

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07286

研究課題名（和文）シナプス小胞の開口放出過程におけるシンタキシンの時空間ダイナミクス解析

研究課題名（英文）Analyzing the Spatiotemporal Dynamics of Syntaxin in the Exocytosis Process of Synaptic Vesicles

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シナプス伝達効率の制御機構の解明にはシナプス小胞の開口放出過程を制御するシンタキシ及び関連するシナプス分子の細胞膜上での時空間ダイナミクスの理解が必要である。本研究では、蛍光再生型の蛍光標識法であるDeQODEタグ技術を用いて、シンタキシ及び、PSD-95と協調してAMPA型受容体の局在を制御するTarp-8の時空間ダイナミクスを解析した。PSD-95のクラスターを形成させたCOS7細胞をモデル系とし、PSD-95クラスターとの相互作用でTarp-8の動きが制限されること、PSD-95クラスター上においてTarp-8が静止している状態と動きやすい状態を遷移しうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はシナプス伝達効率の制御機構を解明することによって脳の機能に関する重要な知見を提供し、神経変性疾患の病態解明や治療法の開発への貢献が見込まれる。さらに、本研究の成果は神経系疾患の治療において革新的なアプローチを提供し、新たな治療戦略の開発にもつながる可能性があります。また、シナプス分子の時空間ダイナミクスに関連する特定のタンパク質や相互作用の特定により、薬物開発にも応用され、神経系疾患の治療薬の開発に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Understanding the spatiotemporal dynamics of syntaxin and related synaptic molecules on the cell membrane, which control the exocytosis process of synaptic vesicles, is necessary for elucidating the control mechanisms of synaptic transmission efficiency. In this study, we analyzed the spatiotemporal dynamics of Tarp-8, which controls the localization of AMPA-type receptors in cooperation with PSD-95, using the fluorescence regeneration-based fluorescence labeling technique called DeQODE tagging. We used COS7 cells as a model system, where PSD-95 clusters were formed, and revealed that the movement of Tarp-8 is restricted by its interaction with PSD-95 clusters. Furthermore, we demonstrated that Tarp-8 could transition between a stationary state and a more mobile state on the PSD-95 cluster.

研究分野：薬理学

キーワード：シナプス分子 一分子蛍光追跡技術

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系のシナプス前部での神経伝達物質の開口放出はシナプス伝達効率を規定する重要な過程である。申請者らはこれまでにシナプス小胞の開口放出がシナプス前部に形成される Munc13-1 やシンタキシンなどのシナプス分子が形成する数 10 ナノメートルの分子集合体によって制御されていることを発見し [Sakamoto et al. Nat Neurosci. 21, 41 (2018)], シナプス前部での分子のナノレベルの配置や動態がシナプス小胞の開口放出の制御に重要であることを示した。シンタキシンは細胞膜に局在する分子であり、SNAP25、VAMP2 などの分子で構成される SNARE 複合体の構成分子としてシナプス小胞膜と細胞膜との融合(ドッキング)を促し、シナプス小胞を開口放出が可能な状態にする。シナプス小胞は開口放出の後にエンドサイトーシスによって再度細胞内に取り込まれ、その後の開口放出で再利用(リサイクリング)されることが考えられている。この開口放出 リサイクリング過程でシンタキシンはシナプス小胞の放出部位へのドッキングを制御する重要な分子であるにも関わらずシナプス前部でどのようにふるまっているのかは不明な点が多い。本研究では「中枢シナプスでの開口放出の際のシンタキシンのシナプス前部での時空間ダイナミクスが、シナプス分子との相互作用の変化や、入力刺激、薬物の処置によってどのように変化するのか」ということを学術的な「問い」として設定する。

通常、細胞内での分子の時空間ダイナミクス解析は蛍光タンパク質や分子タグを介して蛍光標識した標的分子を蛍光顕微鏡で経時的に観察することで行われる。しかしながら、ここで観察されるのは蛍光標識された非常に多くの分子の平均的挙動であり、観察対象分子の一部が他の分子との相互作用などによって異なる振舞いをする場合には多数の分子の平均的な挙動から分子のダイナミクスの本質を知ることができない。それに対し、一分子の時空間ダイナミクスは他のシナプス分子との相互作用やシナプス小胞との相互作用を反映したものであり、シナプス前部で起こっている現象についての情報を与える。実際、これまでのシンタキシンの 1 分子蛍光イメージングとモデル実験を組み合わせた研究では、ショウジョウバエの神経細胞の細胞膜上でシンタキシンが複数の状態を遷移することが示唆されており [Bademosi et al. Nat comm., 7, 13660 (2016)], シナプス小胞の開口放出 リサイクリング過程でのシンタキシンのダイナミクスの解析においては一分子蛍光イメージングによる解析が不可欠である。これまでに受容体やイオンチャネルなどについて一分子イメージングによる時空間ダイナミクスの解析が行われてきた。しかしながら現行技術では標的分子に標識した有機小分子色素が数秒で退色してしまい、標的分子のダイナミクスを精確な見積りに十分なデータ数を得るのが困難であった。また、退色に強い量子ドットで標的分子を標識した際には、そのサイズが標的分子に対して非常に大きく、生理的条件下でのダイナミクスを精確に見積もれているのかという懸念がある(「2、本研究の着想に至った経緯など」の項参照)。したがって、一分子イメージングによる精密なダイナミクス解析のためには、小さな有機小分子色素によって標的分子を標識したうえで、長時間に渡る高精細イメージングを可能にする技術基盤の導入が必要である。

2. 研究の目的

本研究では中枢シナプスでのシナプス小胞の開口放出 リサイクリングの過程で、シンタキシンがシナプス前部でどのようなダイナミクスで振舞うのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

培養海馬神経細胞での一分子蛍光イメージングによるシナプス分子の時空間ダイナミクス解析系の確立

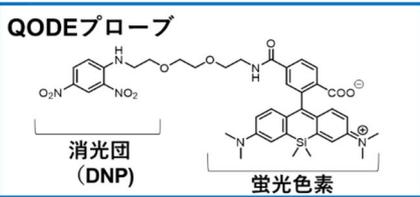
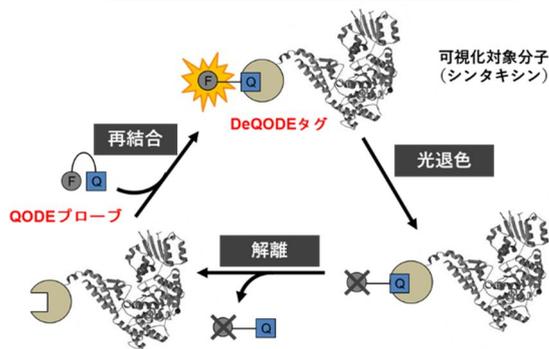
細胞膜上のシンタキシンを長時間(1時間以上)に渡り一分子蛍光イメージングでトラッキングする系を確立する。そのために、申請者らが開発した連続的かつ持続的な蛍光標識を可能にする DeQODE タグ技術を採用する(次ページ右図)。DeQODE タグ技術では、細胞内に可視化対象の分子との融合タンパク質として発現させた抗消光団一本鎖抗体(DeQODE タグ)に、消光団であるジニトロフェニル基(DNP)と 蛍光物質を共有結合させた化合物(QODE プローブ)が結合した際に QODE プローブの蛍光消光が解除され、初めて蛍光性となる。蛍光性となった蛍光物質は励

起光により数秒後に退色するが、退色した QODE プローブが DeQODE タグから解離し、退色していない QODE プローブが DeQODE タグに再度結合するサイクルを維持することで常に観察視野内に蛍光輝点が存在する状態になり、長時間に渡るの一分子蛍光イメージングが可能になる。申請者らはすでに非神経系の培養細胞を用いて DeQODE タグを用いてシタキシンを 5 時間以上に渡りトラッキングすることに成功しており、本研究開始後はこの一分子蛍光イメージング系を培養海馬神経細胞での一分子トラッキングに応用する。

一分子蛍光イメージングにはインハウスで構築した全反射顕微鏡システムを用いて DeQODE タグとシタキシンの融合タンパク質を発現させたラット培養海馬神経細胞で一分子トラッキングをテストする。

アデノ随伴ウイルスベクターを用いて DeQODE タグを付加したシタキシンをラット海馬培養神経細胞に発現させる。細胞外に QODE プローブとして蛍光色素のシリコンローダミンに DNP を結合させた 6SiR-DNP を添加し、シタキシンが蛍光標識され、蛍光輝点として観察できることを確認する。また、一分子トラッキングに適した輝点密度となるように細胞外の 6SiR-DNP 濃度を調整した上で、バックグラウンド蛍光に対して 6SiR-DNP の蛍光輝点が十分な明るさとなるように励起光の強度、EM-CCD カメラの撮影条件を最適化する。

長時間一分子蛍光イメージング (DeQODE タグ技術)



4. 研究成果

培養細胞での一分子蛍光イメージングによるシナプス分子の時空間ダイナミクス解析系の確立

細胞膜上のシナプス分子を長時間に渡り一分子蛍光イメージングでトラッキングし、分子の時空間ダイナミクスを解析できるシステムの構築に取り組んだ。長時間の一分子追跡を実現するために、研究代表者らが開発した連続的かつ持続的な蛍光標識を可能にする DeQODE タグ技術を採用した。DeQODE タグ技術では、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、消光団であるジニトロフェニル基 (DNP) と蛍光物質を共有結合させた化合物 (QODE プローブ) が結合した際に QODE プローブの蛍光消光が解除され、初めて蛍光性となる。蛍光性となった蛍光物質は励起光により数秒後に退色するが、退色した QODE プローブが DeQODE タグから解離し、退色していない QODE プローブが DeQODE タグに再度結合するサイクルを維持することで常に観察視野内に蛍光輝点が存在する状態になり、長時間に渡るの一分子蛍光イメージングが可能になる。まず、全反射顕微鏡システムを用いて DeQODE タグとシタキシンの融合タンパク質を発現させた COS7 細胞で一分子追跡をテストした。細胞外に QODE プローブとして蛍光色素のシリコンローダミンに DNP を結合させた 6SiR-DNP を添加し、シタキシンが蛍光標識され、蛍光輝点として観察できることが確認できた。また、一分子トラッキングに適した輝点密度となるように細胞外の 6SiR-DNP 濃度を調整することによって、バックグラウンド蛍光に対して 6SiR-DNP の蛍光輝点像が十分なコントラストとなる励起光の強度、撮像条件を最適化できた。

最適化した一分子蛍光観察の条件をベースにして COS7 細胞でシタキシンの一分子蛍光イメージングを行い、細胞膜上でのシタキシン分子の動態を調べた。具体的には、DeQODE タグを付加したシタキシン分子 (DeQODE-Syntaxin) の発現ベクターを COS7 細胞に遺伝子導入し、QODE プローブを細胞外液に負荷することによって DeQODE-Syntaxin が染色され、細胞膜に発現していることを確認した。続いて、細胞外に負荷する QODE プローブの濃度を下げることによって、1 分子蛍光が高コントラストで観察できるようにした。加えて、多数かつ長寿命の蛍光輝点の軌跡が得られるように、QODE プローブの濃度と励起光の強度を調節した。QODE プローブ非特異的な結合による蛍光輝点の明るさや数について定量的に評価し、DeQODE-Syntaxin 特異的な蛍光標識が大多数となる観察条件を見出した。続いて、実際に COS7 細胞の細胞膜上で定常状態での拡散係数を算出した。具体的には、多数の蛍光輝点データからフリーの画像解析ソフトウェア ImageJ のプラグインの TrackMate を用いて各輝点をトラッキングして全輝点の時間情報と位置

情報取得した上で、自作解析プログラムによって各輝点の軌跡から拡散係数を算出できるようにした。得られた多数の蛍光軌跡に基づいた拡散係数のデータから推定される拡散係数の分布型が理論的に予想される分布型となることが確認でき、DeQODE システムを用いた 1 分子蛍光観察によって 1 分子レベルのダイナミクスを精密に計測できることが確認できた。

培養細胞でのシナプス分子の時空間ダイナミクスの解析

開発したシナプス分子の 1 分子追跡の計測系を用いて、実際にシタキシンを初めとするシナプス関連分子の生細胞内での 1 分子動態を可視化解析した。種々のシナプス分子を DeQODE タグとの融合タンパク質として COS7 細胞に発現させて、QODE プローブの負荷により標的分子を蛍光標識し、細胞内での分布が既報と同様であることを確認した。次に本観察系を用いて、シタキシンやシナプス伝達においてシナプス後部で重要な役割を担う Tarp- γ 8 についての 1 分子蛍光追跡によって時空間ダイナミクスを解析した。特に Tarp- γ 8 はスキヤホールド蛋白質である PSD-95 と協働的に AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプスへの局在を制御していることが報告されており、Tarp- γ 8 の PSD-95 との相互作用と Tarp- γ 8 の時空間動態との関係についての理解はシナプス可塑性の分子機構の解明に重要な情報を与える。本研究ではモデル系として PSD-95 のクラスターを形成させた COS7 細胞において PSD-95 クラスターの内外での Tarp- γ 8 の動態について 1 分子レベルでの解析を行った。その結果、PSD95 クラスターとの相互作用により Tarp-8 の動きは大きく制限されること、さらに PSD-95 クラスター上において Tarp- γ 8 はほぼ静止している状態と比較的動きやすい状態を遷移しうることが明らかになった。本研究によりシナプス分子の動態の精密解析が可能になり、電気生理学計測やカルシウムイメージングなどのシナプス機能解析と分子動態解析をリンクさせて、分子動態とシナプス機能とを対応付けた解析が可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aritake T, Hino H, Namiki S, Asanuma D, Hirose K, Murata N	4. 巻 451
2. 論文標題 Fast and robust multiplane single molecule localization microscopy using deep neural network.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurocomputing	6. 最初と最後の頁 279-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neucom.2021.04.050	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 Kitajima N, Takikawa K, Sekiya H, Asanuma D, Sakamoto H, Namiki S, Iino M and Hirose K	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo Fluorescence Imaging of Extracellular ATP in the Mouse Cerebral Cortex with a Hybrid-type Optical Sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e4046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.4046	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 Kitajima N, Takikawa K, Sekiya H, Satoh K, Asanuma D, Sakamoto H, Takahashi S, Hanaoka K, Urano Y, Namiki S, Iino M, Hirose K	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e57544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.57544.	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 -

1. 著者名 Aritake T, Hino H, Namiki S, Asanuma D, Hirose K, Murata N	4. 巻 1
2. 論文標題 Single-Molecule Localization by Voxel-Wise Regression Using Convolutional Neural Network.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Results in Optics	6. 最初と最後の頁 100019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rio.2020.100019	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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林新九郎、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 TARP -8の分子動態にPSD95とのカップリングが及ぼす効果の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 ライブセル超解像イメージングを実現する新規蛍光標識技術の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林新九郎、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 再生可能な蛍光ラベリングを導入した長時間一分子トラッキング技術の開発
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北島奈美、瀧川健司、関谷敬、浅沼大祐、坂本寛和、並木繁行、飯野正光、廣瀬謙造
2. 発表標題 脳虚血における細胞外ATP動態の生体内蛍光イメージング
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅沼大祐、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 消光団を利用したケミカルタグ技術の開発とライブセル超解像イメージングへの応用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並木繁行、浅沼大祐、大久保洋平、廣瀬謙造
2. 発表標題 ナノスケールの視点から脳の分子ダイナミクスの再考を目指す蛍光再生型分子標識技術開発
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------