

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14330

研究課題名(和文)なぜシナプスには複数のシナプス接着分子が必要なのか ナノドメイン仮説

研究課題名(英文)Why there are multiple synaptic adhesion molecules in single synapse? - Nanodomain hypothesis

研究代表者

林 康紀 (Hayashi, Yasunori)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90466037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまで複数のシナプス接着因子が同定されているが、一種類のシナプスでなぜ複数が共存するのは判っていない。我々は異なった複数のナノドメインを形成しているという仮説をたてた。ニューロリギンとEphBを対象に、まず超高解像度免疫染色の条件検討した。シナプス後部タンパク質であるHomerに関しては予想通りシナプスに集積している画像が得られた。一方、ニューロリギンおよびEphBに関しては、シグナルが非常に弱く、確信が持てるシグナルが得られていない。いずれも膜タンパクであり、コピー数が少ないことが原因と考えられる。このため、現在、タグを付けた構築を作成し、同様に免疫染色することを試みている。

研究成果の概要(英文)：Multiple synaptic adhesion factors have been identified so far but why they coexist in one type of synapse is not clear. We hypothesized that each of them forms different nano-domain. In order to test this, we carried out super-resolution imaging of immunostaining signal of neuroligin and EphB. We could observe distribution of a postsynaptic protein Homer, as expected from its postsynaptic function. On the other hand, for neuroligin and EphB, the signal was too weak to convincingly conclude anything. Both are membrane protein and we speculated that low copy number of proteins. Therefore, we are currently generating epitope-tagged constructs.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 細胞接着因子 超高解像度顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

シナプスでは前部と後部が厳密に一致した構造を保っている。それに必要な分子がシナプス接着因子と呼ばれる一連の分子であり、いずれもシナプスの前部と後部に対となって発現し、シナプス構造の形成、維持や機能調節に働いている。ニューレキシン、ニューロリギンが一番はじめにシナプス構造の誘導に必要充分である事が示されて以来、カドヘリン、エフリン、免疫グロブリンドメイン蛋白質(SynCAM, LAR-type RPTPs, NCAM/L1)、LRR (leucine-rich repeat) 蛋白質、インテグリン、 δ 受容体・セレベリンといった多様な構造を持つ分子が同定され機能解析がなされてきた。この為、過剰発現や shRNA によるダウンレギュレーションによるシナプスの形態や数の変化、mEPSC の頻度と振幅の測定、結合タンパク質の同定、非神経細胞との共培養系によるシナプス誘導といった解析がなされ、以上で挙げた多くの分子はどれも似た様な活性を持つ事、すなわちシナプス形成や維持に必要であるという事が認められた。

2. 研究の目的

これらの一連の研究から新たな疑問が生じた。それは、このような複数のシナプス接着因子が同じシナプスに共存している意味は何かという点である。本研究では、シナプス接着因子には時空間特異的な機能差異があるのではないかと考え、超高解像度顕微鏡と二光子顕微鏡を組み合わせる事により、次の様な specific aim をたて研究を進めた。

S.A.1: 超高解像度顕微鏡を用いた、シナプス接着因子のナノドメインでの局在の検討

仮説：シナプスは光学顕微鏡では点状に観察され、均一なものと思われがちであるが、電子顕微鏡観察からはシナプス後部では複雑な構造をした PSD、その周辺領域、接着斑、一

方シナプス前部にも接着斑、活性帯が存在する。このようなナノドメインにはそれぞれ特有なシナプス接着因子が存在すると考え、それぞれの接着分子で規定されるシナプスナノドメインの概念を確立する。

S.A.2: pH 感受性 GFP 融合蛋白質とグルタミン酸脱ケージ化を用いたシナプス接着因子のスパインへの移行の観察

仮説：長期増強現象にあたり様々な蛋白質がシナプスへ移行していく。蛋白質の種類によって移行するタイミングは異なり、AMPA 型受容体、アクチンとその調節因子がまずシナプスへ移行し、その後アクチン束化蛋白質が続く。シナプス接着因子もいずれかの段階でシナプスへ移行すると考えられるが、分子種により移行するタイミングに差がある可能性がある。それぞれの因子を pH 感受性 GFP 融合蛋白質として LTP 誘導後のシナプスへの移行を観察していく。

