

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15058

研究課題名（和文）超高速3D超解像イメージング同時1分子追跡による神経シナプス分子集積機構の解明

研究課題名（英文）Development of simultaneous ultra-fast 3D super resolution imaging and 3D single molecule tracking microscope system

研究代表者

角山 貴昭 (Tsunoyama, Takaaki)

沖縄科学技術大学院大学・膜協同性ユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：90896862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：シナプス上では受容体は安定に存在しているということが定説であるが、我々の最近の結果から、実際には受容体は頻繁に出入りを繰り返す、ダイナミックな構造である可能性が示唆された。本研究では超高速3D超解像と超高速3D 1分子蛍光追跡を同時に実行する世界でも類例のない顕微鏡システムを構築し、この仮説を検証することを目的とした。

液体レンズによる高速Zスキャンを特徴とした新規の顕微鏡システムを構築し、今までの2倍以上のZ方向の解像範囲である2 μ mを250 Hzの高速で観察することが可能となった。このシステムを用いて、3次元の超解像シナプスに受容体が入り出す様子を3次元で追跡することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超解像顕微鏡法や1分子蛍光観察法は今では広く用いられているが、3次元での観察となると応用例は少なく、ほとんどは固定細胞を用いたものである。特に神経細胞は複雑な3次元構造をもっており、3次元での生細胞を用いた動態の観察が重要であると考えられるが、限られた知見しか得られていない。

本研究で開発した液体レンズを用いる3次元顕微鏡システムはこの限界を打ち破るものであり、比較的安価に導入が可能で、その性能と安定性も十分なものであると証明ができた。このシステムは様々な観察系に導入することが可能で、3次元の高速観察、というニッチを補完するものであると確信している。

研究成果の概要（英文）：It is a well-known theory that synaptic receptors are stably present (or anchored) on synapses. However, our recent findings suggest that receptors actually undergo frequent entering and departure movements, indicating a dynamic structure. In this study, we aimed to verify this hypothesis by developing a novel microscope system that simultaneously performs ultrafast 3D super-resolution observation and ultrafast 3D single-molecule fluorescence tracking. We developed a novel microscope system characterized by high-speed Z-scanning using a liquid lens, enabling observations with a Z-directional resolution range of 2 μ m, which is more than twice the ordinary range, at a high speed of 250 Hz. Using this system, we were able to track the movement of receptors in and out of 3D super-resolved synapses in three dimensions.

研究分野：生物物理

キーワード：超解像顕微鏡法 3次元観察 1分子蛍光追跡法 細胞膜 神経シナプス 細胞膜受容体

1. 研究開始当初の背景

シナプス上では神経伝達物質の受容体 (AMPA、NMDA などの受容体) はかなり長時間安定に存在しているというのが定説であった。しかし、私が関与した最近の研究から受容体は樹状突起の軸上とシナプス領域との間で、常に、頻繁に、出入りを繰り返し、その内の僅か 1%程度がシナプス内で一時停留するという驚くべき現象が明らかとなった(参考論文 1)。一時停留の時間は 3 種あり (即ち、3 種程度の停留機構があり)、数秒、100 秒、数 100 秒のオーダーで、これより長い停留は見いだせなかった。

驚いたことに、これは、私が別のプロジェクトとして行ってきた接着斑 (細胞膜上にあるミクロンサイズの構造体で、細胞を細胞外基質 [ECM] に結合させる "足"として働く) の中で、ECM 受容体であるインテグリンが働く機構の研究で見出した結果に酷似していた。すなわち、接着斑は、タンパク質のミクロンサイズの大きな塊ではなく、むしろ、80%以上は液状の二重層膜からなり、接着斑の構成タンパク質群は直径が 50nm 程度の集合体 (小島) を作っていて、多数の小島が接着斑領域に散らばっているという群島構造をなしていた。インテグリンは、接着斑の群島の海峡部分を拡散運動し、小島に時々立ち寄っては、そこで小島と ECM を動的に結合していた (参考論文 2,4)。

この結果に基づき、私は、シナプスの構造と神経伝達物質受容体の集積機構について、旧来のモデルと全く異なる革新的な作業仮説を得た。すなわち、シナプスは今まで考えられていた 1 つの巨大な塊 (0.5 - 2 μ m 直径) ではなく、50-100nm 直径の小さなシナプスタンパク質の集合体 (小島) がちりばめられた群島構造からなる。受容体は小島の中の海峡を拡散運動しながら、ときどき小島に結合して、そこで機能しては去っていく。

