

研究終了報告書

「非平衡統計力学に基づく軸索輸送動画解析の医療応用」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：林久美子

1. 研究のねらい

神経細胞では核のある細胞体とシナプスのある末端が長い軸索を介してつながっており、細胞体と末端間の適切な物質輸送は神経活動の恒常性に重要である。キネシンとダイニンというタンパク質分子モーターがこの物質輸送を担っている。細胞体で合成した物質を末端まで輸送する順行性輸送をキネシンが、末端に蓄積した不要物を細胞体に送り返す/末端から取り込まれた物質を細胞体に送る逆行性輸送をダイニンが行う。対象に蛍光ラベルを付加することで蛍光顕微鏡観察を用いて神経細胞軸索輸送を観察することができる。分子モーターの輸送力や輸送を担う分子数は軸索輸送活性を定量する物理パラメータであるが、複雑な非平衡環境にある細胞内では物理計測が困難であるため、これまで計測できなかった。

非平衡統計力学は電流、熱伝導、拡散現象などの非平衡状態にある輸送現象を扱う学問であるが、私たちは神経細胞軸索輸送という生体内輸送に非平衡統計力学を応用することを考えた。揺らぎの定理をはじめとし、非平衡統計力学にはエネルギーや力と物理量の揺らぎを関係付ける関係式群が多くある。私たちはそのような関係式を利用し、蛍光顕微鏡観察で得られた軸索輸送動画を解析し、輸送のタイムコースデータの揺らぎから、これまで計測できなかった軸索輸送活性を定量する物理パラメータ(輸送力や輸送を担う分子数)を計測することを目指した(非侵襲力測定法 特許 6889884号)。

神経細胞軸索輸送の障害は、物質供給の過不足を引き起こし、神経疾患との深い関係が示唆されている。本研究開発では非平衡統計力学に基づく非侵襲力測定法を神経疾患メカニズムの解明に利用することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究開発では神経細胞軸索輸送の中でもKIF1A(キネシンの一種)によるシナプス小胞前駆体輸送を計測対象とした。シナプスの材料であるシナプス小胞前駆体はベシクル(袋状の膜)に内包されて輸送される(図1)。マウス神経細胞と線虫神経細胞において、蛍光顕微鏡を用いてKIF1A野生型が担うベシクル輸送を観察した。ベシクル輸送の蛍光顕微鏡動画を非侵襲力測定法を用いて解析した結果、軸索輸送活性を定量する物理パラメータ(輸送力や輸送を担う分子数)の計測に成功した。複雑な非平衡環境にある細胞内では物理計測が困難であるため、これらの物理パラメータはこれまで計測できなかった。

次に、KAND(KIF1A Associated Neuronal Disorder)の一種である遺伝性痙性対麻痺を対象とし、麻痺の原因であるKIF1A変異体によるベシクル輸送を観察した。蛍光顕微鏡動画を非侵襲力測定法を用いて解析し、疾患が及ぼす軸索輸送活性を定量する物理パラメータの変化を捉えることに成功した。KIF1A変異体によるベシクル輸送で輸送力低下と分子数増加を検出することができた。軸索輸送活性を定量する物理パラメータの変化が、軸索内シナプス形成異常を引き起こすと考えられる。非侵襲力測定法は新しい物理量の計測を可能にし、神経疾患の分子メカニズムを調べるツールとして有用であることを遺伝性痙性対麻痺の例で示すことが出来た。

なお、現在、軸索輸送活性を定量する物理パラメータの変化と疾患で生じる軸索内シナプス形成異常の関係を明らかにするため、神経細胞軸索輸送の非平衡確率過程モデルのシミュレーションに取り組んでいる。ベイズ推定を用いて物理パラメータの変化からシナプス形成パターンを予測することが将来の目標であり、KANDの分子メカニズム解明に重要だと考えている。

数百個の蛍光顕微鏡動画に非侵襲力測定法を効率よく応用するため、解析ソフトウェアを作製しGitHubに公開した(非侵襲力測定法 特許 6889884号)。

(2) 詳細

(研究成果)

◇ 研究テーマ「非侵襲力測定法のソフトウェア開発」

非侵襲力測定法の原理を以下に述べる。軸索輸送の蛍光顕微鏡動画から自作のソフトウェアを用いてベシクルの重心位置のタイムコースデータ $X(t)$ を得る(図1)。定速データ区間においてその位置揺らぎ $\Delta X = X(t + \Delta t) - X(t)$ を計算する。分布 $P(\Delta X)$ を計算し、

$$\text{力の指標 } \chi = \ln [P(\Delta X)/P(-\Delta X)]/\Delta X$$

を計算する。 χ を100個程度のベシクルのタイムコースデータについて χ を計算すると、 χ が離散的でありクラスター化されることが分かる(図2)。これまでの研究[Mol Biol Cell 2018(代表的な論文1);Sci Rep 2019(代表的な論文2);Biophys J 2021(代表的な論文3)]から χ はベシクルに働く輸送力に比例することが示唆され、 χ の離散性は1つのベシクルを輸送するKIF1A分子数に起因すると考えられる。

非侵襲力測定法について特許登録がなされ(特許 6889884号)数百個の蛍光顕微鏡動画に非侵襲力測定法を効率よく応用するため、解析ソフトウェアを作製しGitHubに公開した。

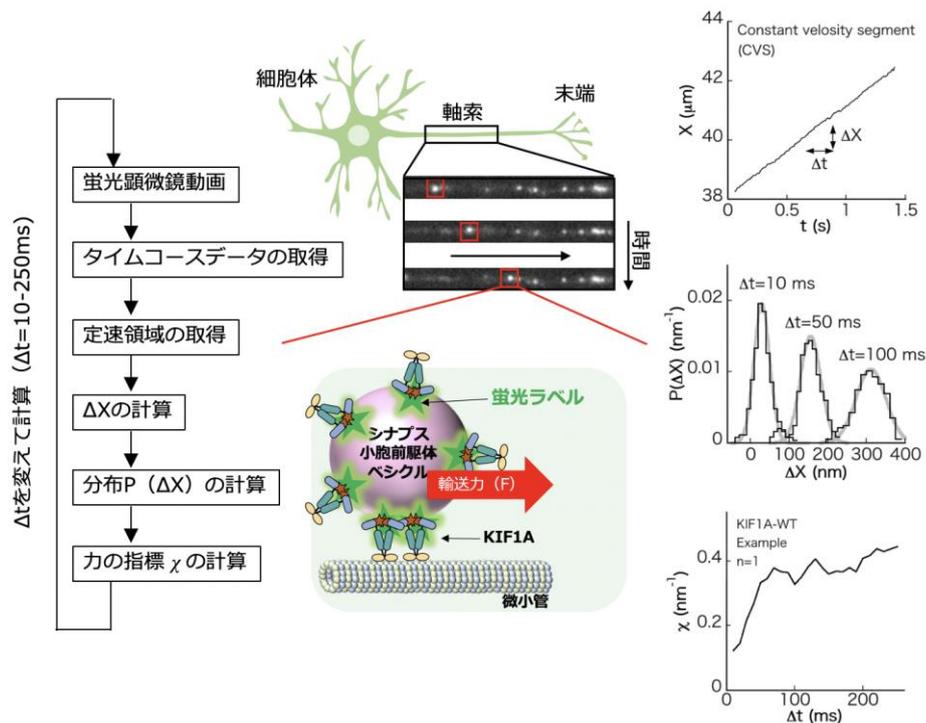


図1 非侵襲力測定法の原理(特許 6889884 号)

◇ 研究テーマ「KIF1A 野生型によるシナプス小胞前駆体輸送への非侵襲力測定法の応用」

遺伝性痲痺性対麻痺の原因であるヒト KIF1A 変異体へ応用する前に、まずはマウスの神経細胞に野生型ヒト KIF1A を導入してベシクル輸送を調べた(図2 bioRxiv 2021) (KIF1A 遺伝子は東北大学学際科学フロンティア研究所 丹羽伸介准教授の提供)。99 個のベシクルのタイムコースデータについて χ を計算するとクラスター化されることが分かった。Affinity Propagation や Boot-Strapping 法から7個のクラスターが同定された。

