

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650180

研究課題名（和文） 神経伝達物質受容体のシナプス膜面での動態を規定する分子のスクリーニング技術の開発

研究課題名（英文） Development of screening method to isolate molecules that regulate behaviors of neurotransmitter receptors at synaptic membranes.

研究代表者

田淵 克彦（TABUCHI KATSUHIKO）

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授（兼任）

研究者番号：20546767

研究成果の概要（和文）：凍結割断レプリカ免疫電顕法は、シナプス膜面の立体構造を保持したまま、神経伝達物質受容体などのタンパク質を可視化できる技術である。しかし、遺伝子導入したニューロンのシナプスをレプリカ標本上で識別し、シナプス分子の動態に与える影響を解析する技術が確立されていなかった。今回、膜融合蛍光タンパク質を遺伝子導入マーカーとして利用し、標本作成後リフォールディングさせることにより蛍光シグナルを復活させ、遺伝子導入ニューロンをレプリカ標本上で識別する技術の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy (SDS-FRL EM) is a technique that enables visualization of proteins, such as neurotransmitter receptors, on synapse membrane with maintenance of space structure. However, the technique in combination with gene transfection has not been established because of the difficulty in recognition of transfected neurons. In this project, we developed a new technique to distinguish transfected neurons on replica membranes by refolding membrane tethered fluorescent proteins that are introduced as markers after SDS digestion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学, 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経実験形態学、シナプス、凍結割断レプリカ免疫電顕、子宮内エレクトロポレーション

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質の放出および受容は脳の活動の根幹であり、これまで多くの研究者が研究してきたが、これを正確に理解するには解明しなければならない問題が山積みされたままである。特に、シナプス後終末における神経伝達物質受容体の動態は複雑に制御されており、これに寄与する数多くの分子の役割を明らかにしていく必要がある。ポストゲノム時代に入り、数多くの分子の機能を簡便にスクリーニングするために、一過性の遺伝子

導入による過剰発現や、shRNAによるノックダウンが用いられるようになり成果を挙げているが、これには効果をモニターするシステムとの組み合わせが必須である。

凍結割断レプリカ免疫電顕法（SDS-FRL法）は、急速凍結した組織を割断後、表面に現れた脂質二重層間の断面をメッキしてレプリカを作成し、SDSで細胞質成分を除去した後、レプリカに密着・残存している膜タンパク質を免疫染色により検出するもので、シナプス

膜の立体的な構造の中で、神経伝達物質の動態を可視化することができる優れた系である。比較的新しい技術であり、実施できる施設も少ないことから、これまで少数の研究者が野生型のマウスやラットを用いてシナプスの正常構造における神経伝達物質の水平方向の広がりや集中度合いを報告し、注目を浴びてきた。最近ではロックアウトマウスにおいて、これらの動態変化を解析する報告が出始めている。しかし、この技術を今後、より幅広く応用しようとしたとき、遺伝子導入系との組み合わせで利用できることが必須である。凍結切断レプリカ免疫電顕法では、観察標的が高密度でなければならないこと、遺伝子導入細胞の識別が困難なことから、現在のところ、遺伝子導入法と組み合わせる研究を行うのが困難なのが実情である。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子導入ニューロンのシナプスについて、凍結切断レプリカ免疫電顕法を用いて神経伝達物質受容体をはじめとする膜表面タンパク質の動態を解析する技術の開発を目指して立案した。このために鍵となるのが、遺伝子導入シナプスをレプリカ標本上で識別する技術の確立することである。これに関してまず、遺伝子導入のマーカーの候補となる遺伝子コンストラクトの選別を行う。そして、高密度で中枢神経系のニューロンに遺伝子導入ができ、強い発現を獲得できる遺伝子導入系について検討を行う。遺伝子導入マーカーの候補として、蛍光タンパク質が融合されたものであることが理想であるが、レプリカ標本は SDS 処理を行うため、蛍光が失活することが予測される。光学顕微鏡レベルで高密度に遺伝子導入された標本でも、電子顕微鏡レベルの微細構造の中で遺伝子導入ニューロン由来のシナプスの存在確率は低く、電顕観察を行う前に蛍光シグナルを比較的高密度で有するレプリカ標本を選別できなければ、実用上かなり非効率なものになってしまう。このため、SDS 処理されたレプリカ標本上で蛍光タンパク質をリフォールディングさせることにより蛍光シグナルを復活させる技術の確立を行う。そして、最後に導入遺伝子に対する免疫染色を行い、透過型電子顕微鏡下で導入遺伝子を可視化し、遺伝子導入ニューロンのシナプスについて、レプリカ免疫電顕による解析ができる技術の確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入法及び遺伝子コンストラクトの選別

