

大気圧走査電子顕微鏡を用いたシナプス構造と分子局在の解析 Analysis of Molecular Localization and Synaptic Structure Using ASEM

植 村 健
Takeshi Uemura

信州大学医学部分子細胞生理学講座

要 旨 シナプス形成は複雑かつ精巧な脳神経ネットワーク構築の要のステップの一つである。近年、小脳における GluRδ2-Cbln1-NRXN 複合体などの脳シナプス形成を担うシナプスオーガナイザーの存在が明らかになってきたが、シナプスの形成過程、分子基盤については不明な点が多い。SiN 薄膜窓を底面にもつ ASEM ディッシュ上に初代培養神経細胞を培養し、光学顕微鏡と電子顕微鏡による同一視野観察が可能な大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) を用いてシナプスに局在する分子の観察を試みた。さらに、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が示された。初代神経細胞培養と ASEM による解析は、シナプス形成の分子機構を解明する上で有力なツールになるものと期待される。

キーワード：大気圧走査電子顕微鏡，シナプス形成，シナプスオーガナイザー，グルタミン酸受容体 GluRδ2

1. はじめに

ヒトの脳には一千億もの神経細胞が存在し、神経細胞と神経細胞がシナプスと呼ばれる特殊な細胞間接着構造で互いに結合することで複雑かつ精巧な神経ネットワークを形成し、脳の情報伝達や記憶・学習をはじめとする高次の脳機能を可能にしている。シナプス形成は脳神経ネットワークの発達において要のステップの一つである。正常な脳機能活動には脳神経ネットワークが正しくシナプスで繋がり、正しく機能することが重要である。その破綻は自閉症や知的障害、統合失調症等の脳発達障害の一因であることが示唆されている。シナプス形成はシナプス前細胞の軸索とシナプス後細胞の樹状突起または細胞体が接触する部位で生じ、シナプスは明確に区別された構造物として観察される (図 1)。シナプス間隙に面するシナプス前部にはシナプス小胞の開口放出の場として重要な働きをしているアクティブゾーンと呼ばれる電子密度が高い膜の裏打ち構造物が存在する。アクティブゾーンには RIM1, Munc13-1, Piccolo, Bassoon 等のタンパク質が集積し、アクティブゾーンの構造形成、維持に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、シナプス間隙を挟んだアクティブゾーンの対面のシナプス後部の膜直下にシナプス後膜厚部 (PSD: postsynaptic density) と呼ばれる電子密度の高い膜の裏打ち構造物が存在する。PSD には種々の神経伝達物質受容体等の膜タンパク質、細胞骨格系分子、PSD-95, Shank

等の足場タンパク質が集積している。シナプスはシナプス前細胞の軸索が標的細胞であるシナプス後細胞に正しく結合して形成されるが、神経細胞が標的細胞を認識してシナプス形成を開始する分子メカニズムには不明な点が多い。

シナプス形成の分子基盤を明らかにするためには、シナプス形成に関わる分子群を同定し、シナプス形成時の機能分子の動態および微細構造の変化を正確に理解することが必須である。シナプス部位における分子局在やシナプス形態の変化について光学顕微鏡による研究が多くなされてきた。しかしながら、シナプスのサイズは数百 nm 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。

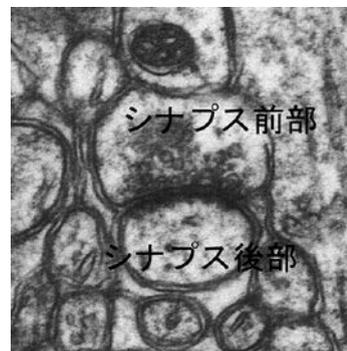


図 1 小脳におけるシナプスの電子顕微鏡像
シナプス前部には多数のシナプス小胞と電子密度の高いアクティブゾーンが観察される。アクティブゾーンのシナプス間隙を挟んだ対面には同じく電子密度の高いシナプス後膜厚部が見られる。

〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1
E-mail: tuemura@shinshu-u.ac.jp
2014 年 2 月 4 日受付

この限界をある程度超える超高分解能蛍光顕微鏡が開発され、主に高分解能での分子位置の特定が可能になった。しかしながら、試料の蛍光標識が必須であり、細胞微細構造を直接観察することができない欠点がある。細胞内の分子局在、微細構造を高分解能で観察するには光学顕微鏡より電子顕微鏡が明らかに適している。しかしながら、電子顕微鏡でシナプスを観察するためには培養面と水平なエポキシ樹脂薄切作成という実際には困難な過程を伴う。そのため、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、佐藤主税博士らにより溶液中の細胞を大気圧下で観察できる大気圧走査型電子顕微鏡 (ASEM: Atmospheric Scanning Electron Microscope) 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が克服できる技術的基盤が確立された¹⁾。

