

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440080

研究課題名(和文) 培養シナプスモデルを用いた神経筋接合部の形態と機能に関わる分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms related to functions of the neuromuscular junction using an in vivo synapse model

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋接合部は運動神経からの筋収縮のシグナルを筋細胞へ伝達する場である。運動神経から放出されるアセチルコリンが筋細胞膜に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に結合することによって筋が収縮する。ニコチン性アセチルコリン受容体は数種類のタンパク質とともに集積して機能しているが、集積のメカニズムは明らかにされていない。そこで、光学顕微鏡と電子顕微鏡で同一視野を観察する相関観察を行うことによって、ニコチン性アセチルコリン受容体集積の分子メカニズムについて解析した。

研究成果の概要(英文)：A neuromuscular junction is the place where signals for muscle contraction are transduced from a motor neuron into a muscle fiber. Acetylcholine released from the motor neuron binds to nicotinic acetylcholine receptors on the plasma membrane of the muscle fiber, and the muscle will be contracted. Nicotinic acetylcholine receptor forms a cluster with various related proteins for efficient signal transduction. However the mechanisms of receptor clustering is still unclear. In this study we analysed the molecular mechanisms of nicotinic acetylcholine receptor clustering using correlative light and electron microscopy.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経筋接合部 ニコチン性アセチルコリン受容体 相関顕微鏡法 電子顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

(1) ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) クラスタ

神経筋接合部 (NMJ) のポストシナプス膜では、nAChR、筋特異的受容体チロシンキナーゼ (MuSK)、ジストログリカンをはじめとした様々なタンパク質分子が集合したクラスタを形成し、機能している。

nAChR クラスタの形成については、光学顕微鏡を用いた培養筋細胞の観察によって解析が進められてきた。光学顕微鏡による観察から、筋細胞膜上で nAChR は自発的に小さな集積 (初期発生型クラスタ) を形成した後、成熟に伴ってクラスタ部位にさらに nAChR が集まり、高密度で大きな成熟クラスタとなる。クラスタの成熟は、プレシナプスから放出されるアグリンが引き金となり、MuSK が必要不可欠であることが分かっていた。また、アグリンによる経路と独立して、シナプス間隙に高密度に存在する細胞間マトリックスであるラミニンを引き金としてジストログリカンを介したクラスタ成熟経路があることも、培養筋細胞を用いた実験から明らかにされていた。

筋細胞全体としてはクラスタ成熟前後で nAChR の発現量は大きく変わらないことから、クラスタ成熟時には、成熟クラスタ以外の場所に存在している nAChR が成熟クラスタ部位へ移動すると考えられる。さらに、nAChR は細胞膜上を移動するだけでなく、エンドソームを介して細胞膜-細胞内膜を往来しており、それがクラスタ成熟に関与するという可能性が光学顕微鏡を用いた観察から示されたが (引用文献①)、詳細な nAChR の細胞膜-細胞内膜間の動態については未だに明らかにされていない。

(2) 培養 NMJ シナプスモデル

シナプスの分子レベルでの解析のため、培養細胞を用いた *in vitro* モデルによる研究は非常に有効である。中枢シナプスの場合、海馬初代培養細胞を用いた *in vitro* シナプスモデルが確立しており分子レベルの研究に大きく貢献した。一方、NMJ に関しては、C2C12 細胞から分化させた培養筋管細胞で nAChR クラスタを形成させるポストシナプスだけの実験系が未だに主流である。

胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化させた運動神経と培養筋管細胞を 1 週間程度共培養することによってシグナル伝達機能を持ち合わせたシナプスを形成できることが報告されていたが (引用文献②)、形態学的に成熟した NMJ の構造を再現するには至っておらず、これが中枢シナプスに比べて NMJ の研究が遅れている要因の 1 つだと思われる。