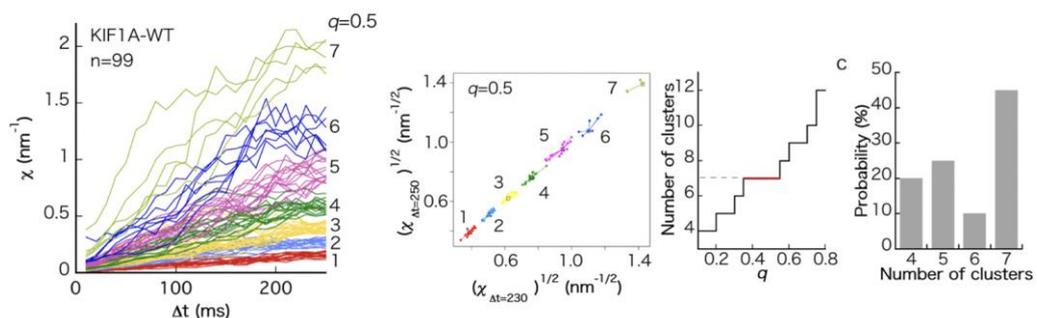


図2 シナプス小胞前駆体輸送(野生型)への非侵襲力測定法の応用

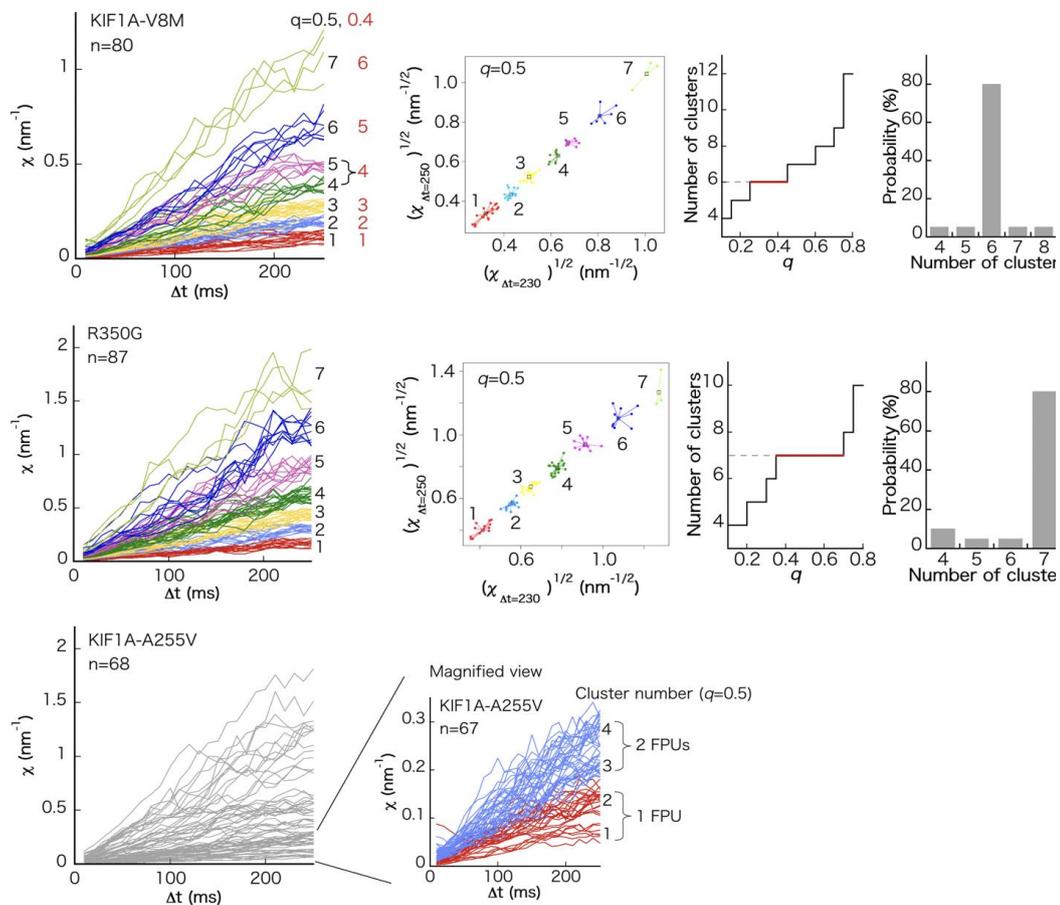


図3 遺伝性痙性対麻痺を引き起こすシナプス小胞前駆体輸送(変異型)への非侵襲力測定法の応用 (bioRxiv 2021)

遺伝性痙性対麻痺の原因であるヒト KIF1A 変異体 (KIF1A-R350G、KIF1A-V8M、KIF1A-A255V) について調べた結果が図3である (bioRxiv 2021)。野生型と同様に 100 個程度のベシクルのタイムコースデータについて χ を計算し、KIF1A-R350G、KIF1A-V8M では Affinity Propagation や Boot-Strapping 法から7個のクラスターが同定された。ただし、KIF1A-A255V ではノイズが多くクラスター分類が困難であった。

