

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19305

研究課題名（和文）脳組織における細胞内外の網羅的ナノライブイメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method for live cell imaging of intracellular and extracellular structures in brain tissue

研究代表者

野住 素広（Nozumi, Motohiro）

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：00420323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外領域の蛍光標識でシナプスを含む脳組織の陰画像を取得する超解像ライブ撮影法SUSHIの原理を細胞内構造の可視化に適用することで、脳組織における細胞内外構造の同時撮影を目指した。培養神経細胞から伸びる軸索の先端、成長円錐における陰画像で、神経成長におけるミトコンドリア形態とアクチン細胞骨格の新たな関係を明らかにすることができた。胎仔マウス脳に子宮内電気穿孔法で赤色蛍光蛋白質を導入し、緑色蛍光を含む培地中で脳スライスを共焦点顕微鏡でライブ撮影を行った。赤色蛍光の陰画像で神経細胞内の構造を取得することに成功した。成長円錐が近くの細胞に向けて糸状仮足を伸ばし、接触する様子を捉えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、2種類の蛍光画像から、脳組織において軸索伸長や遊走で形態変化する神経細胞とその周りを取り囲む多様な細胞群との相互作用を捉えつつ、同時にオルガネラなどの細胞内構造の変化を可視化することが可能になった。今回試みた細胞内構造の可視化は神経細胞に限らず、線維芽細胞やグリオーマ株細胞にも適用できたことから、神経細胞からグリア細胞まで幅広い細胞種での細胞内外ライブイメージングに応用できると思われる。このライブイメージング法は脳の形成過程だけでなく、病態脳における様々な細胞集団の細胞内外動態を網羅的に可視化するツールとしての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Super-resolution shadow imaging (SUSHI) enables the acquisition of shadow images of brain tissue, including synapses, through fluorescent labeling of the extracellular space.

In this study, we applied the principles of SUSHI to visualize intracellular structures, aiming to simultaneously image both intracellular and extracellular structures in living brain tissue. By employing this approach, the shadow imaging of growth cones, which are axonal tips, revealed a novel relationship between mitochondrial morphology and the actin cytoskeleton during nerve growth processes. To achieve this, a red fluorescent protein was introduced into fetal mouse brains through in utero electroporation. Through this method, we successfully captured intracellular structures of the neuron in the shadow images generated from red fluorescence signals. We also observed a growth cone extending its filopodium towards a neighboring cell, followed by cell-cell contact using our imaging technique.

研究分野：神経科学

キーワード：成長円錐 超解像顕微鏡 SUSHI COSHI アクチン ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成時や神経再生時において、神経細胞から伸びる軸索の先端構造は成長円錐と呼ばれ、生体内で最も走化性に特化した領域である。成長円錐は 10 μm 以下の小さな構造のため、細胞骨格やオルガネラの分布はこれまで 2 次元的に描かれてきた。しかし、超解像顕微鏡 3D-SIM で成長円錐を 3 次元撮影すると、接着面と非接着面を明確に識別でき、F-アクチンが非接着面に偏って存在することが明らかになった。F-アクチンは成長円錐の非接着表面で、非接着性のフィロポディアを形成し、脂質ラフト依存的に軸索ガイダンス受容体を集合させる、局所性エンドサイトーシスを誘導し、脂質ラフトを回収することが分かった (Cell Rep, 2017; Neurochem Int, 2018; J Neurosci, 2018; 投稿中)。培養神経細胞で見出した、これらの 3 次元的な細胞構造とプロセスが生体内でも同様に生じるかを明らかにしたいと考え、脳組織における細胞内ライブイメージングを検討した。

低ダメージで脳組織を革新的な分解能で撮影できる超解像ライブ撮影法 SUSHI (Super-resolution shadow imaging [Tønnesen et al, Cell, 2018]) が、生体内の成長円錐を可視化するのに最良であると判断し、開発者である Valentin Nägerl との共同研究を行い、蛍光タンパク質のネガティブ像によって細胞内の各種オルガネラ、細胞骨格を同時に可視化することに成功した。

2. 研究の目的

細胞内 SUSHI 法を用いて神経細胞の細胞内構造を可視化し、オルガネラ 細胞骨格間、オルガネラ間の相互作用が検出できるか検証する。細胞内 SUSHI と原法の SUSHI 法と組み合わせることで、脳組織における細胞内外の同時可視化を試みる (図 1)。