(3) 光子-電子相関顕微鏡法のための分子標識法

光学顕微鏡と電子顕微鏡で同一の場所を観察 (相関観察) して特定のタンパク質の局

在解析を行うためには、光学顕微鏡法と電子顕微鏡法それぞれで検出可能な標識をタンパク質に施す必要がある。光学顕微鏡法では蛍光タンパク質を遺伝的に目的タンパク質に融合させることによって生きている細胞で確実に目的タンパク質分子を標識することができる。電子顕微鏡法でも、遺伝的コード化標識法は有効であると考えられたことから、金属結合タンパク質であるメタロチオネインをタグとして利用することで目的タンパク質を電子顕微鏡で検出できることを示した (引用文献③)。しかしながら、光学顕微鏡と電子顕微鏡のいずれでも検出可能な生きている細胞で標識操作が完了する遺伝的コード化標識法は存在していなかった。

2. 研究の目的

蛍光標識を用いた光学顕微鏡観察では、nAChR と MuSK は NMJ のポストシナプスで細胞内局在の一致が見られる。しかし、複数の分子が膜上の近い位置に単に存在している場合と、相互作用により複合体を形成している場合の見分けはつかない。そこで、数十マイクロメートルに広がる nAChR クラスタの形状観察と、数ナノメートルのタンパク質分子の局在解析を結びつけるために、広い視野で nAChR クラスタ全体の観察が可能な光学顕微鏡と分解能の高い電子顕微鏡との相関観察による細胞レベルから分子レベルに至るシームレスな解析を行うことが有効だと考えた。本研究では、光子-電子相関顕微鏡法を用いて NMJ で nAChR クラスタ形成と機能に関わる分子局在を解明することを目的として、以下の 3 つの目標を掲げた。

(1) nAChR クラスタ形成に関わる nAChR と MuSK の分子メカニズムの解明

クラスタ成熟前に筋管細胞表面に存在している nAChR と MuSK を金ナノ粒子で標識し、クラスタ成熟後のそれらの局在をエンドソームに着目して調べることにより、クラスタ成熟時の nAChR と MuSK の細胞膜-細胞内膜間の動態を明らかにする。共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM) を用いた細胞全体の観察と電子顕微鏡を用いた分子一つひとつの局在観察による相関観察を行うことによって、クラスタの成熟状態 (密度、大きさ) と分子局在の関連を明らかにする。

また、アグリンとラミニンという異なるシグナル伝達経路で成熟した nAChR クラスタ内での nAChR と MuSK の分子局在を、LSM と電子顕微鏡を用いた相関観察を行って比較することにより、2 つの経路における MuSK の作用について考察を行う。

(2) プレシナプスを含む培養 NMJ シナプスモデルの確立

NMJ の成熟にはマウスで数週間の期間を必要とする。成熟した NMJ の構造を *in vitro* で再現するためには、運動神経と筋細胞の数

週間にわたる長期共培養が必須だと考えられる。そこで、運動神経と C2C12 細胞由来筋管細胞の共培養条件を検討し、シナプスの形成を伴う長期共培養法を確立する。

(3) 光子-電子相関顕微鏡法のための分子標識法の確立

光学顕微鏡と電子顕微鏡で特定のタンパク質の相関観察を行うためには、それぞれで観察可能な標識をタンパク質に施す必要がある。そこで、メタロチオネイン (MT) をタグとして開発した遺伝的コード化標識法を改良し、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方で検出可能な遺伝的コード化標識法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 筋管細胞培養

C2C12 細胞 (ATCC) をグリッドと番号の刻まれたカバーガラス (松浪硝子) 上で 100% コンフルエントになるまで 10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地 (DMEM) 培地で培養した後、5% のウマ血清を含む DMEM に交換し、4 日間培養した。アグリン (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、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM) で細胞を観察する前日に、ラミニン (Sigma) は 2 日前に培地に添加した。

