

研究報告書

「細胞膜分子動態1分子解析による細胞の個性の解読」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 坂内 博子

1. 研究のねらい

細胞を取り囲む細胞膜は細胞同士が接触・相互作用する場所であり、他の細胞からの情報を最初に受け取る場である。すなわち、細胞膜は細胞自身の個性を提示し、他の細胞の特性を認識する場と捉えることが可能である。本研究のねらいは、細胞膜に提示された個々の細胞の特性(=個性)を、非破壊・低侵襲で解読するための新技術を開発することである。

細胞膜は脂質二重層とモザイク状に入り混じったタンパク質により構成されている。これらの細胞膜構成要素は流体としての性質を持ち、細胞膜の中で2次的にブラウン運動をしている。先行研究や応募者のこれまでの研究により、「細胞膜分子の動き」は細胞の分化状態や病態など、様々な細胞の個性を反映することがわかってきた。この発見を発展させ、「細胞膜分子の動き」に込められた分子情報を解読することにより個々の細胞の特性を記述する、というのが本研究提案の戦略である。

本研究提案では「病態」という細胞の個性に着目し、膜分子の動きからその個性を読み解く技術を開発する。脳神経疾患モデル動物由来の生細胞を用いて、私がこれまで開発・改良に関わって来た膜分子の動態解析技術「量子ドット1分子イメージング法」を基盤に、疾患と関連して細胞膜に現れる「異常」な分子動態を網羅的に検出する技術「ハイスループット1分子イメージング法」の確立を行う。同一種の細胞から複数の膜分子の動きの情報をナノスケールかつハイスピードで検出し、脳神経疾患に関連する特徴を記述できる新たに指標を創成する。将来臨床で役立つ疾患発症前診断法の基盤となることを見通し、神経細胞に分化誘導したヒト脳神経疾患患者由来のiPS細胞においても疾患特有の分子動態特性を見いだす。

2. 研究成果

(1) 概要

膜分子動態から細胞の個性を読み解くために、本研究ではA「培養細胞を用いたハイスループット1分子イメージング法の確立」、B「脳神経疾患モデル動物由来培養神経細胞の1分子病態解析」、C「疾患由来iPS細胞を用いた1分子病態解析」を行なった。

A「培養細胞を用いたハイスループット1分子イメージング法の確立」では、22種類の膜分子の1分子解析プロトコルを確立した。B「脳神経疾患モデル動物由来培養神経細胞の1分子病態解析」ではアルツハイマー病のモデル細胞で11種類の膜分子動態解析を行った結果、いくつかの膜分子動態が野生型と異なることを発見した。C「疾患由来iPS細胞を用いた1分子病態解析」では、難治性てんかんを持つ患者から樹立したiPS細胞を神経細胞に分化させ1分子解析を行い、神経伝達物質受容体の拡散運動に異常を見出した。

また、1分子解析を、タンパク質の新規機能の発見に新展開した。一見顕著な表現系を持たないタウタンパク質欠損マウスの神経細胞を用いて、D「膜分子動態1分子解析による生理的タウタンパク質の新規機能の発見」という、期待以上の成果を得た。生理的なタウタンパク質は、従来知られていた微小管構造と軸索輸送の安定化という役割に加えて、樹状突起において神経伝達物質の側方拡散運動を制御する役割があることを明らかにした。

さらに、てんかんモデル動物神経細胞の膜分子動態を解析する過程で、細胞内Ca²⁺濃度の上昇「Ca²⁺シグナル」の由来が、膜分子動態制御の方向性を決める重要なファクターであることが明らかになった。そこで、E「Ca²⁺シグナルの由来を特定する新規解析法の開発」を行なった。細胞体小胞体や細胞膜に遺伝子コード型Ca²⁺センサーを標的することにより、Ca²⁺シグナ

