

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16647

研究課題名(和文) アクティブゾーン蛋白質に着目した神経軸索バリコシティー構造の解析

研究課題名(英文) Analysis of the structure of axonal varicosities focusing on active zone proteins

研究代表者

濱田 駿 (HAMADA, Shun)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90755464

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)：アクティブゾーンタンパク質CAST KOマウス由来の培養神経細胞の形態を観察した結果、バリコシティー構造の増加、肥大化が見られた。そこでCAST発現ウイルスによってバリコシティーの形態変化を回復できるか検討したところ、実験系に問題点が浮かび上がった。問題点を解消するため小型の軸索分離用マイクロ流体デバイスを作製し、軸索を分離して培養することができたが、遺伝子導入法が確立できなかった。また、個々のバリコシティーの神経伝達を調べるため、培養神経細胞にChr2を発現させ、Chr2が発現しているシナプス末端を刺激し、シナプス後細胞の応答を記録する実験系の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：From morphological analysis of primary cultured hippocampal neurons derived from presynaptic active zone protein CAST, We found that the number and size of varicosities were increased by CAST deletion. Then, we attempted to recover the change of morphology of varicosities in CAST deleted neurons by the infection of the CAST expressing virus. But, there were some unsuitable problems in our experimental environment. To solve these problems, we developed smaller micro fluid device to separate axons from other neuronal cell bodies and dendrites than existing commercial products. By using this device, it was possible to split axons from cell bodies, but difficult to induce the exogenous gene expression.

To investigate the efficacy of neurotransmission in individual varicosities, Chr2 was expressed in cultured neurons. Then, we undertook to measure the synaptic responses from non-transfected neurons with stimulating Chr2 expressed axon terminals.

研究分野：神経科学

キーワード：バリコシティー プレシナプス アクティブゾーン マイクロ流体デバイス

### 1. 研究開始当初の背景

神経軸索上の瘤状の構造、バリコシティーにはシナプス小胞や小胞分泌機構が備わり、シナプス伝達の場合と考えられている。外傷性脳損傷患者の死後脳の形態学的解析の結果、バリコシティーが顕著に増加したことが報告されているが、バリコシティーの増加がどのような影響を及ぼすのかは未だ明らかになっていない。

我々はシナプス末端のアクティブゾーンを構成する CAST のノックアウトマウス由来の初代培養神経細胞においてバリコシティー構造の肥大化や増加することを見出した。CAST は軸索の末端に局在し、また、CAST ファミリー分子 ELKS は細胞内小胞のゴルジ体からの輸送に関わる Rab6 と結合し、エキソサイトーシス時に小胞と細胞膜との融合を促進することが知られている。これらのことから軸索末端での CAST の不在が小胞輸送に異常をきたし、バリコシティーの肥大化、過剰形成に関与している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

未だ不明な点が多いバリコシティーの形成のメカニズムや機能について明らかにするため、新規に見つけた CAST の欠損によるバリコシティー増大のメカニズムをさらに詳細に調べていく。また、バリコシティーの神経伝達機能の詳細を調べることで、バリコシティーによる脳機能への影響の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CAST 発現ベクターによるレスキュー実験

CAST KO によるバリコシティーの肥大化や数の増加が本当に CAST によるものだったのかを調べるため、CAST KO マウス由来初代培養神経細胞に対し、CAST 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) を感染させ、発現を復元することにより、CAST 欠損によるバリコシティーの肥大、増加が可逆的な変化なのかを調べる。

#### (2) 神経軸索観察用培養器具の開発

初代培養神経細胞は脳組織内の神経細胞とは異なり、無秩序な突起形成をするため、バリコシティーのような微細な構造を定量的に調べるのは困難であるため、培養容器を壁で区切り、細胞体よりも細い溝を掘り、軸索のみその中に伸長できるようにした軸索分離培養容器を作製する。

