

微細構造相関解析法を用いた自閉症モデルマウスのシナプス構造異常の検出 (Structural impairments in a central synapse of ASD model mice revealed by a newly established correlation analysis of sub-synaptic ultrastructures)

研究代表者： 深澤 有吾 (医学系部門・教授)

共同研究者： 松崎 秀夫 (子どものこころの発達研究センター・教授)

概要	本研究では、独自開発した電子顕微鏡による構造解析手法(微細構造相関解析法)を自閉症モデルマウスの脳内シナプス結合の解析に応用することで、シナプスレベルの異常を高精度に同定し、自閉症の病態理解を深めることを目的とした。 家族性自閉症患者の遺伝子に同定されたシナプス結合分子 <i>neuroligin-3</i> の1アミノ酸置換を導入した自閉症モデルマウス (R451C マウス) を共同研究者より提供を受け、このマウスの海馬 CA1 放射状層中のシナプスを対象にシナプス結合内の機能ドメインの構造特徴を定量的に解析し、その特徴間の相関関係を解析した。その結果、このモデルマウスのシナプスでは、シナプス前後構造の間で通常みられる協調的な構造相関関係が見られないこと、また、シナプス後肥厚の過形成が起きていることが明らかとなった。これらの結果から、このモデルマウスではシナプス結合構造自体に異常があり、これがシナプス伝達の機能異常を引き起こした結果、自閉症様行動異常が誘導されている可能性が示唆された。
関連キーワード	シナプス、微細構造、電子顕微鏡、精神疾患モデルマウス、自閉症

研究の背景および目的

シナプス結合の微細構造間の相関関係をもとに構造異常の有無を評価できる新規構造解析系を用いて、自閉症モデルマウスの中枢シナプス結合を解析し、これらマウスの脳内シナプス構造の異常を今までにない精度で解明することを目的とした。

本研究で用いる微細構造相関解析法は、中枢シナプス構造の構築原則と多様性を明らかにするために約2年前に開始した研究の成果をもとに発案したものである。この研究では、野生型マウスの5種類のシナプス結合の超微構造情報を取得し、各構造間の相関を検討した。その結果、特定の超微構造(シナプス前膨大部の体積、シナプス小胞の数、シナプス後樹状突起スパインの体積、シナプス後肥厚の面積)が全てのシナプス結合種において互いに相関関係を維持した状態で構築されていることが明らかとなり、この際、相関関係の「傾き」や「Y切片値」がシナプス結合の種類毎に固有の値をとることが見出された。また、見当識様記憶障害を呈する遺伝子欠損マウスのシナプス結合で、上記の微細構造間の相関関係が消失したり、その相関関係の様子(比率)が変化していることも見出し、本手法がシナプス結合の構造異常の検

出に有効であることを実証した。この手法は、世界的に見ても有数の最新の電子顕微鏡技術である三次元走査型電子顕微鏡(3D-SEM)を用いてのみ実施可能であり、シナプス構造と機能の関係を長年解析してきた申請者が独自に開発した解析技術をベースに確立した方法であり、他の追従を許さない状況にあり、本手法を神経病理学的研究へ応用し、その有用性を拡大することで、本手法による脳内構造解析の優位性を更に高めることができると考えた。

更に、この解析により明らかになる精神神経疾患モデルマウスのシナプス構造相関情報は、疾患モデルマウスに見られる神経病理学的異常がシナプスの構築異常によるものか、それとも、単に解析対象神経回路の活動異常によるものかを明瞭に区別することができ、更に、見出したシナプス構造の異常から、シナプス伝達過程における機能的異常を正確に予測することが可能となる。従って、自閉症モデルマウスのシナプス構造を解析することで、自閉症発症のメカニズム解明と治療戦略の立案の両面に有用な情報を得ることが期待できる。

研究の内容および成果

子どものこころの発達研究センターにおいて飼育されている 8 週齢の自閉症モデルマウス系統 (neurologin-3 R451C マウス : R451C マウス) と野生型マウスを灌流固定後、摘出した脳に 3D-SEM 観察に適した前処理を行った。脳組織試料を名古屋大学医学部分析機器センター保有の 3D-SEM を用いて、海馬 CA1 放射状層中の神経組織構造を 10 nm 毎に連続断層撮影し、福井大学に持ち帰った。この画像からシナプス結合の 3 次元構造を再構築し、シナプス内機能ドメイン (後述) の構造情報を計測した。シナプス前膨大部の体積 (Vpre) とその内部に含有されたミトコンドリアの体積 (Vmito)、シナプス小胞の数 (Nsv)、そして、シナプス後樹状突起スパインの体積 (Vsp) とその中のシナプス後肥厚 (PSD) の面積 (Apsd)、及び、小胞体関連構造の体積 (Vser) を計測対象とした。各機能ドメインの計測値間の相関関係を評価し、野生型マウスのシナプス結合から得られた相関関係と比較することで、自閉症モデルマウスのシナプス結合に潜む構造異常を精査した。