個々のシナプス接着因子を詳細に研究した報告はあるが、同じシナプスに共存する複数のシナプス接着因子が存在する意味を考えた研究は無かった。それぞれがナノドメインを形成し、シナプス可塑性において異なった時空間機能を持っているというアイデアはこれまで検討された事は無くユニークである。この研究によりシナプスナノドメインの実態と機能が明らかになると期待される。

3. 研究の方法

シナプスにシナプス接着因子で規定される複数のナノドメインが存在するかを検討する為、超高解像度顕微鏡 STORM 及び structured illumination microscopy (SIM)を用いてそれを検出した。現時点では STORM は 2 色の蛍光免疫染色が出来る為、複数の抗体を組み合わせる事により、どのシナプス接着因子がどのナノドメインに共存するかを検討することを試みた。我々は Nikon 社製

3D-STORM/SIM システムを所有しており、STORM を用いてシナプス前部の Piccolo と後部 PSD 蛋白質の Homer を二重染色した所、シナプス間隙を挟んで両者が分離して観察される事、また Zhuang によって報告された軸索のアクチンとスペクトリンからなる-180 nm からなる周期構造を確認している。また接触面が 300 nm ほどの長さである事も確認しており、実験の為に必要な機器と技術の準備はできている。

海馬分散培養神経細胞は常法に従い、P2-3 のラット新生仔から作成した。シナプスが成熟する 2 週以降、固定し免疫染色に用いた。免疫染色は dSTORM を用い、観察した。これは、特殊な色素がいらす、ほぼ普通の免疫染色と同様にできる為、多数の蛋白質を様々な抗体で免疫染色するのに便利である。対象とする蛋白質は、海馬シナプスでの機能が示唆されているニューロリギン、N-カドヘリン、エフリン、免疫グロブリンドメイン蛋白質 (SynCAM, LAR-type RPTPs, NCAM/L1)、LRR (leucine-rich repeat) 蛋白質、インテグリン、グルタミン酸 δ_1 受容体、セレベリンを候補としたが、検討の結果、まずニューロリギンおよび EphB 二種の分子について検討した。二次抗体は Alexa 568 ならびに 647 を用い、イメージングは 100 mM β -mercaptoethylamine (MEA) 存在下、pH 7.4 で行った。イメージングには 100 倍油浸レンズを用い、蛍光分子の活性化は 405 nm のパルスレーザーを全反射照明にて行い、イメージングには 561 nm と 647 nm を用いた。各画像最低 50,000 の輝点を取得する。画像解析には付属のソフトを用いた。

4. 研究成果

ニューロリギンと EphB を対象に、まず超高解像度免疫染色の条件検討を行った。ニューロリギンまたは EphB のポリクローナル抗体とシナプス後部タンパク質の Homer のモ

ノクローナル抗体を用い、海馬分散培養に対して免疫染色を行った上で、超高解像度観察を行った。同時に、免疫染色がうまくいっているかを確認するために、共焦点顕微鏡による観察を行った。

Homer に関しては、細胞質に存在するタンパク質であり比較的コピー数が多いのと、当研究室での蓄積があり、良い抗体がわかっていたため、比較的簡単に予想されるのと近い画像が得られた。

一方、ニューロリギンおよび EphB に関しては、シグナル強度が非常に弱く、確信が持てるシグナルが得られていない (図 1、2)。

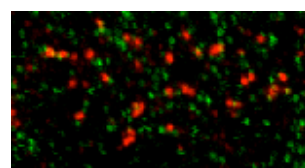
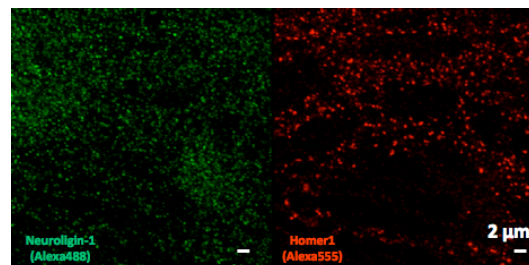


図 1.ニューロリギン 1 と Homer の二重染色画像。上：STORM 画像、下：共焦点顕微鏡 (拡大)。Homer は、シナプス後部タンパク質であり、シナプスのマーカーとして用いた。ニューロリギン 1 のシグナルは神経細胞の分布とは関係なく存在する。

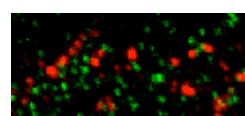
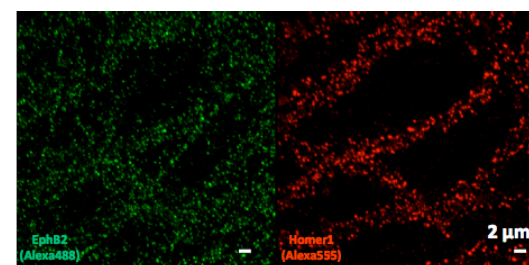


図 2.EphB2 と Homer の二重染色画像。上：STORM 画像、下：共焦点顕微鏡 (拡大)。

ある程度シナプスとの共存が見られるが、シナプス以外にも点状に存在し、何を観察しているのが問題となる。

いずれも膜タンパクであり、コピー数が少ないことが綺麗な免疫染色像が得られない原因と考えられる。このため、現在、FLAG タグを N 末端に付けた構築を作成し、それをレンチウイルスベクターで導入し、同様に免疫染色することを試みている。FLAG タグに関しては、良い抗体が知られている。また、免疫染色の特異性に関しては CRISPR/CAS9 を用いた、ノックダウンを行い、シグナルが消失することを確認する。

また、そのほかカドヘリンなどの免疫グロブリンスーパーファミリー、グルタミン酸受容体などについても検討を行っていく。これが確認できれば、S. A. 2 で記述した、グルタミン酸アンケーシング実験も行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kim K, Lakhnopal G, Lu HE, Khan M, Suzuki A, Hayashi MK, Narayanan R, Luyben TT, Matsuda T, Nagai T, Blanpied TA, Hayashi Y, Okamoto K. A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron*. 2015c Aug 19;87(4):813-26. 査読有
2. *Sakaguchi M, Kim K, Yu LM, Hashikawa Y, Sekine Y, Okumura Y, Kawano M, Hayashi M, Kumar D, Boyden ES, McHugh TJ, Hayashi Y. Inhibiting the Activity of CA1 Hippocampal Neurons Prevents the Recall of Contextual Fear Memory in Inducible ArchT Transgenic Mice. *PLoS One*. 2015 Jun 15;10(6):e0130163. 査読有
3. Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto

T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, Murayama M. A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception. *Neuron*. 2015b Jun 3;86(5):1304-16. 査読有

4. Sato M, Kawano M, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Nakai J, Hayashi Y. Generation and Imaging of Transgenic Mice that Express G-CaMP7 under a Tetracycline Response Element. *PLoS One*. 2015 May 6;10(5):e0125354. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Hayashi Y. Role of cytoskeleton in synaptic plasticity. Student Symposium SPP 2016.02.25, Kloster Kostenz, Regensburg, Germany
2. Hayashi Y. Visualization of neuronal assembly in hippocampal CA1 during spatial memory task. 7th MCCS-Asia Meeting (The 6th FAONS Congress and the 11th Biennial Conference of CNS) 2015.09.20, Wuzhen, Zhejiang, China

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 康紀 (HAYASHI, Yasunori) 国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー 研究者番号:

90466037

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし