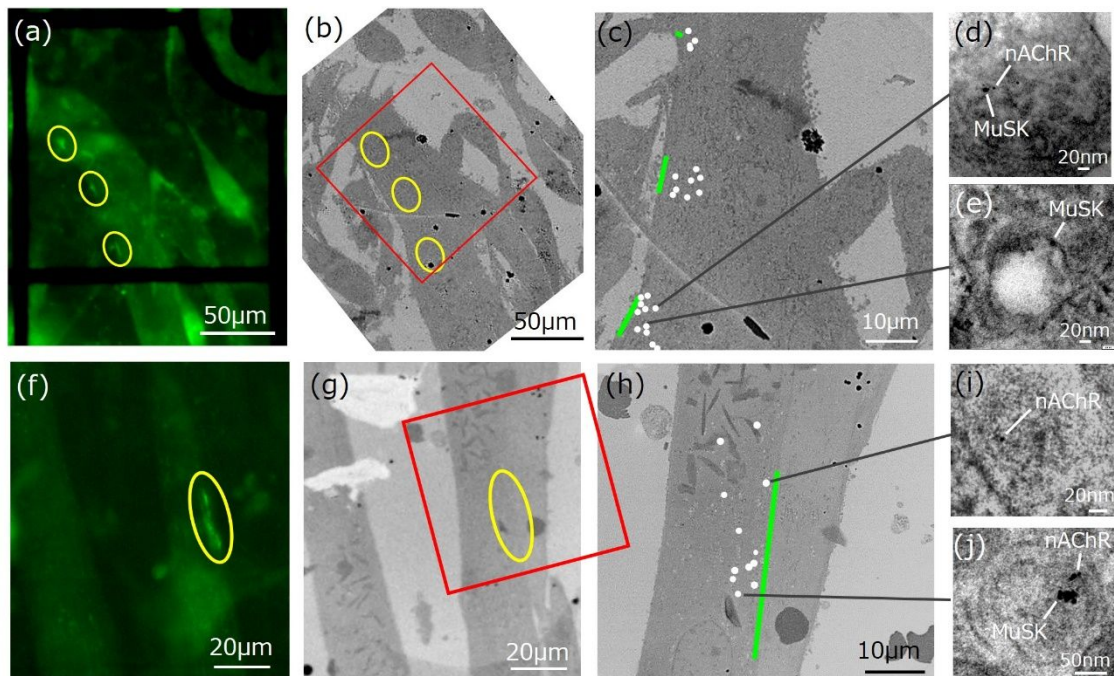


図 2. 細胞膜から細胞内小胞へ取り込まれた nAChR および MuSK の局在解析

(a)(f): nAChR、MuSK を金コロイド粒子で標識した GFP 融合 rapsyn 発現筋管細胞の蛍光顕微鏡像。形成中(a)、崩壊中(f)の分子クラスターを黄色で囲った。(b)(g): 蛍光顕微鏡像と同一視野の SEM 像。(c)(h): (b)(g)の赤四角の拡大 SEM 像。緑線は分子クラスター、白ドットは細胞内に取り込まれた nAChR、MuSK を含む小胞の位置を示す。(d)(e)(i)(j): 細胞内小胞の拡大 TEM 像。

細胞内に取り込まれた nAChR および MuSK を含む小胞（金コロイド粒子が検出された小胞）について解析した結果、崩壊中のクラスター細胞膜直下では、MuSK のみを含む細胞内小胞は検出されず、検出されたすべての金コロイド粒子を含む小胞はラメラ状の小胞であった。一方、形成中の細胞膜直下では、検出された金コロイド粒子を含む小胞の 90%は単層の小胞であった。単層の小胞の中で 27%は、nAChR が含まれず MuSK のみを含む小胞であった。クラスターが崩壊中の細胞膜直下では、nAChR、MuSK がともに、ラメラ状の小胞である後期エンドソームへ移行し、分解される一方、クラスター形成中の細胞膜直下では、nAChR が含まれず MuSK のみを含む小胞が検出された。形成中のクラスター内では、nAChR と MuSK が数ナノメートル以内の距離で近接して局在していることが、これまでに観察されており、近接している nAChR と MuSK は同一小胞に取り込まれることが推測される。それにも関わらず、MuSK のみを含む小胞が多く検出されたこと、nAChR がポストシナプス膜で集積するためには MuSK が細胞内に取り込まれることが必須であることから、小胞に取り込まれた分子の中で、MuSK だけが分画されて細胞内に残り、細胞内小胞に維持された MuSK がクラスター形成促進に関わっている可能性が示唆された。

## (2)メタロチオネインタグを用いた量子ドット様化合物形成と rapsyn の可視化

メタロチオネインは重金属イオンと1分子あたり7~12原子という決まった比率で配位結合するが、さらに硫黄原子が存在すると、重金属と硫黄原子が結晶状に集積した量子ドットを形成する。量子ドットを形成できれば、メタロチオネインタグの検出感度の上昇が見込まれ、クライオ電子顕微鏡法への応用も期待できることから、rapsyn にメタロチオネインタグを施して筋管細胞で発現させ、銀イオンと硫化ナトリウムを添加した培養液を用いて、銀硫黄量子ドットを形成させる検討を行った。その結果、銀イオンと硫化ナトリウムを、順次、一時的に添加することにより、蛍光が検出された分子クラスターの位置で、数ナノメートルの多数のドットをTEMで検出することができた(図3)。

