

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21220008

研究課題名(和文) シナプス構造の分子解剖

研究課題名(英文) Molecular Anatomy of Synaptic Structure

研究代表者

岡部 繁男 (OKABE, Shigeo)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60204012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 111,500,000円、(間接経費) 33,450,000円

研究成果の概要(和文)：PALM(あるいはSTORM)法は一分子蛍光の検出を利用した高解像度光学顕微鏡法である。一個のシナプス後肥厚部(PSD)は直径500nm以下の微細なディスク状構造であり、PALM法によりその内部構造を捉えることが可能である。本研究では、蛍光蛋白質で標識されたPSDおよびスパインについて、PALM法を用いてその内部の分子分布を検出した。更にシナプスの発達の過程とシナプス可塑性が起こった後のPSD内の分子分布の変化を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：PALM and STORM are superresolution imaging techniques based on detection of single fluorescent molecules. Although postsynaptic densities (PSDs) are disc-like microstructures with their diameters of less than 500 nm, PALM and STORM are able to resolve their internal structure. In this study, fluorescently labeled PSDs and spines were visualized by using PALM and the molecular distributions within these structures were detected. Furthermore, we could successfully detect distributional changes of PSD molecules during development of synapses and after induction of synaptic plasticity.

研究分野：総合領域

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：分子神経生物学 シナプス後肥厚部 超解像顕微鏡 二光子顕微鏡 シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

光学的測定技術を応用したシナプス研究はその進展が急速であり、シナプス可塑性に伴うシナプス部位における分子の局在変化やシナプス構造の変化について多くの知見が得られている。シナプスのサイズは約2-3ミクロン程度と非常に小さく、その内部における分子位置や機能変化を読み出すための技術が必要である。スパイン頭部内に存在するシナプス後部膜分子が、他の機能分子とどのように関連しているのか、その詳細を明らかにするためには新たな方法論を開発する必要がある。また光学的測定を利用したシナプス研究のもう一つの重要な流れとして、生体内でのシナプスのイメージング(in vivo imaging)が挙げられる。シナプスの形成・維持機構を理解するには in vitro の実験結果を in vivo で検証することが極めて重要であり、両者をつなぐ方法論の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究計画では以下の二つの具体的目標を設定した。

- (1) シナプス後肥厚部(PSD)内部構築の高解像度観察法の開発
- (2) 上記手法の in vivo シナプス解析への応用

蛍光蛋白質で標識された PSD およびスパインについて、PALM 法を用いてその内部の分子分布を検出し、シナプス形成に伴う PSD の構造と分子分布の変化を明らかにすることを第一の目標とする。第二に、蛍光蛋白質の活性を維持したまま電子顕微鏡用の樹脂に脳組織を包埋し、超薄切片を作成する方法(Array tomography 法)を PALM 法と融合する。更に in vivo imaging を行って新規のシナプスを同定した後、Array tomography 法と PALM 法による解析を行う。脳内でのシナプス形成・リモデリングと、PSD の微細構造の関連を解析し、PSD の構築原理の解明を目指す。

3. 研究の方法

高解像度顕微鏡システムを構築するために、レーザー光学系の設計、装置の組み立て、画像解析ソフトウェアの開発を行い、PALM 法を高い位置決め精度で行うための装置を完成させた。この装置で取得する PALM 画像をタイムラプス観察と組み合わせ、シナプス形成のタイミングと PSD の微細構造の関係を解析した。Array tomography 法を行い、in vivo imaging で観察した構造の再観察の手法、array tomography 用の超薄切片の PALM/STORM 法による観察の実験条件を最適化した。50-500 nm 程度の樹脂包埋切片について、発現させた蛍光蛋白質のシグナルを維持させつつ、抗体によってシナプス構造を可視化することに成功した。In vivo imaging により生後早期の大脳皮質におけるスパイ

