

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570196

研究課題名(和文)クライオ電子顕微鏡を用いた相関顕微鏡法による神経筋接合部の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of the mechanism at neuromuscular junction by correlative light and cryo-electron microscopy

研究代表者

宮澤 淳夫 (Miyazawa, Atsuo)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：60247252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：運動神経と筋肉の間では神経筋接合部と呼ばれるシナプスが形成されている。このシナプスでは神経終末から放出されるアセチルコリンが、筋肉表面にあるアセチルコリン受容体に結合することにより神経から筋肉へ情報が伝達される。アセチルコリン受容体はシナプス領域に集積し、様々なタンパク質と相互作用してクラスターを形成している。クラスターは神経と筋肉の情報伝達に重要であると考えられているが、クラスターの実体やクラスターの形成機構は分子レベルでは明らかにされていなかった。本研究では、光学顕微鏡と電子顕微鏡、特にクライオ電子顕微鏡を用いた解析を相関させることにより、クラスターの分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A synapse between a motor neuron and a muscle fiber is called a neuromuscular junction. At the neuromuscular junction, the signal is transduced by acetylcholine molecules, which are released from the terminal of motor neurons and bind to acetylcholine receptors on the muscle fibers. The acetylcholine receptors form the clusters, interacting with various signaling and scaffolding proteins on the postsynaptic membrane of the muscle fibers. The acetylcholine receptor clusters are indispensable for neuromuscular signal transduction. But the molecular mechanism of acetylcholine receptor clustering remains to be investigated. In this study, we elucidated the molecular distribution of acetylcholine receptors and their associated proteins in the cluster, by the method of correlative observation between light microscopy and electron microscopy, especially, cryo-electron microscopy.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング 神経筋接合部 クライオ電子顕微鏡 相関顕微鏡法 アセチルコリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

神経筋接合部 (NMJ) では、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)、足場タンパク質であるラプシン、シグナル伝達に關与するタンパク質である筋特異的チロシンキナーゼ (MuSK)、細胞骨格など、様々な分子がクラスターを形成し、機能している。クラスター構成分子の多くは神経筋疾患との關連が明らかにされている。しかしながら、NMJ における神経から筋肉への情報伝達やクラスター形成の分子メカニズムについては未だに解明されていない部分が多い。

nAChR クラスターを構成する多くのタンパク質は GFP などの蛍光標識を用いて光学顕微鏡で觀察され、例えば MuSK と nAChR は細胞内局在の一致が見られるとの報告がある。しかし、免疫沈降やプルダウンアッセイによる生化学実験では、MuSK は nAChR とは直接結合しないなど、結果が矛盾する。これは複数の分子がポストシナプス膜上に “単に存在した” だけの場合と、ある特定のタンパク質間相互作用により “クラスターが形成された” 場合の見分けがつかないためと推測される。これは光学顕微鏡觀察では分子同士が直接相互作用していなくても、近くに存在していれば蛍光の重なりにより 1 つのクラスターとして検出される可能性があるため、分解能の高い電子顕微鏡法との相關顕微鏡法による解析を行う必要がある。

また、中枢シナプスの場合、海馬初代培養細胞を用いてシナプスを形成させる実験系が確立しているが、NMJ に関してはこれまでプレシナプスが存在する生体に近い形での NMJ モデルは作製されておらず、NMJ の研究が、中枢シナプスの研究に比べて遅れている要因の 1 つはここにあると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞レベルで觀察する光学顕微鏡法と、生体分子を直接觀察できる分解能を持つ電子顕微鏡法を用いて、光学顕微鏡法で觀察し機能解析した筋管細胞の nAChR クラスターと全く同じ場所を、電子顕微鏡法で觀察する相關顕微鏡法を確立する。光学顕微鏡には、Z 軸方向の位置情報を得られる共焦点レーザーสキャン顕微鏡 (LSM) を、電子顕微鏡には細胞表面のタンパク質分布の解析に適している走査型電子顕微鏡 (SEM) を利用する。相關顕微鏡法を用いて、nAChR クラスターの形成・成熟過程におけるクラスター構成分子の動態と配置、相互作用を明らかにする。

常温の SEM 觀察では、細胞を化学固定した後、脱水、乾燥することが必須であるが、それらの処置によって、細胞は生きていたときの生理的条件とは大きく異なる環境にさらされることになる。より生きていた時に近い状態で解析するためには、化学固定や乾燥のステップを必要としないクライオ電子顕微鏡法が有効である。そこで、本研究では、SEM

