

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24116004

研究課題名(和文)精神疾患におけるシナプス超分子構造機能連関の変容

研究課題名(英文)Transformation of the relationship between synaptic supramolecular assemblies and synaptic function in mental disorder

研究代表者

廣瀬 謙造 (HIROSE, Kenzo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：00292730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 45,000,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患モデル動物のシナプス機能解析に供するグルタミン酸プローブや酸性環境検出蛍光プローブ、超解像イメージング用の蛍光標識法を開発した。超解像顕微鏡を用いた精神疾患モデルマウスの解析からSchnurri-2ノックアウトマウスの海馬でのグルタミン酸受容体やDISC1ノックアウトマウスの線条体側坐核でのドパミン受容体がそれぞれ形成するナノクラスターの大きさや数の変容を明らかにした。DISC1ノックアウトマウスでのD2Rナノクラスターの変容は統合失調症治療薬クロザピンの投与によって野生型レベルになることを明らかにし、微細な分子配置の変容が精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとなりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：We developed fluorescent probes for glutamate and acidic environment, and fluorescence labeling method for superresolution imaging for analyzing synaptic properties in psychiatric disease model animals. By using superresolution microscopy, we clarified transformation in size and number of nanoclusters formed by glutamate receptors in the hippocampus of Schnurri-2 knockout mice and dopaminergic receptors in striatum nucleus accumbens of DISC1 knockout mice, respectively. Further we revealed that the aberration of D2R nanocluster in DISC1 knockout mouse was ameliorated to the level of wild type by administration of antipsychotic drug clozapine. Our studies show that changes of nano-scale molecular assemblies could be a microendophenotype of psychiatric diseases.

研究分野：神経生物学・薬理学

キーワード：精神疾患 シナプス 超解像イメージング 超分子構造

1. 研究開始当初の背景

統合失調症、うつ病などの精神疾患における脳機能の障害の背景にはシナプスの機能的変容があることが明らかになりつつある。統合失調症のリスク遺伝子の研究から精神疾患におけるシナプス形態の異常やシナプス伝達機能の変化 (Chen et al. J. Cell. Biol. 2008) が示唆されている。さらに、統合失調症家系の遺伝学的解析からポストシナプスに局在するスキヤフォールドタンパク質である Shank3 の変異の報告 (Gauthier et al. PNAS. 2010) や統合失調症関連遺伝子 DISC1 のノックダウン実験によってポストシナプスでのグルタミン酸受容体が減少するとの報告 (Hayashi-Takagi et al. Nat. Neurosci. 2010) が相次いでなされ、シナプスでの機能分子の配置と精神疾患との関連が強く示唆されている。しかしながら、シナプスという極めて微細な構造の中での分子の空間的配置 (超分子構造) を精緻に測定、評価する方法論が確立されていないため精神疾患研究ではシナプス分子の空間配置に着目した研究は立ち遅れている。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子スクリーニング、超解像イメージング等の先端技術駆使し、精神疾患モデルの脳で生じている微細な変化 (マイクロエンドフェノタイプ)、特にシナプスに形成される微細な分子配置 (超分子構造) の変容を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

シナプスの機能や形態の微細な変化を検出するための蛍光プローブ類や超解像イメージングに供する蛍光標識法をケミカルバイオロジーの手法を導入して開発した。先行研究において精神疾患様の行動が報告されている精神疾患モデルマウスを導入した。モデルマウスの各脳部位の凍結切片を作製し、

蛍光免疫染色標本を作製し、超解像顕微鏡を用いてシナプス分子の微細な配置の可視化解析を行った。また、同定した分子の微細配置の異常に対する精神疾患治療薬の効果も調べた。

4. 研究成果

シナプス機能の変容に着目した自閉症関連遺伝子の検索

シナプス機能に着目して精神疾患関連分子の検索とシナプス分子の微細配置解析を中心に研究を推進した。これまでに自閉症患者のコピー数変異 (CNV) データを基にした分子スクリーニングによってシナプスでのグルタミン酸受容体のリサイクリングに関わる分子 (Sez612) を同定し、Sez612 ノックアウトマウスが自閉症様行動を示すことを明らかにした。