上記の KIF1A 変異体に加えて様々な分子モーターの種類について力の指標 χ を調べ、比較した結果が図4左である。KIF1A-V8M と KIF1A-A255V で KIF1A 野生型と比較して力の低下が観察された。なお、力の指標 χ の値と光ピンセットを用いた分子モーターの力の1分子計測 (海外グループ) の結果をまとめたのが図4右である。力の指標 (χ) と光ピンセットでの力測定の結果は相関が大きく、力の指標 χ の妥当性を高める結果と考えられる。

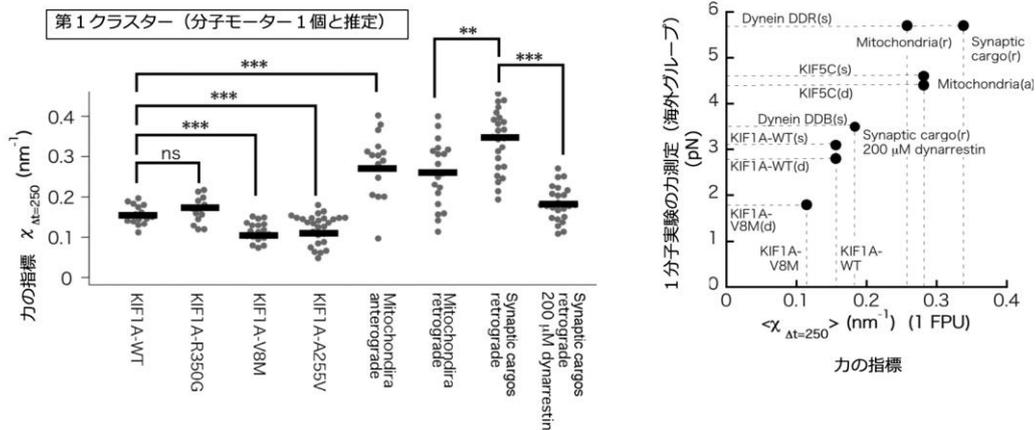


図4 左:野生型と変異型の力の指標(χ)の比較
右:力の指標と1分子計測の力測定の比較

丹羽伸介准教授(東北大学学際科学フロンティア研究所)らの先行研究から KIF1A 変異体は野生型よりもベシクルに結合しやすい活性状態にあると報告されており、当初は KIF1A 変異体によるベシクル輸送で、輸送担う分子数の増加(クラスター数の増加)を予想していた。しかしながら、クラスター数(7個)は野生型と変わらなかった(図3)。これは、マウスの神経細胞内にマウスの KIF1A がある状態でヒト KIF1A 遺伝子を導入したことで、神経細胞内の KIF1A の量が過剰になり、そもそも野生型でも過剰に KIF1A 分子がベシクルに結合してしまったと考えた。

この状況を改善するために、ゲノム編集により KIF1A に変異を加えた線虫を用いて、シナプス小胞前駆体輸送を調べている(線虫は東北大学学際科学フロンティア研究所 丹羽伸介准教授の提供)。

なお、本研究開発では複雑な細胞内環境で細胞骨格やオルガネラとの衝突など、熱ノイズ以外の揺らぎも含めた温度パラメータを非平衡温度(T_{eff})とし、揺らぎの定理を以下の形で修正している [Mol Biol Cell 2018(代表的な論文1);Sci Rep 2019(代表的な論文2);Biophys J 2021(代表的な論文3)]:

$$F = k_B T_{\text{eff}} \cdot \chi$$

細胞内ノイズを表す非平衡温度(T_{eff})は図4右から比例係数として $k_B T_{\text{eff}} = 15k_B T$ を得た。非平衡温度はスピングラスや構造ガラス、駆動粒子系の研究で提唱されてきた概念であるが、ほとんどの非平衡系で $T_{\text{eff}} > T$ であることが特徴である。数理モデルから理論的に $k_B T_{\text{eff}} = 15k_B T$ を示すことが今度の課題である。

◇ 研究テーマ「医療分野へのソフトウェアの普及」

マウスや線虫で取り組んできた神経疾患への非侵襲力測定法の応用を、ヒトiPSニューロンに応用することに取り組んでいる。今後、ヒトiPSニューロン用いて疾患メカニズム解明への非侵襲力測定法の有用性を示し、創薬分野・神経科学分野に普及したい。

◇ 研究目的の達成状況

さきがけ以前は、非侵襲力測定法をマウス神経細胞のエンドソーム輸送や魚類色素細胞のメラニン色素顆粒輸送などに応用し、基礎研究として測定手法の開発を行ってきた。さきがけで初めて遺伝性痙性対麻痺の分子メカニズム解明という医学的な研究テーマを扱い、軸索輸送活性を定量するパラメータ(力や分子数)を計測することが出来た。

医学的なテーマを進める一方で、非侵襲力測定法のソフトウェアの自動化、分類法の改善は遅れをとってしまい、大きな進捗が見られなかった。今後、医学分野へのソフトウェアの普及のために、客観的で容易なデータ処理が必要であるため、機械学習やベイズ推定などを取り入れたデータ解析の改善に取り組みたい。

3. 今後の展開

非侵襲力測定法の医療応用のために、ヒト iPS ニューロンへの応用を目指す。神経変性疾患の分子メカニズム解明へ貢献したい。疾患において、シナプス小胞前駆体輸送の軸索輸送活性を定量する物理パラメータ(分子モーターの力、速度、分子数など)の変化はシナプス形成に重大な影響を及ぼすと考えており、将来は軸索輸送の非平衡確率過程モデル構築のもと、軸索輸送活性を定量する物理パラメータからシナプス形成を予測できる理論の構築を目指す。データ同化シミュレーションで物理パラメータの変化からシナプス形成パターンを予測することが将来の目標(次の5年間)であり、KAND(KIF1A Associated Neuronal Disorder)の分子メカニズム解明に重要だと考えている。

4. 自己評価

研究目的であった非侵襲力測定法の医療応用という点では成果を出すことが出来、今後の方向性も固まったと考えている。KAND(KIF1A Associated Neuronal Disorder)の支援団体である KIF1A.org の Mini Grant に採択され、KAND が非侵襲力測定法ソフトウェアの具体的な応用先になるかもしれない。

医療応用の方向性が固まった一方で、非侵襲力測定法ソフトウェアのアルゴリズムの改訂(分類法や自動化)はほとんど進展がなかった。ソフトウェアの普及に際し、客観的で自動化された解析は絶対不可欠であるので、(理論方面での)今後の課題としたい。また、論文化を目指す過程で、Reviewer から1分子実験を用いた測定法の妥当性の検証を求められており、(実験方面での)今後の課題と考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. *Kumiko Hayashi, Yuta Tsuchizawa, Mitsuhiro Iwaki, Yasushi Okada*
Application of the fluctuation theorem for non-invasive force measurement in living neuronal axons.
Molecular Biology of the Cell 2018, vol 29, 3017-3025

マウス神経細胞の軸索でエンドソーム輸送を調べ、非侵襲力測定法のアルゴリズムを実装した。非侵襲力測定法の結果からキネシンによる順行性輸送、ダイニンによる逆行性輸送共に1-4個程度の分子モーターによって共同輸送されていることが分かった。

2. *Shin Hasegawa, Takashi Sagawa, Kazuho Ikeda, Yasushi Okada, Kumiko Hayashi*
Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit
Scientific Reports 2019, vol 9, 5099

魚類色素細胞のメラニン色素顆粒輸送に非侵襲力測定法を応用した。ホルモン添加によりキネシンを不活性化させ、ダイニンによる逆行性輸送を調べた。その結果メラニン色素顆粒は1-4個程度のダイニンによって共同輸送されていることが分かった。ダイニンの阻害剤シリオブレビンを追加しダイニン数を減少させた際、非侵襲力測定法のクラスター数の減少を確認できた。

3. *Kumiko Hayashi, Miki G. Miyamoto, Shinsuke Niwa*
Effects of dynein inhibitor on the number of motor proteins transporting synaptic cargos
Biophysical Journal 2021, vol 120, 1605-1614

マウス神経細胞のシナプス小胞前駆体輸送に非侵襲力測定法を応用した。その結果シナプス小胞前駆体は1-6個程度の分子モーターによって共同輸送されていることが分かった。ダイニンの阻害剤ダイナアレスチンを追加しダイニン数を減少させた際、逆行性輸送について非侵襲力測定法のクラスター数の減少を確認できた。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

◇ 【国際学会発表(シンポジウム招待講演)】

66th Biophysical Society Annual Meeting 2022, サンフランシスコ

Kumiko Hayashi

“Time course analysis extracts information on intracellular retrograde transport”

◇ 【受賞】

第4回 紫千代萩賞(東北大学優秀女性研究者賞) 2020 年度

◇ 【著作物】

非侵襲力測定法ソフトウェア(力測定方法、力測定装置、力測定システム、力測定プログラム及び記録媒体 特許 6889884 号)

◇ 【報道】 New Scientist

When time runs backwards: What thermodynamics can tell us about life

◇ 【報道】 Research Features

Transport physics reveals the intricacies of cellular transport