

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640039

研究課題名(和文) シナプス形成・成熟過程における分子動態・微細構造の解析技術の開発

研究課題名(英文) Advanced technology development for analyzing molecular dynamics and structure in synapse formation

研究代表者

植村 健 (UEMURA, Takeshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：00372368

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)：シナプス異常を伴う神経発達障害の病因・病態の解明には、シナプスの形成過程および機能分子の動態、微細構造の変化の正確な理解が必須である。本研究ではSiN薄膜窓を備えた特殊培養ディッシュ表面をポリ-L-リジンとラミニンでコーティングすることで神経細胞の初代培養に成功し、溶液中の細胞を観察できる大気圧大気圧走査型電子顕微鏡(ASEM)で観察することに成功した。シナプス前終末を分化誘導する細胞接着分子(シナプスオーガナイザー)の細胞外領域を磁気ビーズにコートし、培養神経細胞に添加することでASEM dish上の任意の場所にシナプス前終末の構造を誘導し観察できることを示した。

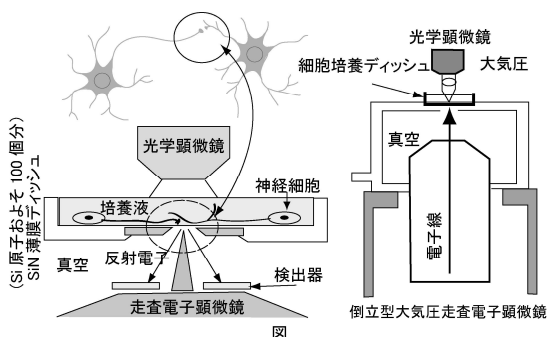
研究成果の概要(英文)：Elucidation of synapse formation process is essential for understanding synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders. Atmospheric scanning electron microscope (ASEM) is an electron microscope which was developed recently to directly observe subcellular structures and organelles through a silicon nitride (SiN) film under atmospheric pressure. In this study, we cultured neurons on poly-L-lysine and laminin coated ASEM dish with the SiN film. Presynaptic differentiation was induced by extracellular domain of synapse organizer-coated magnetic beads and analyzed by fluorescence microscope and ASEM. Fluorescence signals for presynaptic proteins were accumulated on the beads particularly concentrated at the site of contact with axon. Subsequent ASEM analysis revealed that presynaptic protein, presumably of an indistinguishable neurite branch, surrounded each beads. Thus, ASEM is a potentially useful tool for analysis of molecular localization and fine structure of synapse.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：脳・神経 神経科学 シナプス

1. 研究開始当初の背景

近年、統合失調症、精神遅滞、自閉症等の精神疾患の原因・危険因子と考えられる遺伝子が数多く同定され、これらの神経精神疾患はいずれも中枢シナプスの形成や機能低下が関与していると考えられている。最近、我々は中枢シナプス形成を誘導する分子複合体を明らかにしてきた。これらシナプス形成複合体の中で NRXN は自閉症・統合失調症への関与が、また IL1RAPL1 は知的障害・自閉症の原因遺伝子産物であることが知られており、精神発達障害の原因の一部は中枢シナプス形成不全であることが強く示唆される。このような状況下で神経発達障害の病態を理解し、神経発達障害への創薬標的を提示するためには、シナプス形成の分子機構を明らかにし、シナプスがどのような過程を経て形成されるのか機能分子の動態、微細構造の変化を正確に理解することが必須である。近年の光学顕微鏡によるシナプス部位における分子局在やシナプス構造の変化について多くの研究がなされてきた。しかしながら、シナプスのサイズは数百 μm 程度と非常に小さく、光学顕微鏡の分解能が 200 nm 程度であることを考えると微細構造や詳細な分子動態を調べるには明らかに不十分である。電子顕微鏡は細胞内の微細構造を高分解能で解析できる唯一の道具であるが、同一視野でシナプスのダイナミックな変化を観察しつつ特定の時点における微細構造変化、分子局在を同時に観察することは技術的に困難で不可能である。近年、溶液中の細胞を観察できる走査型電子顕微鏡(大気圧走査型電子顕微鏡; ASEM)が開発され溶液中で細胞の微細構造、分子の局在を調べることが可能となり上記の問題点克服できる技術的基盤が確立された。そこでこの新たな解析技術を応用した本研究を提案することとした(下図)。