上記検討の結果、野生型マウスでは、Vpre、Nsv、Vsp、Apsd のそれぞれの計測値間で統計学的に有意な相関関係が認められたのに対し、R451C マウスでは、Vpre と Nsv、及び、Vsp と Apsd の間でのみ有意な相関関係がみられ、シナプス前後の計測値間の相関関係はみられなかった。更に、Vsp

と Apsd の間の相関を示す回帰直線は野生型の回帰直線よりも大きな傾きを持ち、Vsp と Apsd の比の平均値は、R451C マウスで有意に高値を示した。シナプス前膨大部のミトコンドリアやシナプス後スパインの小胞体関連構造の出現頻度、更に Vmito と Vpre、及び Vser と Vsp の間の相関関係には、遺伝子型による違いはみられなかった。

これらの結果は、シナプス接着分子である Neurologin-3 の 1 アミノ酸変異により、シナプス前後構造間の協調的な構築過程が阻害された結果、神経機能の創出に中心的な役割を担う神経回路の形成と再構成が阻害されていることを示している。また、PSD の面積は、発現するイオン透過型グルタミン受容体の発現量と正の相関関係を示すことが知られ、今回の解析で R451C マウスの海馬 CA1 シナプスでは PSD の形成が亢進 (PSD 過形成) していたことから、このマウスのシナプスでグルタミン酸応答が過剰に生じている可能性が示唆された。従って、この自閉症モデルマウスにみられる自閉症様行動異常の発症原因として、シナプス構築異常に起因した神経回路の構造異常、ひいては、機能異常が一因となっていることが示唆された。

今後は、シナプス伝達関連分子の局在解析を進め、さらに自閉症症状を発症しない Neurologin-3 欠損マウスについても解析を進め、自閉症様行動異常の神経回路レベルの原因を明らかにしたい。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Darin Lanjakornsiripan, Baek-Jun Pior, Daichi Kawaguchi, Shohei Furutachi, Tomoaki Tahara, Yu Katsuyama, Yutaka Suzuki, Yugo Fukazawa, Yukiko Gotoh. (2018.4) Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. Nature Communication. In press.

「学会セミナー等の招待講演」

1. Yugo Fukazawa “Common and Unique Ultrastructural Rules across Axospinous Synapses in the Mouse Brain Revealed by FIB-SEM Imaging: A novel method for structural analysis of the synapse in normal mice and disease mice models” The 2nd Neuroscience Society of Nepal, Nepal-Japan Neurosymposium, National Academy of Science and Technology of Nepal (Lalitpur, Nepal), May 3rd, 2017.
2. 深澤有吾「SDS-FRL 法による定量的膜分子局在解析」第 69 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「先端イメージングが解き明かす新しい細胞像」、仙台国際センター(仙台市), 2017 年 6 月 14 日
3. 深澤有吾「FIB-SEM を用いたシナプス微細構造の定量解析: Quantitative analysis of fine structure of synapses by FIB-SEM」第

- 40 回日本神経科学大会 FEI ランチオンセミナー 幕張メッセ, 千葉, 2017 年 7 月 22 日
4. 深澤有吾「凍結切断レプリカ免疫標識法を中心とした免疫電子顕微鏡法による分子局在解析の基礎と応用」新学術領域研究「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会, 長野(蓼科), 2017 年 9 月 8 日
5. Yugo Fukazawa “Common and Unique Construction Rules across Axospinous Synapses in the Mouse Brain: A novel approach for structural analysis of the synapse based on correlated organization of sub-synaptic fine structures obtained by FIB-SEM Imaging” Symposium “Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy” Doshisha University Biwako Retreat Center, Shiga, 2017.11.29-12.1
6. 深澤有吾他「軸索-棘シナプス結合の微細構造相関解析とその応用」第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会シンポジウム「生体機能と形態をつなぐ三次元微細構造解析技術の新たな応用」(東京都武蔵野市), 2018.3.29

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 深澤有吾 科学研究費「挑戦的萌芽」「脳内シナプス結合の構造情報データベースの基盤形成」480 万円 平成 29-30 年度