(2) 運動神経と筋管の共培養

マウス ES 細胞から形成させた胚様体にレチノイン酸 (Sigma) と smoothend agonist (Cayman chemical) を 5 日間処置し、運動神経に分化誘導した。ゼラチンコート上、またはコラーゲンゲル (新田ゼラチン) 上で培養した C2C12 筋管細胞の上に、マウス ES 細胞から分化誘導した運動神経をマウントし、約 1 ヶ月間に渡り共培養の観察を行った。共培養には Neurobasal[®] Medium (NBM; Thermo Fisher Scientific)、DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12; Sigma)、または両者を等量混合したものを主成分とする培地を用いた。グリア細胞株由来神経栄養因子 (Wako) と毛様体神経栄養因子 (Wako) は共培養開始 1 日後からそれぞれ 20ng/mL、10ng/mL となるよう培地に添加した。共培養 4 週間目に nAChR を CF[™]488A 結合 α ブンガロトキシン (α -BTX) (Biotium) で染色した後、シナプス前部のマーカーであるシナプトフィジンを蛍光免疫染色した。両者の共染色を指標に神経筋シナプスの形成を評価した。

(3) nAChR と MuSK の標識

細胞内動態を調べる実験では、LSM で観察する前日に、一次反応液として抗 nAChR 抗体ラット Fab (Developmental Studies Hybridoma Bank at Iowa University) と抗 MuSK 抗体マウス Fab (東京都健康長寿医療センター研究所・重本和宏博士提供) を含む培地で 1 時間インキュベートし、洗浄した後、

二次反応液として 5nm の金ナノ粒子結合抗ラット IgG 抗体 (Cytodiagnosics)、および 10nm の金ナノ粒子結合抗マウス IgG 抗体 (BB International) を含む培地で 1 時間インキュベートした。洗浄後、アグリンを添加して一晚培養した後、2% パラホルムアルデヒドで固定してから、Alexa488 結合 α -BTX (Thermo Fisher Scientific) で nAChR の染色を行った。

細胞表面のクラスター中の分子局在を調べる実験では、LSM で観察する日に一次反応液として抗 nAChR 抗体ラット Fab と抗 MuSK 抗体マウス Fab を含む培地で 1 時間インキュベートし、洗浄した後、二次反応液として 5nm の金ナノ粒子結合抗ラット IgG 抗体 (Abcam)、および 10nm の金ナノ粒子と Alexa488 結合抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) および Alexa555 結合 α -BTX (Thermo Fisher Scientific) を含む培地で 1 時間インキュベートした。

(4) MT-EC20 融合 MBP の発現

MT-EC20 融合 MBP 発現プラスミドをトランスフォームされた大腸菌を LB 培地で 37°C で培養し、OD₆₀₀ が 1.0 になったら、0.5mM のイソプロピルチオガラクトピラノシドを添加し、30 分後に 1mM の塩化カドミウムと亜セレン酸ナトリウムを添加し一晚培養を続けた。

(5) 電子顕微鏡観察用試料調製

細胞内動態の観察、分子標識法の検討実験では、LSM で細胞を観察後、2.5% グルタルアルデヒド、2% 四酸化オスミウムでそれぞれ 1 時間固定した後、エタノールの希釈系列を用いて脱水した。大腸菌は、高圧凍結した後、2% 四酸化オスミウムを含むアセトンで凍結置換することによって脱水した。脱水した試料をエポン 812 を用いて樹脂包埋し、ウルトラミクロトーム (ライカマイクロシステムズ) を用いて 500nm 厚または 70nm 厚の切片を作製した。500nm 厚の切片はカバーガラスに、70nm 厚の切片はグリッドに拾い、酢酸ウラニルとクエン酸鉛を用いて染色した。カバーガラスは SEM の観察用試料台にカーボンペーストで貼り付け、イオンスパッタリングにより白金コーティングを行った。

クラスター内の分子局在を調べる実験では、細胞をエタノールを用いた脱水後、*t*-ブチルアルコールへ置換し、凍結乾燥を行った。

(6) 観察

LSM510 (カールツァイス) を用いて蛍光観察を行った後、JSM6701F (日本電子) を用いてより詳細な細胞の観察を行った。細胞の形態観察には主に二次電子検出器を利用し、金ナノ粒子の観察には反射電子検出器を利用した。

4. 研究成果

(1) nAChR クラスター形成に関わる nAChR と

MuSK の分子メカニズムの解明

① nAChR クラスター形成に関わる nAChR と MuSK の細胞内動態の解明

筋管細胞表面に発現している nAChR と MuSK をそれぞれ大きさの異なる金ナノ粒子の結合した抗体で標識した後、アグリンを培地に添加して一晩 nAChR を成熟させ、さらに蛍光リガンドを用いて細胞表面の nAChR を標識した。LSM で細胞を観察したところ、多数の nAChR クラスターが細胞表面に形成されていることが確認できたので、樹脂包埋を行って準超薄切片を作製し、nAChR クラスターが観察された細胞を SEM で探した。図 1a で示したように、カバーガラスに刻まれたグリッドと番号をもとに、LSM と SEM で、同一の細胞と nAChR クラスターの位置を合わせることができた。nAChR の蛍光が観察された部位近傍を SEM で倍率を上げて観察すると、図 1b-d のように、エンドサイトーシスされた nAChR と MuSK 由来の金粒子を含む小胞が細胞質中

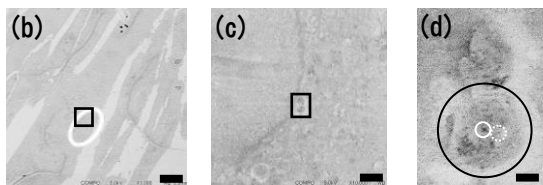
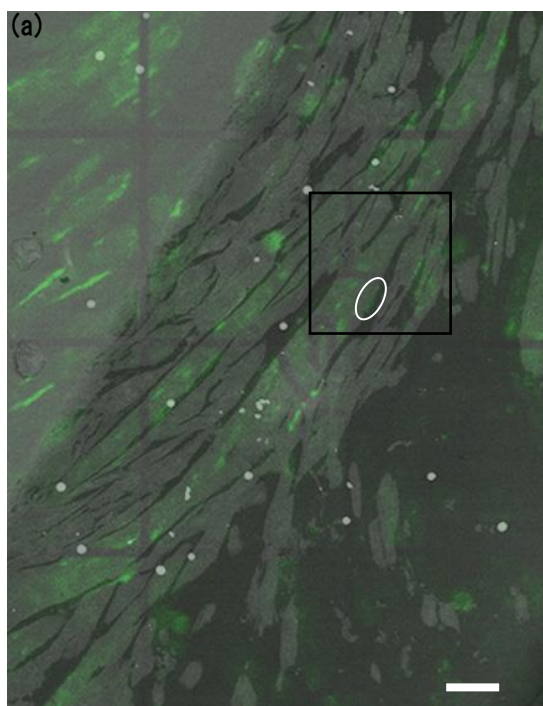


図1 LSM と SEM による相関顕微鏡法を用いた nAChR クラスター成熟時の分子動態観察

(a) LSM と SEM の画像を重ね合わせた像。緑色は細胞表面の nAChR の局在を示す。SEM で観察したクラスター部分を白線で囲った。スケールバー=20 μm 。

(b)(a)の四角の SEM による拡大像。クラスター部分を白線で囲った。スケールバー=10 μm 。

(c)(b)の四角の拡大像。スケールバー=1 μm 。

(d)(c)の四角の拡大像。スケールバー=200nm。白実線丸は MuSK、白点線丸は nAChR 由来の金ナノ粒子を示す。エンドサイトーシス小胞を黒線で囲った。

でいくつも観察された。多くの小胞では nAChR と MuSK の両方が含まれていた。

アグリンを添加すると数十 μm の大きな nAChR クラスターだけでなく数 μm の小さなクラスターも増加する。そこで、nAChR クラスターの大きさを LSM 観察像から測定し、クラスターの大きさごとに、エンドサイトーシスされた nAChR および MuSK を含む小胞の位置を調べた。その結果、全長 10 μm 以上の大きな nAChR クラスターでは、クラスターが局在している細胞膜から 8 μm 以内で多くのエンドサイトーシスされた nAChR および MuSK を含む小胞が存在していた一方、全長 10 μm 以下のクラスターでは、細胞膜から 16 μm 程度の距離までエンドサイトーシスされた nAChR および MuSK を含む小胞が広がっていた。

アグリンによる筋管細胞膜上での nAChR クラスターの成熟は一過的であり、いったん大きな成熟クラスターとなった後、数時間でクラスターの崩壊が生じることから、観察された 10 μm 以下の nAChR クラスターは崩壊が始まったクラスターである可能性が高いと考えられる。クラスター成熟時には、いったん細胞内にエンドサイトーシスされてプールされていた nAChR や MuSK が活発に細胞膜へリサイクリングされるために細胞膜近くに集まるが、クラスターが崩壊するに従って nAChR や MuSK を含む小胞は細胞膜から遠ざかる可能性があることが示唆された。

② アグリンおよびラミニン依存的成熟 nAChR クラスター内における分子局在の解明

アグリンまたはラミニン依存的に筋管細胞で nAChR クラスターを成熟させ、LSM と SEM を用いた相関観察を行ってクラスターの全体像とクラスター内の分子局在を 2 つの成熟経路で比較した。LSM を用いた観察の結果、ラミニン依存的なクラスターはアグリン依存的なクラスターより小さい傾向にあった。また、LSM で観察された蛍光部分の細胞表面を SEM で観察したところ、図 2 で示したように、アグリン依存的なクラスターでは nAChR と MuSK がクラスター内でいくつもの小さな集積を形成していたのに対して、ラミニン依存的なクラスターではネットワーク状に分散しているエリアが多く観察された。MuSK を介してシグナルが伝達されると考えられているアグリンに対して、ラミニンはジストログリカンを介したシグナル伝達機構に関わっていると考えられている。本来生体内では両者が存在しているが、クラスター成熟時に nAChR を集める経路が両者で異なっていること支持する結果となった。

また、アグリンもラミニンも添加しない状態で形成された初期発生型クラスター内では nAChR と MuSK の両方を含む小さな集積が多く形成されていたのに対し、成熟クラスターではアグリン依存的、ラミニン依存的ともにクラスター内で MuSK 単独の小さな集積がしばしば観察された。MuSK はアグリンによ

で活性化することが知られているが、ラミニンの経路でもクラスター成熟に伴って MuSK の分子局在に変化が見られたことから、ラミニンによるクラスター成熟経路にも MuSK が関与している可能性が示唆された。

本研究により、初期発生型クラスターでは nAChR 分子と MuSK 分子が近接して小さな集積を形成し、両者は同じエンドソームに取り込まれて成熟クラスター部位へ運ばれた後、MuSK が nAChR から解離するという nAChR クラスター形成に関わる新たな分子メカニズムを提唱することができた。今後、クラスターを構成する他の分子についても同様の検討を行うことにより、クラスター形成機構の全貌解明につながると考えている。

また、LSM と SEM を用いて相関観察を行った結果、SEM で観察するためには細胞を乾燥させる必要があるが、乾燥によって細胞が収縮し、相関観察が困難な部位が生じることも明らかになった。そこで、LSM で観察したカバーガラスを急速凍結し、低温下でクライオ

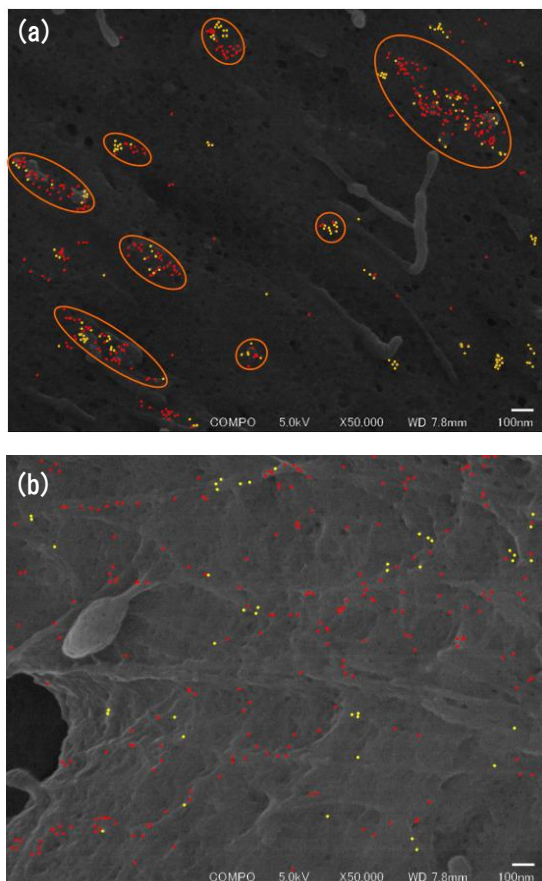


図 2 LSM と SEM による相関顕微鏡法を用いた成熟 nAChR クラスター内の分子局在観察

(a) アグリン依存的成熟クラスター内での nAChR と MuSK の分子局在

(b) ラミニン依存的成熟クラスター内での nAChR と MuSK の分子局在

赤色は nAChR 分子、黄色は MuSK 分子を示し、クラスター内に存在する小さな集積をオレンジ色で囲った。

SEM による観察を行い、LSM で観察した細胞をクライオ SEM で同定できることについても確認することができた。クライオ SEM で観察することによって、今後、乾燥によるアーティファクトのない生きていたときに近い状態での分子局在の解析が実現可能である。

(2) プレシナプスを含む培養 NMJ シナプスモデルの確立

マウス ES 細胞から分化させた運動神経と C2C12 細胞から分化させた筋管細胞を用いて成熟シナプスモデルを作製するために、長期共培養法の検討を行った。ゼラチンコート上で培養した筋管細胞に運動神経をマウントすると、翌日には筋管細胞が剥離し、共培養を維持することができなかった。一方、筋管細胞の基盤にコラーゲンゲルを用いることにより、4 週間の共培養の維持に成功した。NBM、DMEM/F12 および混合培地について検討した結果、NBM を用いた共培養において、運動神経細胞からの突起の顕著な発達が認められた。また NBM の成分が多いほど、運動神経細胞付近での筋管細胞の収縮が多く認められた。共培養 3~4 週目において、シナプ

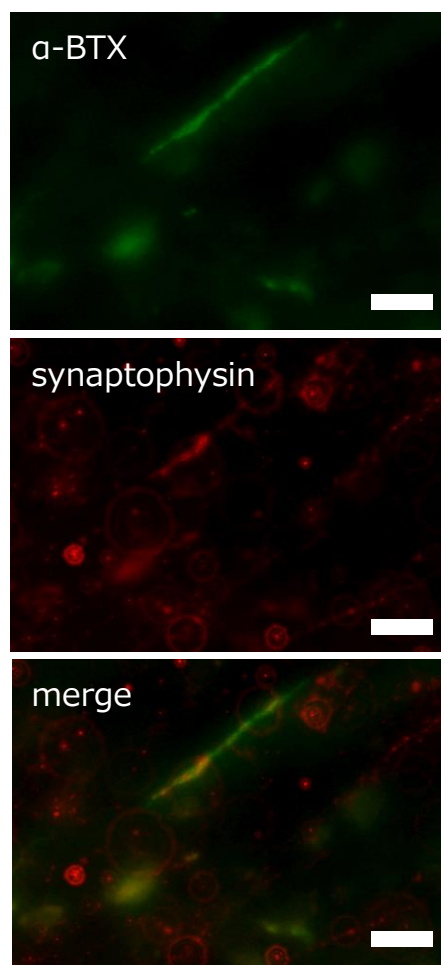


図 3 C2C12 細胞とマウス ES 細胞由来運動神経の共培養により形成された神経筋シナプス

共培養 4 週目の細胞の nAChR を CFTM488A 結合 α -BTX で染色し、synaptophysin を蛍光免疫染色した。両者の共存が認められた(merge)。

ス前部と nAChR クラスターの共存が認められ、図 3 のように神経筋シナプスの形成を確認することができた。長期共培養の実現により、従来の培養 NMJ モデルより成熟した NMJ が再現できている可能性が高く、今後、この培養系を用いることによって飛躍的な NMJ 研究の進展が期待される。

(3) 光子-電子相関顕微鏡法のための分子標識法の確立

クラスター構成分子を光学顕微鏡および電子顕微鏡の両方で観察するためのタグとして、金属結合タンパク質である MT、フィトケラチンの α アミノ酸アナログである EC20、およびこれらを融合した MT-EC20 について光学顕微鏡と電子顕微鏡での検出の可能性について検討を行った。それぞれのタグをマルトース結合タンパク質 (MBP) 遺伝子に融合し大腸菌に導入した。カドミウムイオンおよび亜セレン酸イオン存在下で融合タンパク質を発現させたところ、図 4 のように、MBP-MT-EC20 を発現している大腸菌で CdSe 量子ドットに由来する蛍光を検出することができた。さらに電子顕微鏡観察によって、大腸菌のペリプラズム間隙で CdSe 量子ドット様構造物の存在を確認することができた。これは今までにはなかった、生きた細胞中で標識操作が完了する光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方で検出可能な遺伝的コード化標識法であり、この標識法は光子-電子相関顕微鏡法において種々のタンパク質の標識として広く適用されることが期待できる。

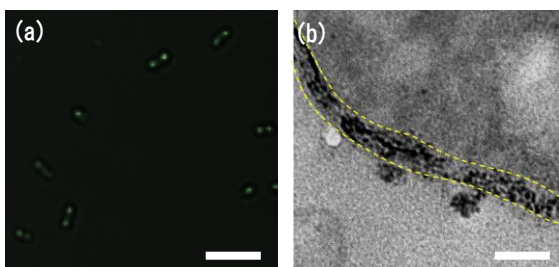


図 4 LSM、TEM を用いた MT-EC20 標識の検出
(a) LSM で観察した MT-EC20-MBP 発現大腸菌
スケールバー=5 μ m。
(b) TEM で観察した MT-EC20-MBP
ペリプラズム間隙を黄色点線で囲った。
スケールバー=50nm。

〈引用文献〉

- ① Hans R. Brennerl, Mohammed Akaaboune, Recycling of Acetylcholine Receptors at Ectopic Postsynaptic Clusters Induced by Exogenous Agrin in Living Rats, *Dev Biol.*, 394, 2014, 122-128
- ② Gareth B. Miles, Damien C. Yohn, Hynek Wichterle, Thomas M. Jessell, Victor F. Rafuse and Robert M. Brownstone, Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells, *J. Neurosci.*, 24, 2004,

7848-7858

- ③ Yuko Fukunaga, Ai Hirase, Hyeji Kim, Natsuko Wada, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa, Electron microscopic analysis of a fusion protein of postsynaptic density-95 and metallothionein in cultured hippocampal neurons, *Microscopy*, 56, 2007, 119-129

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

- ① 野間有加里, 西野有里, 宮澤淳夫, 相関顕微鏡法を用いた nAChR クラスターの分子局在解析, 第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会, 2017 年 5 月 30 日~6 月 1 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ② 西野有里, 宮澤淳夫, クライオ SEM で見える新しい世界, 日本顕微鏡学会第 27 回サマースクール 2016, 2016 年 7 月 29 日~31 日, 京都大学物質-細胞統合システム拠点 (京都府・京都市)
- ③ Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Atsuo Miyazawa, Observation method of cross-sectioned cells by cryo-electron microscopy, 18th International Microscopy Congress, 2014 年 9 月 7 日~12 日, プラハ (チェコ共和国)
- ④ 西野有里, 伊藤喜子, 宮澤淳夫, Cryo SEM を用いた新たな組織・細胞観察法, 日本顕微鏡学会第 25 回電顕サマースクール 2014, 2014 年 7 月 25 日~27 日, 久留米大学 (福岡県・久留米市)
- ⑤ 西野有里, 狩谷祐輔, 宮澤淳夫, 光子・電子相関顕微鏡法を利用したアセチルコリン受容体クラスターの分子局在解析, 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会, 2014 年 5 月 11 日~13 日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市)

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

(2) 研究分担者

福永優子 (FUKUNAGA, Yuko)
千葉科学大学・危機管理学部・准教授
研究者番号: 80254522

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし