

シナプス前後構造の協調的成熟を支える分子メカニズムの解明

研究代表者： 深澤 有吾（医学領域脳形態機能学分野・教授）

概 要	シナプス結合は神経細胞どうしが結合して形成する神経回路の構造基盤であると同時に、シナプス前神経細胞からシナプス後細胞への情報伝達を担う機能的にも重要な構造である。特に軸索 - 樹状突起棘シナプスに分類されるシナプス結合は、構造と機能の両面で高い可塑性を示し、学習・記憶、更に精神神経疾患との深い関連性が報告されている。従って、その調節を担う分子メカニズムを解明することは、脳の高次機能創出メカニズムや神経疾患の病態理解に必須である。そこで本研究では、シナプス前後の結合構造全体を高い分解能で定量的に解析できる最新の電子顕微鏡観察技術を用いた独自手法を開発し、シナプス結合の構築則及び、その規則を制御する遺伝子を同定することで、シナプス結合の構造と機能の制御メカニズムを明らかにすることを目指している。本年度は、野生型マウスの 6 種類のシナプス結合を解析し、構築則を明らかにした。
関連キーワード	シナプス結合、超微形態、構造・機能相関、精神神経疾患、電子顕微鏡

研究の背景および目的

本研究は、脳内シナプスのシナプス前後構造の協調的成熟を支える分子メカニズムを解明し、精神神経疾患の病態理解に新規コンセプトを提案することを目的とする。

シナプス伝達の分子メカニズム研究は 2 つの制約によりその進展が阻まれている。1 つは、伝達を担うシナプス結合が極めて小さく、且つ構造特徴が神経細胞の組合せ毎に多様性を示すことであり、もう 1 つは、シナプス伝達が前後の 2 つの神経細胞で起こる独立した現象により担われていることである。従って、シナプス結合の構造と機能を単一シナプスで解析することができない。このためこれまでの研究の多くは培養神経細胞や急性脳スライスを対象に、多種多様なシナプスを「ひとまとめ」にして解析することを余儀なくされ、シナプス集団をまとめて解析して得られる平均像しか評価できていない。更に、シナプス前後で起こる現象を、それぞれの現象に適した独立した手法で解析しているため、シナプス全体としてどの様に動作しているのかは未だに理解できていない。この現状を打破するためには、単一シナプスレベルでシナプス前後の機能的関係性を解析できる実験系を確立し、知見を得ることが必要である。

近年の脳神経科学領域の研究では、非侵襲的脳内活動の観測や光遺伝学手法を用いた神経活動制御により、脳内のどの部位の神経回路或いは神経細胞が特定の脳機能創出に関与するかを明らかにすることが盛んに行われている。しかし、個々の

神経細胞がどの様に情報を伝え、処理しているかが分からなければ、脳の情報処理のメカニズムには迫れない。従って、この脳内神経回路研究の後に、シナプス伝達機構解明の重要性が再認識されることが予想される。

申請者はこれまで、シナプス伝達特性の形成に関与する分子とその局在を単一シナプスレベルで明らかにする研究に従事し、シナプス結合を構成する各機能ドメインの構造と分子局在との相関関係を明らかにし、更に、これら分子の局在様式と機能との相関関係を明らかにしてきた。また、シナプス前後構造の構造的特徴を定量的に解析できる独自の観察法（収束イオンビーム搭載高分解能走査型電子顕微鏡を用いたシナプス微細構造間相関観察法）も確立し、シナプス前後構造内の各機能ドメインの構造特徴が、シナプスの成熟に伴い協調的に変化することを示す結果を得た。

そこで、この観察系を応用して、脳内シナプス結合の前後構造の協調的成熟を担う分子機構を、シナプス結合種毎に、単一シナプスレベルで解明できれば、次世代の神経科学研究領域の開拓に資する成果となると考えた。本研究は、シナプス構造情報から情報伝達上の機能特性を予測する手法の開発に繋がるので、回路レベルの研究成果と統合することで、脳の情報処理機構の解明や個性の創出、神経疾患発症のメカニズム解明、そして治療戦略の立案など多方面に有用な知見と技術を提供できる可能性が有る。

研究の内容および成果

野生型マウスの 6 種のシナプス結合（内側嗅内野一歯状回シナプス、外側嗅内野一歯状回シナプ

ス、海馬 CA3-CA1 放射状層シナプス、嗅内野一海馬 CA1 分子層シナプス、海馬 CA3-CA3 放射状層

シナプス、小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプス)の連続電子顕微鏡断層画像を名古屋大学医学部分析機器センターに設置されている収束イオンビーム搭載高分解能走査型電子顕微鏡を用いて取得した。それぞれのシナプス結合種につき20個以上のシナプス結合を解析対象として無作為に抽出し三次元再構築した。各シナプス結合の再構築像より、シナプス前膨大部の体積、シナプス小胞の数、ミトコンドリアの数と体積、及び、シナプス後棘突起(スパイン)の数と体積、シナプス後肥厚(PSD)の面積、スパイン内小胞体の体積を計測し、各計測項目間の相関関係を検討した。

