

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23720

研究課題名（和文）単一スパイン内のオルガネラダイナミクス解析に基づく神経変性疾患の発症要因の解明

研究課題名（英文）Analysis of organelle dynamics in a single spine in neurodegenerative diseases

研究代表者

壺井 将史 (Tsuboi, Masafumi)

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：20847123

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアと小胞体の物理的接触（Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact Site; MERCs）の形成異常とAD発症との因果関係を明らかにするために、本研究では、マウス大脳のグルタミン酸作動性ニューロンの単一スパインにおけるMERCsの定量法の確立を目指した。その結果、深層学習を用いた新たな画像解析手法の開発により連続切片電子顕微鏡観察からMERCsの量をハイスループットに解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、小胞体とミトコンドリアの接触異常とアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症との関連が報告されている。本研究で確立した解析手法は、神経変性疾患の患者様の死後脳や疾患モデルマウスの脳内で細胞の臓器とも言えるオルガネラの微細構造にどのような変化が起きているかをハイスループットに解析することを可能にする。これにより、神経変性疾患の発症を引き起こす微細なオルガネラの構造異常が見つかり、新規の薬剤ターゲットや治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the causal relationship between the abnormality of ER-Mitochondria contact site (MERCs) and the pathogenesis of Alzheimer's disease, we tried to establish a method to quantify the amount of ER-mitochondria contact in a single spine of glutamatergic neurons in the mouse cortex. As a result, we succeeded in developing a new analysis method using deep learning and quantifying the amount of ER-mitochondria contact from serial section electron microscopy in a high-throughput manner.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：小胞体-ミトコンドリア接触 大脳皮質 電子顕微鏡法 神経変性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患、特にアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) 患者数は年々増加の一途を辿り、大きな社会問題となっている。海馬 CA1 領域神経細胞の樹状突起におけるスパイン構造の脱落は軽度認知障害の段階から見られ、スパインの脱落と認知機能低下の程度には強い相関関係が存在することが知られている (Scheff et al., *Neurology* 2007)。そのため、スパイン構造の脱落による神経回路の恒常性の破綻が AD 発症の大きな要因の一つと考えられている。また、神経変性疾患の発症早期からスパイン機能に重要な小胞体やミトコンドリアの機能異常が見られることから、これらの機能異常が神経変性疾患の発症・進行に関係する可能性が示唆されてきた。即ちスパイン内部のオルガネラ動態を詳細に解析しスパイン脱落の分子実態を明らかにすることが、AD 発症の要因を知るために非常に重要である。しかしながら、これまでに行われてきたゴルジ染色や蛍光タンパク質によるイメージングではそのようなオルガネラの微細な構造変化を捉えるには解像度が不足しており、スパインの形態やスパイン内部のオルガネラの微細な変化を解析することは出来ていなかった。また、解像度の高い電子顕微鏡観察法を用いたスパイン解析は主に 2 次元画像観察に基づいて行われており定性的な結論を導くに留まっていた。即ち、脳の「どの神経細胞」の「どのシナプス」で「どのようなオルガネラ動態の変化」が起きているかはよく分かっていない。

2. 研究の目的

これまでに、AD 罹患者や AD モデルマウスの脳においてミトコンドリアと小胞体の物理的接触 (Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact Site; MERCS) 形成に異常が見られることや、それらの脳において MERCS 局在タンパク質が増加していることなどが報告されている (Area-Gomez et al., *EMBO J*, 2012, Hedskog et al., *PNAS*, 2013)。MERCS は細胞内の Ca²⁺ 濃度調整、脂質輸送、ATP 産生など細胞生存に必須のプロセスに寄与し細胞の恒常性維持に非常に重要な働きをすることが知られているが、この MERCS の破綻と AD 発症との因果関係については不明である。そこで、MERCS の異常と AD の初期症状に見られるスパイン脱落との因果関係を明らかにするため、本研究では、電子顕微鏡観察を用いたミクロな視点から大脳皮質グルタミン酸作動性ニューロンのスパインにおける MERCS の状態を定量的に解析する手法の確立を目指した (図 1)。

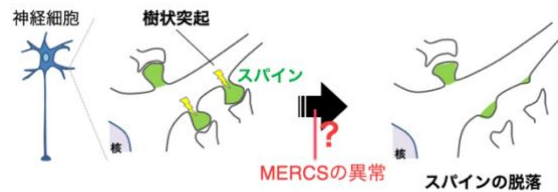


図 1: 本研究の概要

3. 研究の方法

3 次元電子顕微鏡と光学顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡観察手法を用いて大脳皮質内の特定のニューロンのスパインとその内部のオルガネラ構造を調べるために、蛍光・電子顕微鏡の同時観察を可能にする融合タンパク質をいくつか設計し、それらを発現する DNA コンストラクトを作成、検討した。さらに、深層学習を取り入れた画像解析手法を新たに構築し、連続切片電子顕微鏡観察により得られたマウス脳の電子顕微鏡画像から、グルタミン酸作動性ニューロンにおける小胞体-ミトコンドリア接触の定量を行った。

4. 研究成果

蛍光-電子相関顕微鏡による観察を行うために、細胞膜表面に蛍光タンパク質とアスコルビン酸オキシダーゼ (APEX) の融合タンパク質を発現する DNA コンストラクトの検討を行い、APEX の細胞膜表面への局在化と同一細胞での蛍光タンパク質の観察に成功した。

さらに、連続切片電子顕微鏡観察法により得られた多量の画像から MERCS を定量的に解析する手法の確立を検討した。これまででは、得られた電子顕微鏡画像からミトコンドリアと小胞体を人の目で判断しマニュアルで segmentation を行ない、それぞれのオルガネラの 3 次元的再構築を行っていた。そこで我々は、既存の深層学習 (U-Net) を導入した新規の解析手法の構築

を行い、細胞内のミトコンドリア及び小胞体を半自動で segmentation することに成功した (図 2)。

そこでさらに、連続切片電子顕微鏡を用いてマウス脳の電子顕微鏡画像を取得し、数百枚の電子顕微鏡観察画像における MERCS 量を定量した。この時、哺乳類細胞において MERCS 形成を担う責任因子 PDZD8 (Hirabayashi et al., Science 2017) のノックアウトマウス的大脑でも同時に解析を行なったところ、PDZD8 をノックアウトしたマウス由来のニューロンにおいて MERCS 量が低下傾向にあることを見出した。この結果は、本研究で構築したプラットフォームの妥当性をサポートするものである。以上から、マウス脳における連続切片電子顕微鏡画像からハイスループットにミトコンドリアと小胞体を 3 次元的に再構築し、それらの接触面を定量解析する手法の確立に成功した。

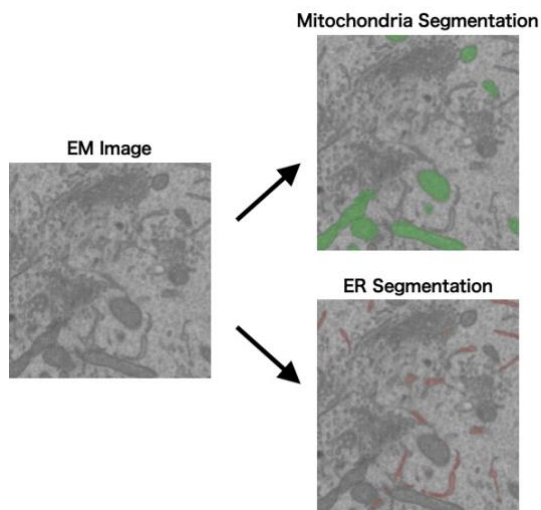


図 2: 深層学習を用いた解析手法による EM 画像中のミトコンドリア及び小胞体の segmentation の例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masafumi Tsuboi
2. 発表標題 The role of mitochondria-ER contact sites in neurons during mammalian brain development
3. 学会等名 The 43rd annual meeting of the Japan neuroscience society
4. 発表年 2020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
---------	---------