

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500317

研究課題名(和文) シナプス伝達効率を左右する因子の戦略的配置の可視化

研究課題名(英文) Visualization of strategic localization of synaptic molecules

研究代表者

釜澤 尚美(KAMASAWA NAOMI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・特任助教

研究者番号：50455218

研究成果の概要(和文)：聴覚系の神経細胞間の情報伝達を行うシナプス領域では、伝達物質の放出を制御するタンパク分子と受け側の伝達物質受容体が、協調しながら劇的に形態変化することで、音が聞こえる時期に合わせて、それぞれの分子の配置が空間的に完成される様子を電子顕微鏡法によって可視化した。

研究成果の概要(英文)：Synaptic membrane molecules, glutamate receptors and calcium channels were ultrastructurally visualized in the calyx of Held synapse using freeze-fracture replica immunogold labeling methods. Presynaptic and postsynaptic components were synchronously localized to the synapses at the timing of the onset of hearing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経超微形態学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳・神経、シナプス、受容体、チャネル、電子顕微鏡、レプリカ標識法

1. 研究開始当初の背景

シナプス後部の受容体分子はシナプス部位で約10～100倍の密度に凝縮されて存在し、放出される伝達物質を効率よく受け取ることができるように配置されている。また、神経伝達物質の放出・受容・回収に関与する複数の膜タンパク分子相互の位置関係は、シナプス伝達の過程において、どの分子がどのように活性化されるかという効率を大きく左右すると考えられる。このような膜タンパク分子の会合様式や相互の位置関係は、蛍光顕

微鏡法や超薄切片法による電子顕微鏡法では解析できない課題であり、凍結切断レプリカ標識法によって膜タンパク分子の空間的配置について解析を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ラット、マウスの脳組織について、レプリカ免疫標識法を用いてシナプスの伝達効率を左右する膜タンパク分子を標識し、それぞれの膜タンパクがシナプス前・

後の膜上でどのような位置関係で配置しているのかを明らかにすることを目的とし、グルタミン酸作動性シナプスにおける、シナプスの伝達効率を制御する膜タンパク分子の空間的配置を電子顕微鏡レベルで可視化した。

3. 研究の方法

動物はホルムアルデヒドで還流固定後、脳切片を加圧凍結法で凍結した。凍結試料を切断、金属蒸着によってレプリカ膜を作製し、SDS 溶液中でレプリカ下の生物試料を溶解した。その後、レプリカに抗原抗体反応を施した。グルタミン酸受容体の検出は抗 GluA 抗体、抗 GluN 抗体を用い、シナプス前膜のアクティブゾーンに存在するタンパクに関しては、レプリカ標識法で利用可能な抗体を探索した。抗体の特異性はノックアウト動物を利用して適宜行った。

4. 研究成果

(1) Calyx of Held シナプスにおけるグルタミン酸受容体の形態形成

聴覚系のシナプスでは、数百ヘルツ以上の周波数で送られてくる信号を正確に伝達する必要があるため、伝達効率に優れたシナプスが形成されていると考えられる。本研究では、台形体核に存在する calyx of Held シナプスに着目し、生後 1-3 週間の発育段階における受容体タンパクの凝集形態の変化と、それらの受容体クラスター内の AMPA 型、NMDA 型の各グルタミン酸受容体の局在、分布の変化を詳細に解析した。

その結果、生後 1 週目では膜タンパク分子がゆるく凝集したクラスター (図 1、黄色) が数多く存在し、かつ、シナプス前終末と MNTB 主要細胞が接着している部分では、受容体に対する標識がクラスターの外側にも多く観察された (図 1、P7)。聴覚系がほぼ完成する生後 2 週目では、膜タンパク分子がクラスター内でより凝縮し、それらには AMPA 型グルタミン酸受容体の標識が集中した。NMDA 型に対する標識は 1 週目に比べて減少した (図 1、P14)。生後 3 週目では膜タンパクのクラスター数は減少し、膜タンパク分子は非常に高密度に凝集した。これらのクラスターには NMDA 型受容体に対する標識はほぼ消失し、AMPA 型受容体に対する標識のみが集中した (図 1、P24) (学会発表⑦、⑨)。

さらに、双面レプリカ標識法でグルタミン酸受容体の挙動を解析した。凍結切断時には

脂質二重膜の中央で物理的な割断が生じることが知られているが、グルタミン酸受容体は、他の多くの膜タンパクと異なり、通常はそのほとんどが細胞外側 (E-face 側) に移行する。しかし、生後 3 週間までの calyx of Held シナプスでは、グルタミン酸受容体の割断時の膜内移行の様子が異なっており、相当数の受容体分子が細胞質側 (P-face 側) に存在していることが確認できた。同じ生育段階の動物で電気生理学の結果から推定されたグルタミン酸受容体の数は、切断面の両側に振り分けられた受容体数にほぼ等しいことが推測された。また、これらの形態学的な結果は、シミュレーションを介することで、電気生理で得られた結果と比較できることを提案した (学会発表④ - ⑥)。