2. シナプスオーガナイザー

今世紀に入って、脳の神経細胞の間にシナプスを形成し、それを維持する分子 (シナプスオーガナイザー) の探索が盛んに行われてきた。シナプス部位にはシナプス前部とシナプス後部の接着を介する N カドヘリンをはじめとする多くのトランスシナプティックな細胞接着分子が存在する。これらシナプス間細胞接着分子の中で、ごく少数の細胞接着分子が前シナプスと後シナプスの分化を誘導させる機能を有することが明らかになってきている²⁾。このような機能を有するシナプス間細胞接着分子の中で最も機能解析が進んでいる分子が Neurexin (NRXN) と Neuroligin (NLGN) である。NRXN または NLGN を発現させた非神経細胞と初代培養神経細胞を共培養すると、通常はシナプスを形成しない非神経細胞の周囲に神経突起が伸張し、それぞれシナプス後部、シナプス前部の構成成分が集積してくる。そのため、シナプス前部に局在する NRXN とシナプス後部に局在する NLGN がトランスシナプティックに結合することで双方向性にシナプス前部とシナプス後部を分化誘導させることでシナプス形成を担っていると考えられる。生体脳においてはトランスシナプティックな NRXN-NLGN 複合体は正常なシナプス機能発現には必須であるが、シナプス形成・維持には必ずしも必要でないことが示唆されている³⁾。近年、脳シナプス形成を担う複数のシナプスオーガナイザーの存在が明らかになってきたが、後述する GluR82-Cbln1-NRXN と同様に受容体の下流にあるシナプス形成を担う分子メカニズムはほとんど分かっていない。

3. 小脳シナプス形成を司るグルタミン酸受容体 GluR82

グルタミン酸受容体 GluR82/GluD2 は主に小脳プルキンエ細胞の平行線維シナプスに局在する分子である。GluR82 はアミノ酸配列の相同性からイオンチャネル型 GluR に分類されるが、他のイオンチャネル型 GluR と異なりイオン透過活性が報告されていない。また、GluR82 はグルタミン酸の代わりに D-セリンと結合することが報告されている。GluR82

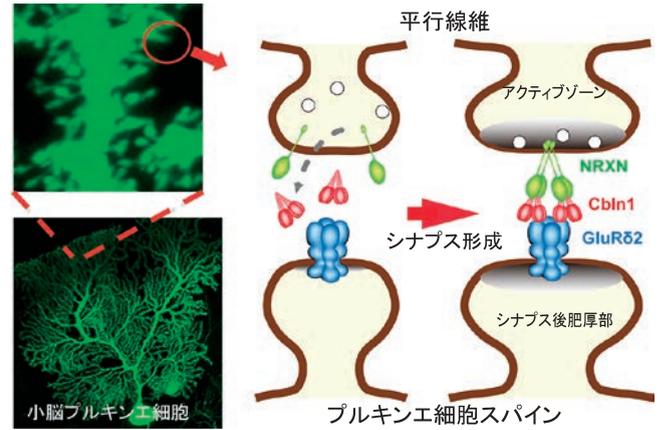


図2 小脳シナプス形成の分子機構モデル
シナプス後部の GluR82 が Cbln1 を介してシナプス前部の NRXN と結合して三者複合体を形成することでシナプス形成が誘導される。

の KO マウスの解析から、GluR82 は小脳平行線維—プルキンエ細胞間のシナプス形成・維持に重要な役割を果たしていることが示されていた⁴⁻⁶⁾。GluR82 によるシナプス形成機構は長年不明であったが、筆者らは GluR82 が分泌タンパク質である Cbln1 を介して NRXN とトランスシナプティックに結合することで小脳プルキンエ細胞—平行線維間のシナプス形成を誘導することを明らかにした⁷⁾ (図2)。どのようなシグナルを細胞質内に伝えることでシナプス形成が誘導されるかについては不明であるが、GluR82-Cbln1 による NRXN の 4 量体化がシナプス前部の分化を誘導すること⁸⁾、Cbln1 が NRXN と GluR82 と結合することでシナプス前部から小さな突起の形成を誘導し、シナプス前部の構造を形成することが報告されている⁹⁾。

4. 光学顕微鏡と大気圧走査電子顕微鏡による同視野観察

GluR82 は Cbln1 を介して NRXN と結合することで小脳シナプス形成を誘導する (図2)。GluR82 のシナプス形成を誘導する活性は培養神経細胞系でもシナプス前部の分化誘導能という形で再現される⁷⁾。非神経細胞である HEK293T 細胞に GluR82 を発現させ、培養小脳神経細胞と共培養すると、HEK293T 細胞周囲にシナプス前部に局在しているタンパク質が集積してくるのが観察される。磁気ビーズに組換えタンパク質として精製した GluR82 の N 末端細胞外領域 (NTD: N-terminal domain) を結合させて培養神経細胞に添加した場合も同様にシナプス前部の分化誘導が見られる⁷⁾。

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トし、マウス小脳由来の神経細胞を培養した。培養6日目に GluR82-NTD を結合させた磁気ビーズを添加し、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