#### (3) オプトジェネティクスによるバリコシティー機能の解析

個々のバリコシティーの機能を調べるため、光受容型イオンチャネル ChR2 を培養神経細胞に発現させ、個々のバリコシティーに対し局所的に光刺激を与え、バリコシティーが接する神経細胞にパッチクランプ法によって電気生理学的な応答を記録する。それに

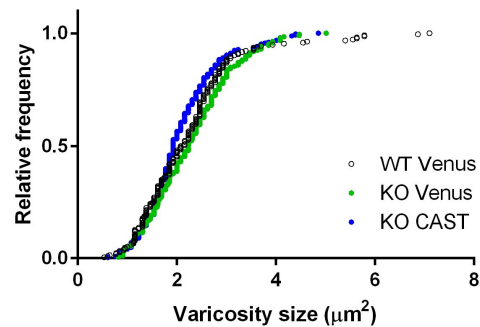
よってバリコシティーのサイズと神経伝達効率との関係性を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) CAST 発現ベクターによるレスキュー実験

CAST KO 由来細胞に CAST を過剰発現させ、バリコシティーのサイズを比較した (図 1)。

図 1 CAST KO 細胞へのレスキュー実験



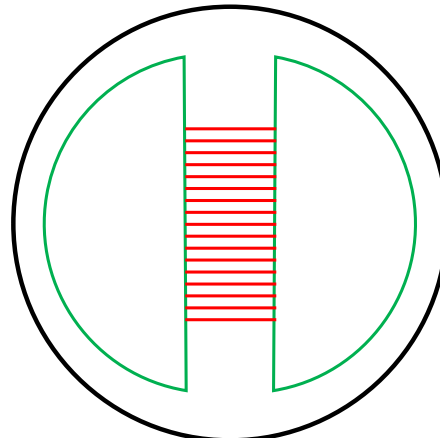
比較として、WT と KO 由来の神経細胞には Venus 発現 AAV を感染させた。結果として、3 群のバリコシティーの大きさには顕著な差は見られなかった。

培養神経細胞は組織内の神経細胞とは異なり、無秩序に樹状突起や軸索を伸長させるため、個々の細胞の形態を区別するのが困難であり、また、個々の細胞を観察しやすくするため、培養密度を下げるとトランスフェクションによる毒性の影響のためか、細胞の状態が著しく悪化する様子が見られた。このため、軸索の観察を目的とした軸索を分離して培養、観察できるような培養容器の開発、利用を検討することにした。

#### (2) 神経軸索観察用培養器具の開発

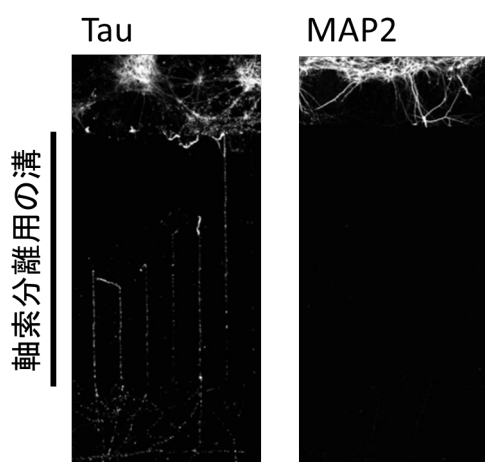
神経細胞から軸索のみを単離して観察するため市販の軸索分離培養容器を参考に、直径 12 ミリのカバースリップに収まるマイクロ流体デバイスを山梨大学工学部浮田助教に依頼し作製した (図 2)。

図 2 マイクロ流体デバイスの模式図



容器には 2 か所培地を入れる空間を作り、そのうちの片方で神経細胞を培養する。2 つの空間は幅 7 $\mu\text{m}$ 、長さ 450 $\mu\text{m}$  以上の溝で繋がれており、この溝へは細胞体は通過せず、樹状突起も 450 $\mu\text{m}$  以下の長さにはしかならないため、軸索のみが通過できる。作製した容器を用い、神経細胞を培養したところ、ごく一部の神経細胞が容器に蒔いた時点で溝を通過してしまうが、ほぼ大半の神経細胞は溝を通過しなかった。そこで、神経細胞の部位特異的のマーカの抗体で免疫染色を行った(図3)。

図3 軸索分離培養容器の検討



軸索マーカーの Tau と樹状突起や細胞体の MAP2 でそれぞれ抗体染色を行ったところ、想定通りに Tau のみが溝の反対側へ伸長していることが確認された。

また、この容器を用いた培養系で遺伝子導入を行う条件を検討した結果、AAV を用いた遺伝子導入は行うことができたが、導入したい遺伝子ごとにウイルスを作製する必要があるため、より簡便なりポフェクション試薬を用いた遺伝子導入法を現在検討している。

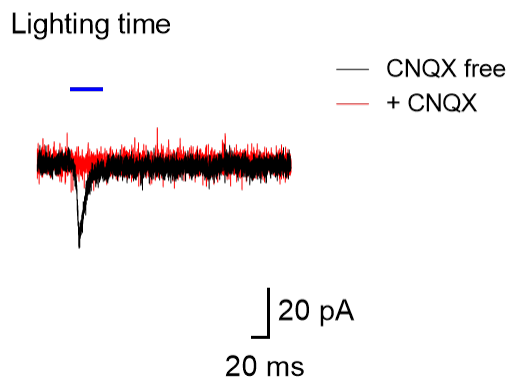
### (3) オプトジェネティクスによるバリコシティー機能の解析

軸索分離培養容器の開発と並行して、個々のバリコシティーの神経伝達機能を調べるための実験系として、光受容体型イオンチャンネル ChR2 を用いた実験系の構築を図った。

まず、神経細胞へ蛍光タンパク質 YFP が付加された ChR2-YFP を過剰発現させ、蛍光が発現している神経細胞をパッチクランプ法により光応答電流を測定したところ、問題なく観察された。しかしながら、ChR2 が発現している軸索が投射している神経細胞をパッチクランプし、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤のテトロドトキシン存在下で活動電位を阻害し、光刺激によるシナプス末端だけの電位変化で誘導されるシナプス応答を測定しようとしたところ、そのような応答が測定できなかった。シナプス末端への光刺激によるシナプス応答の誘導は脳組織や脳スライスでは良く行われているが、培養神経の

環境下では、ChR2 が電位依存性カルシウムチャンネルを開口させるだけの電位の上昇を引き起こせていないと考え、培養神経細胞さまざまな条件を試行錯誤の結果 GABAA 受容体阻害剤ピクロトキシン、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤テトロドトキシン、電位依存性カリウムチャンネル阻害剤 4-アミノピリジン存在下で、光刺激に応じた応答が観察された(図4)。

図4 プレシナプス ChR2 への光刺激によるシナプス応答の観察



この応答はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体阻害剤 CNQX で阻害されたことからシナプス応答であることが確認された。

ただ、このような応答を安定的に記録することが未だ困難であり、さらなる改良点として、ChR2 をより大きい電流が流れるものへ変えることを検討中である。

本研究では、未だに不明な点が多いプレシナプスの構造や機能を解析するための、新規のツールを作製した。その結果として細胞体から軸索のみを単離して培養することが可能になり、培養神経細胞でシナプス末端のみをオプトジェネティクスによって刺激する実験系の構築に伸展が見られた。しかし、未だ克服すべき課題が多いため、今後も改良を続け、バリコシティーの解析やそれ以外のプレシナプスの研究への貢献を目指したい。

### 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 1件)

Shun Hamada, Toshihisa Ohtsuka, CAST: Its molecular structure and phosphorylation-dependent regulation of presynaptic plasticity, Neuroscience Research, 査読有, 127 巻, 2018, 25-32

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.12.005>

[その他]

ホームページ等

山梨大学医学部生化学講座第1教室

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 駿 (HAMADA, Shun)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90755464