また、NMJのようなごく一部にしか存在しない部位を観察対象とする場合、小さな切片を作製する必要のあるクライオTEMでは、目的部位を確実に狙ってトリミングすることが困難である。一方、クライオSEMでは、クライオTEMより広い面を観察できる。そこで、筋管細胞をクライオSEMで観察する手法についても検討を行い、観察できることを確認した。

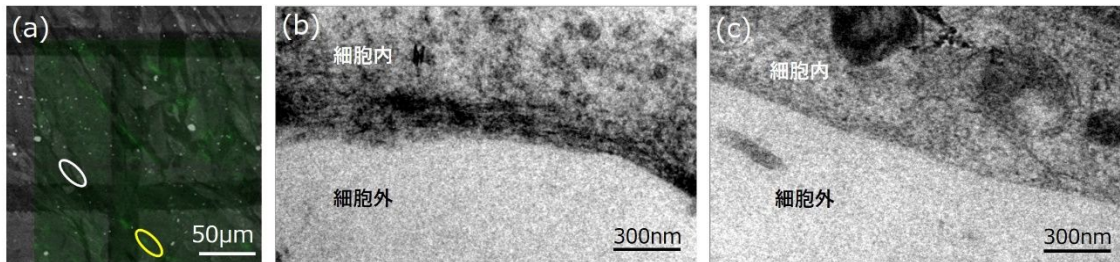


図3. メタロチオネインタグによる銀硫黄量子ドット形成の検討

(a): nAChR を蛍光標識したメタロチオネインタグ融合 rapsyn 発現筋管細胞の蛍光顕微鏡像と SEM 像の重ね合わせ。  
(b): 蛍光が検出されたクラスター部位( (a)黄色枠内)の拡大 TEM 像。細胞膜直下で電子密度の高いドットが多数観察された。(c): 蛍光が検出されなかった筋原細胞( (a)白枠内)の拡大 TEM 像。(b)のようなドットは見られない。

## (3)ES 細胞を用いた培養 NMJ モデルの作製

これまでに報告されていた培養 NMJ モデルは、動物から取り出した初代培養細胞を用いた培養が主流であったが、より再現性が高く、遺伝子操作等を効率良く行うことが可能な培養 NMJ モデルを構築するために、マウス ES 細胞のみを材料として NMJ 形成の検討を行った。マウス ES 細胞から分化させた筋管細胞上に、運動神経へ分化する定法に従って作製したマウス ES 細胞由来胚様体を載せ、神経栄養因子を加えて培養することによって胚様体を運動神経へ分化させ、NMJ の形成を試みた。筋管細胞への分化条件、胚様体添加の時期、培地組成について検討した。プレシナプスマーカーおよびポストシナプスマーカーを蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察した結果、プレシナプスの存在を示すシナプトフィジンとポストシナプスの存在を示す nAChR の共局在部位の存在が確認され、NMJ 形成の可能性が示された。

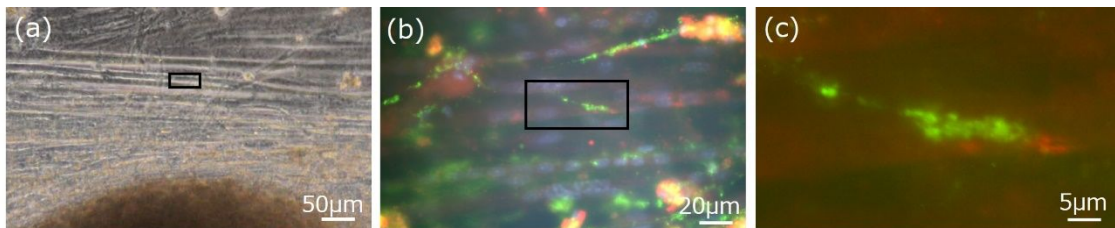


図4. マウス ES 細胞を用いた培養 NMJ モデルの作製

(a): ES 細胞から分化させた筋管細胞と運動神経共培養の位相差像 (b): (a)を蛍光標識して蛍光顕微鏡で観察した。シナプトフィジン(緑)、nAChR(赤)、核(青) 微分干渉像の重ね合わせ。(c): 黒四角の拡大蛍光顕微鏡像。シナプトフィジン(緑)、nAChR(赤)の重ね合わせ。

## <引用文献>

- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N, Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore, *Nature*, 423, 2003, 949-955.  
Fukunaga Y, Hirase A, Kim H, Wada N, Nishino Y, Miyazawa A, Electron microscopic analysis of a fusion protein of postsynaptic density-95 and metallothionein in cultured hippocampal neurons, *J. Electron Microsc.*, 56, 2007, 119-129.  
Saito M, Abe N, Ishida A, Nakagawa S, Matsuoka H, Concentration-dependent effects of spermine on apoptosis and consequent generation of multilayer myotube sheets from mouse embryoid bodies *in vitro*, *In Vitro Cell.Dev.Biol.Anim.*, 50, 2014, 973-981.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西野有里、野間有加里、村松諒太、宮澤淳夫
2. 発表標題 アセチルコリン受容体クラスター構成タンパク質の分子動態解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuri Nishino, Yukari Noma, Atsuo Miyazawa
2. 発表標題 Dynamic localization of acetylcholine receptor and related proteins studied by CLEM
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 生体解析分科会研究会 "Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西野有里、田村佳穂、伊藤喜子、宮澤淳夫
2. 発表標題 クライオSEMの特徴を生かした生物試料の観察
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第76回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西野有里、伊藤喜子、宮澤淳夫
2. 発表標題 クライオSEMを用いた含水試料の観察
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第77回学術講演会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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