

令和 1 年 11 月 29 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860726

氏 名 中畑 義久

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：フロリダ州ジュピター（国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）生体における神経損傷後の細胞内分子活性の時空間ダイナミクスと分子間相互作用の解明
3. 派遣期間：平成 30 年 5 月 1 日 ～ 令和 1 年 10 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
マックスプランクフロリダ研究所 神経シグナル伝達グループ
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

目的

本研究課題は、生体における損傷後神経細胞内の分子活性の時空間的ダイナミクスとそれら分子間の相互作用を明らかにすることを目的としている。

研究実施状況

課題1：複数分子の同時イメージングに向けた新規1分子FRETセンサーの開発

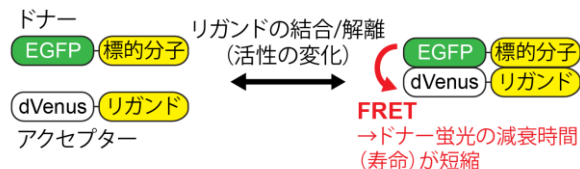
生きた細胞内の複数の分子活性をリアルタイムかつ高い空間分解能で可視化するためには、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の原理を利用した分子活性センサーの利用が有効である。通常、1つのシグナル分子の活性を測定するためには、2つの蛍光分子が使われる（図1）。そのため、2つシグナル分子の同時イメージングには、合計4つの蛍光タンパク質を必要とする（図2）。また、各FRETセンサーのドナーとして、異なる波長の蛍光が用いられる必要がある。そこで、感度が高く、従来用いられてきた緑色FRETセンサー（ドナーとして mEGFP、アクセプターとして dVenus を使用、図2上）と同時に使用できる1分子赤色（橙色）FRETセンサーを開発している（図2下）。本センサーのドナーは、既存の赤蛍光タンパク質 tdTomato に類似した赤色の蛍光スペクトルでありながら、励起スペクトルは緑色タンパク質の EGFP に近い（図2）。そのため、本センサーは、かつて我々が開発した複数の赤色FRETセンサー（Nakahata et al., 2016, *Sci Rep*; Laviv et al., 2016, *Nat Methods*）の課題（すなわち、①赤緑両方の蛍光励起のために複数の波長の光源を必要とする点、②2分子型FRETセンサーに由来する低感度、内在性シグナル阻害などの課題）を解決し、単一の励起波長（490 nm 付近）によって、高速かつ高感度で2つの細胞内分子活性の測定を可能にする。

遂行状況

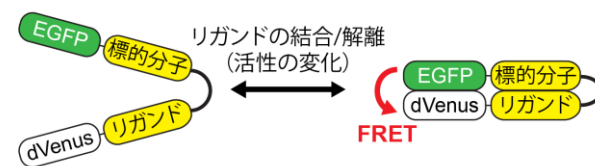
新たに開発した蛍光タンパク質ドナー（未発表）に合わせて、複数のアクセプター候補を選定し、さらに分子センサー内におけるドナーとアクセプターの配置および標的分子の組み合わせを替えた多数のDNAコンストラクトをサブクローニングによって作製した。それらを HeLa 細胞およびマウス脳の培養組織切片に強制発現させ、二光子蛍光寿命顕微鏡下で FRET センサーの発現効率や Ca^{2+} イオノフォア刺激に対する応答感度、応答のキネティクスを検討した。

その結果、従来の高性能緑色 FRET センサーと同等、もしくはより広いダイナミックレンジを示すセンサー候補を同定した（図3）。次に、これら赤色 FRET センサーを既存の緑色 FRET センサーもしくは緑色蛍光カルシウムセンサーである GCaMP6s と共発現させ、複数の細胞内分子ダイナミクスを同時観察できる事を確認した。現在は、これらのセンサーを子宮内電気穿孔法（*in utero* エレクトロポレーション）