2. 研究の目的

シナプス形成は、脳神経回路網の発達において要のステップであり、正確な神経伝達や脳の高次機能に極めて重要である。近年、統合失調症、精神遅滞、自閉症などの神経精神疾患の原因あるいは危険因子と考えられる遺伝子が次々と明らかにされ、これらの疾患関連遺伝子はいずれも脳シナプスの形成、機能に関与すると考えられている。本研究はシナプス形成過程の微細構造変化とこれら機能分子の挙動を溶液中で大気圧走査型電子顕微鏡と光学顕微鏡で同時に解析する系を樹立し、シナプス形成時におけるこれらの分子の分子挙動・分子位置と微細構造変化の過程を解析し、これら機能分子欠損時の変化を観察することで神経精神疾患の病態を理解し、シナプス形成に関わる分子創薬標的分子を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

海馬初代培養神経細胞および小脳初代培養を電子線透過性が高い窒化シリコン(SiN)薄膜窓を底面にもつ特殊培養ディッシュ上で培養し、神経細胞に蛍光蛋白質を発現させ、シナプス形成の過程を光学顕微鏡で観察し、最適なタイミングでグルタルアルデヒド固定を行うことで微細構造変化と機能分子の局在を解析していく。シナプスオーガナイザーの細胞外領域を結合させた磁気ビーズ上にシナプス前部構造をそれぞれ誘導させ、単一分子で誘導されるシナプス構造の形成過程の微細構造と機能分子の局在を解析する。

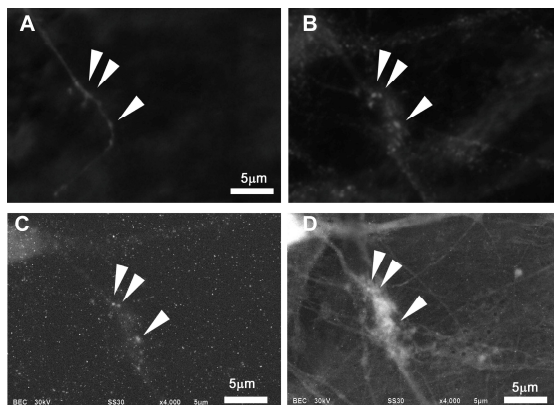
4. 研究成果

初代培養神経細胞を電子線透過性が高い窒化シリコン(SiN)薄膜窓を底面にもつ特殊培養ディッシュ上で培養し、神経細胞に蛍光蛋白質を発現させ、シナプス形成の過程を光学顕微鏡で観察し、最適なタイミングでグルタルアルデヒド固定を行うことで微細構造変化と機能分子の局在を解析する実験系の開発を行なった。

(1) ASEM と光学顕微鏡で同一視野を観察するために、電子線透過性が高い窒化シリコン(SiN)薄膜窓を底面にもつ特殊培養ディッシュ(ASEM ディッシュ)表面をポリ-L-リジ

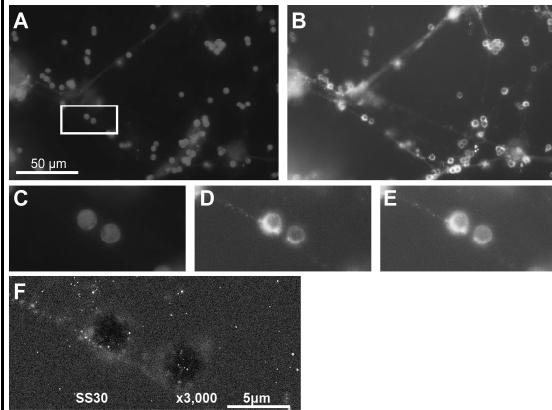
ンとラミニンでコーティングし、コートした ASEM ディッシュ上に大脳皮質神経細胞および小脳顆粒細胞の初代培養を試みた。培養 6 日目および 14 日目に培養神経細胞をグルタルアルデヒドで固定し、シナプス前部アクティブゾーンタンパク質 Bassoon またはシナプス後肥厚部足場タンパク質 Shank2 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。いずれの培養神経細胞においても、従来培養に用いているカバーガラス上での培養と同様の染色像が得られた。ASEM ディッシュをポリ-L-リジンとラミニンで処理することにより、初代培養神経細胞が可能であることを示した。

(2) マウス培養大脳皮質神経細胞を光学顕微鏡と ASEM での同時観察を試みた。培養 14 日目に神経細胞を固定し、シナプス部位に局在するタンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行った。一部の神経細胞にはウイルスを用いて EGFP を発現させ神経突起をラベルした。光学顕微鏡で確認されたシナプス前終末アクティブゾーンタンパク質 Bassoon のシグナルは ASEM ではよりシャープな高分解能のシグナルとして観察された。また、重金属染色後に同一視野を観察すると多くの細い神経線維が金シグナル付近に存在することが明らかとなった。



(3) マウス小脳由来の神経細胞をポリ-L-リジンとラミニンでコーティングした ASEM ディッシュ上で培養し、シナプスオーガナイザーで誘導されるプレシナプス構造物の観察を試みた。培養 6 日目にシナプスオーガナイザーの細胞外領域を結合させた磁気ビーズを培養神経細胞に添加し、24 時間後に固定した。シナプス前部のタンパク質を 1 次抗

体により標識し、FluoroNanogold Fab' で 2 次標識を行い、上部に光学顕微鏡を搭載してある倒立型の ASEM を用いて同視野観察を行った。光学顕微鏡による観察でシナプス前部に存在するタンパク質が磁気ビーズの周辺に集積してくることが観察された。金増感した後、同一視野を ASEM で観察すると、アクティブゾーンのタンパク質 Bassoon を標識した金粒子と軸索が磁気ビーズの周辺を取り巻くよう存在していることが観察された。



光学顕微鏡と ASEM による相関観察はシナプス形成の分子基盤を解析する上で非常に有効な解析系である。本研究ではシナプス形成を誘導するタンパク質をコートした磁気ビーズを培養神経細胞に添加することで、ASEM ディッシュ上の任意の場所にシナプス前部の構造を作り観察できることを示した。磁気ビーズを用いた解析系では、単一分子が誘導するシナプス構造(シナプス前部またはシナプス後部)を解析することが可能である。磁気ビーズ添加から観察までの時間をコントロールすることで、シナプス形成時における機能分子の挙動と微細構造変化の過程を詳細に解析する実験が期待される。蛍光蛋白質 EGFP 等で標識した神経細胞を液浸レンズを備えた光学顕微鏡で薄膜の上方から観察することでシナプスのダイナミックな変化を観察しつつ、最適なタイミングで固定し同一視野での電子顕微鏡による微細構造、分子局在を解析することも可能である。染色法等の改善の余地があるが、新たな方法論の確立はシナプスの形成過程の解析を飛躍させこの分野の進展に大きく貢献できるものとする。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Yamagata A, Yoshida T, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Iwasawa-Okamoto S, Mori H, Mishina M, Fukai S. Mechanisms of splicing-dependent trans-synaptic adhesion by PTP-IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation. *Nat. Commun.* 6, 6926, 2015, 査読有
Doi: 10.1038/ncomms7926.

Hirano K, Kinoshita T, Uemura T, Mtohashi H, Watanabe Y, Ebihara T, Nishiyama H, Sato M, Suga M, Maruyama Y, Tsuji NM, Yamamoto M, Nishihara S, Sato C: Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM. *Ultramicroscopy* 143, 52-66, 2014, 査読有
Doi: 10.1016/j.ultramic.2013.10.010.

[学会発表](計 4 件)

植村健 (Insights into structure and assembly of GluD2-Cbln1-neurexin adhesion complex for cerebellar synapse formation) 第 88 回日本生化学大会, 2015.12.1, (シンポジウム, 招待講演)、神戸ポートアイランド、神戸市

植村健 (小脳シナプス形成を担う GluR2-Cbln1-neurexin 接着分子複合体の構造基盤), 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015.9.14, (シンポジウム, 招待講演)、金沢大学、金沢市

佐藤主税, 木下 貴明, 植村 健, 平野和己, 川田 正晃, 西山英利, 佐藤 真理, 海老原 達彦, 須賀三雄, 西原祥子 (The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and

Synaptic Induction in Solution), 2014 Microscopy & Microanalysis meeting, 2014.8.5, ハートフォード, アメリカ合衆国

植村 健, 佐藤 真理, 西山 英利, 須賀 三雄, 佐藤 主税 (受容体でコートした磁気ビーズによる初代培養シナプス形成誘導のASEM水中免疫電顕), 日本顕微鏡学会 第70回記念学術講演, 2014.5.11, 幕張メッセ国際会議場, 千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 健 (UEMURA, Takeshi)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号: 00372368

(3) 連携研究者

佐藤 主税 (SATO, Chikara)
独立行政法人産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・研究グループ長
研究者番号: 00357146