

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650081

研究課題名（和文） 神経回路特異的なシナプトソーム調整法の確立

研究課題名（英文） Preparation of synaptosome derived from specified neural circuit

研究代表者

畠 義郎 (HATA YOSHIO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40212146

研究成果の概要（和文）：大脳皮質など、多様な細胞の複雑な回路からなる脳組織の機能や、その発達・可塑性を支える分子機構を理解するためには、特定の神経回路での機能分子の振る舞いを単離して吟味する必要がある。そのため、対象とする神経投射をあらかじめ標識しておき、標識されたシナプス結合部位を含むシナプトソーム標本を調製することを試みた。大脳皮質視覚野に種々の蛍光トレーサを注入し、皮質より調整したシナプトソーム標本をフローサイトメトリー解析により蛍光強度依存的に分離した。その結果、カルボシアニン系色素 DiI によって標識した標本で、蛍光強度が強く、かつシナプスマーカー蛋白陽性の、蛍光標識シナプトソームを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The cerebral cortex consists of various types of neural cells which are interconnected and make up a complex network. Therefore, it is necessary to examine the behavior of functional molecules at specified neural connections to understand the function, development and plasticity of the cerebral cortex. The aim of the present project is to prepare the synaptosome sample derived from the neural connections that was fluorescently labeled in advance. To this end, I labeled the neurons in the visual cortex by injecting fluorescent tracers, prepared synaptosome samples from the labeled tissue, and sorted them using flowcytometry according to their fluorescent intensity. I could obtain the successfully labeled synaptosomes from cortical tissue injected with a carbocyanine dye DiI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード： 神経発生・神経発達・神経再生・神経再建

1. 研究開始当初の背景

神経回路の機能や可塑性を支える分子の種類と振る舞いを明らかにすることは、疾患の理解にも直結する重要な課題である。しかし、脳は多様な神経細胞が織りなすネットワークであり、脳組織全体が内包する分子の種類や量を調べても、それがどのような回路で、どのような機能を担うものかは特定できない。代表者が主な研究対象としている哺乳類視覚系は、生後初期の臨界期と呼ばれる一時期に視覚入力を遮断することで、視覚野の機能と回路の大きな変化を引き起こす。その分子機構は広く研究されており、特に近年は、プロテオーム、メタボローム解析といった強力な網羅的解析技術が導入されつつあるものの、実際には、そこで注目された候補分子が、どの神経結合のいかなる変化に寄与するものかは、ほとんど明らかとなっていない。これには、脳、特に大脳皮質が多様な細胞の複雑なネットワークであり、そこで生じる変化や、それに関与する分子が一様でないことが大きな原因であると考えられる。例えば、視覚遮断により、遮蔽した眼は弱視となり、入力軸索は退縮するが、他方の眼の視力に変化はなく、入力軸索は伸長するというように、同じ視覚野内で複数の（時には逆方向の）可塑的变化が並行して進む。視覚野のみならず、自然刺激に対する脳の適応や学習の際には、神経回路の多様な変化が同時に生じると考えられる。このような状況では、皮質領野全体を対象とした解析では、回路変化の個々の過程に関わる分子変化を検出できない可能性が高い。

2. 研究の目的

回路機能やその可塑性を理解するには、シナプスでの分子変化に注目する必要がある。シナプスを構成する機能分子群は、それぞれの神経結合で異なっているが、脳組織全体よ

りサンプルを調製すると、シナプス部分だけでなく神経細胞の様々な部分が含まれてしまう。さらに、全ての神経結合に由来する成分が混在するため、特定のシナプスにおける変化は確認しがたい。そこで、あらかじめ標識しておいた特定の神経結合に由来するシナプトソームを単離することで、これらの問題の解決を目指す。シナプトソームは、シナプス接合部を含む微細な小胞であり、形態的にも生化学的にも神経終末部の特徴を保っている。特定の神経結合由来のシナプトソームを網羅的解析に用いれば、神経回路のどの部分でどのような分子変化が生じたかを明らかにすることが可能となる。

3. 研究の方法

1) 蛍光蛋白質標識を用いた特定シナプトソームの回収

まず、大脳皮質ニューロン選択的に GFP を発現する遺伝子改変動物を用いて、蛍光標識を指標にシナプトソームを単離・回収するプロトコルを確立した。

この動物の視床には GFP の発現は見られないため、GFP 発現ニューロンに由来するシナプトソームは、小胞型トランスポーターとして VGluT1 あるいは VGAT を発現し、視床で発現する VGluT2 は見られないと考えられる。GFP 発現マウスの大脳皮質より得られたシナプトソームを、GFP 蛍光の強度によりセルソーター (MoFlo XDP cell sorter, Beckman Coulter) で分離するプロトコルを決定した。シナプトソームが会合して塊になっていないかなど、セルソーターでの分離に適した標本を得るための条件検討が主眼である。正しく分離されたかどうかは、標本中の VGluT1、VGAT が濃縮されているか、VGluT2 が混入していないかを免疫染色、ウェスタンブロットにより調べることで評価した。

2) 蛍光標識した神経投射由来のシナプトソームの回収

大脳皮質視覚野にトレーサー等を注入して一群のニューロンを標識し、視覚野より調製したシナプトソームより、標識されたニューロン由来のものを回収することを試みた。この時、蛍光トレーサとして、蛍光標識デキストラミン、蛍光標識 PHA-L、DiI など種々のトレーサを用いてその結果を比較し、最適なプロトコルを確立した。

4. 研究成果

初年度は、大脳皮質のV/VI層ニューロンに選択的に GFP を発現する遺伝子改変マウス (Thy-1 GFP マウス) を用いて、蛍光標識を指標にシナプトソームを単離・回収するプロトコルを検討した。まず、Thy-1 GFP マウスの組織における GFP 分布を確認したところ、大脳皮質において、GFP はVI層の錐体細胞に強く発現していた。この錐体細胞の細胞体から表層に向かって伸びる樹状突起は、主に興奮性の入力を受ける棘突起とよばれる構造を持つ。そこで、synaptophysin で蛍光免疫染色を行ったところ、棘突起に発現している GFP と共局在あるいは隣接する synaptophysin シグナルを確認できた。このことから、このマウスの皮質には GFP シグナルがシナプス後部に発現しているシナプスが存在すると考えられる。

Thy-1 GFP マウスより大脳皮質由来シナプトソームを調製し、ウェスタンブロット解析と多重蛍光免疫染色によって評価した。ウェスタンブロット解析の結果、VGluT1、VGluT2、VGAT、SNAP25、synaptophysin、PSD-95 といったシナプスマーカー蛋白はいずれも細胞質画分と比べ、シナプトソーム画分で多く見られたが、laminA/C、GAPDH、GFAP などの核/細胞質マーカー蛋白はシナプトソーム画分にはほとんど見られなかった。一方 GFP はどの画分にも同程度に含まれていた。

シナプトソーム標本について GFP、synaptophysin、PSD-95 の多重蛍光免疫染色を行った結果、それぞれが完全に重なるこ

とはなかったが、3種のシグナルが $1\mu\text{m}$ 以内に近接して存在する様子が確認された。シナプトソームの大きさは直径 $1\mu\text{m}$ ほどであり、このことから GFP で標識された神経結合に由来するシナプトソーム得ることができたと考えられる。GFP シグナルと近接しない synaptophysin シグナルも観察され、この標本は、GFP 陽性および陰性シナプトソームが混在するものと考えられる。

以上で得た標本より、蛍光シグナルを手掛かりとして、GFP 発現ニューロンに由来するシナプトソームを、セルソーターを用いて分離、濃縮することを試みた。この過程で、シナプトソームが会合して塊になるのを防ぐ調製条件、ソーティングのパラメータなど、セルソーターでの分離に適した標本を得るための条件を決定した。

初年度に確立したシナプトソーム回収法を基に、実際に蛍光トレーサーを脳に注入して軸索を標識した動物よりシナプトソームを調製し、標識投射に由来するシナプトソームを分離することを試みた。蛍光標識したデキストラミン、レクチンである PHA-L、カルボシアニン系色素である DiI など数種類の神経トレーサーを大脳皮質に注入し、シナプトソーム標本を調製したところ、DiI によって標識したシナプトソーム標本において、蛍光強度の強い顆粒群を検出した (図 1)。

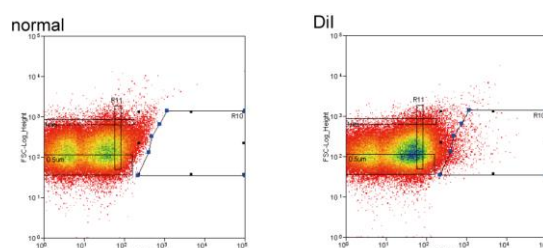


図 1. 正常皮質 (左) と DiI 注入皮質 (右) から調製したシナプトソームのフローサイトメトリ解析。各サンプルを前方光散乱 (縦軸) と赤の蛍光強度 (横軸) についてプロットした。DiI 注入皮質からのサンプルには、蛍光強度が強いサンプル群 (R10 区画) が認められる。

また、DiI を注入した大脳皮質についてシナプス前終末のマーカー蛋白の免疫染色を行い、DiI が軸索末端部分を標識していることを確認した。DiI 注入部位より調製したシ

ナプトソームを、フローサイトメトリー解析を用いて蛍光強度依存的に分離した後、蛍光陽性集団と蛍光陰性集団について免疫染色を行い、標識シナプトソーム標本が単離できているかどうかを確認した。その結果、蛍光陽性集団に標識シナプトソーム標本が多く見られた (図 2)。

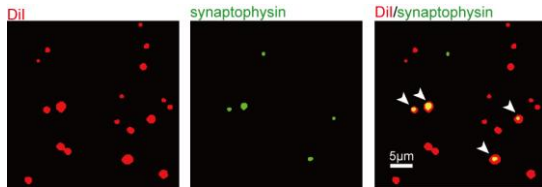


図 2. DiI 注入皮質シナプトソームからソートした高蛍光輝度群 (図 1 の R10 区画、左) のシナプス前終末のマーカースynaptophysin 免疫染色像 (中央)。両シグナルを持つ粒子 (右、矢じり) は標識されたニューロンに由来するシナプトソームである。

以上より、蛍光トレーサによりあらかじめ標識した神経投射に由来するシナプトソーム標本を得ることができた。現在、上記成果の発表準備中である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①大村菜美、米田泰輔、嶋 義郎「薬理的に抑制したマウス大脳皮質視覚野における膝状体-皮質軸索の経験依存的可塑性」第 88 回日本生理学会大会 (2011/03/28、パシフィコ横浜、横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋 義郎 (HATA YOSHIO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40212146

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し