と LSM を用いた筋管細胞の相關觀察法をクライオ SEM と LSM の相關觀察法へ発展させる。

また、SEM では細胞表面を細胞外から觀察することができるが、nAChR クラスターは膜タンパク質だけではなく、細胞膜裏打ちタンパク質や細胞骨格とも相互作用していると考えられているため、細胞質側についても解析する必要がある。細胞骨格などの化学固定によって壊れやすい構造をより生体に近い状態で觀察するために、クライオ透過型電子顕微鏡 (クライオ TEM) を駆使して凍結切片の觀察を行う。

さらに、nAChR クラスター成熟にはプレシナプス (運動神経終末) も關与していることが知られている。そこで、詳細な nAChR クラスターの解析のために、プレシナプスが存在する NMJ の *in vitro* モデルの作製も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) C2C12 細胞培養

C2C12 細胞は 10% のウシ胎児血清を含むダルベッコ・フオークト変法イーグル最小必須培地 (DMEM) で培養を行った。筋管細胞への分化誘導は、100% コンフルエントになるように細胞を増殖させた時点で、ウマ血清を含む DMEM に培地交換した。その後、さらに 3 日間に渡って毎日新しいウマ血清を含む DMEM に培地交換をした。アグリニン (東京都健康長寿医療センター研究所・重本和宏博士提供) は、最後の培地交換時に添加した。

### (2) 共培養

NG108-15 細胞を、低血清濃度下でジブチルサイクリック AMP を添加することで神経細胞に分化させた。分化した NG108-15 細胞 (神経細胞) を回収し、コラーゲンゲル上で分化させた C2C12 細胞 (筋管細胞) の上に播種し、数週間培養を続けた。

### (3) LSM と常温 SEM を用いた相關觀察

ゼラチンでコーティングしたグリッドと番号が刻まれたカバーガラス上に C2C12 細胞を培養して分化させ、蛍光色素およびコロイド金粒子の結合した抗体もしくは nAChR のリガンドである  $\alpha$ -bungarotoxin を用いて nAChR および MuSK を標識し、2% パラホルムアルデヒド水溶液で固定した。蛍光標識された nAChR と MuSK のクラスター全体像を LSM (LSM510: カールツァイス) で觀察した後、グルタルアルデヒド固定、エタノール脱水、三級ブタノールを用いた凍結乾燥を行った。SEM 觀察用の試料台にカーボンペーストで試料を貼り付けた後、イオンスパッタリングにより表面を白金コーティングし、光学顕微鏡で觀察したのと同じ細胞、同じクラスターに着目して、コロイド金粒子で標識された個々の分子の分布を SEM (JSM6701F: 日本電子) で觀察した。

### (4) LSM とクライオ SEM を用いた相關觀察

TEM 観察用の金製グリッドにコロジオン膜を張った後、カーボン蒸着することによってカーボン膜を張り、その上で C2C12 細胞を培養、分化させた。蛍光色素およびコロイド金粒子の結合した抗体もしくは nAChR のリガンドである  $\alpha$ -ブングアロトキシンを用いて nAChR および MuSK を標識し、nAChR と MuSK のクラスター全体像を LSM で観察した。その後、急速凍結装置 (EM GP : ライカマイクロシステムズ) を用いてグリッドを浸漬凍結した。凍結したグリッドは、クライオ SEM 観察用のホルダーに固定し、凍結試料トランスファー装置 (EM VCT100 : ライカマイクロシステムズ) を用いてクライオ SEM に搬送し、観察しながら昇温し、エッチングを行った。エッチングした試料を EM VCT100 を用いて凍結切断装置 (JFD- : 日本電子) に搬送して表面のカーボン蒸着を行った後、ホルダーを EM VCT100 を用いて SEM に戻し、観察を行った。

#### (5) クライオ TEM を用いた凍結切片観察

直径 1mm にくり抜いたプラスチックシート上で培養、分化させた C2C12 細胞を、プラスチックシートごと高圧凍結装置 (EM PACT2 : ライカマイクロシステムズ) を用いて高圧凍結した。プラスチックシートを試料ホルダーに固定し、凍結ウルトラミクロトーム (EM UC7/FC7 : ライカマイクロシステムズ) を用いて凍結超薄切片を作製した。凍結超薄切片は極低温電子顕微鏡 (JEM3100F : 日本電子) を用いて観察した。

#### (6) クライオ SEM を用いた切削表面観察

プラスチックシートを用いて高圧凍結した細胞を UC7/FC7 で凍結切削 (面出し) した。このプラスチックシートをクライオ SEM 観察用のホルダーに移し、EM VCT100 を用いて SEM に搬送し、クライオステージを利用して観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) LSM と常温 SEM を用いた筋管細胞の相関観察と nAChR クラスターの分子局在解析

本研究課題では、分化した C2C12 細胞 (筋管細胞) の細胞膜で形成された nAChR クラスターを光子-電子相関顕微鏡観察する方法を確立した。これは、番号が刻まれたカバーガラス上で細胞を培養し、蛍光色素およびコロイド金粒子の結合した抗体もしくはリガンドを用いて nAChR を標識し、クラスターの全体像を LSM を用いて観察した後、同一視野を SEM を用いてより高倍率で観察するものである。これにより、nAChR クラスターの成熟の程度 (クラスターの大きさや形状、nAChR の集積程度を表す蛍光強度) と、クラスター内の個々の nAChR 分子の分布状態との関係を解析することが可能となった。

本研究では、この相関観察を発展させて、二重標識による 2 つの分子の同時観察にも成功した。nAChR と、nAChR クラスター形成に

深く関与することが生化学的研究から明らかにされている MuSK をそれぞれ異なる波長の蛍光分子と異なる大きさの金粒子を結合させた抗体で共標識し、LSM と SEM で同一視野の観察を行った。分化前の C2C12 細胞 (筋原細胞) は、筋管細胞への分化に伴って、nAChR クラスターが自発的に形成されるが、培養液にアグリンを添加することによって一つひとつの nAChR クラスターが大きくなり、またクラスターの数も増加する (クラスターの成熟)。そこで、アグリンを添加していない初期型の小さなクラスターと、アグリンを添加して成熟したと考えられる大きなクラスターでクラスター内の nAChR と MuSK の分子分布の観察を行った。その結果、図 1 に示したように、クラスター内で、nAChR と MuSK が混在した小さな分子集積が多数存在し、それらが LSM では一体となって一つのクラスターとして観察されていたことが分かった。また、nAChR と MuSK は分子レベルでも近接して存在しており、何らかの相互作用によって小さな分子集積を形成していると考えられる。アグリンを添加した細胞で観察された成熟後のクラスターでは、一つひとつの分子集積を構成する分子数がアグリン非存在下で形成されたクラスターより多く、また、MuSK の分子数に対する nAChR の分子数の割合が増加していることが明らかになった。

近年、生体膜では動的な分子間相互作用や細胞膜から取り出すと壊れてしまう弱い相互作用によってタンパク質が複合体やクラスターを形成していることが提唱されているが、実証することは非常に困難であった。

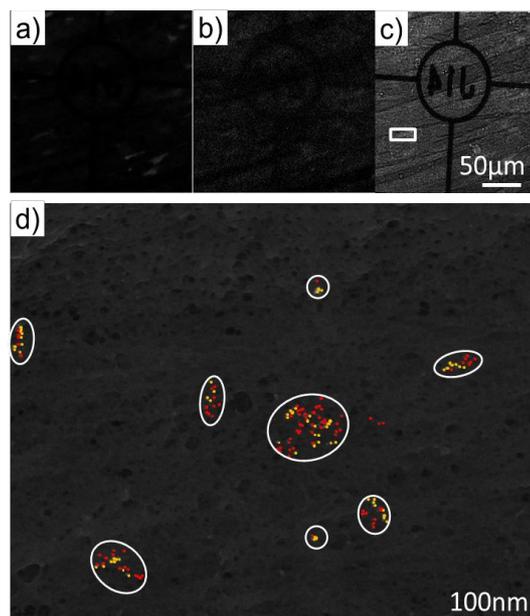


図 1 アグリン非添加、筋管細胞での nAChR、MuSK の光子 - 電子相関顕微鏡観察例

a: nAChR, b: MuSK, c: nAChR と MuSK, 位相差像を重ね合わせたもの, d: c) 内の白い四角で囲んだクラスター内の SEM 像、一つの nAChR 分子を赤色のドットで、一つの MuSK 分子を黄色のドットで示した。クラスター内に存在する分子集積を白色で丸く囲っている。

免疫標識法と SEM を用いた観察では、細胞膜に存在した状態での分子の分布や配置を周囲の環境とともに一度に観察できることから、組織形態学的にも分子構造学的にも非常に有用な手法である。また、光学顕微鏡法と電子顕微鏡法を相関させることにより、細胞レベルと分子レベルの研究を有機的に融合できる本研究は、難治性の神経筋疾患を分子レベルから解明することに寄与する基礎研究であり、その成果はいち早くヒト疾患の臨床研究に応用・展開できるものである。

#### (2) 筋管細胞の LSM とクライオ SEM を用いた相関観察

我々は LSM と常温の SEM を用いた光子 - 電子相関顕微鏡観察を行うことに成功したが、より生きていた時に近い状態での構造を解析するために、化学固定や脱水、乾燥のステップを必要としないクライオ SEM と LSM を用いた筋管細胞の相関観察法についても検討を行った。常温 SEM を用いた相関観察で細胞培養の基板として利用していたグリッドが印刷されたカバーガラスはクライオ SEM ではカバーガラスが氷で覆われているためにグリッドを反射電子や二次電子で検出できず、利用できないことが分かった。種々の基板について検討を行った結果、透過型電子顕微鏡用の金製のグリッドを基板として利用し、表面の氷を真空内で昇華させることにより、LSM とクライオ SEM で筋管細胞の相関観察を行うことに成功した。

#### (3) クライオ TEM を用いた筋管細胞の凍結切片の観察

nAChR クラスターが相互作用していると考えられている細胞膜裏打ちタンパク質や細胞骨格などの細胞質側について観察するためには、超薄切片を作製して TEM で観察することが適している。細胞骨格などの化学固定によって壊れやすい構造をより生体に近い状態で観察するために、クライオ TEM による凍結超薄切片の観察を試みた。筋管細胞は培養基板から剥がすと直ちに細胞自身の収縮により変形してしまうため、基板に接着したまま高圧凍結し、基板を残した状態で凍結切片を行うことにした。切片に使用するダイヤモンドナイフを傷つけることのない材質で、しかも細胞培養に影響を及ぼさず、高圧凍結用のキャリアに装着可能な培養基板について検討を行った結果、直径 1mm のプラスチックシートが利用できることが分かった。基板に接着した状態で凍結切片し、クライオ TEM で観察した結果、図 2 に示したように筋管細胞に特徴的な多核化や多数の細胞内小胞、アクチン様の繊維構造を観察することができた。

多くの接着細胞は、培養基板から一時的に剥がしても生存には影響しないが、接着した状態と浮遊した状態では形態が異なり、また基板から剥がすことによって細胞間の接着

も破壊されてしまうことが多い。シナプスを含めて細胞間の接着部位は情報伝達に重要な場であることが多く、それらを観察するためには接着状態を保ったまま試料調製を行う必要がある。プラスチックシートを用いた本方法は、他の多くの接着性の培養細胞の調製に適用可能な手法である。

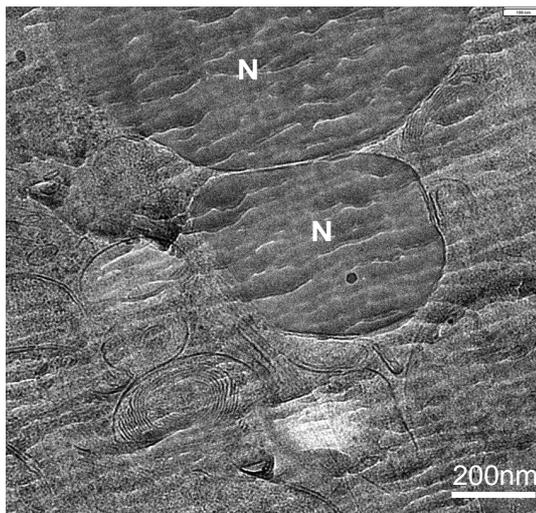


図2 筋管細胞の凍結超薄切片のクライオ TEM 観察像  
N: 核

#### (4) クライオ SEM を用いた筋管細胞の切削表面の観察

我々は筋管細胞の凍結切片を観察することに成功したが、同時に、筋管細胞の凍結切片は切削時の収縮によりヒダ状になりやすいため凍結切削後の観察が非常に困難であることが分かった。そこで、高圧凍結した細胞を、切削による変形のない状態で観察することを目的とし、TEM では一般的に観察対象となっていない凍結超薄切片作製後の試料ブロック側の切削表面に着目し、クライオ SEM を用いて切削表面の観察を試みた。ダイ

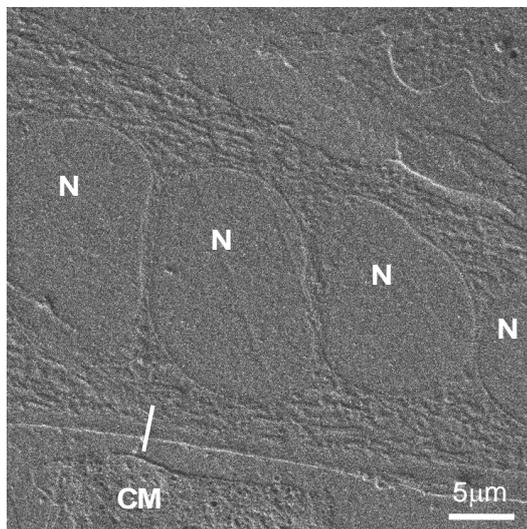


図3 筋管細胞の凍結切削表面のクライオ SEM 観察像  
N: 核、CM: 細胞膜

ヤモンドナイフによる切片作製後の切削表面は非常に平坦でそのままの状態ではクライオ SEM で観察することはできなかったが、切削表面の氷をわずかに昇華させることによって細胞膜や細胞小器官などの構造物が表面にわずかに突出することで、一切の染色操作なしにクライオ SEM で観察できることを見出した。この手法では、プラスチックシート上に接着した筋管細胞を、細胞全体像が見える低倍率から、分子標識に用いるコロイド金粒子が観察可能な高倍率まで、俯瞰的にシームレスな観察ができることが分かった。

#### (5) *in vitro* 神経筋接合部モデルの作製

nAChR クラスター成熟にはプレシナプスも関与していることが知られており、より詳細な解析にはプレシナプスを含めた観察が必要となる。そこで、NMJ の *in vitro* モデルの作製について検討を行った。筋管細胞へ分化させた C2C12 細胞に、神経細胞へ分化させた NG108-15 細胞を添加して共培養を行う条件を検討したところ、5 週間の長期共培養により、生体に近い形状を持った NMJ を作製することに成功した。

C2C12 細胞と NG108-15 細胞はいずれも株化細胞であるため、遺伝子操作を再現性良く行えるなど分子生物学的な実験が可能である。このため、個々の分子の機能を明らかにするために非常に有効な NMJ の *in vitro* モデルとして使用できる。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計9件)

Yusuke Kariya, Yuri Nishino and Atsuo Miyazawa, Establishment of correlative light-electron microscopy using cryo scanning electron microscopy and examination of molecular distribution in acetylcholine receptor clusters, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸国際会議場(兵庫県) 宮澤淳夫, 遺伝的コード化標識による生体分子の電子顕微鏡観察, 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 29 回学術講演会(招待講演), 2013 年 6 月 7 日~9 日, 神奈川歯科大学(神奈川県)

Yuri Nishino, Yoshiko Ito and Atsuo Miyazawa, Cryo-scanning electron microscopy for cross-sectioned biological specimens, 第 4 回回折構造生物国際シンポジウム 2013, 2013 年 5 月 26 日~29 日, 名古屋市中小企業振興会館(愛知県)

Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Atsuo Miyazawa, Observation method of intact cellular architectures by cryo-scanning electron microscopy, Nagoya Symposium - Frontiers in

Structural Physiology, 2013 年 1 月 22 日~24 日, 名古屋大学豊田講堂(愛知県) 西野有里, 伊藤喜子, 宮澤淳夫, クライオ走査型電子顕微鏡を用いた生物試料の切断面観察法, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日, 福岡国際会議場(福岡県)

西野有里, 伊藤喜子, 宮澤淳夫, Cellular nano- and micro-structures visualized by cryo-SEM, 日本顕微鏡学会 第 56 回シンポジウム(招待講演), 2012 年 11 月 19 日~20 日, 北海道大学学術交流会館(北海道)

伊藤喜子, 西野有里, 宮澤淳夫, クライオ SEM のための、凍結マイクロトームを用いた断面作製法とクライオトランスファー技法の紹介, 日本顕微鏡学会 第 56 回シンポジウム(招待講演), 2012 年 11 月 19 日~20 日, 北海道大学学術交流会館(北海道)

Yuri Nishino, Sho Hasegawa, Yusuke Kariya and Atsuo Miyazawa, Correlative Light-Electron Microscopy of Acetylcholine Receptor Clusters, 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 13 日~16 日, パシフィコ横浜(神奈川県) Ayumi Ishihara, Junichi Saito, Yuko Fukunaga and Atsuo Miyazawa, *In vitro* formation of neuromuscular junction with NG108-15 cells and C2C12 myotubes, 第 34 回神経科学大会, 2011 年 9 月 14 日~17 日, パシフィコ横浜(神奈川県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮澤淳夫 (MIYAZAWA, Atsuo)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号: 60247252