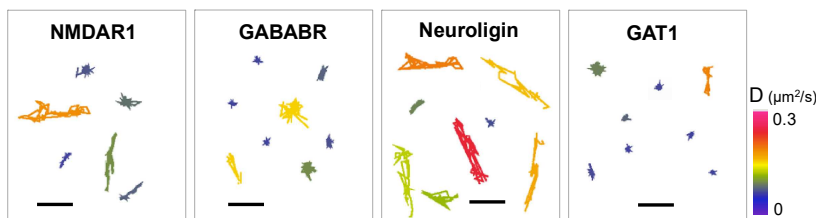
ルの発生点を正確に特定するという新しい解析法を確立した。

(2) 詳細

A 「培養細胞を用いたハイスループット1分子イメージング法の確立」

従来の1分子イメージング研究では技術的な制限から2~3種類の分子の動態に焦点を絞って解析せざるを得なかった。この問題を克服するため、細胞膜上の神経機能に関わる膜タンパク質(神経伝達物質受容体、Gタンパク質共役型受容体、細胞接着因子、トランスポーター、リガンド受容体)を量子ドットでラベルする方法を確立した。これにより、20種類以上の膜タンパク質動態を観察できるプロトコールが完成した(図1)。また、量子ドットの画像解析プログラムを改良し(早稲田大・井上貴文教授との共同研究)、分子動態の解析やパラメータの可視化の機能を強化した。以上の結果は、Springer NEUROMETHODS series “Single Molecular Microscopy”, (Eds. N. Yamamoto and Y. Okada) に寄稿しており、現在査読中である。

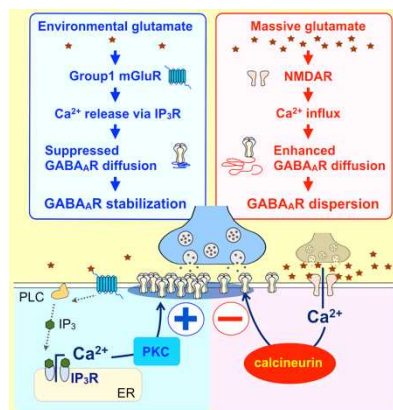
図1: 複数の膜分子に対する1分子動態解析の結果。1.5秒間の膜分子の側方拡散軌跡を表す。暖色は速い拡散運動を、寒色は遅い拡散運動を示す。*Bannai H, Inoue T, Hirose M, Niwa F, Mikoshiba M “Synaptic function and neuropathological disease revealed by quantum-dot single particle tracking.”(査読中) より。



B 「脳神経疾患モデル動物由来培養神経細胞の1分子病態解析」

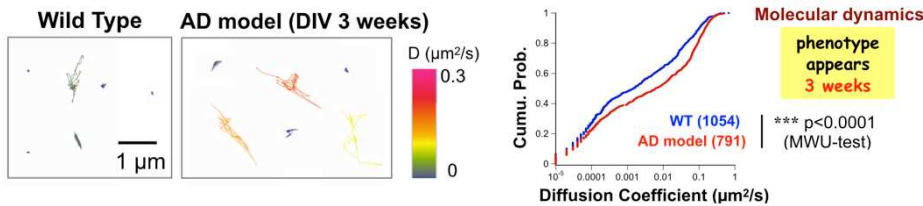
1) 生後9日にてんかん様症状を発症するIP₃受容体タイプ1ノックアウトマウス由来の神経細胞で膜分子動態1分子解析を行なったところ、抑制性神経伝達物質受容体 GABA_A受容体(GABA_AR)の側方拡散が増大していることを見出した(Bannai & Niwa et al. Cell Reports 2015)。この結果は、IP₃受容体を介した細胞内Ca²⁺貯蔵庫小胞体からの恒常的なCa²⁺放出が、細胞表面のGABA_ARの動態を制御していることを意味している。さらに細胞内Ca²⁺貯蔵庫からの「Ca²⁺放出」(図2左)と細胞外からの「Ca²⁺流入」(図2右)がそれぞれ異なる下流シグナルを活性化し、GABA_ARの側方拡散に対して「抑制」と「促進」という正反対の役割を持つことが明らかになった。膜分子動態が細胞内Ca²⁺シグナルを使い分けることにより巧妙に制御されていることが示された結果である。

図2: てんかんモデル細胞の1分子解析により、Ca²⁺シグナルの由来(右:放出、左:流入)によって、膜分子動態制御の方向性(+:安定化、-:不安定化)が決まることがわかった



2) 生後4ヶ月という早期にアミロイドβ (Aβ)の蓄積を起こすアルツハイマー病モデルマウス(理研・西道隆臣研究室より提供)由来の神経細胞において、複数の膜分子動態を解析した。培養後3週間目のこの神経細胞を用いて、10種類以上の膜分子の動態情報を1分子イメージングにより取得したところ、ある神経伝達物質受容体の動きが、アルツハイマー病モデル細胞において増加することを見出した(図3)。

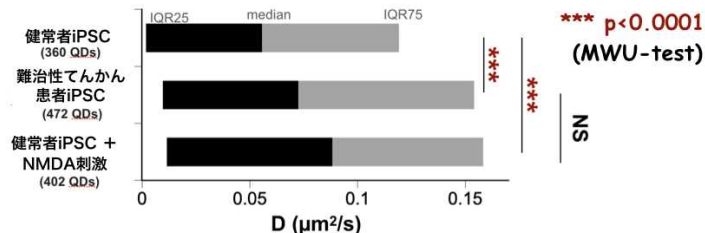
図3: 3週間培養したアルツハイマー病モデルマウス(AD model)由来神経細胞で見出された、受容体の拡散運動の増加(左: 受容体運動の軌跡; 右: 拡散係数)



C 「疾患由来 iPS 細胞を用いた1分子病態解析」

慶應義塾大学の岡野栄之教授・前田純宏講師と共同研究で、ヒト iPS 細胞(iPSC)における1分子イメージングに成功した。(iPSC における1分子イメージングは、今の所世界で報告はない)。健常者由来 iPSC を神経細胞に分化させた細胞を用いて、1分子動態解析の技術を確立した。確立した1分子動態解析技術を用いて、ヒト iPSC 由来神経細胞でも、てんかん発作を模した神経興奮の増大により、受容体の側方拡散運動が増加することを示した(図4: 健常者 iPSC + NMDA 刺激)。これは、過去げっ歯類で存在が示された「神経活動依存的な受容体側方拡散運動の制御」(Bannai et al. Neuron 2009)が、ヒト神経細胞にも共通して存在することを意味する結果である。また、難治性てんかん患者から樹立した iPSC 由来神経細胞でも、NMDA 刺激時と同様、受容体の側方拡散が増加することがわかった(図4: 難治性てんかん患者 iPSC)。

図4: 神経細胞に誘導後2ヶ月培養したヒト iPSC における、受容体側方拡散運動解析。神経興奮を誘導した iPSC、難治性てんかん患者から樹立した iPSC において、受容体拡散運動の増加が観察された。



D 「膜分子動態1分子解析による生理的タウタンパク質の新規機能の発見」

リン酸化タウの異常蓄積がアルツハイマー病をはじめとするタウオパチーの原因であることはよく知られているが、正常な神経細胞に発現する微小管結合たんぱく質タウが神経機能に果たす役割についてはあまり知られていない。タウの生理的役割を明らかにするために本研究では、タウ欠損マウス由来の神経細胞の細胞膜分子動態に現れる異常を、量子ドット1分子イメージング法を用いて解析した(学習院大学・高島明彦教授との共同研究、学生1名)。タウ欠損神経細胞の樹状突起・細胞体において、抑制性シナプス受容体、興奮性受容体ともに、受容体の動態に以上がおこることが明らかになった(図5)。