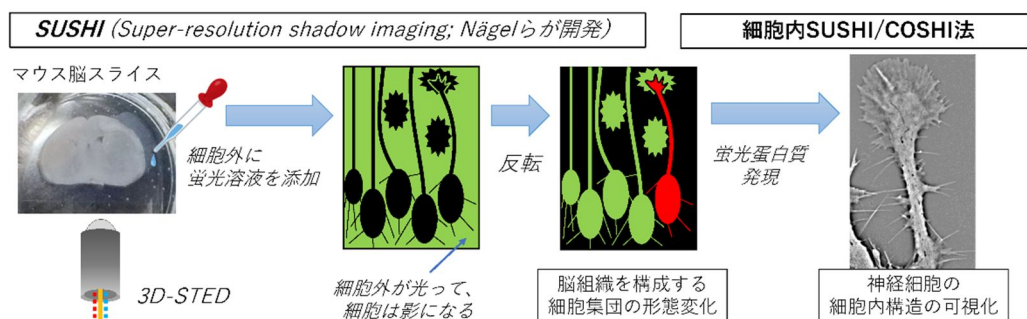


図 1 SUSHI と細胞内 SUSHI/COSHI による脳組織、神経細胞内構造の可視化方法

3. 研究の方法

SUSHI/COSHI による細胞内構造のネガティブ像取得、構造の同定

超解像観察法の 1 つである STED (Stimulated emission depletion) 顕微鏡は、励起光と同時に長波長の誘導励起レーザーをドーナツ状に照射することで蛍光の励起領域を小さくし、50 nm 前後の分解能を発揮する。本研究では STED に加え、縞模様の励起光を用いた超解像顕微鏡 SIM (Structured illumination microscopy)、共焦点顕微鏡も併用して、蛍光タンパク質による細胞内のネガティブ像の取得を行った。各陰影はそれぞれのオルガネラや細胞骨格に特異的な分子マーカーを使って構造の同定を行った。

COSHI による細胞外、細胞内の同時可視化

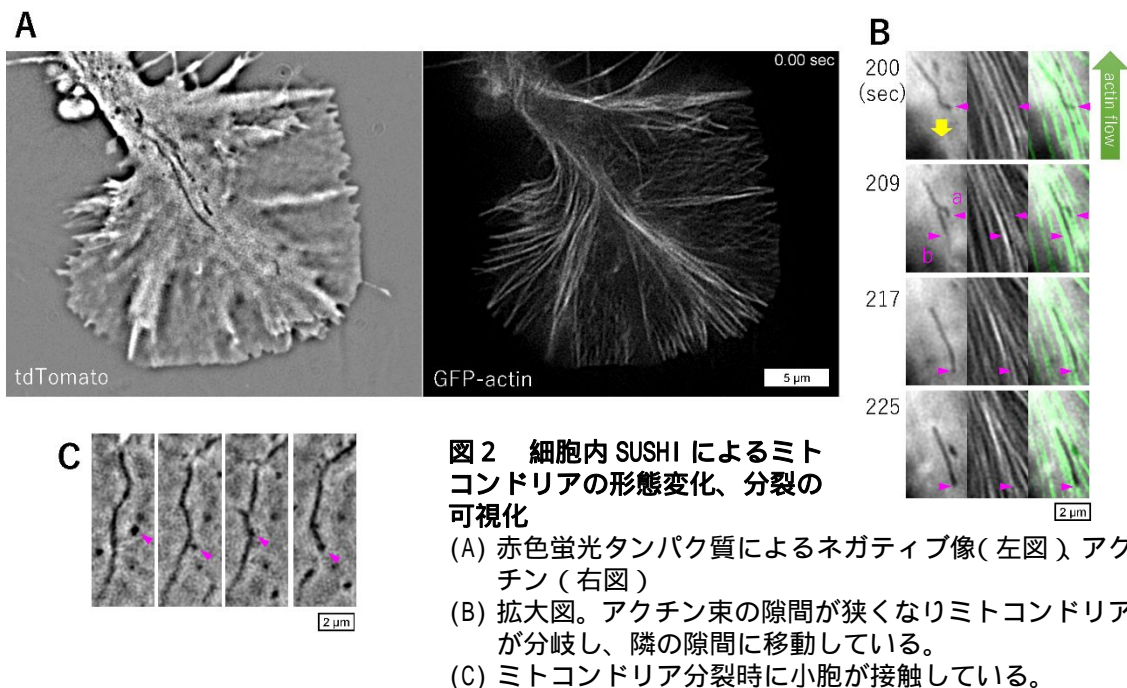
細胞内 COSHI のために、赤色蛍光タンパク質の発現ベクターを *in utero* electroporation によってマウス胎仔に導入し、生後、緑色蛍光色素カルセインを含む培地に脳スライスを浸した。脳スライスを含むガラスボトムディッシュを保温し、共焦点顕微鏡で細胞外 (緑色蛍光) 細胞内 (赤色蛍光) のネガティブ像を撮影した。

4. 研究成果

SUSHI による成長円錐内構造の可視化

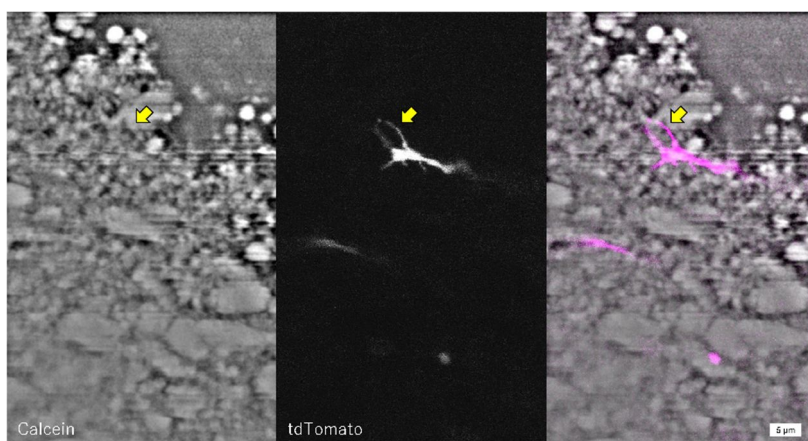
蛍光タンパク質を発現させた神経細胞の成長円錐を超解像顕微鏡 SIM で撮影したところ、ミトコンドリア、エンドソーム、リソソーム、F-アクチン束などの細胞内構造をネガティブ像として検出できた。成長円錐のミトコンドリアの多くは成長円錐中心部に局在するが、SUSHI でライブ映像をみると、成長円錐の先端側に向かって順行性に移動するミトコンドリアが見られた。しかし、そのミトコンドリアは F-アクチンに富む周辺領域でほとんど停止することが分かった。周辺領域の豊富な F-アクチンがミトコンドリアの侵入を物理的に阻害すると思われるが、何度も周辺領域への侵入を試みるミトコンドリアは F-アクチン束の隙間を通して、先端近傍まで

移動した。そのとき、F-アクチンの隙間が狭くなると、ミトコンドリアは形態を変化させて、隣のより間隔の広い空間に移動する様子が捉えられた。これらの観察から、成長円錐の F-アクチンがミトコンドリアの分布、形態を直接制御している可能性が初めて示された(図2)。ミトコンドリアの分裂時にリソソームと思われる小胞が接触する様子も細胞内 SUSHI で可視化できた。



マウス脳スライスにおける細胞内外構造の可視化

マウス胎仔に赤色蛍光タンパク質を *in utero* electroporation で導入し、生後のマウス脳スライスを緑色蛍光色素カルセインを含む培地に浸し、共焦点顕微鏡を用いて細胞内外のネガティブ像取得を行った。脳組織内でも、株細胞と同じように神経細胞の細胞核や小胞状の構造が検出することができた。脳梁における軸索の COSHI 像では、軸索先端の成長円錐から伸びたフィロポディアが伸長経路途中の細胞に接触している様子が、COSHI による細胞外可視化で検出できた(図3)。



SUSHI/COSHI による神経細胞の細胞内外の観察により、これまでの手法では見逃されてきた現象を初めて可視化することができた。本研究により、2種類の蛍光画像から、脳組織において軸索伸長や遊走で形態変化する神経細胞とその周りを取り囲む多様な細胞群との相互作用を捉えつつ、同時にオルガネラなどの細胞内構造の変化を可視化することが可能になった。今回試みた細胞内構造の可視化は神経細胞に限らず、線維芽細胞やグリオーマ株細胞にも適応できたことから、神経細胞からグリア細胞まで幅広い細胞種での細胞内外ライブイメージングに応用できると思われる。このライブイメージング法は脳の形成過程だけでなく、病態脳における様々な細胞集団の細胞内外動態を網羅的に可視化するツールとしての応用が期待される。

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 Hou Xubin, Nozumi Motohiro, Nakamura Harukazu, Igarashi Michihiro, Sugiyama Sayaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Coactosin Promotes F-Actin Protrusion in Growth Cones Under Cofilin-Related Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.660349	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 Okada Masayasu, Kawagoe Yosuke, Takasugi Toshiyuki, Nozumi Motohiro, Ito Yasuyuki, Fukusumi Hayato, Kanemura Yonehiro, Fujii Yukihiro, Igarashi Michihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 JNK1-Dependent Phosphorylation of GAP-43 Serine 142 is a Novel Molecular Marker for Axonal Growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03580-6	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野住素広、五十嵐道弘
2. 発表標題 非接着性のフィロポディアは拡散性ガイダンス因子の濃縮に関係する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野住素広、五十嵐道弘
2. 発表標題 超解像陰影法による複数オルガネラの同時可視化
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi, U. Valentin Nagerl
2. 発表標題 Visualization of various organelle dynamics by super-resolution shadow imaging of intracellular space
3. 学会等名 Neuro2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Three-dimensionally extending filopodia of neuronal growth cones, are associated with the localization of an axon guidance receptor
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	本多 敦子 (Honda Atsuko) (40467072)	新潟大学・医歯学系・特任助教 (13101)	

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