このような構造であるからこそ、受容体はシナプス (小島) と樹状突起の軸上の膜の間で素早く行き来ができ、神経興奮による長期増強 (Long-term potentiation: LTP) 時には、受容体を、サブユニット組成の違うものへ入れ換えたり、受容体数を増加させたり、シナプスサイズを増大させたりを急速に実行できる、のではないかと考えている。

2. 研究の目的

本申請研究の第一の目的は、超高速 3D 超解像 PALM イメージングと超高速 3D 1 分子蛍光追跡を同時に実行する世界でも類例のない顕微鏡システムを構築することである。これは、我々が最近開発した、世界最高速度での撮影が可能な 1 分子蛍光観察カメラシステム(参考文献 3,4)と、世界最長の 1 分子蛍光追跡法(参考文献 2)を組み合わせ、さらに液体レンズによる高速 Z スキャンを導入することで可能になる。

第二の目的は、開発した 3D システムを用いて、神経の興奮性シナプスの 3 次元構造の動的変化と、そこへの神経伝達物質受容体の出入りを 3D 高速追跡し、受容体の集積の制御機構を解明することである。我々の作業仮説は、シナプスは、実際には、さらに小さな分子集合体の集合であり (群島構造)、神経興奮によって各小島の生成と受容体集積が変化し、それによって長期増強 (LTP) が強化される、である。従来 2D 超解像法では、3D 構造は見えず、構造変化を見るには遅すぎた。この壁を打破し、シナプスの群島構造の変化を観察しながら、そこへの受容体の出入りを 1 分子レベルで 3D 追跡して、受容体の集積の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

本顕微鏡システムを、(a)液体レンズによる高速 Z スキャン、(b)我々が最近開発した世界最高速度の 1 分子蛍光カメラ、(c)世界最長の 1 分子蛍光追跡、を組み合わせることで実現する。

画像から 1 分子の Z 座標を得るためには、シリンドリカルレンズを用い非点収差を利用する、astigmatism 法を用いる。予備検討では、1 蛍光分子の Z 方向位置決定精度は 50nm 程度であった。しかし、この方法で分解できる Z 方向の範囲は $\pm 500\text{nm}$ 程度であり、初代培養神経細胞や通常の培養細胞の高さは 5 ミクロン程度なので、普通は、顕微鏡ステージを上下させて観察することになる。例えば、予備検討ではピエゾステージを Z 軸方向に 500nm ずつ動かして 10 回観察した。しかし、この方法では、物理的にサンプルを移動させるため、静止するまでに時間がかかり（したがって高速観察が出来ない）、しかもサンプルがドリフトする問題があった。そこで、本申請研究では、液体レンズによって Z スキャンを行い、 $5\ \mu\text{m}$ 以上の範囲で PALM と 1 分子追跡を実行する。液体レンズは印加する電圧に応じて焦点距離を変化させることができる特殊レンズであり、これを用いることで従来用いられてきたピエゾ素子に比べて 10 倍以上の速度で焦点を移動させることができる。

この開発した顕微鏡システムを応用し、シナプスの群島構造と受容体の出入りの検討を進める。興奮性シナプスの構造タンパク質として PSD95・Homer・SynGAP・Shank をとりあげ、それらの蛍光標識体を神経細胞に発現させる（必要なら、内在性の分子は shRNA でノックダウンし、分子のラベル率を上げる）。これらのスパイン内とシナプス内での 3 次元分布を超高速 3D 超解像法で調べ、各シナプスにおいて、シナプス分子の群島構造を検討する。同時に受容体 (AMPA 受容体・NMDA 受容体) の 1 分子が 3 次元的に拡散運動する様子を追跡する。受容体分子が、樹状突起の軸上の膜とシナプスとの間を移動する過程を明らかにする。

