

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14336

研究課題名(和文) 神経細胞の活動動態と細胞種とコネクトームをつなぐ技術の確立

研究課題名(英文) New approaches to link cell type, function, and wiring in the brain

研究代表者

今井 猛 (Imai, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：70509851

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)：脳の動作原理を理解するには、回路構造と機能を同一個体で包括的に明らかにすることが重要である。そこで、本研究では脳の3次元的な構造を保ったまま抗体等で染色し、さらに透明化を行ってメソスケールのコネクトームを明らかにすることを目指した。比較的高濃度のサポニンを用いて、形態に影響を与えることなく深部まで抗体染色が可能になることを見出した。またイオヘキソールを用いて屈折率を調整し、球面収差を減らした透明化法SeeDB2を開発した。これにより、組織深部における高解像イメージングを確立した。

研究成果の概要(英文)：To understand functional dynamics of the brain, it is important to analyze neuronal connectivity function in the same animals. In this study, we developed a method to stain thick brain tissues with antibodies and examine connectivity after tissue clearing. We found that high concentration of saponin solution facilitates antibody staining deep inside. We also developed a new tissue clearing agent that minimized spherical aberrations. Using this strategy, we established high-resolution fluorescence imaging of thick tissues.

研究分野：神経科学

キーワード：蛍光イメージング 神経回路 コネクトーム 透明化

1. 研究開始当初の背景

脳機能は膨大な数の神経細胞が織りなすネットワークによって成り立っている。従来、電子顕微鏡でも光学顕微鏡でも、神経細胞の形態を観察する際には切片を作成して2次元で観察するのが定法であった。しかしながら、神経細胞は3次元的に伸びてネットワークを形成しているため、「回路」を明らかにするためには3次元的な情報を手にする必要がある。

電子顕微鏡ベースで3次元情報を得るための方法としては、近年 serial block-face SEM という、連続断面を撮像する新しい顕微鏡が Denk らによって開発されるなど、高解像度コネクトーム研究が飛躍的に進歩している。光学顕微鏡で3次元情報を得るには、従来、共焦点顕微鏡や2光子励起顕微鏡といった、焦点面の光情報だけを取得する顕微鏡が使われてきた。しかしながら、これらの光学顕微鏡においては、脳サンプル内で光散乱が生じるために深部の観察が困難であった。従来から有機溶媒を用いた組織透明化法が用いられてきたが、有機溶媒は蛍光タンパク質等の著しい褪色をもたらすという問題点があった。

こうした問題は、近年、水溶性の組織透明化試薬が開発されたことで克服されつつある。我々は、近年開発された水溶性組織透明化試薬がいずれも一時的にあるいは恒久的に組織の膨潤や収縮を伴い、微細形態を損なってしまうという欠点を問題と考え、組織形態を保持したまま組織を透明化する新しい試薬 SeeDB を開発した (Nat. Neurosci., 2013; Curr Prot Neurosci, 2014)。SeeDB は高濃度フルクトースと微量の還元剤からなる単純な組成であり、簡単な操作で3日ほど処理すれば透明化が完了する。また、高屈折率の SeeDB に最適化した対物レンズも特注で作製し (現在オリンパス社から販売)、厚さ6 mm の成体マウス脳を背側から腹側まで可視化することに初めて成功した。

しかしながら、透明化で明らかになるのは神経回路構造だけに過ぎない。本課題では、これまで独立にデータ取得されてきた神経活動動態、個々の神経細胞の分子的性質、神経回路構造という3者を統合的に解析するための新しい方法の確立を目指した。

2. 研究の目的

具体的には、2光子カルシウムイメージング等によって神経活動動態の計測を行った後、その脳サンプルをそのままの状態に抗体などによる組織染色を施し、さらに透明化することで神経回路の可視化を行うというパイプラインを目指した。特に本課題では以下の3つの要素技術の確立を目指した。

自家蛍光を押さえ、蛍光シグナルを保持した、より簡便な組織透明化試薬の開発

脳サンプルをそのまま深部まで組織染色するための新しい染色法の開発

神経回路再構成のための高解像イメージングの確立

3. 研究の方法

については、厚みのある組織に対して、自家蛍光を生じずに透明化を可能とする試薬のスクリーニング、条件検討を行った。

については、様々な界面活性剤を使って組織浸透性、組織形態の保持について解析を行い、至適条件を決定した。さらに、様々な緩衝液で熱処理をしたり有機溶媒で処理するなどして抗体の浸透性を高める条件を検討した。

については、で同定された透明化試薬について、さらに球面収差を減らして解像度を高めるための条件検討を行った。特に、深部における超解像イメージングへの有効性について検証した。

