

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0144

研究課題名（和文）神経突起伸長の駆動力を生み出す先端構造の超解像ナノイメージング

研究課題名（英文）Nano-imaging of the growth cone producing the driving force for nerve growth

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） 11,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経突起を先導する成長円錐に含まれる多様なオルガネラ、細胞骨格の相互作用を明らかにする目的で、細胞質の蛍光を照明として細胞内構造の陰影像を取得する、超解像陰影法による細胞内の観察を試みた。蛍光タンパク質を発現させた細胞で、膜オルガネラだけでなく、細胞骨格の一部も検出することができた。成長円錐では、アクチン重合に伴って生じる膜小胞や、アクチン逆行性流動に逆らって伸長方向へ移動を繰り返すオルガネラを可視化できた。またミトコンドリアの分裂時に小胞が近接する過程も検出された。超解像陰影法は多種類のオルガネラや細胞骨格を同時に可視化できる優れた撮影法であ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

超解像陰影法による細胞内の可視化は、関心のある細胞内構造を蛍光標識する従来の方法に比べて、簡便に多くのオルガネラや細胞骨格を同時検出できるだけでなく、非選択的な可視化によって思い込みには囚われない細胞内イメージングを実現できる。原法のSUSHI (super-resolution shadow imaging)と組み合わせることで、生きた組織内の細胞内外を同時にライブイメージングすることが可能になった。

研究成果の概要（英文）：To observe the interaction between various organelles and the cytoskeleton in the growth cones that lead neurites, we applied super-resolution shadow imaging, SUSHI, to visualize the intracellular structure. Using cultured cells that cytosolically expressed the fluorescent protein Citrine, we could readily discriminate negative images of various organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, endosome, lysosome and also cytoskeleton. The live shadow imaging showed that vesicles arising following actin polymerization and organelles that repeatedly move to the leading edge against the actin retrograde flow. Mitochondrial fission was also detected immediately after a vesicle approached the mitochondrion in the growth cone. The super-resolution imaging is one of the best methods to visualize multiple organelles and cytoskeletons simultaneously.

研究分野：神経科学

キーワード：成長円錐 超解像陰影法 超解像顕微鏡 オルガネラ アクチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経回路の形成時に神経細胞は長い軸索を伸ばし、標的の細胞とシナプスを形成する。伸長中の軸索先端は成長円錐と呼ばれ、伸長経路上に存在する様々なガイダンス分子に対する走化性を持っている(図1)。神経損傷後の再生軸索にも成長円錐が見られる。軸索が伸びるとき、成長円錐の先端端ではアクチン細胞骨格の再編成が生じ、成長円錐の駆動力を生み出す。我々は超解像顕微鏡 SIM (Structured Illumination Microscopy) によるライブ観察で、成長円錐のアクチン再編に伴って先端端特異的なエンドサイトーシスが生じることを明らかにした (Nozumi *et al.*, *Cell Rep*, 2017)。アクチン再編は成長円錐が移動する方向で生じるので、アクチン依存性のエンドサイトーシスで移動方向から選択的に形質膜を回収できる。このアクチン依存性エンドサイトーシスによって、先端端の形質膜上に局在する受容体や脂質分子を効率的に回収できると考えている (Nozumi *et al.*, *Neurochem Int*, 2018)。

細胞体から遠く離れた成長円錐には、様々なオルガネラや細胞骨格が小さな領域に詰め込まれている(図1)。そのため、我々が報告した F-アクチンと形質膜の相互作用のように、細胞骨格、オルガネラ間で多様な相互作用が生じ、効率的に成長円錐を動かしている可能性が高い。

2018年にポルドー大学の Valentin Nägerl 教授らは、脳組織の新しい蛍光観察法を発表した。脳組織における神経細胞の可視化は、通常であれば細胞自体を蛍光標識するが、彼らは細胞外空間を蛍光で光らせて、細胞群の陰影像を超解像顕微鏡で撮影し、白黒反転させるというアプローチを採った (Tønnesen *et al.*, *Cell*, 2018)。我々はこの超解像陰影法 (Super-resolution Shadow Imaging, SUSHI) を細胞内構造の可視化に適用すれば、成長円錐内のオルガネラや細胞骨格を直接標識することなく網羅的に可視化できるのではないかと考えた(図2)。