4. 研究成果

(1) astigmatism 法における位置決定精度の詳細な検討

基礎データとして、astigmatism 法における位置の決定精度を測定した。高精度のシリンドリカルレンズを特注し、それを検出系の光路に挿入するためのユニットを自作した。このユニットはシリンドリカルレンズと結像レンズの距離を調整することが可能で、Z 位置と歪みの強さを調整することが可能である。さまざまな曲率のシリンドリカルレンズと結像レンズとの距離を検討した結果、R2000 mm のシリンドリカルレンズを結像レンズから 50 mm の位置に設置することが、最も測定範囲と位置精度のバランスが良いという結論が得られた。このセッティングを用いることで、 $\pm 400\ \text{nm}$ の Z 範囲の測定が可能である。

各ポイントでの位置精度を見ていくと、焦点面において、XY 方向の位置決定精度が $\pm 25\ \text{nm}$ 、Z 方向が $\pm 45\ \text{nm}$ 、焦点面から $\pm 200\ \text{nm}$ の面において、XY 方向が $\pm 30\ \text{nm}$ 、Z 方向が $\pm 55\ \text{nm}$ 、焦点面から $\pm 400\ \text{nm}$ の面において、XY 方向が $\pm 40\ \text{nm}$ 、Z 方向が $\pm 75\ \text{nm}$ 、程度となった。

(2) 液体レンズを用いた高速 Z スキャンシステムの構築

広範囲の Z 方向への追跡を可能とするため、液体レンズを用いた高速 Z スキャンのセットアップを行なった。まず、特注のサンプルホルダーを用いて、対物レンズとレボルバーの間に液体レ

ンズユニットを挿入した状態でサンプルを固定できるように工夫した。また、より安定した観察条件を実現するため、サンプルチャンバーのみでなく、顕微鏡全体を自作の保温箱で囲い、システム全体を 37 度に保つ工夫を施した。その結果、観察時のサンプルドリフトが劇的に改善し、数 nm 以下に抑えられるようにした。液体レンズの焦点距離はアナログ電圧信号によって制御が可能なので、自作の顕微鏡制御システムを用いて、信号ボードからのアナログ制御が可能のようにセットアップした。さらに観察フレーム単位での同期を可能とするため、カメラ制御信号との同期を可能とするソフトウェアの開発も行なった。

その結果、数ミリ秒以内での安定した焦点の移動が可能となり、250Hz の観察において、1 フレーム以内に 2 焦点の多焦点画像を取得することが可能となった。

(3) 高速カメラシステムのさらなる最適化

我々はこれまでに通常のカメラよりも 100 倍高速な 1 分子蛍光観察用のカメラ(時間分解能 33 マイクロ秒)の開発を続けており、本申請研究の目的に合わせた最適化を試みた。その結果、~100 Hz、5~10 nm 程度の予期しない Z 方向の周期振動が確認された。これは今まで検出不可能で見逃されてきたものであり、顕微鏡本体に伝達されたファンや回転体からの振動が原因であると考えられた。冷却装置の水冷化やサンプルホルダーの改良などによりこの問題を解決し、検出不能なレベルまで振動を抑制することが可能となった。これまでの結果と合わせて高速カメラの開発と応用として、J. Cell Biol. に 2 報論文を出版した(参考文献 3,4)。

(4) 神経細胞培養法の最適化

神経細胞の培養については、通常の培養細胞とは異なり、繊細な管理が肝要となる。さらに本研究では、細胞同士の重なりを極力少なくするため、より培養条件が厳しい低密度培養が必須となるという問題があった。この最適化を試み、慎重に調整したコンディションドメディウムを用いることで、低密度培養においても 4 週間以上の長期間に渡って神経細胞を健康な状態に保つことが可能となった。

(5) 生細胞を用いた試験

培養細胞に蛍光タグタンパク質を融合した膜タンパク質を発現させ、細胞膜上の拡散を 3 次元で追跡した。500 Hz の観察スピードで 2 つの焦点を液体レンズによりスキャンし、250 Hz の二焦点動画を取得することに成功した。この動画から 1 分子蛍光スポットを 3 次元追跡するアルゴリズムを開発し、通常 1 μm 程度が限界であった Z 方向の追跡範囲を 2 倍に拡張することに成功した。

(6) 神経細胞を用いた観察

ラット海馬から調整した初代培養の神経細胞に mEos3.2 タグを融合させた Homer-1B をスパインマーカーとして、Halo7 タグを融合させた AMPA 受容体をモデル受容体として発現させ、3 次元超解像法と 1 分子追跡法の同時観察を試みた。

