

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20680

研究課題名（和文）光遺伝学とクライオ電子線トモグラフィーを用いた神経細胞極性形成期の細胞骨格研究

研究課題名（英文）Study of Cytoskeletal Dynamics during Neuronal Polarization Using Optogenetics and Cryo-Electron Tomography

研究代表者

吉原 壮悟（Yoshihara, Shogo）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60963973

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）：本研究では、光遺伝学とクライオ電子線トモグラフィー(Cryo-ET)とを組み合わせたタイムラプスCryo-ET法により、細胞骨格ネットワークの微細な形態変化過程を捉え、脳神経極性の形成機序やそれによって生じてしまう疾患の原因を解明することを目的とし、研究を行った。金グリッド上にて青白光照射時間に対応したPhotoactivatable-Rac1誘導性のアクチン細胞骨格構造の蛍光をクライオ蛍光顕微鏡により観察し、その蛍光に対応した部位をクライオ電顕上で撮影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

脳の情報処理機能を司る神経細胞の極性形成には、アクチンおよび微小管からなる細胞骨格ネットワークが重要な役割を担っている。それらの制御破綻が統合失調症や認知症などの重篤な精神疾患を引き起こしてしまうが、現在の光学顕微鏡の実験系では微細な極性形成過程を細胞内で観察することは困難であり、その詳細な分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、光遺伝学とクライオ電子線トモグラフィーとを組み合わせ、細胞骨格ネットワークの超微細構造変化を経時的に捉える。これにより神経細胞の極性形成機序および疾患の発症原因を解明する点に本研究の学術的意義や社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanisms of brain neural polarity formation and the causes of related diseases by capturing the fine morphological changes in the cytoskeletal network using a time-lapse cryo-electron tomography (Cryo-ET) method that combines optogenetics and Cryo-ET. We successfully observed the fluorescence of Photoactivatable-Rac1-induced actin cytoskeletal structures corresponding to blue-white light irradiation times on gold grids using cryo-fluorescence microscopy, and captured the corresponding regions on cryo-electron microscopy.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クライオ電子線トモグラフィー 光遺伝学 アクチン 細胞骨格 細胞極性 Rac1

1. 研究開始当初の背景

脳の情報処理機能には、神経細胞の極性が重要である。神経細胞は1本の軸索と複数の樹状突起を有することで細胞極性を形成する。細胞極性の形成は細胞先端部の成長円錐や周辺部に見られるラメリポディアなどの構造により精密に制御されているが、その詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。細胞極性の制御破綻が統合失調症や認知症などの重篤な疾患を引き起こすため、制御機構の解明が疾患の治療基盤を築くことに繋がる (Yoshihara et al., *Cell Rep*, 2021; Gao et al., *Nat Commun*, 2017)。

成長円錐およびラメリポディアは、主にアクチン細胞骨格によって構築される薄い膜状の細胞突起であり、アクチン繊維の分岐や束化、伸長などに伴い、形成・変容・伸縮を繰り返す非常に動的な構造である。構造の構築には低分子量G蛋白質 Rac1 が中心的な機能を担っており、その下流においてアクチン繊維の分岐作用を持つ Arp2/3 複合体によりネットワークを形成する (Miki et al., *EMBO J*, 1998)。これまでに、発生初期の神経細胞において微小管形成中心機能を持つ中心体が軸索を生じるラメリポディアを制御していることや、微小管束化タンパク質による均一な配向性が軸索形成に重要であることなどが明らかになりつつあるが、それらとアクチン細胞骨格との関係の多くが未解決である。そこで本研究は、光遺伝学とクライオ電子線トモグラフィー (Cryo-ET) とを組み合わせたタイムラプス Cryo-ET 法を用いて、「アクチンネットワークの微細な構造変化は、軸索もしくは樹状突起という細胞極性をどのように運命づけているのか？」という学術的な問いに切り込む。

2. 研究の目的

アクチンネットワークの多様な構造を分類し、構造の特徴から局在する分子を推測し、分子局在や構造の動態を解析することで、極性形成機構や機能関わる超微細構造の変化を明らかにする。そのために、人工的光遺伝学ツールである PA-Rac1 (Photoactivatable-Rac1, Wu et al., *Nature*, 2009) によってアクチンネットワークを活性化した際の超微細構造を Cryo-ET にて観察する。取得データは細胞内小器官や微小管との位置関係、アクチン繊維の分岐数や束化数などの解析を行い、定量的な知見を得る。

3. 研究の方法

PA-Rac1 と Cryo-ET を組み合わせることで、細胞極性に必須である成長円錐およびラメリポディアの形成期にどのような微細構造が含まれるかを明らかにする。まず、カーボン支持膜付き金グリッド上で細胞を培養し、PA-Rac1 をアデノウイルスにより導入する。次に青色光照射による Rac1 の活性化を行い、固定する。そして、浸漬凍結装置 Vitrobot による急速凍結を行い、様々な時期の試料を作製する。そして、凍結したまま試料を観察できるクライオ蛍光顕微鏡 Cryo EM CLEM を用いてグリッド全体を撮影し、PA-Rac1 とアクチンの蛍光像から観察に適した部位を同定する。アクチンはアクチン結合蛍光プローブである *Lifect-mRuby* 導入マウスを用いることで可視化した。同定部位を、透過型クライオ電顕 Titan Krios を用いてトモグラフィー撮影し、解析する。