遺伝子導入法として、*in vivo* で高密度に遺伝子導入でき、強い発現を維持できる手法

ということで、子宮内エレクトロポレーション法を選択した。子宮内エレクトロポレーション法は、胎生期の脳室に遺伝子をインジェクションし、エレクトロポレーションをかけることで、遺伝子を脳室周辺の神経芽細胞に取り込ませることができる。脳室周辺の神経芽細胞は、発生に伴い分化移動し、大脳皮質の錐体ニューロンを形成するが、発生初期に脳室周辺から分化移動したものは大脳皮質の脳室側に、発生後期に脳室周辺から分化移動したものは大脳皮質の表層側の錐体ニューロンになり、これによって組織学的に6層から成る層構造を形成する。したがって、特定の発生時期にエレクトロポレーションをすることで、大脳皮質の特定の層の錐体ニューロン特異的に遺伝子導入できる。このため、遺伝子導入コンストラクトに関しては、プロモーターによって部位特異的な発現を制御する必要が無い。時間・空間的に普遍的に発現する強力なプロモーターとして CAG プロモーターを選択した。EGFP, mVenus, mCherry などの蛍光タンパク質に、シナプス局在タンパク質および膜融合シグナルを付加した遺伝子配列を CAG 発現ベクター (pCAGGS ベクター) に挿入し、マーカー候補遺伝子コンストラクトを作成した。

(2) 子宮内エレクトロポレーションによるマウス脳への遺伝子導入

マウス大脳皮質体性感覚野の II/III 層の錐体ニューロン特異的に遺伝子導入を行うため、妊娠 14.5 日目のマウスを用いて子宮内エレクトロポレーションを行った。遺伝子導入個体を識別するため、膜融合型及びシナプスタンパク質融合緑色蛍光タンパク質を遺伝子導入するときは、DsRed 発現コンストラクトを混合した DNA 溶液を調整し、膜融合型及びシナプスタンパク質融合赤色蛍光タンパク質を遺伝子導入する場合は、EGFP 発現コンストラクトを混合した DNA 溶液を調整した。また、これら DNA 溶液に Fast Green 色素を混合し、インジェクション中に DNA 溶液が可視化できるようにした。

妊娠 ICR マウスをソムノペンチルで麻酔し、開腹、子宮を露出し、胎児の側脳室に DNA 溶液を注入し、ネッパジーンのエレクトロポレーター (CUY21) のピンセット型電極の陽極をインジェクションした側脳室の直上に対して、35V の電圧を 50 ms かけ、950ms の間隔において 4 回繰り返した。子宮を腹腔内に戻し、縫合後、通常飼育を行った。処置から 4 日後にマウスが誕生し、青色 LED (Handy Blue) を用いて新生児マウスの頭部を照らして蛍光の有無を観察し、遺伝子導入個体を識別した。

生後1か月の遺伝子導入マウスについて、還流固定を行い脳を摘出し、大脳皮質を含む切片を作成し、共焦点顕微鏡下で蛍光シグナルを観察した。シナプスで強いシグナルが得られるかどうかを検討し、候補の遺伝子コンストラクトを選別した。

(3) 凍結割断レプリカ電顕

蛍光シグナルが強く観察された脳部位を脳切片から切り出し、高圧下で急速凍結を行い、凍結サンプルを作成後、割断用のキャリアーに挟み、割断装置(JFD11)で割断を行い、割断面に炭素を蒸着させた。これを、2.5% SDS に浸し、80 °C で18時間インキュベートし、細胞質成分を除去し、レプリカ標本を作成した。この状態で、蛍光顕微鏡下で観察し、蛍光シグナルが検出されないことを確認した。蛍光タンパク質をリフォールディングするために、レプリカ標本を浸している2.5% SDS 溶液600 ulのうち、200 ulを5% ポリエチレングリコール、1 mM レチナル溶液に置換し、室温で5分インキュベートした。これを5回繰り返す、最後に5% ポリエチレングリコール、1 mM レチナル溶液に置換した状態で、一晩インキュベートした。蛍光顕微鏡下でレプリカ標本を観察し、蛍光シグナルの回復に成功した。また、膜融合型EGFPを導入したレプリカ標本について、抗GFP 1次抗体及び金標識2次抗体と反応させ、透過型電子顕微鏡下で観察し、遺伝子導入ニューロンのシナプス膜表面をレプリカ電顕像として標識することに成功した。

4. 研究成果

凍結割断レプリカ免疫電顕法では、細胞膜表面の分子のシグナルを検出するため、遺伝子導入細胞を標識する方法として、細胞膜に局在するシグナルを有する蛍光タンパク質について、CAG プロモーターで発現誘導されるプラスミドコンストラクトを作成し(pCAGGS ベクターに挿入)、子宮内エレクトロポレーション法を用いてマウス大脳皮質II/III層の錐体ニューロンに遺伝子導入を行い、遺伝子導入された成熟マウスについて還流固定を行い、脳切片について共焦点蛍光顕微鏡下で、シグナルの局在および強度をスクリーニングした。これらの中で、H-ras を融合した EGFP コンストラクト(pCAGGS-EGFP-H-ras)と、ミリスチル化シグナルを融合したmCherryのコンストラクト(pCAGGS-myr-mCherry)が細胞膜表面で強いシグナルを示した。また、シナプスタンパク質を融合した蛍光タンパク質についても解析を行い、シナプス前終末局在タンパク質であるVAMP2、VGlut1、VGlut2とVenusと