2分子FRETセンサー



1分子FRETセンサー



< 1分子センサーの利点 >

- ・シグナルノイズ比が高い(高感度)
- ・内在性シグナル阻害リスクの低減

図1. FRET センサーによる分子活性の計測

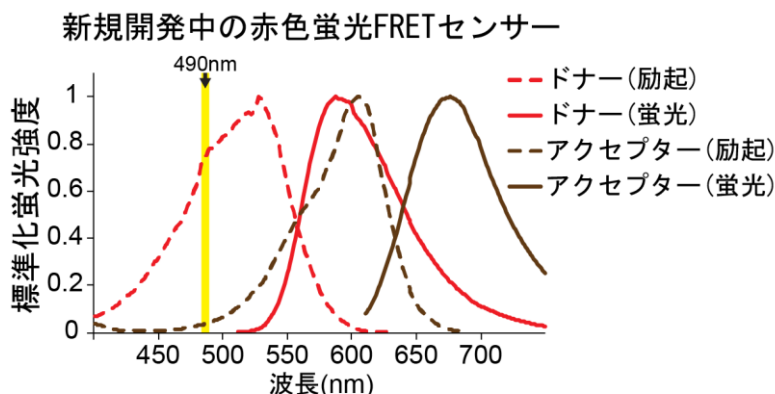
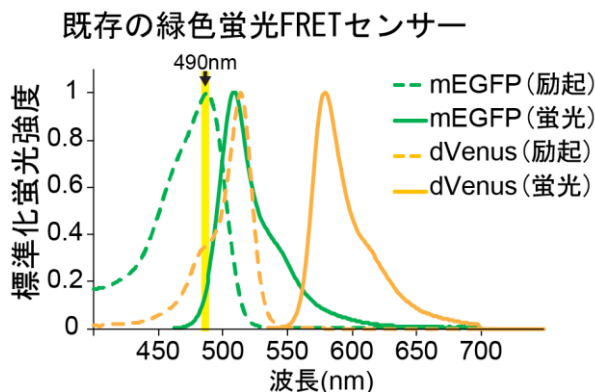


図2. 従来の緑色 FRET センサーと同時励起可能な開発中の赤色 FRET センサーの蛍光スペクトル

ン法) により生体マウス脳に遺伝子導入し、生体脳内において Ca^{2+} 応答と $\text{CaMKII}\alpha$ など複数の分子センサーの同時観察を進めている。