神経細胞では通常の培養細胞よりも自家蛍光が強く、十分なシグナルを得るためにはより長い露光時間が必要であった。さまざまな条件を検討した結果、250 Hz の撮影速度で 125 Hz の 2 焦点画像を取得が可能となった。

この結果、3 次元超解像で明らかとなったスパイン構造に受容体がダイナミックに出入りする様子を 3 次元で可視化することができた。これからより定量的な解析や他の分子種の観察

を進める予定であり、近いうちに結果をまとめて論文を投稿する予定である。

参考文献

1. J. Morise, K. G. N. Suzuki, A. Kitagawa, Y. Wakazono, K. Takamiya, T. A. Tsunoyama, Y. L. Nemoto, H. Takematsu, A. Kusumi, S. Oka. AMPA receptors in the synapse turnover by monomer diffusion. *Nat Commun* 10, 5245 (2019).
2. T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. *Nat. Chem. Biol.* 14, 497–506 (2018).
3. Takahiro K. Fujiwara, Shinji Takeuchi, Ziya Kalay, Yosuke Nagai, Taka A. Tsunoyama, Thomas Kalkbrenner, Kokoro Iwasawa, Ken P. Ritchie, Kenichi G.N. Suzuki, Akihiro Kusumi. Development of ultrafast camera-based single fluorescent-molecule imaging for cell biology. *J. Cell Biol.* 222, e202110160 (2023).
4. T. K. Fujiwara, T. A. Tsunoyama, S. Takeuchi, Z. Kalay, Y. Nagai, T. Kalkbrenner, Y. L. Nemoto, L. H. Chen, A. C. E. Shibata, K. Iwasawa, K. P. Ritchie, K. G. N. Suzuki, A. Kusumi. Ultrafast single-molecule imaging reveals focal adhesion nano-architecture and molecular dynamics. *J. Cell Biol.* 222, e202110162 (2023).

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara Takahiro K., Tsunoyama Taka A., Takeuchi Shinji, Kalay Ziya, Nagai Yosuke, Kalkbrenner Thomas, Nemoto Yuri L., Chen Limin H., Shibata Akihiro C.E., Iwasawa Kokoro, Ritchie Ken P., Suzuki Kenichi G.N., Kusumi Akihiro	4. 巻 222
2. 論文標題 Ultrafast single-molecule imaging reveals focal adhesion nano-architecture and molecular dynamics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202110162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202110162	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 該当する

1. 著者名 Fujiwara Takahiro K., Takeuchi Shinji, Kalay Ziya, Nagai Yosuke, Tsunoyama Taka A., Kalkbrenner Thomas, Iwasawa Kokoro, Ritchie Ken P., Suzuki Kenichi G.N., Kusumi Akihiro	4. 巻 222
2. 論文標題 Development of ultrafast camera-based single fluorescent-molecule imaging for cell biology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202110160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202110160	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 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 3件）

1. 発表者名 Taka A. Tsunoyama, Christian Hoffmann, Daiki Sasaki, Bo Tang, Koichiro M. Hirose, Yuri L. Nemoto, Rinshi S. Kasai, Takahiro K. Fujiwara, Kenichi G.N. Suzuki, Hiroki Ishikawa, Dragomir Milovanovic, Akihiro Kusumi.
2. 発表標題 Nano-liquid platform on the plasma membrane that integrates receptor signals for cancer promotion.
3. 学会等名 61st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taka A. Tsunoyama, Christian Hoffmann, Daiki Sasaki, Bo Tang, Koichiro M. Hirose, Yuri L. Nemoto, Rinshi S. Kasai, Takahiro K. Fujiwara, Kenichi G.N. Suzuki, Hiroki Ishikawa, Dragomir Milovanovic, Akihiro Kusumi.
2. 発表標題 iTRVZ: Liquid-like nanoscale signaling platform on the plasma membrane that integrates receptor signals leading to cancer promotion.
3. 学会等名 68th Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tak-aki Tsunoyama
2. 発表標題 Nanoscale condensed liquid platform on the plasma membrane for signal integration
3. 学会等名 OIST-Kyoto University Joint Workshop (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tak-aki Tsunoyama
2. 発表標題 Nanoscale LLPS-based liquid-like signaling platform that cooperatively integrates RTK, GPCR, and GPI-anchored receptor signals
3. 学会等名 The 45th annual meeting of the molecular biology society of Japan (招待講演) (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

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