4. 研究成果

蛍光を最大限保持し、組織形態にも優しい組織透明化試薬 SeeDB2

これまでに蛍光タンパク質のイメージングに適した組織透明化法として、Scale/ScaleS、CLARITY、SeeDB、CUBICなどが報告されているが、まだいくつもの問題点が存在する。Scale/ScaleS や CUBIC は簡便であるがサンプルの膨潤が顕著であり、神経回路の微細構造が保たれないため、in vivo データとの照らし合わせは困難になってしまうという問題点がある。CLARITY はその煩雑さのために再現性が良くない。CUBIC は多くのタンパク質が流出するため、蛍光タンパク質の量も低下する。高屈折率のフルクトース溶液からなる SeeDB は形態を良く保持し、蛍光タンパク質の蛍光も良く保持しているが、メイラード反応を生じやすいため、自家蛍光が生じやすい点、蛍光タンパク質の種類によっては (CFP など) 褪色が見られる点、DAPI 等を用いた対照染色が難しい点などが欠点として残っていた。

そこで我々は、化学的により安定で反応性に乏しく、より効率よく透明化を達成する化合物の探索を行った。特に透明化には高屈折率であることが重要であるということが SeeDB の研究過程で判明していたため、高屈折率化合物に着目して検討を行ってきた。その結果、すでに X 線造影剤として用いられていたイオヘキソールを用いた透明化液が極めて効果的であることを見出し、SeeDB2 と命名した。イオヘキソールは低濃度でも極めて屈折率が高く、アルコール基を持っているために水溶性であり、医療用に使われているように安全性も高い。イオヘキソールは浸透圧がほぼ等張であるため、SeeDB のように自然に組織に浸透しにくいという欠点があったが、界面活性剤を用いることで効率よく固定組織に浸透することを見出した。浸潤プロトコルを最適化することで、組織の伸縮・変形を全く伴わずに短時間 (数時間 ~ 1-2 日) で

組織を透明化できることが判明した。実際に僧帽細胞樹状突起の形態変化について定量したところ、従来の透明化 (CUBIC, CLARITY, ScaleS など) よりも形態がよく保持されていることが判明した。自家蛍光は極めて低く、また蛍光タンパク質の保持についても、従来の方法よりも格段に向上していることが確認できた。

抗体の深部浸透性の向上

厚みのある組織の深部を抗体染色するうえでは、特に細胞膜を抗体分子が透過・浸透できるようにすることが必要である。そこで本研究では様々な界面活性剤について、組織へのダメージと抗体の浸透性の両面から検討を行った。界面活性剤については 0.5-2% とし、SDS、Triton X-100、Tween 20、NP-40、サポニンなどを試した結果、サポニンが最も組織へのダメージが少なく、かつ抗体の浸透性に優れることを見出した。たとえば、マウス嗅球において、深さ 150-200um 程度の僧帽細胞を anti-Reelin で染色することができた。

更に深部まで染色するため、形態を保ちつつもより積極的に脂質を除去する方法についても検討した。この結果、特殊な緩衝液中で熱処理をすることにより、極めて短時間で抗体の浸透性を向上させることに成功した。例えば成体の大脳皮質においては、表層からだい 5 層 (深さ 600um 以上) まで anti-GFP で染色することができた。この他、Gad67 や PV など、抑制性神経細胞のマーカーでも染色できることを確かめた。

深部イメージングにおける解像度の向上

光学顕微鏡を用いた神経回路解析でしばしば問題になるのは分解能の限界である。光学顕微鏡においては回折限界のため、光の波長と同程度よりも細かい構造を解像することは不可能である。軸索や樹状突起スパインはしばしば光の回折限界と同程度かそれ以下の太さになるため (100-300nm 程度) とくにシナプスレベルの構造を明らかにする上では深刻な制約であると言える。近年この問題を解決する超解像顕微鏡も開発されているが、深部において超解像画像を得ることは光散乱や球面収差の制約から困難であった。

球面収差はイメージング液とサンプルの屈折率の不一致により生じる。レイリーの分解能の式より、イメージング液の屈折率が高い程分解能が高くなるため、高解像イメージングは、屈折率 1.518 のイメージングオイルを用いて行われている。しかしながら試料の屈折率はこれより低いいため、たとえ透明であったとしても球面収差を生じ、光が 1 点に収束しなくなるために解像度が低下する。本研究ではこの問題を克服するため、イメージングオイルの屈折率と完全に同じ屈折率を有する透明化液 SeeDB2S を開発した。SeeDB2S は屈折率が 1.518 であり、球面収差を生じないため、試料の深部においても分解能が低下しない。また、球面収差が減るために光のロスもなく、深部でも明るさが一定に保たれる。

