

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
戦略的国際科学技術協力推進事業 (SICP) 日本－英国研究交流
(英語) International Collaborative Research Program
Strategic International Research Cooperative Program (Japan-UK),
Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 神経変性疾患によるシナプス形成能劣化の 1 分子イメージング解明
(英語) Single molecule imaging of synaptic protein dynamics
in neurodegeneration

研究開発担当者 (日本語) 京都大学 物質－細胞統合システム拠点 教授 楠見 明弘
所属 役職 氏名：(英語) Kusumi Akihiro, Professor,
Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

多くの神経変性疾患 (例えば、プリオン感染やアルツハイマー) では、シナプスの構造可塑性が劣化し、シナプスの欠失につながることを、英国側代表研究者である Giovanna Mallucci ケンブリッジ大学教授 (臨床神経科学部; チェアマン) は示していた。本研究の目的は、日本国側代表研究者である楠見明弘京都大学教授 (物質細胞統合システム拠点、当時; 現在、沖縄科学技術大学院大学教授) のグループが超高速 1 分子イメージング法、新しいシナプス受容体のラベル法、新しい脂質蛍光プローブなどの開発を進め、それらを駆使して、Mallucci 教授の進めるシナプス構造可塑性、特に、低温誘導シナプス構造可塑性の機構解明を、Mallucci 教授と協力しつつ、脳と初代培養海馬神経細胞系で進めることであった。シナプス分子のシナプスへの出入りを 1 分子追跡し、それによって、シナプスの形成と維持の機構を解明することを目指した。それによって、疾患によってシナプス形成能が劣化する過程と機構を解明するための基盤技術開発を進め、実際の解明研究を進めた。

その結果、本研究期間の間に、以下の成果が挙げられた。

(1) AMPA 受容体のアンタゴニストを利用した蛍光標識法を開発した

AMPA 受容体のアンタゴニストを用いて、修飾の特異性と蛍光褪色速度の両方がある程度満足させるラベル法を開発した (Nat. Commun. 2017)。

(2) シナプス/スパインマーカーの Homer1b-mGFP を、他の膜分子と同時に発現させる方法を確立した

(3) GPI アンカー型受容体で神経細胞に多い Thy1 とプリオンタンパク質 (PrP) の会合度を解明した

PrP は Thy1 より会合しやすいことが、株細胞と初代培養海馬神経細胞で見いだされた。このような性質が、変異体 PrP のタンパク質レベルでの伝播に寄与している可能性が示唆された (Cell Biochem. Biophys. 2017 印刷中)。

(4) AMPA 受容体と相互作用するといわれている糖脂質である GM1 (ガングリオシド)、スパイン内でのラフト分子相互作用を調べるためのガングリオシド (GM1, GM2, GM3, GD1b) とスフィンゴミエリンの蛍光アナログの合成に成功した (Nat. Chem. Biol. 2016; J. Cell Biol. 2017)。シナプスへの応用はこれからである。

(5) 超高速 1 分子イメージング法を開発した (投稿準備中)

一方、本事業の重要な目的は、本研究分野を担い、英国側研究者との研究交流を担う人材を育成することであった。これについては、以下の成果があった。

(1) 京都 (2015)、ケンブリッジ (2016)、京都 (2017) でシンポジウムを開催し、若手の交流を促進した。特に、あとの 2 回のシンポジウムでは、本事業でサポートされている 3 つのグループのメンバーを積極的に招聘し、彼らをコアとして構成した。この試みは非常に成功していて、これを今後も継続したいという意向が 3 つのグループ全てと、招待講演者から示されている。それで、このような 50 人未満の参加者が密接に交流する会を継続すべく、次回のミーティングは、参加に特に熱心な研究者を中心に、ロンドンで開催する話し合いが進んでおり、持続的発展の可能性が大きい。

(2) 京大の大学院生と研究員が 3 週間にわたってケンブリッジ大学・モルッチ研究室に滞在し、ケンブリッジ大学・モルッチ研究室の大学院生が 2 週間にわたって京大・楠見研究室に滞在して、共同実験をおこなった。研究成果が挙がると同時に、研究室を越えて、他の研究者とも互いに知り合う機会となり、若手研究者は大きな成長を見せた。

英文

Professor Giovanna Mallucci, Chair of the Department of Clinical Neuroscience of the University of Cambridge and the PI of the U.K. side of this project, previously showed that, in many neurodegenerative diseases, such as the prion and Alzheimer diseases, the structural plasticity of synapses is decayed, leading to the loss of synapses. The objective of the present project was that Prof. Mallucci and Professor Akihiro Kusumi of Kyoto University (Institute of Cell-Material Sciences; during the project period; now professor of Okinawa Institute of Science and Technology), P.I. of the Japanese side of this project, and their groups collaborate to unravel the mechanism of synaptic plasticity in normal cells and tissues as well as during their neurodegeneration processes. Prof. Kusumi will develop ultrafast single-molecule imaging, new methods for fluorescently labeling synaptic receptors, and new lipid probes, and apply them extensively, with Prof. Mallucci, to reveal synaptic structural plasticity, particularly that induced by low-temperature treatment found by Prof. Mallucci. In this project, we aimed to reveal how synaptic molecules enter and exit from synapses by using single-molecule imaging, and by doing so, to understand the mechanisms by which synapses are generated and maintained. We succeeded in developing basic technologies required for

revealing the mechanisms by which structural plasticity of synapses is lost, and by using the developed techniques, our understanding of the mechanism was advanced.

More specifically, we obtained the following results.

(1) We developed a method to specifically label AMPA receptors with photostable organic fluorophores using the AMPA receptor antagonist. This method provide a good compromise for labeling specificity and the rate of photobleaching (Nat. Commun. 2017) .

(2) We established a simple method to have Homer1b-mGFP, which works as a synapse/spine marker for many experiments, and other membrane receptors conjugated to tag proteins expressed in neurons.

(3) We revealed the levels of oligomerization of GPI-anchored receptors, Thy1 and prion protein (PrP), which exhibit high levels of expressions in neurons (Cell Biochem. Biophys. 2017 in press).

(4) New fluorescent ganglioside analogs (GM1, GM2, GM3, GD1b) and new fluorescent sphingomyelin analogs were synthesized. They are different from the existing "analogs", in that they behave very much like their endogenous counterparts. These analogs will be useful for the studies of synaptic structural plasticity because a ganglioside GM1 was proposed to interact with AMPA receptors, where as gangliosides GM1, GM2, GM3, and GD1b as well as sphingomyelins might undergo raft-based interactions with proteins in synapses/spines (Nat. Chem. Biol. 2016; J. Cell Biol. 2017).

(5) Ultrafast single-molecule imaging, which operates at 40,000 frames/s with a reasonable image size (~ 6 x 4 μm) has been developed (manuscript in preparation).

One of the main objectives of this entire AMED program is to help raise young researchers who will become core researchers to advance this research area and exchanges of researchers between the U.K. and Japan. In addition to exchanges of graduate students and postdocs for collaborative research, we held three symposia: Kyoto in 2015, Cambridge in 2016, and Kyoto again in 2017. The latter two meetings included two other teams (grantees) of this AMED program, and turned out to be very interesting ones. Based on the success of these two meetings, the core members of these meetings plan to hold such meetings every year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 5 件)

1. HIRAMOTO-YAMAKI N, TANAKA K. A. K, SUZUKI K. G. N, MIYAHARA M. S. H, KALAY Z, TANAKA K, KASAI R. S, and KUSUMI A (co-corresponding author), and FUJIWARA T. K. Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes. *Traffic*. 2014, 15, 583-612.
2. KOMURA N, SUZUKI K. G. N, ANDO H, KONISHI M, KOIKEDA M, IMAMURA A, CHADDA R, FUJIWARA T. K, TSUBOI H, SHENG R, CHO W, FURUKAWA K, FURUKAWA K, YAMAUCHI Y, ISHIDA H, KUSUMI A (Co-Corresponding Author), and KISO M. Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat. Chem. Biol.* 2016, 12(6), 402-410.
3. KINOSHITA M, SUZUKI K. G. N, MATSUMORI N, TAKADA M, ANO H, MORIGAKI K, ABE M, MAKINO A, KOBAYASHI T, HIROSAWA K. M, FUJIWARA T. K, KUSUMI A, and MURATA M. Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. *J. Cell Biol.* 2017, 216, 1183-1204.

4. WAKAYAMA S, KIYONAKA S, ARAI I, KAKEGAWA W, MATSUDA S, IBATA K, NEMOTO Y. L, KUSUMI A, YUZAKI M, HAMACHI I. Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. Nature Communications. 2017, 8, 14850.
5. 楠見明弘, 藤原敬宏. 光ピンセット.朝倉書店 「顕微鏡学ハンドブック」V. 光によるマニピュレーション. 2014.
6. KUSUMI A, TSUNOYAMA T. A, HIROSAWA K. M, KASAI R. S, and FUJIWARA T. K. Tracking single molecules at work in living cells. Nature Chemical Biology. 2014, 10(7), 524-532.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Membrane mechanisms: Concerted action of membrane domains for signal transduction in the plasma membrane, 口頭, 楠見明弘, 8th IUPAP International Conference on Biological Physics, 2014/6/20, 国外.
2. Organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, Departmental Seminar, Toxicology Unit, Medical Research Council and the University of Leicester, 2014/7/8, 国外.
3. Membrane mechanisms as revealed by single-molecule tracking in living cells, 口頭, 楠見明弘, The Biennial British Biophysical Society Conference, 2014/7/10, 国外.
4. 細胞膜メゾドメインのシグナル機構：1分子追跡による解明, 口頭, 楠見明弘, 第6回 薬学の未来を考える京都シンポジウム「イメージング技術が切り開く創薬・病態研究の未来」, 2014/8/2, 国内.
5. Tracking single molecules at work in the plasma membrane of living cells, 口頭, 楠見明弘, First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, 2014/8/29, 国外.
6. Tracking single fluorescent molecules at work in living cells: Revealing organizing principles of the plasma membrane for signal transduction, 口頭, 楠見明弘, 2014 HeKKSaGOn Summer School, 2014/9/1, 国外.
7. Unit raft mechanism for signal transduction revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, Biomembrane Days 2014, 2014/9/2, 国外.
8. シナプスとイニシャルセグメント領域における細胞膜分子の異常な拡散挙動：1分子追跡による解明, 口頭, 楠見明弘, 第37回日本神経科学学会大会 シンポジウム S2-B-1 「Sculpting the neuronal intracellular environment: from single molecule behavior to local signal integration」, 2014/9/12, 国内.
9. 神経細胞軸索の細胞膜にある2次元拡散障壁は分子選択性フィルターである, 口頭, 楠見明弘, 第52回日本生物物理学会年会 シンポジウム「システム協同性が操る神経細胞機能/Cooperativity in shaping the nerve cell function」, 2014/9/25, 国内.
10. Diffusion barrier in the neuronal axon initial-segment membrane is a molecule-selective filter in the plasma membrane, ポスター, 宮原愛美, 第52回日本生物物理学会年会, 2014/9/27, 国内.
11. Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, ComBio 2014, 2014/10/1, 国外.
12. Basic unit rafts for raft formation and function as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cell Biology (KSMCB) 2014,

2014/10/22, 国外.

