

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03427

研究課題名（和文）学習や環境変化によるシナプス分子のナノレベルでの微細配置の変容

研究課題名（英文）Nano-level transformation of the fine arrangement of synaptic molecules elicited by learning and environmental changes

研究代表者

廣瀬 謙造 (Hirose, kenzo)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：00292730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,120,000円

研究成果の概要（和文）：学習や環境など外的刺激によってシナプス伝達効率が変化すると考えられている。我々は中枢シナプスでの伝達効率がシナプス内のタンパク質のナノレベルの微細配置によって制御されていることを明らかにし、脳高次機能の制御機構の理解にはシナプス分子の微細配置が重要であることを示した。本研究では、動物個体への外部からの刺激に対して、シナプス分子のナノレベルの微細配置にどのような変化が生じるのかを解明することを目的とした。具体的には、マウス脳でのシナプス分子局在の可視化解析を行う超解像顕微鏡プラットフォームを確立し、マウスの学習や飼育環境の違いによって脳で生じるシナプス分子の微細な配置の変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脳の高次機能や学習・記憶形成のメカニズムをシナプス分子の微細配置に着目して理解を目指す点が学術的に意義がある。また、本研究の成果は神経変性疾患の研究における貢献や薬物開発への応用が期待される。シナプスの異常や機能の変化は神経変性疾患に関与しており、この研究によってそれらの異常な配置を解明することで、新たな治療法や薬物の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Synaptic transmission efficiency is believed to change in response to external stimuli such as learning and the environment. We have revealed that the efficiency of central synapses is controlled by the nanoscale arrangement of synaptic proteins, highlighting the importance of fine molecular organization of synapses in understanding the mechanisms of higher brain functions. This study aimed to elucidate the changes in the nanoscale arrangement of synaptic molecules in response to external stimuli in animals. Specifically, we established a super-resolution microscopy platform to visualize the synaptic molecular localization in the mouse brain and revealed the fine changes in synaptic molecular organization caused by differences in housing conditions.

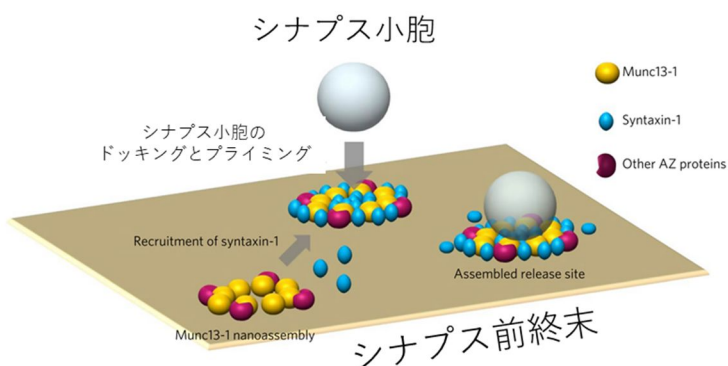
研究分野：薬理学

キーワード：シナプス分子 超解像イメージング

1. 研究開始当初の背景

動物個体への感覚刺激、環境変化や学習によって脳内の特定の神経回路の特性はダイナミックに変化することが知られている。この背景には神経回路上に存在しているシナプスのシナプス伝達効率の変化が寄与していると考えられ、動物個体レベルの応答をシナプス活性の変化につなげる分子基盤の解明が待たれている。これまでに動物の学習や環境と分子との関係を理解するために、学習タスクを課された動物や環境変化に晒された動物のオミクス解析や脳内での c-fos などの最初期遺伝子の発現解析などが行われてきた [Hefferman et al. Trends Neurosci, 41, 496 (2018), Yap et al. Neuron, 100, 330 (2018)]。しかしながら、これらの試みは、細胞レベルの解析に留まっており、シナプスのレベルで切り分けて解析した研究はなされていない。