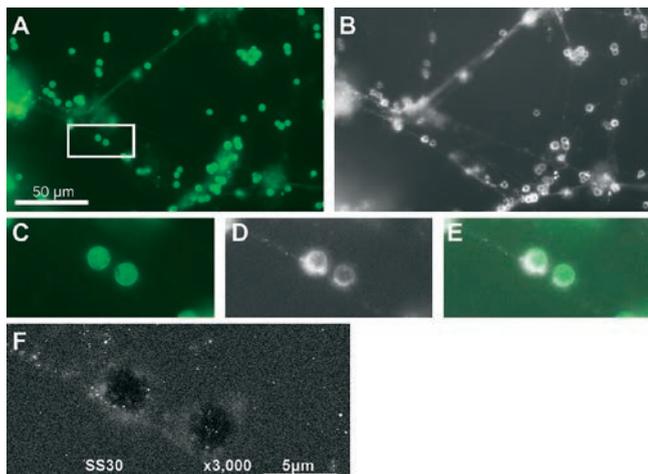


図3 培養小脳神経細胞と GluRδ2-NTD-Fc 結合させた磁気ビーズの光学顕微鏡と ASEM による同視野観察。
 (A) EGFP を発現している神経細胞の軸索と磁気ビーズ。(B) 抗 Bassoon 抗体 (Alexa Fluor 594 と金粒子で標識) および抗 VGlut1 抗体 (Alexa Fluor 647 で標識) による免疫染色像。(C-E) 図3Aの白線四角の拡大図。(F) 図3Aの白線四角内の ASEM 像。引用文献 10 より改変。

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 (図 3A-E)。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 (図 3F)。磁気ビーズは ASEM では黒い像として観察されたが、これは粒子のコアがポリスチレンであるためと推測される。次に、培養大脳皮質神経細胞を光学顕微鏡と ASEM で同時に観察した。培養 14 日目に固定し、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ている (図 4A)。光学顕微鏡で確認された Bassoon のシグナル (図 4B, 矢頭) 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る (図 4C, 矢頭)。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分かる (図 4D)。

シナプスの基本的な構造と機能が明らかになり、シナプス形成を担うシナプスオーガナイザーの存在が明らかになってきたが、依然としてシナプス形成・維持の分子機構や神経回路レベルでの研究は未解決の部分が多い。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

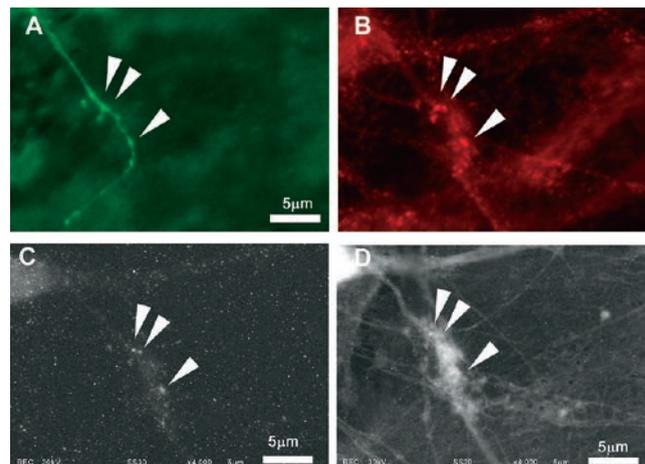


図4 培養大脳皮質神経細胞の光学顕微鏡と ASEM による同視野観察。
 (A) EGFP を発現させた大脳皮質神経細胞 (B) 抗 Bassoon 抗体 (Alexa Fluor 594 と金粒子で標識) および抗 Shank2 抗体 (Alexa Fluor 647 で標識) による免疫染色像。(C) ASEM 像。(D) タンニン酸、クエン酸鉛および酢酸ウラニル処理後の ASEM 像。引用文献 10 より改変。

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考えられる。

謝 辞

本稿の小脳シナプス形成の分子機構については東京大学大学院医学系研究科三品昌美教授 (現立命館大学) のご指導のもとで行った研究であり、ASEM による解析は産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の佐藤主税博士との共同研究である。心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nishiyama, H. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, 169, 438-449 (2010)
- 2) Siddiqui, T.J. and Craig, A.M.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, 21, 132-143 (2011)
- 3) Sudhof, T.C.: *Nature*, 455, 903-911 (2008)
- 4) Kashiwabuchi, N. *et al.*: *Cell*, 81, 245-252 (1995)
- 5) Kurihara, H. *et al.*: *J. Neurosci.*, 17, 9613-9623 (1997)
- 6) Takeuchi, T. *et al.*: *J. Neurosci.*, 25, 2146-2156 (2005)
- 7) Uemura, T. *et al.*: *Cell*, 141, 1068-1079 (2010)
- 8) Lee, S.J. *et al.*: *J. Neurosci.*, 32, 4688-4701 (2012)
- 9) Ito-Ishida, A. *et al.*: *Neuron*, 76, 549-564 (2012)
- 10) Hirano, K. *et al.*: *Ultramicroscopy* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2013.10.010>