13. Plasma membrane domain mechanisms for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, 2014 Symposium in Chemical Biology, 2014/11/27, 国外.
14. Molecule-selective lateral-diffusion barrier in the neuronal axon membrane, 口頭, 宮原愛美, 「細胞のメゾスケール構造機能」シンポジウム: Symposium on the cellular meso-scale structures and their functions, 2014/12/13, 国内.
15. Molecule-selective lateral-diffusion barrier in the neuronal axon membrane, ポスター, 宮原愛美, 「細胞のメゾスケール構造機能」シンポジウム: Symposium on the cellular meso-scale structures and their functions, 2014/12/13, 国内.
16. Single-molecule imaging of endogenous AMPA receptor using chemical labeling, ポスター, 根本悠宇里, 「細胞のメゾスケール構造機能」シンポジウム: Symposium on the cellular meso-scale structures and their functions, 2014/12/13, 国内.
17. Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction: tracking single molecules in living cells, 口頭, 楠見明弘, Departmental Seminar, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, 2015/1/23, 国外.
18. Transient GPCR dimers trigger basal signals as revealed by single-molecule imaging, 口頭, 笠井倫志, The 18th iCeMS International Symposium/The 15th International Membrane Research Forum, 2015/3/3, 国内.
19. Molecule-selective lateral-diffusion barrier in the neuronal axon membrane, 口頭, 宮原愛美, The 18th iCeMS International Symposium/The 15th International Membrane Research Forum, 2015/3/3, 国内.
20. Molecule-selective lateral-diffusion barrier in the neuronal axon membrane, ポスター, 宮原愛美, The 18th iCeMS International Symposium/The 15th International Membrane Research Forum, 2015/3/3, 国内.
21. 過渡的ホモダイマーの衝撃: GPCR と GPI アンカー型受容体の両方に見られるシグナルとドメイン形成の基本ユニット, 口頭, 楠見明弘, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会/第 92 回日本生理学会大会 シンポジウム 4 S04 「膜タンパク質複合体の微視的局在、ストイキオメトリーおよび機能の動的側面」, 2015/3/21, 国内.
22. Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, Brazilian Physical Society Meeting 2015 XXXVIII ENFMC, 2015/5/26, 国外.
23. Hierarchical organization of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, Departmental Seminar: Dept. of Physics, Faculty of Philosophy, University of Sao Paulo, 2015/5/29, 国外.
24. Single-molecule view of mechanisms and functions of membrane compartmentalization, 口頭, 楠見明弘, Mechanisms and functions of membrane compartmentalization, 2015/9/6, 国外.
25. Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, International Symposium on Frontiers in Bioimaging, 2015/10/26, 国外.
26. Single-molecule tracking revealed organizing principles of the plasma membrane for its signal

- transduction function, 口頭, 楠見明弘, Super Resolution Symposium, 2015/11/27, 国外.
27. Single-molecule tracking revealed organizing principles of the plasma membrane for signal transduction, 口頭, 楠見明弘, Cold Spring Harbor Asia Conferences "New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms", 2015/12/9, 国外.
 28. Development of super-long single fluorescent-molecule tracking revealed dynamic integrin function for cell adhesion, 口頭, 角山貴昭, I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience, 2016/3/21, 国外.
 29. Method development for prolonging single fluorescent-molecule tracking in living cells, ポスター, 角山貴昭, I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience, 2016/3/21, 国外.
 30. Dynamic monomer dimer equilibrium of GPCRs as characterized by single-molecule tracking, ポスター, 笠井倫志, I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience, 2016/3/21, 国外.
 31. Single molecule tracking of AMPA receptor in living neurons, ポスター, 根本悠宇里, I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience, 2016/3/21, 国外.
 32. 生命科学温故知新：博士号をとろう, 口頭, 楠見明弘, 慶応義塾大学大学院 グローバル環境システムリーダー (GESL) プログラム 7月度 GESL セミナー, 2016/7/21, 国内.
 33. Ultrafast single-molecule imaging for understanding signaling at the cell membrane, 口頭, 楠見明弘, 1st Microscopy Mela: 8th International Bangalore Microscopy Course, 2016/9/25, 国外.
 34. Very transient molecular interactions enable signal transduction: findings by single-molecule tracking, 口頭, 楠見明弘, Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine, 2016/10/6, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当有りません。

(4) 特許出願
該当有りません。