4. 研究成果

最初に、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、初代培養海馬神経細胞における PA-Rac1 誘導性アクチン細胞骨格形成をガラス底ディッシュ上で観察した。活性化30秒後から、神経突起の根本付近に顕著なラメリポディア状の構造が出現し、それは光照射に伴い成長し、計3分間の照

射により、全神経突起に出現した (図 1)。野生型神経細胞で見られる成長円錐とは明確に区別される構造であるため、PA-RAC1 による構造であることが示された。

次に金グリッド上で同様に培養および遺伝子導入を行い、CLEM を用いて凍結した状態の細胞を蛍光観察した。グリッド上でも問題なくアクチン細胞骨格の広がりが見られ、同定部位のクライオ電子線トモグラフィー観察を行った (図 2)。

しかし想定とは異なり、全体的にコントラストが低い像しか得られておらず、微小管やアクチン束といった強固な構造は見られなかった (図 3)、微弱なアクチンネットワークの観察には至らなかった。現在、固定や凍結条件の改良を進めている。

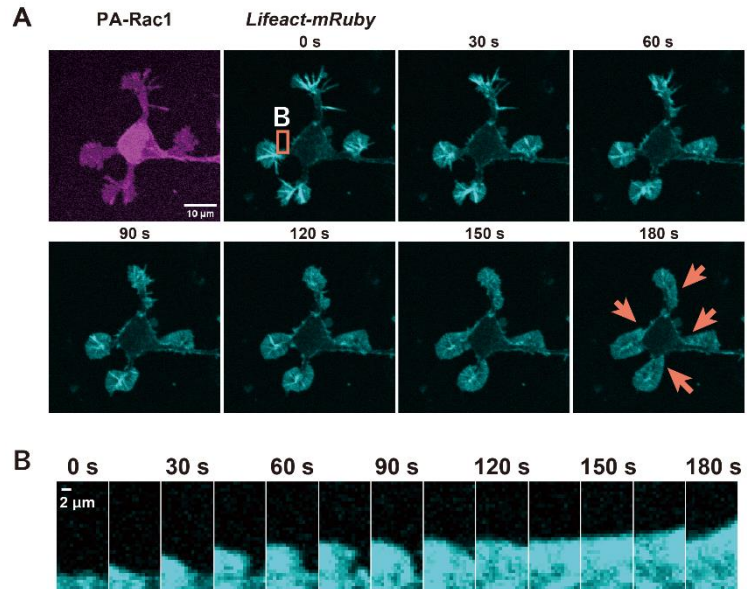


図 1. PA-Rac1 によるアクチン細胞骨格の形成過程。

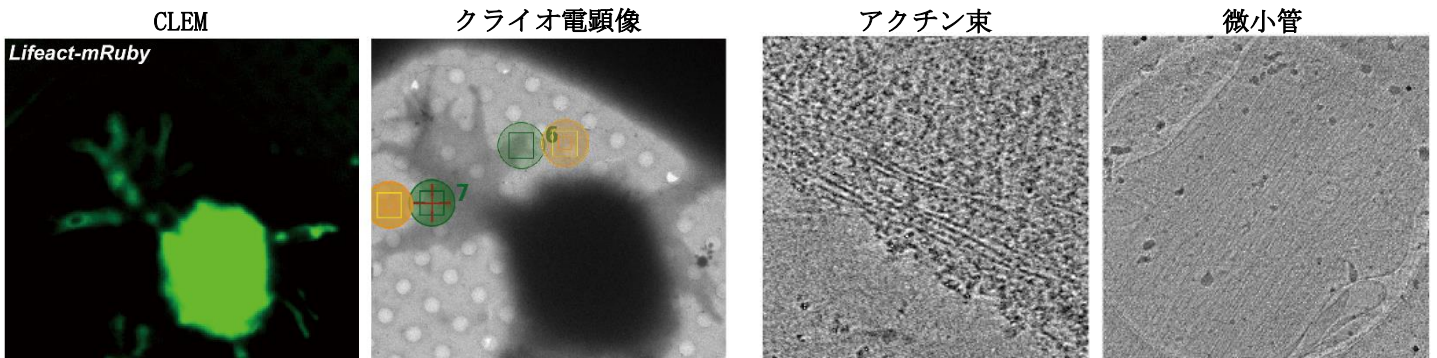


図 2. PA-Rac1 誘導性アクチン細胞骨格の CLEM および低倍率クライオ電顕像。

図 3. 撮影された Cryo-EM 像。

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 Shogo Yoshihara
2. 発表標題 Cytoskeleton analysis for combined optogenetic and cryo-ET
3. 学会等名 クロススケール新生物学第1回若手の会
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
---------	---------