シナプス分子の超分子構造解析に資する超解像顕微鏡プラットフォームの整備

シナプス分子の超分子構造の可視化解析のために、一分子蛍光の明滅画像から再構成的に超解像画像を取得する 3D-STORM 顕微鏡法と励起範囲を光学的に局限させる STED 顕微鏡法の 2 方式の超解像顕微鏡システム開発を行った。一分子蛍光画像データから分子の存在位置を推定する最尤推定法を採用したアルゴリズムを GPGPU 上に実装した解析ソフトウェアを開発し、超解像イメージの高速取得を実現した。また、超解像イメージから超分子構造の特徴を客観的に抽出し、分子の空間分布を評価するために Ripley の K 関数法を組み込んだ解析ソフトウェアを完成させた。複数種の分子の超分子構造のシナプス内での空間パターンの比較のための光学系の設計・実装及び異なった分子間の空間的位置関係を評価する pair correlation 関数などを利用した空間分布解析系を構築した。

シナプス機能—シナプス分子超分子構造連 関の解析プラットフォームの確立

グルタミン酸イメージングによってプレシナプス機能評価を行ったシナプスでシナプス分子の超分子構造を解析する解析プラットフォームを構築した。グルタミン酸イメージングによってシナプスの特性の評価を終えた標本を免疫染色し、超解像イメージングによって個々のシナプス毎にシナプス機能とシナプス分子の超分子構造との直接的な対応付けを可能にした。この解析プラットフォームを導入し、Munc13-1 分子がプレシナプスのアクティブゾーンで形成する直径 70 nm 程度の分子クラスターの個数がシナプス小胞の放出部位の数を規定することを明らかにした。

精神疾患モデルでのシナプス分子超分子構造の解析

シナプス分子の超分子構造の変容の検索を先行研究において精神疾患様の行動が確認されている DISC1 ノックアウトマウス、Shank3 ノックアウトマウス、Nuroigin-3 変異導入マウス、Schnurri-2 ノックアウトマウスの大脳皮質、海馬、小脳、線条体の脳スライス標本で行った。Schnurri-2 ノックアウトマウスの解析では海馬においてグルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットがシナプスにおいて 80 nm 程度のナノクラスターを形成すること、Schnurri-2 ノックアウトマウスではこのナノクラスターの大きさ、数が著明に減少していることを見出した。

DISC1 ノックアウトマウスの解析では、線条体側坐核においてドパミン受容体 2 型サブユニット (D2R) が 70 nm 程度のナノクラスターを形成すること、DISC1 ノックアウトマウスではこのナノクラスターの大きさ、数が増加していることを見出した。加えて、DISC1 ノックアウトマウスの線条体側坐核の medium spiny neuron のスパインの数が野生

型のものとは比べて著しく減少していることも見出した。ここで同定した D2R のナノクラスターやスパイン形態の変容は非定型統合失調症治療薬であるクロザピンの投与によって野生型のレベルまで回復することを明らかにした。以上の成果は本計画研究で目標とした疾患モデル動物のシナプスレベルでのマイクロエンドフェノタイプの同定を達成したことを示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Isa M, Namiki S, Asanuma D, and *Hirose K. Spatiotemporal Control of Receptor Tyrosine Kinase Activity by Caged Ligands. *Chem Lett*, 44, 150-1 (2015), 査読有
DOI:10.1246/cl.140901
- ② Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N & *Hirose K. High-throughput development of hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission. *Angew Chem Int Ed Engl*. 53, 13439-43 (2014), 査読有
DOI:10.1002/anie.201407181
- ③ Isa M, Asanuma D, Namiki S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, *Hirose K. High-Throughput Screening System To Identify Small Molecules That Induce Internalization and Degradation of HER2. *ACS Chem Biol.*, 9, 2237-41 (2014), 査読有
DOI:10.1021/cb500654q
- ④ Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, *Hirose K. Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics. *Angew Chem Int Ed Engl*. 53, 6085-9. (2014), 査読有

DOI:10.1002/anie.201402030

- ⑤Tokunaga T, Namiki S, Yamada K, Imaishi T, Nonaka H, Hirose K, Sando S. Cell surface-anchored fluorescent aptamer sensor enables imaging of chemical transmitter dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 9561-4 (2012), 査読有
DOI:10.1021/ja302551p

[学会発表] (計 2 1 件)