タウたんぱく質は、正常な細胞では樹状突起よりも軸索に密集している。本研究の結果は、少ないながらも樹状突起に存在するタウが、興奮性・抑制性神経伝達物質受容体の動態制

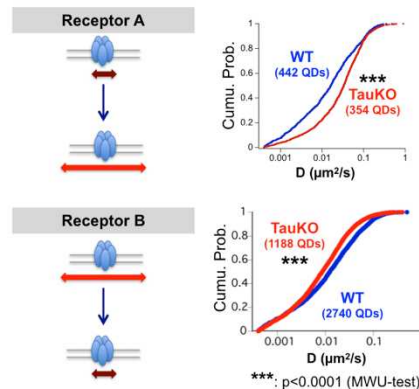


図4: タウ欠損マウス(TauKO)における興奮性シナプス受容体と抑制性受容体の拡散運動の異常

御という、これまで知られていなかった機能を持つことを明らかにしたものである。

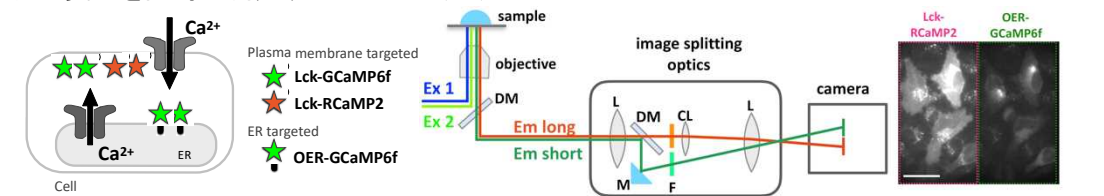
E 「Ca²⁺シグナルの由来を特定する新規解析法の開発」

上記 B の研究で我々は、てんかんの予防／発症に関わる GABA_A 受容体の動態制御が、Ca²⁺シグナルの由来に依存することを見いだした(Bannai & Niwa et al. *Cell Reports* 2015)。既存のイメージング技術には、Ca²⁺シグナルの由来を捉える時空間解像度を兼ね備えたものはないが、本研究にとって今後必要不可欠な技術となる。したがって、本研究では「Ca²⁺シグナルの由来」まで検出できる新規 Ca²⁺イメージング法の確立を行った。

この目的のために、Ca²⁺ストアである細胞内小胞体(ER)膜の細胞質側に遺伝子コード型 Ca²⁺センサー(GECI)を標的した「ER 標的型センサー」を新たに作成した(Niwa et al. BBRC 2016)(図6)。この「ER 標的型センサー」は、既存の Ca²⁺センサーに比べて、より高感度で時間解像度良く Ca²⁺放出を検出できることが分かった。また、生きた線虫個体内でも、「ER 標的型センサー」を用いた1細胞レベルの Ca²⁺イメージングが可能であった。さらに、グリア細胞アストロサイトの自発的 Ca²⁺シグナルを調べたところ、「細胞膜標的型センサー(Lck-GCaMP6f)」の方が「ER 標的型センサー(OER-GCaMP6f)」より高頻度で Ca²⁺シグナルを検出することがわかった。この結果は、アストロサイトの Ca²⁺シグナルは従来の予測に反して、Ca²⁺流入成分が多い可能性を示している。

Lck-GCaMP6f, OER-GCaMP6f を使い分けることにより、アストロサイト(Sakuragi et al. BBRC 2017)・HEK293 細胞 (Vervliet et al. *Biochem. Pharmacol.* 2017)において、それぞれ Ca²⁺流入・Ca²⁺流入を極めて感度良く認識できることも示された。さらに、同一細胞で細胞膜近傍とER膜近傍の Ca²⁺変化を同時に計測するためのシステムを確立した(Bannai et al. *JoVE, In Press*)。

図6: Ca²⁺シグナルの由来を特定するための膜標的型 GECI(右)と、細胞膜・ER膜の Ca²⁺シグナル変化を同時に測定するシステム(左)



3. 今後の展開

本研究により、膜分子動態が細胞の状態を表す大変感度の高い指標であることが明らかになった。例えば、タウ欠損マウスは、個体レベルでも神経細胞レベルでも一見異常がない動物であるが、膜分子動態には明確な異常があった。今後は、統合失調症やうつ病などの細胞においても、膜分子動態の異常があるかを検討していきたい。これらの病気は、現在目に見える病態が同定されておらず発症メカニズムも不明な疾患であるが、本研究を展開していくことにより、明確な病態を定義できる可能性がある。動態異常を引き起こすタンパク質やシグナル経路を追求することにより、従来の研究とは異なる方向性から精神疾患の発症メカニズムが明らかになると期待される。

アルツハイマー病モデルマウスの神経細胞も、個体で最初の表現系アミロイドベータの蓄積が見られる時期(4ヶ月)よりはるかに早く(3週間)に、膜分子動態の異常があらわれていた。今回膜分子動態を解析したモデルマウスは、アミロイドベータの蓄積が特に早期におこる系統である。他のアルツハイマー病モデルの動物でも検証する必要がある。さらに、加齢にともなって発症するアルツハイマー病のモデルを構築する必要がある。現在、初代培養ニューロンに凝集しやすい変異を持ったヒトのタウをアデノ随伴ウイルス(AAV)強制発現させる系は立ち上がっている。このタウ強制発現系を「加齢に伴うアルツハイマーモデル」のタタキ台として、今後改良を重ねていきたい。

さらに今後は、アルツハイマー病モデル動物細胞で見出された膜分子動態異常と、その後の

シナプス脱落や神経細胞死といった神経変性の中に因果関係があるかを調べていく必要がある。この膜分子動態異常を阻害してその後の神経変性おこらなくなれば、両者の間の因果関係が考えられる。もし因果関係が認められた場合は、膜分子動態を指標としてアルツハイマー病治療のための薬剤スクリーニング系を構築する。

4. 評価

(1) 自己評価

・研究目的の達成状況

膜分子の網羅的解析技術がある程度立ち上がったこと、さらに疾患モデル細胞や遺伝子欠損細胞で膜分子動態異常を見出すことができたことから、本研究は概ね達成できたと考えている。研究遂行の過程で、新たな優先度の高い課題が浮上してきたが、それも解決できた。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

あまり多くのマンパワーが確保できない体制の中、本研究では領域内外の素晴らしい研究者たちとの出会いと連携のおかげで、研究開始時に予想していたより多くのことを達成できた。特に、さきがけ領域内の研究者の皆様は、本研究に必要な知識や材料を快くご提供いただき、大変感謝している。一番行き詰まった2017年に、研究集会で出会った高島明彦先生、岡野栄之先生に、タウノックアウト動物や各種タウの遺伝子、疾患モデルヒトiPS細胞を快くご提供をいただけたことが、本研究にとって大変重要な転機であった。また、さきがけ研究者の研究にインスパイアされて着想した機械学習についても、川上玲先生という専門家と出会う機会に恵まれ、実現することができた。研究費執行状況については、おおむね計画どおり実行された。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

これまで10年間神経細胞の1分子イメージング研究を行っており、この分野の変遷をずっと注視してきた。その中でも、膜分子動態1分子解析を、脳神経疾患の診断に使うという着想は世界的にみても大変独創的なものである。研究開始時にはまだ夢物語であったこの着想が、本さきがけ研究の3年半で大幅に実現性が増したと思う。もしこの計画が達成され、日本発の診断技術(例えばアルツハイマー病やALSなど、現在は発症前に診断が難しい疾患)の発症前診断技術が確立できれば、社会・経済への波及効果は大きいと考えられる。

・その他領域独自の評価項目

領域会議では、これまですべての研究者のアドバイスシートに必ず質問やコメントを記入するように心がけてきた。研究者の皆様実際に役立ったかどうかはともかく、このことが私自身の成長を促した。全く他分野の研究を自分ごととして真剣に考えて発表を聞くことで、新たな着想を得ることができ、自分一人では解決不可能な課題の解決にむけて重要な手がかりを得ることができた。また、さきがけ研究者間の連携ができないかを常に考え、実際5名の先生とサンプルのやりとりを含めた共同研究、3名の先生と実験技術の情報交換をしてきた。このさきがけ1細胞領域のポテンシャルをうまく活用でき、異分野融合に少しは貢献できたと思う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

最大20種類以上の膜タンパク質動態を量子ドットでラベルし観察することができる研究プロトコルを完成しました。これらを利用して脳神経疾患モデル動物やてんかん患者由来のiPS細胞を観察し、てんかんのモデルであるIP₃受容体タイプ1ノックアウトマウス由来の神経細胞では、抑制性神経伝達物質受容体GABA_A受容体の側方拡散の増大が、一方、てんかん患者由来のiPS細胞由来神経細胞では、受容体拡散運動の増加を観察しました。更に細胞内貯留庫由来と細胞外由来の細胞内Ca変動を測りわけける手法を確立し、それぞれ異なる下流シグナルを活性化し、GABA_ARの側方拡散に対して「抑制」と「促進」という正反対の役割を持つ

ことも明らかにしました。また、タウ欠損神経細胞の樹状突起・細胞体において、抑制性シナプス受容体、興奮性受容体の動態とともに異常がおこることを示し、これはタウ分子の生理的役割の解明につながる成果と期待されます。多くの共同研究によって、確立した技術の応用展開も広がっているようです。是非、これらの分子の動態を制御機構や生理機能に迫り、大きな論文発表へと繋げて欲しいと期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Bannai H 1, Niwa F1, Sherwood MW, Shrivastava AN, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Lévi S, Triller A*, Mikoshiba K*. (1: co-first author) “Bidirectional Control of Synaptic GABAAR Clustering by Glutamate and Calcium”
<i>Cell Reports</i> , 13: 2768–2780 (2015) |
| 2. Niwa F, Sakuragi S, Kobayashi A, Takagi S, Oda Y, Bannai H* , Mikoshiba K*.
“Dissection of local Ca(2+) signals inside cytosol by ER-targeted Ca(2+) indicator.”
<i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 479:67–73 (2016) |
| 3. Sakuragi S, Niwa F, Oda Y, Mikoshiba K*, Bannai H* .
“Astroglial Ca ²⁺ signaling is generated by the coordination of IP ₃ R and store-operated Ca ²⁺ channels”
<i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 486:879–885 (2017) |
| 4. *Bannai H
“Molecular membrane dynamics: Insights into synaptic function and neuropathological disease” (Review Article) <i>Neurosci Res</i> . 129, 47–56 (2018) |
| 5. *Bannai H , Hirose M, Niwa F, Mikoshiba K. “Dissection of local Ca ²⁺ signals in cultured cells by membrane-targeted Ca ²⁺ indicators” <i>JoVE</i> , (2018/12/19 Accepted) |

(2) 特許出願

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)

- 第 14 回 日本学術振興会賞 (2018 年)
- “Physiology and pathology of brains revealed by single molecule imaging” Keynote lecture in OIST Joint Minisymposium with The 16th International Membrane Research Forum Okinawa, March 18–20, 2019 予定
- “Approach to role of physiological Tau protein by single molecule analysis of membrane molecule dynamics” *12th International Symposium on NanoMedicine*, Yamaguchi, December 8, 2018
- “Approach to the brain function by imaging single molecule behavior” Invited lecture in Neuroscience Seminar in *University of Düsseldorf*, Düsseldorf, Germany, June 27, 2017
- 2つのシグナル物質の使い分けによる正反対の神経制御 — 新たな抑制性シナプス伝達制御メカニズムの発見 — (2015年12月18日) http://www.riken.jp/pr/press/2015/20151218_2/

○ だいた。