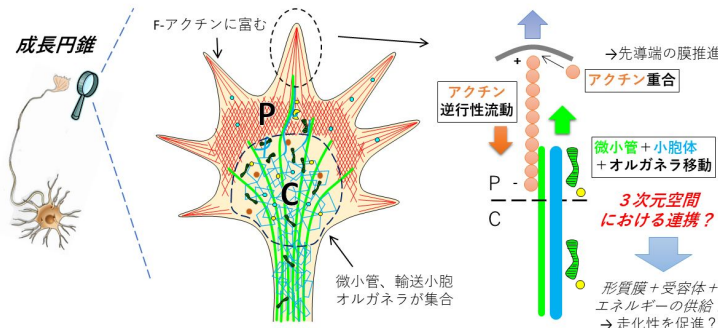


図1 成長円錐における細胞骨格、オルガネラの分布

伸長する軸索の先端には走化性をもつ成長円錐が形成される。成長円錐は-アクチンが豊富な周辺領域(P)と軸索から伸びた細胞骨格の微小管、オルガネラが分布する中心部(C)に分けられる。

2. 研究の目的

培養細胞で蛍光タンパク質を発現させて、背景照明として用いることで、オルガネラや細胞骨格が網羅的にライブ撮影可能かを明らかにする。確立した超解像陰影法を使って、成長円錐内のオルガネラ、細胞骨格のライブイメージングを行う。成長円錐内の網羅的ライブイメージングで新たな構造間相互作用の発見を目指す。

3. 研究の方法

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陰影像の取得を行った。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。

4. 研究成果

超解像陰影法を細胞内構造の可視化に応用できるかどうかを確かめるため、オルガネラの観察が容易な COS-7 に蛍光蛋白質 YFP を発現させて、ライブ撮影を行った。共焦点顕微鏡によるスナップショットでは、細胞核が薄い陰影で示され、核の周囲に様々な形態の陰影が検出された(図3)。

COS-7 細胞に赤色蛍光蛋白質で標識したオルガネラマーカーを YFP と共発現させて、検出された陰影がミトコンドリア、エンドソーム、リソソーム、ゴルジ体、小胞体であることが確認できた。さらに培地にラパマイシンを添加して飢餓状態を模倣したところ、誘導されたオートファゴソームも陰影として検出できた。COS-7 細胞内の蛍光陰影を撮影した動画では、紐状のミトコンドリアが細かく分裂する様子、ゴルジ体から多数の小胞が放出される過程、エンドソームやリソソームが移動して小胞融合する過程などが鮮明に映し出されていた。

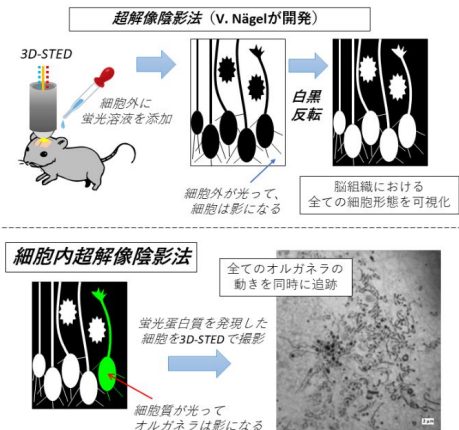


図2 超解像陰影法による細胞内外の観察

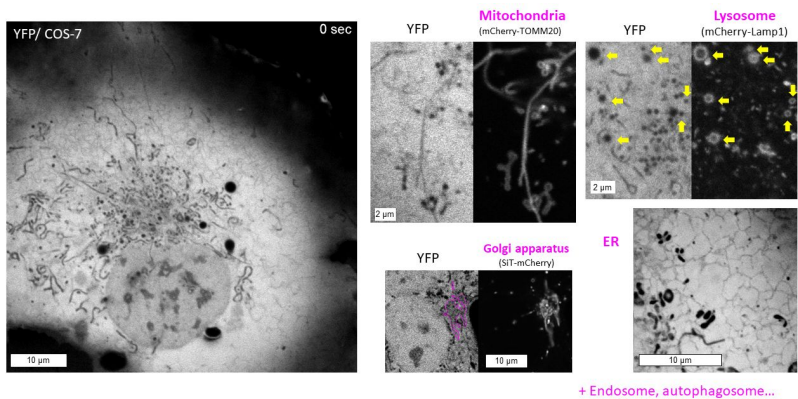


図 4 蛍光陰影によるオルガネラの可視化

COS-7 細胞に蛍光蛋白質 YFP、各種オルガネラマーカーを共発現させて共焦点顕微鏡で撮影した。黄色の矢印は個々のリソソムの陰影とマーカー分子の位置を示す。ゴルジ体は他のオルガネラに比べ弱い陰影で可視化された（マゼンタで囲んだ領域）。