近年、細胞内での分子の配置を従来の光学顕微鏡の空間解像度を超えてイメージングできる超解像顕微鏡技術が急速に進歩している。とりわけ単一分子局在化法を測定原理とする超解像顕微鏡法である STORM 法や PALM 法は 10 nm 程度の空間解像度で超解像イメージの取得が可能であり、その大きさが高々 1 μ m 程度の微小な構造であるシナプス内でのシナプス分子の配置の精密な解析において高いポテンシャルを有している (Small AR et al. Annu Rev Phys Chem. 2014)。単一分子局在化法では細胞内の解析対象分子を蛍光標識抗体や蛍光タンパク質を介して蛍光標識し、標識した蛍光色素や蛍光タンパクをまばらに明滅させる。蛍光輝点の中心位置を決定し、マッピングしていく作業を数万枚の画像について繰り返すことによって 1 枚の超解像イメージを再構成する。研究代表者らはこれまでに STORM 法を用いた超解像イメージングによって、シナプス分子の三次元配置を世界最高の 10nm の空間解像度で可視化することに成功し、Munc13-1 や RIM1、Munc18 などのシナプス分子が作り出すナノレベルの微細配置が神経伝達物質を含むシナプス小胞の開口放出活性の制御に重要であることを明らかにしてきた (右図、Sakamoto et al., Nat Neurosci., 2018)。今後、神経回路特性の調節メカニズムの理解には、環境変化や学習によって活性化する神経細胞上のシナプス分子群に生じているナノレベルの配置の変化を精密に解析し、動物個体レベルの応答と結びつける研究が不可欠である。本研究では「学習や環境によってシナプス分子のナノレベルの微細配置にどのような変化が生じるのか」という点を学術的な「問い」とする。



2. 研究の目的

本研究では、動物の飼育環境や学習に対する動物個体レベルの応答とシナプス分子のナノレベルの微細配置の変化との関係を明らかにすることを目的とする。本研究での問題設定は、申請者がシナプス前部での神経伝達物質の放出活性をシナプス前部に発現しているシナプス分子の微細配置が制御していることを発見したことが端緒となっているユニークなものがある。本研究課題は動物個体レベルの応答とシナプスでの分子の振る舞いとを結びつける重要なテーマであるにも関わらず、これまで取り組みがなされてこなかった。申請者は得意とする超解像顕微鏡技術を駆使する独創的なアプローチでこの重要な問題に挑む。

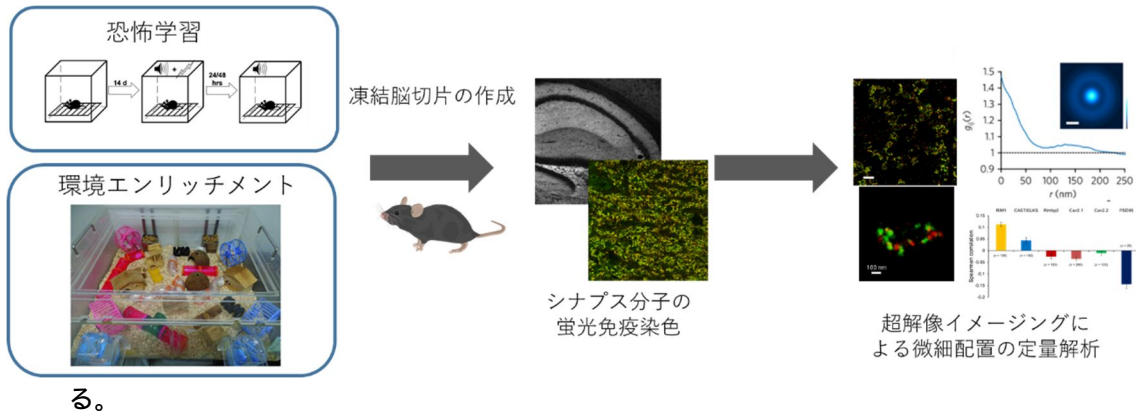
本研究は、これまで立ち遅れていたナノレベルのシナプス分子の配置に着目して神経回路を制御する分子メカニズムの理解を目指す研究パラダイムの確立を目指すものである。シナプス前部におけるナノレベルのシナプス分子の微細配置は正常のみならず病態においてもその変容が示唆されており、本研究の成果は中枢神経系作用薬の創薬への基盤を与えることが期待できる。

3. 研究の方法

本研究では以下の実験のスキームでマウス個体に与えた外部刺激がシナプス分子のシナプスでの微細配置にどのような変化をもたらすのかを定量的に調べる (下図)。

恐怖条件学習を課したマウスと環境エンリッチメント下で飼育したラットの脳の凍結脳切片を作製する。

先行研究での電気生理学的解析によってシナプス機能に変化が生じていることが明らかになっている部位を対象として約20種類のシナプス分子の抗体を用いた蛍光免疫染色を行う。蛍光免疫染色を行った脳切片を超解像顕微鏡法で可視化解析し、外部刺激を与えたマウスやラットのシナプス内でシナプス分子の微細配置にどのような変化が生じているのかを調べ



マウス脳凍結切片でのシナプス分子局在の可視化解析プラットフォームの確立

マウス脳の各部位でのシナプス分子を STORM 法で可視化解析するために、マウス脳の凍結切片を用いてシナプス分子の蛍光免疫染色をおこない、STORM 法で解析するための標本作製条件を最適化する。ここで観察対象とするシナプス分子として、シナプス前部の分子として Munc13-1RIM1、CAST、ELKS、電位依存性カルシウムチャネルなど主に神経伝達物質の放出に関わる分子群を対象とする。また、シナプス後部の神経伝達物質の受容体、PSD95 や Homer などのスクヤホールドタンパク質などを対象とする。STORM 法による超解像イメージングでは標的分子に特異性が高い抗体を用意することが肝となるが、研究代表者らはこれら対象分子の大部分について、市販あるいは自作した抗体を凍結脳切片の蛍光免疫染色標本と共焦点レーザー顕微鏡で観察し、特異性が高く、高精細な STORM イメージングに耐えうる抗体の選定を完了している。また、シナプスの種別を同定するためのマーカー分子として用いる vGluT1、vGluT2 (グルタミン酸作動性シナプス)、GAD1、GAD65 (GABA 作動性シナプス)、DAT (ドパミン作動性シナプス)の抗体についても選定を終えている。

本研究では複数種類の分子のシナプスでの共局在の様子を調べるために、多重染色に最適な一次抗体及び二次抗体組み合わせを決定する。蛍光像の取得条件など多重染色に適した染色条件について共焦点レーザー顕微鏡を用いて決定する。決定した一次抗体、二次抗体を用いた多重染色での STORM イメージングのテストを行う。ここでは波長可変レーザーと3色の半導体レーザーを搭載したインハウスで開発したマルチカラーSTORM 顕微鏡システムを用いる。テストを通じて最適な励起条件、撮像条件を決定し、得られた超解像イメージから微細構造間の位置関係を解析するために統計的手法を組み入れた解析系も構築する。具体的には、3色 STORM 法に適した蛍光明滅特性(放出光子数、蛍光輝点密度)で、チャンネル間での蛍光シグナルの漏れ込みを最小化できるように二次抗体標識に用いる蛍光色素の種類や光学フィルタ を選定し、撮像条件の最適化を行う。また、Pair correlation 関数 (PCF) や周波数解析を利用して、異なる複数種類の分子の微細配置の空間相関解析を可能にする。

マウスの条件学習や飼育環境がシナプス分子のナノレベルの微細配置に及ぼす変化の解析

マウスが条件学習をした際や飼育環境の違いによってシナプス分子の微細配置にどのような変化が生じるのかを STORM イメージングによって調べる。エンリッチ環境下での飼育がシナプス分子の微細配置にもたらす変化を STORM イメージングによって調べる。成熟雄ラットを一晩もしくは一日当たり 1 時間のエンリッチメント環境下で飼育し、通常の飼育環境で飼育しているラットのシナプス分子の微細配置と比較しつつ解析を行う。ここでは、恐怖学習マウスと同様にシナプス分子群を対象として蛍光免疫染色標本を作製し、先行研究での電気生理学的アッセイによってシナプス機能に変化が生じることが報告されている [Ohline et al. Neuropharmacology, 145, 3 (2019)]. 海馬内のシナプスに着目して STORM イメージングによってシナプス分子の微細配置の変化を調べる。3種類のシナプス分子を対象とした三重染色標本

を作製し、エンリッチメント環境下での飼育によってシナプス分子の微細配置の位置関係にどのような変化が生じるのかを pair-correlation 関数 (PCF) 解析や周波数解析などの空間相関解析で明らかにする。