ンと PSD のターンオーバーを定量的に解析するための実験条件を最適化した。

4. 研究成果

(1) PALM 法を用いたシナプス内部における分子分布の決定

高精度の位置情報を取得可能な新しい顕微鏡システムを構築した。この装置で位置決め精度として 20 nm 以下を達成した。

蛍光活性化が可能な複数の蛍光蛋白質(Dronpa, Dendra, EosFP, PA-tagRFP)について、シナプス分子(PSD-95, Shank, Homer などのシナプス足場蛋白質)との融合蛋白質を作成・評価し、イメージングに利用可能なブローブを複数得た。

PALM 法により単分子の位置情報の高精度取得とシナプス微細構造の検出に成功した。

この手法とタイムラプスイメージングを組み合わせ、新しく形成された PSD、安定に維持されている PSD の微細構造の特徴をそれぞれ抽出することに成功した。

培養細胞のシナプスに可塑的变化を誘導した際のシナプス足場蛋白質の分布変化を PALM 法により同定することに成功した。

(2) In vivo imaging 法によるマウス大脳皮質におけるシナプスリモデリングの特徴抽出と PSD 分子構築の解析

子宮内電気穿孔法により神経前駆細胞に蛍光蛋白質で標識した PSD 分子を発現させ、大脳皮質の生後早期発達期におけるシナプス動態を明らかにした。次に in vivo imaging で同定された新規シナプス・安定シナプスについて、その PSD の微細形態の特徴を PALM 法によって明らかにする技術を確立した。具体的には、電子顕微鏡観察に利用される超薄切片法を応用して、まず脳組織を固定し、樹脂包埋後に厚さが 50-数百ナノメートル程度の超薄切片を作成し、切片内に水平に含まれる PSD 構造について、蛍光イメージングおよび PALM 法による分子分布解析を行った。本手法により、個体で観察されたシナプスの分子構築を組織固定後に再度高分解能で観察することが可能となった。

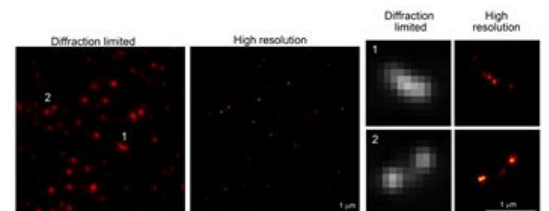


図1 組織切片での PSD-95 の STORM 法による超解像画像

(3) 培養細胞系でのシナプス構造と分子構築の蛍光イメージングを実施し、シナプスが形成される際の神経細胞種、シナプス部位別の多様な形態形成とそれに関与する分子を

同定することに成功した。例としては抑制性神経細胞上に形成される興奮性シナプスの移動現象の解明、小脳の平行線維とプルキンエ細胞の間でのシナプス形成の過程で現れる軸索からの微小突起の機能、海馬錐体細胞のスパインシナプスの形成を樹状突起の成長端で抑制する分子メカニズムの同定などである。

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 18 件)

Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., Takumi, T. and S. Okabe. Enhanced synapse remodeling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nature Communications*, 査読あり in press.

Ito-Ishida, A., Kakegawa, W., Kohda, K., Miura, E., Okabe, S. and M. Yuzaki. Cbln1 down-regulates the formation and function of inhibitory synapses in mouse cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience* 39, 1268-80, 2014, 査読あり.
doi: 10.1111/ejn.12487.

Dai X., Iwasaki H., Watanabe M. and S. Okabe. Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. *European Journal of Neuroscience* 39, 531-47, 2014, 査読あり.
doi: 10.1111/ejn.12413.

Obashi, K. and S. Okabe. Regulation of mitochondrial dynamics and distribution by synapse position and neuronal activity in the axon. *European Journal of Neuroscience* 38, 2350-2363, 2013, 査読あり.
doi: 10.1111/ejn.12263.

Shin, E., Kashiwagi, Y., Kuriu, T., Iwasaki, H., Tanaka, T., Koizumi, H., Gleeson, J. G. and S. Okabe. Doublecortin-like kinase enhances dendritic remodeling and negatively regulates synapse maturation. *Nature Communications* 4, 1440, 2013, 査読あり.
doi: 10.1038/ncomms2443.

Ito-Ishida, A., Miyazaki, T., Miura, E., Matsuda, K., Watanabe, M., Yuzaki,

M and S. Okabe. Presynaptically released Cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation. *Neuron* 76, 549-564, 2012, 査読あり.
doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.027.

Kawabata, I., Kashiwagi, Y., Obashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., Wynshaw-Boris, A., Yanagawa, Y., Okabe, S. LIS1-dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nature Communications* 3, 722, 2012, 査読あり.
doi: 10.1038/ncomms1736.

Hirai, S., Miwa, A., Ohtaka-Maruyama, C., Kasa, i M., Okabe, S., Hata, Y, and H. Okado. RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex. *EMBO Journal* 31, 1190-1202, 2012, 査読あり.
doi: 10.1038/emboj.2011.486.

Kondo, S. Kohsaka, S. Okabe, S. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Molecular Brain* 4, 27, 2011, 査読あり.
doi: 10.1186/1756-6606-4-27.

Kusano K, Enomoto M, Hirai T, Wakabayashi Y, Itoh S, Ichinose S, Okabe S, Shinomiya K, and A. Okawa Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1. *Neuroscience Letter* 492, 64-69. 2011, 査読あり.
doi: 10.1016/j.neulet.2011.01.058.

Numano, F., Inoue, A., Enomoto, M., Shinomiya, K., Okawa, A., Okabe, S. Critical involvement of Rho GTPase activity in the efficient transplantation of neural stem cells into the injured spinal cord. *Molecular Brain* 2, 37, 2009, 査読あり.
doi: 10.1186/1756-6606-2-37.

Tanaka, S., Kunii, M., Harada, A., Okabe, S. Generation of cortactin floxed mice and cellular analysis of motility in fibroblasts. *Genesis* 47, 638-646, 2009, 査読あり.
doi: 10.1002/dvg.20544.

Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T., Okabe, S. Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of CaMKII α kinase activity in dendritic spine enlargement, LTP and learning. *Journal of Neuroscience* 29, 7607-7618, 2009, 査読あり.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0707-09.2009.

〔学会発表〕(計 94 件)

岡部 繁男 Imaging dynamics of postsynaptic molecules and its application in the analysis of neurodevelopmental disorders. In “Imaging synapse structure and function in the vertebrate brain” Janelia Farm (Ashburn, VA) March 30-April 2, 2014.

岡部 繁男 Assembly and remodeling of synaptic scaffolding molecules revealed by photoactivated localization microscopy. In International Symposium on Super-Resolution Imaging 2013 Hamamatsu, December 2, 2013. (オークラアクトシティホテル)

岡部 繁男 “Imaging synapse dynamics in vitro and in vivo” Plenary Lecture in International Symposium on Morphological Sciences (XXIII ISMS) 2013, Niigata, September 10th to 13th, 2013. (朱鷺メッセ)

岡部 繁男 “Imaging analysis of synapse formation in vitro and in vivo” in “Current Trends and Future Directions of Synaptic Plasticity Research” Seattle, July 18th - July 20th 2013.

岡部 繁男 “Imaging analysis of synapse dynamics in vivo” Symposium “Deep tissue two-photon microscopy” 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 京都 2012年8月26-29日。(京都国際会館)

岡部 繁男 「中枢神経シナプス動態の可視化」第34回日本分子生物学会年会フォーラム 横浜 2012年12月13-16日。(パシフィコ横浜)

岡部 繁男 “Imaging synapse remodeling and interactions with glia” Symposium “Development of the synapse” in ISDN 2010: 18th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Estoril, Portugal June 6-9, 2010.

〔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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 繁男 (OKABE, Shigeo)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60204012

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 慎二 (TANAKA, Shinji)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00529034

岩崎 広英 (IWASAKI, Hirohide)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 30342752

根東 覚 (KONDO, Satoru) (平成 21 - 22 年度)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20301757

西井 清雅 (NISHII, Kiyomasa) (平成 21 年度)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20264020