この方法を用いて、STED、SIM、Airyscan などの超解像顕微鏡を用いて、脳スライス深部の蛍光イメージングを行った。この結果、深さ 100um 以上まで超解像イメージングが可能であることが示された。また、このために、非常に密に蛍光標識された軸索や樹状突起をも容易に分離して再構成・解析できることが判明した。

以上の成果の一部は 2016 年 3 月に *Cell Reports* 誌に発表された (表紙にも掲載)。今後は実際に機能的イメージングと組み合わせ、生物学的な問題の解決に活用すること、光遺伝学などと組み合わせること、などが課題である。

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 1 件)

Meng-Tsen Ke, Yasuhiro Nakai, Satoshi Fujimoto, Rie Takayama, Shuhei Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato, and Takeshi Imai

Super-resolution mapping of neuronal circuitry with an index-optimized clearing agent

Cell Reports 14(11), 2718-2732 March 22, 2016

doi:10.1016/j.celrep.2016.02.057 査読有

[学会発表] (計 31 件)

以下、特に関連の高いものを抜粋

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Yasuhiro Nakai, Rie Takayama, Shuhei Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato, Takeshi Imai

SUPER-RESOLUTION MAPPING OF THE BRAIN USING SEEDB2

Focus on Microscopy 2016, March 20-23. 2016, Taipei, Taiwan

Takeshi Imai

Deep-tissue super-resolution imaging using an index optimized clearing agent
CSHA meeting on New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms

Dec 7-11.2015, Suzhou, China

Takeshi Imai

Deep-tissue super-resolution imaging using an index optimized clearing agent
第 7 回光操作研究会 国際シンポジウム
「神経回路と神経修飾」

2015.12.04-05 東京都文京区 (東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂)

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Yasuhiro Nakai, Rie Takayama, Shuhei Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato, Takeshi Imai

Deep-tissue super-resolution imaging

using an index optimized clearing agent
Cell Symposia: Engineering the Brain -
Technologies for Neurobiological
Applications

Oct 15-16. 2015, Chicago, IL, USA

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto,
Yasuhiro Nakai, Rie Takayama, Shuhei
Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato,
Takeshi Imai

Deep-tissue super-resolution imaging
using an index optimized clearing agent
AXON2015, Sep 20-22. 2015, Klosterneuburg,
Austria

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Shuhei
Yoshida, Rie Takayama, Tomoya Kitajima,
Makoto Sato, Takeshi Imai

Super-resolution mapping of the brain
using SeeDB2

第 38 回 日 本 神 經 科 学 大 会
Neuroscience2015

2015.07.30 神戸市 (神戸国際会議場、神
戸国際展示場)

今井 猛

透明化技術を用いた神経回路解析のノウ
ハウ

OLYMPUS Innovation Forum 2015 in Kobe

2015.07.28 神戸市 (神戸ポートピアホ
テル)

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto,
Yasuhiro Nakai, Rie Takayama, Shuhei
Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato,
Takeshi Imai

Deep-tissue super-resolution imaging
using an index optimized clearing agent
Tools and Technologies 東北大学知のフ
ォーラム 脳科学研究最前線 -先端技術で切
り拓く超複雑系- シンポジウム

2015.07.25-27 宮城県仙台市 (東北大学片
平キャンパス知の館)

Takeshi Imai

Deep-tissue super-resolution imaging
using an index optimized optical clearing
agent

第 17 回 京 都 大 学 大 学 院 生 命 科 学 研 究 科 シ
ンポジウム

2015.07.02-03 京都市 (京都大学芝蘭会
館稲盛ホール)

Meng-Tsen Ke, Shuhei Yoshida, Rie
Takayama, Tomoya Kitajima, Makoto Sato,
Takeshi Imai.

Deep-tissue super-resolution imaging
using an optimized clearing agent, SeeDB2
日本発生物学会第 48 回大会

2015.06.03 茨城県つくば市 (つくば国際会
議場)

Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.

Super-resolution mapping of the brain
using SeeDB2

BBW 2015 From Neural Circuitry to
Neurotechnology

2015.05.11-5.12 東京都千代田区 (飯野ビル
ディング)

〔図書〕(計 1 件)

今井 猛

組織透明化試薬を用いた 3D 蛍光イメージ
ングのすすめ

生化学 2015 87(2):225-229

出版日: 2015 年 4 月 25 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

感覚神経回路形成研究チーム

[http://www.cdb.riken.jp/research/labora
tory/imai.html](http://www.cdb.riken.jp/research/laboratory/imai.html)

研究室ホームページ

<http://imai.uijin.com/>

SeeDB Resources

[https://sites.google.com/site/seedbreso
urces/](https://sites.google.com/site/seedbresources/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 猛 (Imai, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所

多細胞システム形成研究センター

チームリーダー

研究者番号: 70509851

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし