

シナプス構造の分子解剖 Molecular Anatomy of Synaptic Structure

岡部 繁男 (OKABE SHIGEO)
東京大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

PALM (あるいは STORM) 法は一分子蛍光の検出を利用した高解像度光学顕微鏡法である。一つのシナプス後肥厚部 (PSD) は直径 400nm 程度のディスク状構造であり、PALM 法によりその内部構造を捉えることが可能である。本研究計画では、蛍光蛋白質で標識された PSD およびスパインについて、PALM 法を用いてその内部の分子分布を検出することを目指す。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：分子神経生物学 シナプス後肥厚部

1. 研究開始当初の背景

光学的測定技術を応用したシナプス研究はその進展が急速であり、シナプス可塑性に伴うシナプス部位における分子の局在変化やシナプス構造の変化について多くの知見が得られている。シナプスのサイズは約 2-3 ミクロン程度と非常に小さく、その内部における分子位置や機能変化を読み出すための技術が必要である。スパイン頭部内に存在するシナプス後部膜分子が、他の機能分子とどのように関連しているのか、その詳細を明らかにするためには新たな方法論を開発する必要がある。また光学的測定を利用したシナプス研究のもう一つの重要な流れとして、生体内でのシナプスのイメージング (in vivo imaging) が挙げられる。シナプスの形成・維持機構を理解するには in vitro の実験結果を in vivo で検証することが極めて重要であり、両者をつなぐ方法論の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究計画では以下の二つの具体的目標を設定した。

1. シナプス後肥厚部 (PSD) 内部構築の高解像度観察法の開発
2. 上記手法の in vivo シナプス解析への応用

蛍光蛋白質で標識された PSD およびスパインについて、PALM 法を用いてその内部の分子分布を検出し、シナプス形成に伴う PSD の

構造と分子分布の変化を明らかにすることを第一の目標とする。第二に、蛍光蛋白質の活性を維持したまま電子顕微鏡用の樹脂に脳組織を包埋し、超薄切片を作成する方法 (Array tomography 法) を PALM 法と融合する。更に in vivo imaging を行って新規のシナプスを同定した後、Array tomography 法と PALM 法による解析を行う。脳内でのシナプス形成・リモデリングと、PSD の微細構造の関連を解析し、PSD の構築原理の解明を目指す。

3. 研究の方法

高解像度顕微鏡システムを構築するために、レーザー光学系の設計、装置の組み立て、画像解析ソフトウェアの開発を行い、PALM 法を高い位置決め精度で行うための装置を完成させた。この装置で取得する PALM 画像をタイムラプス観察と組み合わせ、シナプス形成のタイミングと PSD の微細構造の関係を解析した。Array tomography 法を行い、in vivo imaging で観察した構造の再観察の手法、array tomography 用の超薄切片の PALM/STORM 法による観察の実験条件を最適化した。50-500 nm 程度の樹脂包埋切片について、発現させた蛍光蛋白質のシグナルを維持させつつ、抗体によってシナプス構造を可視化することに成功した。In vivo imaging により生後早期の大脳皮質におけるスパインと PSD のターンオーバーを定量的に解析するための実験条件を最適化した。

4. これまでの成果

(1) PALM 法を用いたシナプス内部における分子分布の決定

A. 高精度の位置情報を取得可能な新しい顕微鏡システムを構築した。この装置で位置決め精度として 20 nm 以下を達成した。

B. 蛍光活性化が可能な複数の蛍光蛋白質 (Dronpa, Dendra, EosFP, PA-tagRFP) について、シナプス分子 (PSD-95, Shank, Homer などのシナプス足場蛋白質) との融合蛋白質を作成・評価し、イメージングに利用可能なプローブを複数得た。

C. PALM 法により単分子の位置情報の高精度取得とシナプス微細構造の検出に成功した。

D. この手法とタイムラプスイメージングを組み合わせて、新しく形成された PSD、安定に維持されている PSD の微細構造の特徴をそれぞれ抽出することに成功した。

E. さらにタイムラプスイメージングを組み合わせた実験結果を定量的に解析することで、シナプスが形成された後の時間経過に従った PSD 構造の成熟過程を示すことに成功した。

(2) 脳内のシナプスについて高分解能顕微鏡法を適用するための方法論の開発

脳内のシナプスについては、全反射や斜光照明による一分子の励起・検出手法を直接適用出来ない。これに代わる手法として、電子顕微鏡観察に利用される超薄切片法を応用して、まず脳組織を固定し、樹脂包埋後に厚さが 50-数百ナノメートル程度の超薄切片を作成し、切片内に水平に含まれる PSD 構造について、蛍光イメージングおよび PALM 法による分子分布解析を行う技術基盤を得た。

(3) In vivo imaging 法によるマウス大脳皮質におけるシナプスリモデリングの特徴抽出と PSD 分子構築の解析

子宮内電気穿孔法により神経前駆細胞に蛍光蛋白質で標識した PSD 分子を発現させ、大脳皮質の生後早期発達期におけるシナプス動態を明らかにした。次に in vivo imaging で同定された新規シナプス・安定シナプスについて、その PSD の微細形態の特徴を PALM 法によって明らかにするための技術基盤を確立した。

5. 今後の計画

(1) 平成 21-23 年度の計画はほぼ予定通りに進行している。

(2) 平成 24-25 年度の研究では特に PALM 法、Array tomography, in vivo imaging の三つの技術の統合を推進する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Kawabata, I., Kashiwagi, Y., Obashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., Wynshaw-Boris, A., Yanagawa, Y., Okabe, S. LIS1-dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nature Communications* 3, 722, 2012.

2. Hirai, S., Miwa, A., Ohtaka-Maruyama, C., Kasa, i M., Okabe, S., Hata, Y, and H. Okado. RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex. *EMBO Journal* 31, 1190-1202, 2012.

3. Kondo, S., Kohsaka, S. Okabe, S. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo *Molecular Brain* 4, 27, 2011

4. Kusano K, Enomoto M, Hirai T, Wakabayashi Y, Itoh S, Ichinose S, Okabe S, Shinomiya K, and A. Okawa Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1. *Neuroscience Letter* 492, 64-69. 2011.

5. Numano, F., Inoue, A., Enomoto, M., Shinomiya, K., Okawa, A., Okabe, S. Critical involvement of Rho GTPase activity in the efficient transplantation of neural stem cells into the injured spinal cord *Molecular Brain* 2, 37, 2009.

6. Tanaka, S., Kunii, M., Harada, A., Okabe, S. Generation of cortactin floxed mice and cellular analysis of motility in fibroblasts *Genesis* 47, 638-646, 2009.

7. Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T., Okabe, S. Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of CaMKII α kinase activity in dendritic spine enlargement, LTP and learning *Journal of Neuroscience* 29, 7607-7618, 2009.

平成 22 年 6 月 日本顕微鏡学会学会賞 (瀬藤賞) 授賞

ホームページ等

<http://synapse.m.u-tokyo.ac.jp/>