細胞内蛍光陰影法では膜オルガネラだけでなく、微小管やアクチン束も陰影として捉えることができることが分かった（図 4）。大きな成長円錐を形成する神経系株細胞 NG108-15 に細胞質に分布する GFP-Stmn1 を発現させて、ミトコンドリアと一緒に先導端のアクチン束をライブ撮影することに成功した。一方で、網目状のアクチン繊維や 1 本ごとの微小管は検出できなかった。これはアクチンフィラメントや微小管単体の直径が 10-25 nm と遥かに顕微鏡の検出限界を下回るため、複数のフィラメントが太い束になった領域のみが部分的に陰影として検出できたと考えられる。

神経成長円錐の内部を蛍光陰影法でライブ撮影した結果、COS-7 細胞と同じように、ミトコンドリア、エンドソーム、リソソームのダイナミックな動きを撮影することができた（図 5）。成長円錐の先導端で重合したアクチン繊維は成長円錐の中心部に向かって常に逆行性に

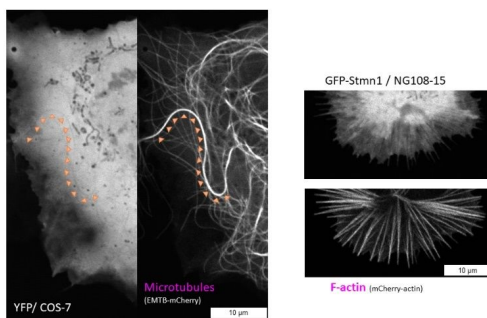


図 3 蛍光陰影による細胞骨格の可視化

微小管は太い束が部分的に陰影として可視化できた（左図、橙色の矢印）。成長円錐の F-アクチン束も陰影が検出できた（右図）。

移動し、リサイクルのために脱重合する。このアクチン逆行性流動に逆らって、ミトコンドリアやリソソームなどのオルガネラが高速でアクチン豊富な領域に侵入する様子がみえた。冒頭に述べたアクチン依存性エンドサイトーシスで生じた小胞がアクチン逆行性流動で成長円錐の中心部に集められる様子も捉えることができた。

細胞内の蛍光陰影法における問題点もいくつか分かってきた。成長円錐の蛍光陰影像を見ると先導端付近がかなり暗く、オルガネラの陰影が識別しにくいことが分かる（図 5）。これは COS-7 細胞のような細胞体に比べて成長円錐に厚みがないため、背景照明となる蛍光分子が不足していることに起因すると考えられる。COS-7 細胞のように網目状の小胞体が成長円錐で検出されないのも、同じ原因であると思われる。YFP よりも高量子収率の明るい蛍光蛋白質をいくつか試してみたが、より良い蛍光蛋白質は見つかっていない。しかし今後、顕微鏡の分解能向上やライトシート顕微鏡による 3 次元可視化などにより、より鮮明な空間像が取得できる期待している。

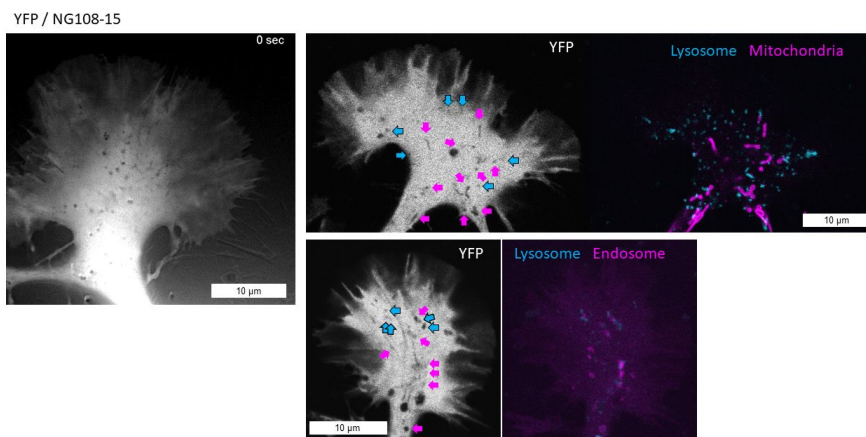


図 5 蛍光陰影による成長円錐のオルガネラ可視化

オルガネラマーカーで蛍光陰影の同定を行った。リソソームを青色の矢印、ミトコンドリアとエンドソームを紫色の矢印で示した。

成長円錐や培養細胞に蛍光蛋白質を発現するだけで、オルガネラから細胞骨格まで多種類の細胞内構造を同時にライブ撮影できることを明らかにした。今回の観察法を原法である超解像陰影法と組み合わせることで、神経組織の細胞内外の網羅的可視化が可能になる。現在、マウス脳組織に対して細胞内外の蛍光陰影観察を試みている。今回の研究で開発した細胞内の超解像陰影法を生きた脳組織に導入することで神経細胞だけでなく、グリア細胞との細胞間の相互作用を可視化しつつ、同時にそれらの細胞内で生じている過程を明らかにできると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Igarashi Michihiro, Honda Atsuko, Kawasaki Asami, Nozumi Motohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Neuronal Signaling Involved in Neuronal Polarization and Growth: Lipid Rafts and Phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	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/fnmol.2020.00150	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, Sato Yuta, Nozumi Motohiro, Ishikawa Yuya, Tamada Atsushi, Yamazaki Hiroyuki, Sekino Yuko, Kanemura Yonehiro, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi, Kaneko Naoko, Sawamoto Kazunobu, Fujii Yukihiko, Igarashi Michihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	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) 10.1186/s13041-021-00755-0	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 Wei Ran, Sugiyama Arika, Sato Yuta, Nozumi Motohiro, Nishino Hironori, Takahashi Miyuki, Saito Taro, Ando Kanae, Fukuda Mitsunori, Tomomura Mineko, Igarashi Michihiro, Hisanaga Shin-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Isoform-dependent subcellular localization of LMTK1A and LMTK1B and their roles in axon outgrowth and spine formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvaa019	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 Doki Chihiro, Nishida Kohei, Saito Shoma, Shiga Miyuki, Ogara Hikari, Kuramoto Ayumu, Kuragano Masahiro, Nozumi Motohiro, Igarashi Michihiro, Nakagawa Hiroyuki, Kotani Susumu, Tokuraku Kiyotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Microtubule elongation along actin filaments induced by microtubule-associated protein 4 contributes to the formation of cellular protrusions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvaa046	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 Igarashi Michihiro, Nozumi Motohiro, Wu Ling-Gang, Cella Zanicchi Francesca, Katona Istvan, Barna Laszlo, Xu Pingyong, Zhang Mingshu, Xue Fudong, Boyden Edward	4. 巻 38
2. 論文標題 New observations in neuroscience using superresolution microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9459 ~ 9467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1678-18.2018	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

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Super-resolution imaging unveils the novel structures in growth cones
3. 学会等名 第63回日本神経化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Actin reorganization and plasma membrane trafficking in three-dimensional space of nerve growth cones
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 敦子、野住 素広、内野 春希、有田 誠、五十嵐 道弘
2. 発表標題 神経発生における極長鎖脂肪酸合成酵素GPSN2の生理機能
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi
2. 発表標題 New relationships between F-actin organization and membrane trafficking in the growth cone revealed by SIM
3. 学会等名 Neuroscience 2018, Society for Neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ボルドー大学からの国際共同研究支援 (LabEx BRAIN) に採択
<https://brain.labex.u-bordeaux.fr/Actions/Recherche/Accueil-de-scientifiques-etrangers/r1951.html>
 超解像顕微鏡SIMで撮影した写真がJournal of Neuroscienceの表紙に掲載
https://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/news/index.html#anq_h45

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ネゲル バレンティン (Nagerl Valentin)	ボルドー大学・学際的神経科学研究所・チームリーダー、教授	

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			
フランス共和国	ボルドー大学	CNRS		