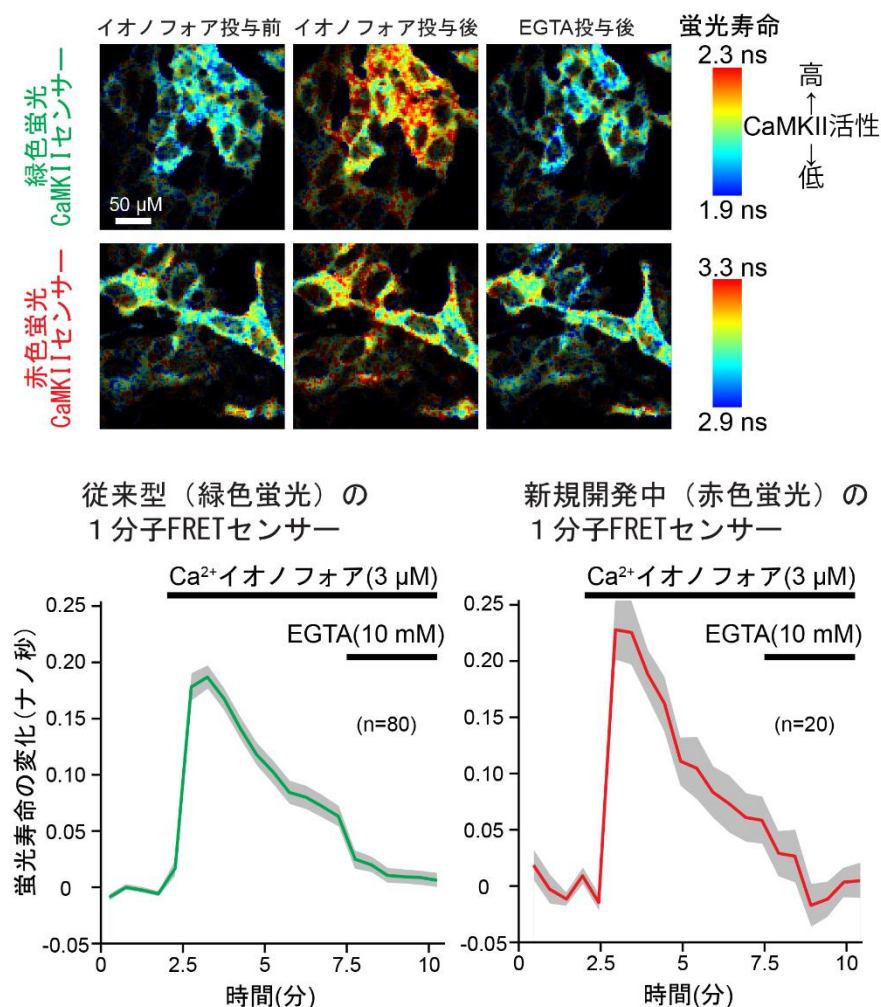


図 3. 新規開発中の赤色 FRET センサーの一例

Ca^{2+} イオノフォア刺激によって HeLa 細胞内に発現した CaMKII 分子の構造が変化し、ドナー (赤色蛍光) 由来の蛍光寿命が長くなった。ドナー由来の蛍光寿命の増減は、 CaMKII の活性化/不活性化を示している。開発中の赤色 FRET センサーは、従来型の緑色 FRET センサーと比較し、同等もしくはより広いダイナミックレンジを示した (未発表)。

課題 2 : 生体マウス脳における細胞内分子活性ダイナミクスの解析

主に *in vitro* 系の先行研究により、PI3K、Akt、MAPK/ERK など、神経損傷後に関わるシグナル分子が同定されてきた (Curcio & Bradke, 2018, *Annu Rev Dev Biol*)。しかし、神経細胞死や軸索再生など、損傷後神経細胞の運命を司る各シグナル分子が、生体の細胞内においてどのような活性ダイナミクスを示し、どのような分子間相互作用によって調整しているのか、という時空間的パターンをリアルタイムで検討することは困難であった。そのため、本課題では、既存および上述の新規 FRET センサーを利用して神経損傷関連分子群の FRET センサーを作製し、生体脳における複数の分子活性を同時に解析する。

遂行状況

現在までに、主に酸化ストレスなどの細胞外刺激によって活性化する分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ MAPK/ERK (Cheung & Slack, 2004, *Sci Signal*) や $\text{CaMKII}\alpha$ を標的とした FRET センサーを用いて実験を進めてきた。具体的には、MAPK/ERK センサーの DNA コンストラクトを子宮内電気穿孔法で野生型マウスの第一次体性感覚野 (S1 領域) に遺伝子導入し、生後 1 ヶ月齢以降に開頭手術を行い、二光子蛍光寿命顕微鏡 (FLIM) を用いて S1 領域 2/3 層の錐体細胞を観察した。すると、高頻度のヒゲ触刺激後に神経細胞内局所で MAPK/ERK 分子が活性化される現象が観察された (図 4、未発表)。実際

マウス第一次体性感覚野 2/3 層の樹状突起に強制発現させた MAPK/ERK FRET センサー

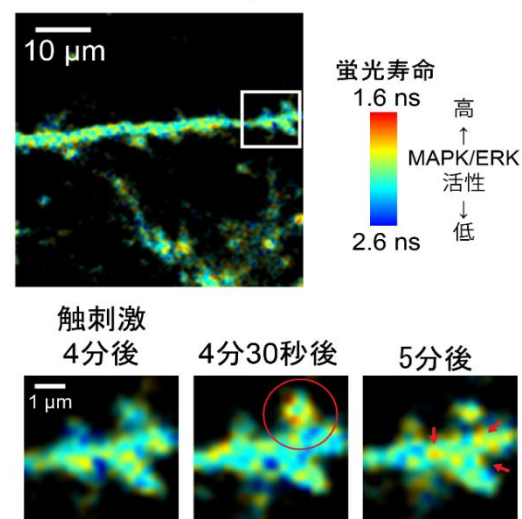


図 4. 生体マウス第一次体性感覚野における MAPK/ERK 分子の活性化パターン

高頻度ヒゲ刺激後に単一スパインにおいて MAPK/ERK の活性化がみられ、その後、樹状突起シャフト上に活性が伝播する様子が観察された (未発表)。

の触刺激と単一シナプス入力の間接的関係について更なる検証が必要であるが、培養脳切片を用いて単一スパイン刺激を行った先行研究においては、刺激後約5分後に MAPK/ERK が最も活性化することが報告されていることから (Tang & Yasuda, 2017, *Neuron*)、生体マウス脳 S1 領域の神経細胞においても、高頻度触刺激後に同様のタイムコースで MAPK/ERK が活性化することが示唆された。また、未だ定性的な実験結果ではあるものの、MAPK/ERK の活性パターンが単一スパインから樹状突起シャフト部へ伝播する様子も観察された。MAPK/ERK は活性化により細胞質から核内へ移行し、転写制御に関与することが知られている。そのため、本結果は、生体に対する触刺激が S1 領域におけるシナプス入力を惹起し、それに伴う細胞内分子の活性化とシグナル伝播の一連の過程を可視化できることを示唆している。現在は、MAPK/ERK に加えて、そのシグナルカスケードの下流に位置する転写翻訳因子、cAMP 応答配列結合タンパク (CREB) および、シナプス応答から CREB 活性までのシグナル伝達を仲介すると考えられる CaMKII α やプロテインキナーゼ A (PKA) も含めて同様の検討を行っている。

課題 3 : 高速広域 3D Volumetric イメージング法の開発

生体脳イメージングにおいて、上述の通り、特定の外的刺激に対応する特異的な局所シナプス入力の関係を明らかにすることは極めて重要である。細胞体サイズのスケールで、特定の刺激に対応した神経細胞の活動を観察することは比較的容易であり、現在、生体脳イメージングでは広く用いられている観察手法である。しかし、微小シナプスサイズのスケールで外的刺激特異的な細胞内分子シグナルの活性を捉えるためには、高い空間分解能で多数のスパインを同時に観察することが不可欠である。そこで、音響光学 (acoustic-optics) に基づく高速焦点距離可変液体レンズを二光子蛍光顕微鏡に組み込み、高速・広域 3D Volumetric イメージング法の開発を進めている。これにより、超高速で異なる焦点 (Z 軸) 距離の領域を撮像することができるようになり、図 5 (黄色円) に示すような、従来であれば同時観察することが難しかったシナプス前後部の近接領域などの重なり合った領域を含め、広域かつ三次元的な同時撮像が可能になった。

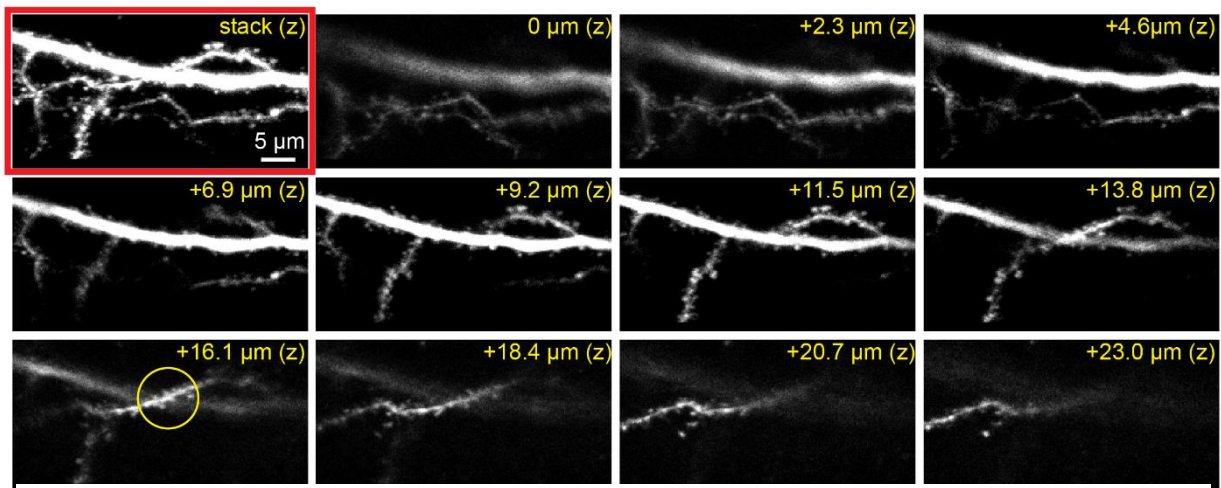


図 5. 高速広域 3D Volumetric イメージングにより撮像した樹状突起およびスパイン

CaMKII α FRET センサーをマウスの神経細胞に遺伝子導入し、2.3 μm ずつ異なる深さの樹状突起領域を同時に撮像し、取得画像を再構築した (未発表)。赤枠は各画像野の重ね合わせ像 (23 μm 深)。複数の樹状突起に渡って多数のスパイン構造を確認することができる。

総括

本課題では、生体脳において神経損傷関連分子シグナル活性の時空間ダイナミクスを明らかにするため、各シグナル分子活性を可視化する新規 FRET センサーの開発を行った。マウス第一次体性感覚野にそれら FRET センサーを導入し、触刺激に伴う樹状突起上の局所領域におけるシグナル分子活性を捉えることができた。加えて、生体脳においても高い時空間分解能で分子活性を可能にする高速広域 3D Volumetric イメージング法の開発を進めてきた。現在は、引き続き複数の細胞内分子シグナル活性について定量的データの取得及び解析を進めている。