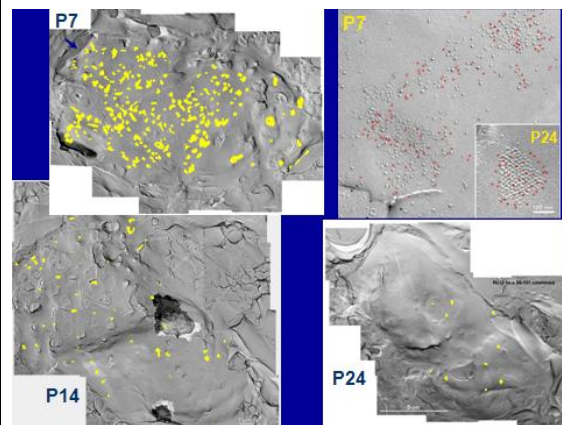


図 1 生後 1-3 週間のグルタミン酸受容体クラスター配置 (黄色) とタンパク分子の凝集 (右上)

(2) シナプス前膜に存在する P/Q 型カルシウムチャネルの局在変化

シナプス小胞を放出する機構においては、カルシウムチャネルが放出を直接制御する分子として非常に重要な役割を持つ。しかしこれまで、組織化学で使用可能なカルシウムチャネルに対する抗体が非常に限られていたことから、カルシウムチャネルの局在様式に関しての形態学的な情報はほとんど明らかになっていない。

本研究では、P/Q 型カルシウムチャネルに対する入手可能な抗体の中から、レプリカ標識法で使用できる抗体を発見し、calyx of Held シナプスにおけるカルシウムチャネルの局在を電子顕微鏡レベルで可視化することに成功した。興味深いことに、本シナプスにおいては生後 1-3 週間の発育段階で、シナプス後膜のグルタミン酸受容体のクラスター化に対応したように、シナプス前膜のカルシウムチャネル、およびシナプス前タンパク複合体に存在する CAST や Rim1 といったタン

パクもアクティブゾーン領域内にクラスタ一化していく様子が明らかになった (図2) (学会発表③)。

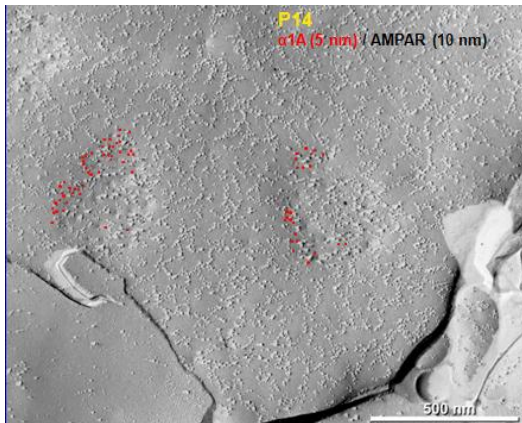


図2 生後2週間の calyx of Held シナプスにおける P/Q 型カルシウムチャネルの分布 (赤)

本研究によって、シナプス形態形成におけるシナプス前後の協調した発達過程を可視化することができたと考える。(1) (2) に述べた成果については、現在報文を準備中である。また、同様の抗体を用いて小脳でも解析を開始し、プルキンエ細胞に形成されるシナプスにおいても P/Q 型カルシウムチャネルの局在様式を明らかにした (学会発表②)。

(3) シナプス前終末に存在するグルタミン酸受容体の存在

シナプス前受容体の存在については長年の議論が続いているが、本研究では他の組織化学的手法に比べて検出の感度が高い、凍結切断レプリカ標識法を用いて検出を検討した。海馬 CA3 領域、線条体核、台形体核を用いて、AMPA 型、NMDA 型のそれぞれのグルタミン酸受容体について実験を行った。その結果、シナプス前膜上には、非常に低い密度で金粒子の反応が認められ、その受容体数は電気生理学の実験結果から計算される受容体数とほぼ等しかった。しかし、シナプス前膜では、後膜受容体のような膜タンパク分子の凝集といった特徴的な構造は観察されず、金粒子の反応が真の標識であるという確証は得られなかった。

(4) レプリカ標識法の発展と応用

① 双面レプリカ標識法

本研究では、通常のレプリカ標識法の応用である双面レプリカにおいて、試料の切断、および金属蒸着条件について最適化を行い、より詳細に膜タンパク分子

の局在様式を解析できるようになった。そして、網膜における電氣的シナプスの構成タンパクについて、チャンネルを形成する二つの細胞が2種類のタンパクを発現し、同じタンパク種同士で結合していることを初めて形態学的に明らかにし、論文として報告した (学会発表⑧、雑誌論文②)。

膜タンパク分子が形成する構造は、百ナノメートルの場合が多く、その構造内での分子の局在を可視化することは、光学顕微鏡では非常に困難である。レプリカ標識法は、2次元の面として生体膜を観察し、分子の会合様式を直接可視化しながら、抗原抗体反応によって分子の同定が可能であるという利点がある。本結果は、ギャップ結合内で異なる分子種がセグメントを形成し、かつ、接着する2つの細胞でそのセグメント同士が空間的に完全に一致した事実を双面レプリカ法の応用により明らかにできた成果であると考えられる。

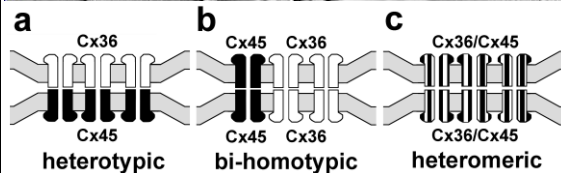
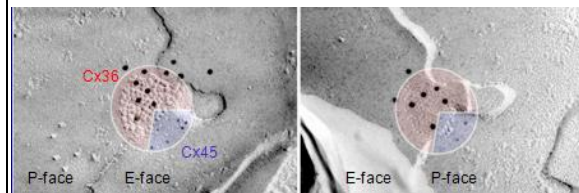


図3 網膜神経細胞間のギャップ結合双面レプリカ標識像
2つの細胞がそれぞれ2種類のコネクシン (Cx36 と Cx45) を発現し、かつ、同じコネクシン同士がセグメントを形成してチャンネルとして機能する bi-homotypic 結合(b)であることが明らかになった。
(Li, Kamasawa et al. 2008)

② レプリカ標識法における新技術の開発として、これまでの金に代わって、種々のナノ粒子を標識物質として用い、粒子の元素の違いを検出して抗原部位を同定する可視化技術を開発し報告した。本法はさらに、ナノ粒子によって目的の抗原を従来法よりも高密度に標識する方法として実現できる可能性を示した (雑誌論文①)。さらに、通常は銀増感等により大きさを増さなければ、透過型電子顕微鏡での観察が不可能なナノ金粒子を、直接可視化する技術として、STEM 暗視野観察法を確立した。ナノ金粒子でグルタミン酸受容体を標識したところ、通常法の5nm 金粒子で標識した場合の約3倍の標識効

率が得られることが判明した。本件については引き続き観察条件の検討および詳細な解析が必要である。

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 2 件)

① Loukanov A, Kamasawa N, Danev R, Shigemoto R, Nagayama K, Immunolocalization of multiple membrane proteins on a carbon replica with X STEM and EDX, Ultramicroscopy, 査読有、110 巻、2010、366-374

② Li*, N Kamasawa*, C Ciolofan, CO Olson, S Lu, KGV Davidson, T Yasumura, R Shigemoto, JE Rash, JI Nagy、Connexin45-Containing Neuronal Gap Junctions in Rodent Retina Also Contain Connexin36 in Both Apposing Hemiplaques, Forming Bihomotypic Gap Junctions, with Scaffolding Contributed by Zonula Occludens-1, The Journal of Neuroscience、査読有、28 巻、2008、9769-9789

[学会発表] (計 11 件)

① 釜澤尚美 「生体分子の局在分布から機能を考える」日本顕微鏡学会 生体構造解析分科会 2010 年度研究討論会 2010 年 12 月 27 日 湯沢ニューオータニホテル (新潟県)

② Dwi Wahyu Indriati, Naomi Kamasawa, Masahiko Watanabe, Ryuichi Shigemoto 「Quantitativeocalization of $\alpha 1A$ subunit of P/A type calcium channel in rat cerebellum as revealed by SDS-Freeze Fracture replica labeling」7th FENS (Forum of European Neuroscience) 2010 年 7 月 7 日 アムステルダム (オランダ)

③ 釜澤尚美、渡辺雅彦、重本隆一 「凍結切断レプリカ標識法によるカルシウムチャネルとグルタミン酸受容体の局在解析」日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 2010 年 5 月 25 日 名古屋国際会議場 (愛知県)

④ Naomi Kamasawa, Ko Matsui, Timotheus Budisantoso, Ryuichi Shigemoto Developmental clustering of glutamate receptors in the Calyx of Held synapses」Neuroscience 2009 2009年9月17日 名古屋国際会議場 (愛知県)

⑤ Naomi Kamasawa, Ko Matsui, Timotheus

Budisantoso, Ryuichi Shigemoto、Development and function of glutamate receptor clustering in the Calyx of Held synapses. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences 2009年7月28日 京都国際センター (京都府)

⑥ 釜澤尚美、重本隆一 双面レプリカ標識法を用いたシナプスの観察 日本顕微鏡学会第65回学術講演会 2009年5月27日 仙台国際センター (宮城県)

⑦ 釜澤尚美、重本隆一 凍結切断レプリカ標識法で観察した台形体核グルタミン酸作動性シナプスの発達過程 日本顕微鏡学会第65回学術講演会 2009年5月27日 仙台国際センター (宮城県)

⑧ Naomi Kamasawa, X Li, KGV. Davidson, T Yasumura, JI NAGY, R SHIGEMOTO, JE RASH、Double-replica labeling reveals that connexin-45 is accompanied by connexin-36 adult rodent retina, forming bi-homotypic gap junctions. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 19 日、Washington DC, USA

⑨ 釜澤尚美、重本隆一、台形体核におけるグルタミン酸作動性シナプスの凍結切断レプリカ標識法による解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会、2008 年 5 月 22 日、京都国際センター (京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

釜澤 尚美 (KAMASAWA NAOMI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・特任助教

研究者番号：5 0 4 5 5 2 1 8