の融合コンストラクト(pCAGGS-Venus-VAMP2, pCAGGS-Venus-VGlut1, pCAGGS-Venus-VGlut2)で、大脳皮質のII/III層からV層に投射されるシナプス前終末で強いシグナルを得ることが確認できた。

大脳皮質遺伝子導入部位を蛍光顕微鏡で確認しながら、組織片を切り出し、高圧下で急速凍結・割断し、カーボン蒸着、SDS処理により細胞成分を除去し、SDS-FRL 標本を作成した。このサンプルを蛍光顕微鏡下で観察し、SDS処理により蛍光シグナルが消失したことを確認した。消失した蛍光シグナルを復活させるために、蛍光タンパク質のリフォールディングする条件を検討し、5% ポリエチレングリコールと1 mM レチナルを含む溶液で、SDSを含むレプリカ標本溶液を徐々に置換することで、蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを検出できるレベルに回復させられることを見出した。

蛍光シグナルが高密度に見られるレプリカ標本を選別し、抗GFP抗体を反応させた後、金標識された二次抗体でインキュベーションし、透過型電子顕微鏡にて、導入遺伝子を有するシナプス表面を標識することに成功した。

凍結割断レプリカ免疫電顕法は、シナプス表面タンパク質を可視化する方法として極めて有用であるが、これまで遺伝子導入と組み合わせることができなかった。今回の研究で、遺伝子導入した膜局在蛍光タンパク質を、SDS処理をした後にリフォールディングされることにより、導入ニューロンを可視化し免疫染色によりレプリカ上で識別する技術が確立できた。これにより、今後シナプス分子のshRNAやfloxマウスに対するCre組換え酵素、更には過剰発現コンストラクトなどを導入することにより、これらの分子が神経伝達物質受容体をはじめとする膜タンパク質の、シナプス表面での動態に及ぼす効果を効率よく解析できることが期待できる点で、重要な意義を持つ。

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6件)

(1) Jason Aoto, David C Martinelli, Robert C Malenka, Katsuhiko Tabuchi, Thomas C. Südhof. Presynaptic Neurexin-3 Alternative Splicing Trans-Synaptically Controls Postsynaptic AMPA-Receptor Trafficking. Cell. in press.

(査読有)

(2) Elaine C. Budreck, Oh-Bin Kwon, Jung Hoon Jung, Stephane Baudouin, Albert Thommen, Hye-Sun Kim, Yugo Fukazawa, Harumi Harada, Katsuhiko Tabuchi, Ryuichi Shigemoto, Peter Scheiffele.

Proc Natl Acad Sci USA. 110(2):725-730.2013
DOI:10.1073/pnas.

(査読有)

(3) Deeba Noreen Baig, Toru Yanagawa, Katsuhiko Tabuchi

Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant. Japanese Journal of Biological Psychiatry. 23(4):281-286.2012

(査読無)

(4) Mark Etherton, Csaba Foldy, Manu Sharma, Katsuhiko Tabuchi, Xinran Liu, Mehrdad Shamloo, Robert C. Malenka, Thomas C Sudhof.

Autism-linked Neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. Proc Natl Acad Sci USA 108(33):13764-13769. 2011

DOI: 10.1073

(査読有)

(5) Mark R Etherton, Katsuhiko Tabuchi, Manu Sharma, Jaewon Ko, Thomas C Sudhof. An autism-associated point mutation in the Neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus.

EMBO-J. 30(14):2908-2919.2011

DOI: 10.1038

(査読有)

(6) 田淵克彦

Neuroligin
分子精神医学 11(3):207-218.2011

(査読無)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 田淵克彦, 張文欣, Nur Farehan Mohamed Asgar, Thomas C Sudhof, 重本隆一

Synapse maturation and autism: The role of synapse adhesion molecules.

第 90 回日本生理学会大会

2013 年 3 月 27 日タワーホール船堀(東京都)

(2) Katsuhiko Tabuchi

Synapse maturation and autism: The role of Neuroligins and Neurexins.

The 11th Biennial meeting of the Asia Pacific Society for Neurochemistry

2012 年 10 月 1 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

(3) 田淵克彦

Analysis of Neuroligin mouse models relevant to pathophysiology of autism.

第 34 回日本生物学的精神医学会

2012 年 9 月 30 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

(4) Katsuhiko Tabuchi

Synapse function and autism: The role of Neuroligins and Neurexins.

15th Annual Neuroscience Symposium The Korean Society for Brain and Neural Science

2012 年 9 月 26 日ソウル国立大学 (韓国)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2seiri/ja/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 克彦 (TABUCHI KATSUHIKO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授
(兼任)

研究者番号 : 20546767

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

江頭 良明 (EGASHIRA YOSHIHIRO)

同志社大学・脳科学研究科・研究員

研究者番号 : 80582410