その結果、全てのシナプス結合種において、シナプス前膨大部の体積、シナプス小胞の数、シナプス後スパインの体積、PSDの面積の各計測項目間に統計学的に有意な正の相関が見られた。更に、シナプス前と後にまたがる計測項目(シナプス前膨大部の体積とスパインの総体積、シナプス小胞の数とPSDの総面積)の間にも有意な正の相関が見られた(図参照)。この事は、シナプス結合前後を構成する各オルガネラや機能ドメインが一定の比率を保ちながら、増大・退縮していることを示唆している。特に、シナプス前膨大部の体積とシナプス小胞の数はシナプス前からの放出確率と正に相関し、更に、スパインの体積とPSDの面積は共にシナプス後電流の大きさと正に相関することが示されているので、機能面でも協調的に変化していることが予想され、このシナプス前後の協調的な変化を可能にしている分子機構を明らかにし

たいと考えた。

更に、このシナプス前後構造の相関の様子(近似直線の傾きやY切片、及び、比率)は、シナプスの種類が異なると固有の値を示すことも明らかとなった。従って、個々のシナプス結合種毎に特徴的な構造を有することが明らかとなった。

以上の結果から、今後はシナプス前後構造の協調的な構築機構とシナプス種固有の構造特徴の形成に関わる分子(遺伝子)の探索を行うこととした。また、精神神経疾患モデルマウスのシナプス結合構造を本手法で解析することで、これまで発見されていない新たなシナプス異常を見出し、病態理解を深める研究も行いたいと考えている。

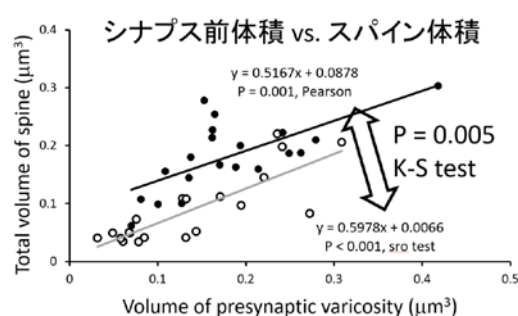


図. シナプス前後構造の相関関係の例。シナプス結合を構成する微細構造の測定値の多く間で相関関係を示すが、その傾きやY切片は結合毎に異なることが分かった。

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. Sato-Hashimoto M, Hayashi Y, Nozu T, Toriba R, Horikoshi A, Akaike M, Nagai H, Shimizu W, Hirose A, Kawamoto K, Saiki A, Ishikawa T, Elhanbaly R, Kotani T, Murata Y, Saito Y, Naruse M, Shibasaki K, Oldenborg P-A, Jung S, Matozaki T, Fukazawa Y, Ohnishi H. (2019) "Microglial SIRP α regulates the emergence of CD11c⁺ microglia and demyelination damage in white matter". eLife. In press.

2. Xie M-J, Ishikawa Y, Yagi H, Iguchi T, Oka Y, Kuroda K, Iwata K, Kiyonari H, Matsuda S, Matsuzaki H, Yuzaki M, Fukazawa Y, Sato M. (2019) "PIP3-Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover". Scientific Reports. In press.

3. Rafael L, Carolina A, Francisco C, Morató A.X., Alejandro M-H, Rocio A-R, Jesús M-G, Luis de la O, Watanabe M, Adelman J, Shigemoto R, Fukazawa Y. (2018) "SK2 channels associate with mGlu1a receptors and CaV2.1 channels in Purkinje cells". Frontiers in Cellular Neuroscience 12: 311.

4. Kakegawa W, Katoh A, Narumi S, Miura E, Motohashi J, Takahashi A, Kohda K, Fukazawa Y, Yuzaki M, Matsuda S. (2018) "Optogenetic Control of Synaptic AMPA Receptor Endocytosis Reveals Roles of LTD in Motor Learning". Neuron 99: 985-998.

「特記事項」

特に無し。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究(B)「微細構造相関解析法を用いたシナプス前後の協調的成熟を支える分子機構の解明」・代表・採択・1474万円

日本学術振興会・科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究(萌芽)「脳内小棘構造(spine)の機能解明に向けた解析基盤の構築」・代表・審査中・500万円