H28 [学会発表] 計 (1) 件

- ①大西泰地、統合失調症モデルマウス腹側線条体における DRD2 空間分布の変容、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎新聞文化ホール (長崎県長崎市)

H27 [学会発表] 計 (5) 件

- ②大西泰地、Subregion-specific alteration of DRD2 expression in the striatum of model mice of schizophrenia、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ③中山翔太、Analysis of synaptic molecular arrangement in a mouse model of schizophrenia、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ④廣瀬謙造、The Imaging Technology to Investigate Synaptic Transmission、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 12 日、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)
- ⑤有吉 哲郎、Molecular mechanisms for the formation of Munc13-1 nanoclusters at presynaptic terminals、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ⑥廣瀬謙造、Synaptic Function Illuminated by a Hybrid-Type Fluorescent Glutamate Probe、New Biological Frontiers Illuminated by Molecular

Sensors and Actuators、2015 年 6 月 30 日、Taipei (Taiwan)

H26 [学会発表] 計 (5) 件

- ⑦有吉哲郎、シナプス前部における Munc13-1 ナノクラスター形成の分子機構について、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑧金原直也、超解像顕微鏡によって視覚化されたシナプス前終末におけるカルシウムチャンネルの空間配置、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑨廣瀬謙造、超解像顕微鏡法によるシナプス機能を担う分子構築の解明、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑩並木繁行、Supramolecular assemblies of synaptic proteins for synaptic vesicle release site at central synapses、17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)、2014 年 7 月 16 日 ~ 7 月 17 日、Cape Town International Convention Centre、ケープタウン (南アフリカ共和国)
- ⑪金原直也、Analyzing molecular basis of neurotransmitter release with fluorescent glutamate imaging、17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)、2014 年 7 月 16 日 ~ 7 月 17 日、Cape Town International Convention Centre (南アフリカ共和国、ケープタウン)
- H25 [学会発表] 計 (8) 件
- ⑫武井大祐、細胞スクリーニングを介した自閉症関連遺伝子の探索、第 87 回日本薬理学会、2014 年 3 月 21 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ⑬瀧川健司、シナプス伝達を可視化する蛍光性グルタミン酸センサーの開発、第 87 回日本薬理学会、2014 年 3 月 20 日、仙台国

際センター (宮城県仙台市)

⑭廣瀬謙造、中枢神経系におけるグルタミン酸および ATP の蛍光イメージング、STROKE2014、2014年3月14日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

⑮廣瀬謙造、Supramolecular assembly controls neurotransmitter release、第36回日本分子生物学会年会、2013年2月4日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

⑯廣瀬謙造、ナノスコーピーによる精神病態へのアプローチ、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、2013年10月26日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

⑰金原直也、グルタミン酸イメージング技術を用いた神経伝達物質放出の分子基盤の解析、第36回日本神経科学大会、2013年6月21日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑱金原直也、Analyzing molecular basis of presynaptic function with fluorescent glutamate indicator、第6回MCCS-Asiaシンポジウム、2013年6月19日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑲瀧川健司、シナプス伝達を可視化する高性能グルタミン酸センサーの開発、第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2013年5月31日、横浜赤レンガ倉庫 (神奈川県横浜市)

H24 [学会発表] 計 (2) 件

⑳瀧川健司、シナプス伝達を可視化する高性能グルタミン酸センサーの開発、第86回日本薬理学会年会、2013年3月22日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

㉑金原直也、グルタミン酸イメージングによるプレシナプス機能を制御する分子基盤の解析、第35回日本神経科学大会、2012年9月19日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: 新規蛍光標識方法、発明者: 廣瀬謙造・浅沼大祐・並木繁行・田中理恵子、権利者: 国立大学法人東京大学、種類: 特許、番号: 特願 2017-7952、出願年月日: 2017年1月19日、国内外の別: 国内

②名称: 酸性環境検出蛍光プローブ、発明者: 浦野泰照・長野哲雄・浅沼大祐・廣瀬謙造・並木繁行・高岡洋輔、権利者: 国立大学法人東京大学、種類: 特許、番号: 特願 2013-532636、出願年月日: 2011年9月7日、国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 謙造 (HIROSE, Kenzo)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00292730

(2) 連携研究者

浅沼 大祐 (ASANUMA, Daisuke)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 10611204

並木 繁行 (NAMIKI, Shigeyuki)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90452193