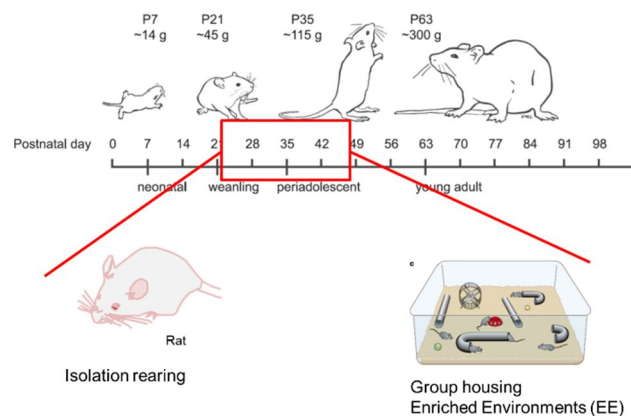
4. 研究成果

マウス脳凍結切片でのシナプス分子局在の可視化解析プラットフォームの確立

マウス脳凍結切片でのシナプス分子局在を超解像顕微鏡で可視化解析を行うためのプラットフォームの確立を目指して研究を実施した。マウス脳の各部位でのシナプス分子を単一分子局在化法を測定原理とする超解像イメージング法である確率的光学再構築顕微鏡法 (STORM 法) で可視化解析するために、マウス脳の凍結切片を用いてシナプス分子の蛍光免疫染色条件を最適化した。ここでは、主に神経伝達物質の放出に関わる分子群やシナプス後部の神経伝達物質受容体などのシナプス分子を対象として、個々の分子について STORM 法に適用できるレベルの染色効率や特異性が得られるように染色条件を最適化した。続いて、複数種類の分子のシナプスでの共同在の様子を調べるために、二重・三重染色に最適な一次抗体及び二次抗体組み合わせの探索を行った。テストを通じて最適な撮像条件を決定し、得られた超解像イメージから微細構造間の位置関係を解析するために統計的手法を組み入れた解析系も構築した。具体的には、3重染色標本に対する STORM 法に適した蛍光明滅特性 (放出光子数、蛍光輝点密度) で、チャンネル間での蛍光シグナルの漏れ込みを最小化できるように二次抗体標識に用いる蛍光色素の種類や光学フィルタを選定し、撮像条件の最適化を行った。

マウスの条件学習や飼育環境がシナプス分子のナノレベルの微細配置に及ぼす変化の解析

脳切片でのシナプス分子を対象とした二重染色、三重染色の実験系を用いたシナプス分子の微細配置の解析に取り組んだ。ここでは Munc13-1、RIM1、CAST、ELKS、電位依存性カルシウムチャンネル、PSD95 などのシナプス分子を対象として多重染色によるマルチカラー化の強みを活かしてシナプス分子間の位置関係などについても超解像顕微鏡を用いた詳細な解析にも取り組んだ。また従来の超解像顕微鏡による解析は2分子を対象とした二重染色標本に留まっていたが、従来の顕微鏡システムの光学系を大幅に見直すことによって三重染色以上の標本についても高精細な超解像イメージを取得し、3種類以上の分子間の空間配置をについて解析できるプラットフォームを構築した。



また従来の超解像顕微鏡による解析は2分子を対象とした二重染色標本に留まっていたが、従来の顕微鏡システムの光学系を大幅に見直すことによって三重染色以上の標本についても高精細な超解像イメージを取得し、3種類以上の分子間の空間配置をについて解析できるプラットフォームを構築した。

以上の顕微鏡システムを用いて、学習や飼育環境とシナプス分子の微細配置の位置関係の変容との関係について解析を進めた。エンリッチメント環境下で飼育したマウスの脳の種々の部位について複数種類のシナプス関連分子の免疫染色を行い、マルチカラー超解像顕微鏡により各分子の微細配置を解析した。その結果、海馬 CA3 領域の stratum lucidum および stratum oriens において、シナプス内での Cav2.2-Munc13 量比が増加することを明らかにした。

本研究では従来の方法論では不可能であった複数の分子のシナプスでの微細な配置や量的な解析を実現し、学習や環境とシナプス分子の微細配置の変容との関係を始めて明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitajima Nami, Takikawa Kenji, Sekiya Hiroshi, Satoh Kaname, Asanuma Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Takahashi Shodai, Hanaoka Kenjiro, Urano Yasuteru, Namiki Shigeyuki, Iino Masamitsu, Hirose Kenzo	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 Free PMC
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.57544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Shodai, Hanaoka Kenjiro, Okubo Yohei, Echizen Honami, Ikeno Takayuki, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Hirose Kenzo, Iino Masamitsu, Nagano Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 15
2. 論文標題 Rational Design of a Near infrared Fluorescence Probe for Ca ²⁺ Based on Phosphorus substituted Rhodamines Utilizing Photoinduced Electron Transfer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 524 ~ 530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aritake Toshimitsu, Hino Hideitsu, Namiki Shigeyuki, Asanuma Daisuke, Hirose Kenzo, Murata Noboru	4. 巻 451
2. 論文標題 Fast and robust multiplane single-molecule localization microscopy using a deep neural network	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurocomputing	6. 最初と最後の頁 279 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neucom.2021.04.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aritake Toshimitsu, Hino Hideitsu, Namiki Shigeyuki, Asanuma Daisuke, Hirose Kenzo, Murata Noboru	4. 巻 1
2. 論文標題 Single-molecule localization by voxel-wise regression using convolutional neural network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Results in Optics	6. 最初と最後の頁 100019 ~ 100019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rso.2020.100019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島佑介、坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 シナプス小胞放出サイトの形成に寄与するMunc13-1とアクティブゾーンタンパク質の相互作用
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川裕貴、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 中枢シナプス分子のライブセル超解像イメージングを実現する新規蛍光標識技術の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西泰地、坂本寛和、大久保洋平、廣瀬謙造
2. 発表標題 記憶形成に関与するシナプスの検出法の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林新九郎、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 TARP -8の分子動態にPSD95とのカップリングが及ぼす効果の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------