

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15048

研究課題名(和文) シナプス分子のナノ配置の可視化解析から迫る自閉症病態メカニズム

研究課題名(英文) study of pathological mechanism underlying autism by focusing on nanoscale distribution of synaptic molecules

研究代表者

並木 繁行(Namiki, Shigeyuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90452193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患モデル動物の脳でのシナプス分子の微細配置解析に供する超解像イメージングプラットフォームの開発を行った。モデル動物の脳スライス標本をSTORM法で解析するための光学系や標本の蛍光標識法を最適化した。また、超解像イメージから分子配置の特徴抽出をするソフトウェア開発も行った。モデルマウスの脳内各部位のSTORMによる解析から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抗精神病薬クロザピンの投与によって改善することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We developed a superresolution imaging platform for microscopic analysis of synaptic molecules in the brain of psychiatric model animals. We optimized optical systems and experimental conditions for the fluorescence labeling of brain slices of model animals for STORM imaging. We also developed software for analyzing distribution of synaptic molecules in STORM images. STORM analysis of various regions of brain of the model mouse revealed the change in size and number of nanoclusters formed by dopamine receptors in striatum nucleus accumbens of DISC1 knockout mice. We confirmed that alteration of D2R nanoclusters in DISC1 knockout mice was improved by administration of antipsychotic clozapine.

研究分野：薬理学

キーワード：精神疾患 自閉症 シナプス 超解像イメージング

1. 研究開始当初の背景

自閉症は、社会性や他者とのコミュニケーション能力や障害や強い固執傾向を示す先天性の精神疾患である。近年の自閉症患者のゲノム解析によって自閉症関連分子が数百以上同定され、これらの分子の多くは直接的あるいは間接的にシナプス形成やシナプス伝達制御に関係する機能を持つことが明らかになっている。実際、自閉症関連分子の欠損・変異導入マウスではシナプス機能異常と自閉症様行動が見いだされている (Moy et al. *Mol Psychiatry*, 13, 4 (2007); Won et al. *Front. Mol. Neurosci.*, 6, 19 (2013))。しかしながら、自閉症関連分子の異常がどのようにシナプス機能の異常につながっているのかという点は未解明である。申請者はこれまでに一ベル化学賞を受賞した超解像顕微鏡技術と神経伝達物質グルタミン酸のイメージング技術を組み合わせた解析によって、種々のシナプス分子が形成する微細配置がシナプス機能を制御していることを証明した。申請者は、以上の予備的知見から「シナプス分子の微細配置の破綻によって引き起こされるシナプス機能の変容が自閉症の病態メカニズムである」との考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、精神疾患モデルマウスで生じているシナプス分子の微細な空間配置の異常を検出する超解像イメージングプラットフォームを構築する。構築した超解像イメージングプラットフォームを用いて、精神疾患関連遺伝子の改変マウスでシナプス分子の微細配置の破綻が生じていることを証明すると共に、既知の精神疾患治療薬がシナプス分子の微細構造変容に対してどのように作用するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

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、20nm程度の空間分解能を有する超解像顕微鏡である Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)を用いてシナプス分子の微細配置の可視化解析を行った。STORM イメージの構築、解析に供するソフトウェアは本課題中で開発した。

4. 研究成果

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

マウスの大脳皮質、海馬、線条体、小脳で生じているシナプス分子の配置ナノメートルスケールの解像度で解析するために、10~20nm と非常に高い空間分解能を有する Stochastic optical reconstruction (STORM) 顕微鏡を採用した。STORM イメージングでは、標的分子を極めて高い特異性で蛍光免疫染色で蛍光標識する必要があるため、野生型マウス由来の凍結脳切片を用いて最適な凍結切片の作成法、抗体の選定、染色プロトコル、顕微鏡の光学系設定の最適化を行い、対象分子に特異的な蛍光シグナルが高いシグナル/ノイズ比で得られるようにした。

プレシナプスに局在するシナプス小胞の輸送・開口放出関連分子 (Munc13、RIM-1、Rab ファミリータンパク質など)、ポストシナプスの受容体やイオンチャネル (グルタミン酸受容体、GABA 受容体、カルシウムチャネルなど)、スキャホールドタンパク質である PSD95 と PSD95 との結合が報告されている分子を対象として、蛍光免疫染色標本を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、標本作製条件を最適化した。条件の最適化作業においては可視化対象分子の蛍光シグナルが見られる場所を Bassoon などのシナプスマーカーの

蛍光シグナルの位置と比較し、非特異的シグナルやバックグラウンド蛍光との差について定量的評価を行った。STORM イメージングにたえ得る蛍光免疫染色像を与える一次抗体が用意できなかった Munc13-1 と RIMBP2 についてはマウスモノクローナル抗体を作製し、高性能な抗体を得ることに成功した。

続いて、STORM イメージングの条件を最適化した。最適化した免疫染色条件でシナプス分子を蛍光標識した脳切片標本の STORM イメージングを行った。ここでは、最適な励起波長、光学フィルタ、用いる測定溶液の組成等について明るい蛍光明滅が多く見られるように最適化した。超解像イメージの取得にあたっては STORM イメージングでの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。

実際に自閉症モデルマウスである Shank3 ノックアウトマウス (Peca et al. Nature, 472, 437, (2011)) を用いた試験的な STORM イメージングを通じて自閉症モデルマウスから得られた超解像イメージデータの解析戦略を検討した。ここでは、スキャホールドタンパク質である Bassoon とグルタミン酸受容体の GluA1 サブユニットを対象として、標本作製、イメージングを行った。対象分子のプレシナプスのアクティブゾーンやポストシナプスの post synaptic density などへの集積の程度、形成される微細構造のサイズや形態などのパラメーターを抽出するために、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 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。また、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・実装及び異なる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。

精神疾患モデルでのシナプス分子超分子構造の解析

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シナプス分子の超分子構造の変容の検索を行った。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、このナノクラスターの大きさ、数が野生型マウスと比べて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精神疾患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 (論文準備中)。

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0件)

[学会発表](計4件)

H28 [学会発表] 計(1)件

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(3)件

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)

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)

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)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

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

取得年月日：2017年1月19日出願、

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

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

(2)連携研究者

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