

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」
研究課題「ナノ形態解析によるシナプス動態制御
システムの解明」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者：岡部 繁男
(東京大学大学院医学系研究科、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

シナプスは軸索(シナプス前部)と樹状突起(シナプス後部)の間の一種の接着構造であり、興奮性シナプスの樹状突起側にはスパインとよばれる数ミクロン程度の大きさの突起が存在する。スパイン内のシナプス接着部位にはシナプス後肥厚部(postsynaptic density: PSD)と呼ばれる構造が形成され伝達物質受容体を集積する。大脳皮質のスパインシナプスの安定性と可変性を理解するには、第一にスパインシナプスの形態と分子動態を正確に測定する方法論、第二に得られた定量的なデータを利用して形態と分子動態を説明するモデルが必要である。しかしながら従来はナノスケールの解像が不可能であり、スパインシナプス局所での分子の動きも計測できなかった。近年様々な超解像顕微鏡技術が発展し、また1分子追跡技術が大きく進歩したため、スパインシナプスの形態や分子動態の精密測定が可能となった。本研究ではスパインシナプスの形態と分子動態を正確に測定する方法論を開発し、それらの技術を実際の標本に適用することで、これまで知られていなかった新しいシナプス安定性・可変性に関する知見を得ることが出来た。具体的には以下の三項目についてそれぞれ大きな成果があった。

(1) 個体レベルでシナプスの動的な変化とそのナノスケールでの形態の特徴を明らかにするため、in vivo 二光子イメージングにより大脳皮質のスパインシナプスを可視化しその動的な形態変化を記述した後同一のシナプスについて超解像顕微鏡を用いた解析を行った。組織内での構造を高精細かつ自動的に解析する手法の開発にも成功した(*eLIFE* 2019)。安定あるいは動的なスパインシナプスに特徴的な形態のパラメーターの抽出が新しく開発された手法により可能となった。

(2) 培養神経細胞においてナノスケールでの分子イメージング、1分子追跡、スパイン形態のナノメートル計測を行い、膜分子や細胞質分子のスパイン内部での移動・スパインへの出入りと形態に関連したパラメーターを統合して解析することが可能となった(*Nat. Comm.* 2019)。膜分子の動態に関しては、一分子の動態を90秒もの長時間追跡することを可能とする方法論が開発された(*Nat. Chem. Biol.* 2018)。スパインシナプスの形態をナノスケールで精密に測定することで、スパイン頭部の凹みがシナプス前部との膜の接着部位に対応していること、この凹みが顕著なスパインはより安定な動態を示すこと、一方でスパイン体積はより大きく変動し、形態学的な可塑性を有することが明らかになった(*Nat. Comm.* 2019)。シナプス前部による動態制御機構についての解析も進展した(*Cell Rep.* 2018)。

(3) スパインシナプスの形態と分子動態の関連を、分子動態モデルを用いたシミュレーションにより評価した。シミュレーションにより、スパイン頭部内での分子動態を蛍光分子相関法(FCS)で測定した結果とスパイン頭部内のアクチン線維の密度および分布から分子動態を理論的に推定した結果の比較が可能となり、FCSの測定結果からスパイン内部に存在するアクチン線維の性質を推定できる様になった(*Cell Rep.* 2019)。また培養細胞系での実験により得られたスパイン頭部の形態と分子動態の関係性について、数理的手法によってスパインシナプスを制御する形態と分子動態のパラメーターを明らかにすることが可能になった。

これら三項目の研究の推進に伴いグループ間での連携も進み、岡部グループでのスパイン形態のナノスケール解析技術で得られたデータを、井上グループの実施したスパイン内部の細胞質に存在する拡散障壁の推定手法と組み合わせることで、スパインの形態、スパイン細胞質内での分子動態、細胞骨格のシナプス可塑性に伴う再編成という三つの現象を統合的に理解できる様になった。またスパイン頭部の細胞膜の曲率に依存して膜蛋白質の動態が変化する、という現象のモデル化においては、楠見グループの実施した膜蛋白質の一分子観察、岡部グループのスパイン表面形態のイメージング、井上グループの膜分子動態の数理解析の三つを組み合わせた研究が実現できた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:

シナプスナノ形態の定量的解析手法の開発: これまではスパインシナプスの形態を光学顕微鏡で電子顕微鏡画像との対応付けができる形で取得することは困難だったが、3次元の構造化照明法と自動画像処理技術を活用することで可能となった。更に機械学習の方法を導入することで、これまで主観的に行われていたスパイン形態の分類をより客観的かつ効率良く実施することが可能となった。またこの手法が生細胞でのスパイン動態の解析にも有効であることを示した (2019 Nat. Comm.)。

2.

概要:

スパインシナプス頭部の細胞質での分子動態を直接測定する手法はこれまで存在しなかった。蛍光消退回復法などの手法はスパイン頭部とシャフト内での分子の移動しやすさを測定することは出来るが、スパイン頭部局所の分子動態にはアクセスできない。この状況を打破するために、蛍光相関分光法などの手法を用いてスパイン内部の分子動態を直接測定する方法を開発し、シナプス可塑性の直後にアクチン細胞骨格の再編成により短時間のみスパイン内の分子拡散速度が上昇することを明らかにした (2019 Cell Rep.)

3.

概要:

超長時間 1 蛍光分子追跡法の開発: これまでは、1 蛍光分子を、位置決定精度 25nm 程度の条件下で追跡できる時間は、せいぜい 10 秒程度で、しかも頻繁に点滅することが多く、これが AMPA 受容体などの分子のスパインへの出入りや、スパイン内部での挙動を追跡する大きな障害となっていた。これを大幅に改善する方法を開発し、寿命 90 秒、最長で 7 分間程度、1 分子を追跡し続ける (褪色と点滅を防ぐ) ことができるようになった (2018 Nat. Chem. Biol.)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要:

構造化照明法を用いて取得したスパインシナプスの画像を元にして、スパインの形状を定量的に記述し、形態に関するパラメーターを用いてシナプスの分類や特徴抽出を自動的に行うプログラムの商品化を企業との共同研究として実施し、ソフトウェアの商品化が 2019 年 7 月に実現した。

<代表的な論文>

Kashiwagi, Y., Higashi, T., Obashi, K., Sato, Y., Komiyama, N., Grant, S. G. N. and S. Okabe. Computational geometry analysis of dendritic spines by structured illumination microscopy. Nature Communications 2019, 10, 1285. doi: 10.1038/s41467-019-09337-0.

Obashi, K., Matsuda, A., Inoue, Y., and S. Okabe. Precise temporal regulation of molecular diffusion within dendritic spines by actin polymers during structural plasticity. Cell Reports 2019, 27, 1503-1515.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.006.

T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. Nat. Chem. Biol. 2018, 14, 497-506. doi: 10.1038/s41589-018-0032-5.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 岡部グループ

研究代表者: 岡部 繁男 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

研究項目

- ・In vivo 二光子イメージングによる脳内シナプスの動態測定
- ・In vivo 二光子イメージングによる脳内シナプスのナノ形態解析
- ・培養神経細胞でのナノスケールスパイン形態測定
- ・培養神経細胞でのナノスケール分子動態イメージング

② 楠見グループ

主たる共同研究者: 楠見 明弘 (沖縄科学技術大学院大学 教授)

研究項目: 一分子追跡法によるシナプス膜分子の動態解析

- ・AMPA 受容体の蛍光ラベル法の開発
- ・ラフト分配機能を維持したままでの蛍光ガングリオシド分子の開発
- ・ラフト分配機能を維持したままでの蛍光スフィンゴミエリンの開発
- ・超長時間 1 蛍光分子追跡法の開発
- ・1 分子追跡と 1 分子局在化顕微鏡法の超高速化法の開発
- ・神経細胞の主要な glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型受容体である Thy1 と PrP の細胞膜上での挙動解明
- ・AMPA 受容体のテトラマーの動的形成と分解の解明
- ・AMPA 受容体のシナプスへの集合機構の解明

③ 井上グループ

主たる共同研究者: 井上 康博 (京都大学大学院工学研究科 教授)

研究項目: 数理モデリングによるシナプス動態解析

- ・スパイン内分子拡散動態シミュレーション手法の開発
- ・スパイン表面上分子拡散動態シミュレーション手法の開発
- ・蛍光相関分光法 (FCS) シミュレーション手法の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

以下に記述する様に、国内、国外の研究者との連携、ネットワーク形成が CREST 研究実施中に格段に進展した。

(岡部 G)

国外連携: スパインシナプス形態の超解像イメージングについては、英国 Edinburgh 大学の Seth. G. N. Grant 博士の研究グループとの共同研究であり、今後もこの連携は発展すると考えている。またスパインシナプス形態の超解像イメージングにおいて開発したプログラムについて韓国の Seoul National Univeristy の Sunghoe Chang 博士から共同研究の依頼があり、連携を開始している。

国内連携: 電子顕微鏡解析技術について、順天堂大学の日置寛之博士、東京大学工学部の平林祐介博士との連携が進んでいる。培養細胞でのシナプス解析については神戸大学の高井義美博士との連携を実施中である。In vivo imaging に関しては慈恵医科大学の渡部文子博士、東京大学医学部の饗場篤博士、東海大学工学部の岡村陽介博士との共同研究が進行中である。

企業連携: スパインシナプス形態の評価を創薬に応用する可能性については、武田薬品工業との共同研究を実施しており、今後も連携を継続する予定である。

(井上 G) 米国 Purdue 大学 Kim Taeyoon 博士 (Assistant Professor) と、アクチン細胞骨格構造のより詳細な数理モデル化について連携している。