

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07428

研究課題名(和文) 神経ペプチドの標的ニューロン可視化による神経修飾機構の解明

研究課題名(英文) Neuromodulation by neuropeptides

研究代表者

赤染 康久 (Akazome, Yasuhisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50302807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチドによる神経修飾機構の解明を目的として、メダカにおいて生殖関連行動の制御に関与することが認められている終神経GnRH3ニューロンの微細構造を解析した。終神経GnRH3ニューロンに共同在することが知られているFMRFアミド免疫陽性ペプチド(おそらくニューロペプチドFF)および、GnRH3ニューロンGFP標識メダカを利用してGFPに対する免疫電顕法を実行し、当該ニューロンの分泌小胞や軸索終末の微細構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日脳内のニューロン間の結合に関して全面的に把握しようとするコネクトーム解析の取り組みが盛んである。その次の段階として特定のニューロンの結合様式について理解することが必要となる段階に達すると予想される。特定のニューロンをidentifyしつつその微細構造に迫ることを可能とする本研究は、私たちの脳理解を次の段階へと導くもので、私たちの真理探究への欲求を満たすという意味で学術的にも社会的にも多少の意味を持っているものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to elucidate the mechanisms how neuropeptidergic neurons participate neuromodulation by clarifying the fine structures of these neurons. I elucidated the ultrastructure of GnRH3 neurons in the medaka (*Oryzias latipes*) by improving the tissue procession in the immunoelectron microscopy. Thus far, osmium tetroxide has not been used in tissue preparation in immunoelectron microscopy because of its strong oxidation activity, which has been regarded to bring about decrease of antigenicity of specimens. However disuse of osmium has caused poor preservation of ultrastructure of membranous structures. In the present study, I optimized tissue preparation process of electron microscopy. Optimized procedures enabled me to observe ultrastructure of medaka GnRH3 neurons, and therefore I could determine the precise transmitter-releasing site of these neurons. The improved methods will open the door to further elucidation of neuronal connectivity of the brain.

研究分野：神経生物学

キーワード：微細構造 GnRHニューロン 神経修飾

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の中樞神経では、主としてグルタミン酸（興奮性）および GABA（抑制性）によるミリ秒単位の迅速なシナプス伝達により神経情報伝達機能のかなりの部分が成り立っている。実際にはこれに加え、各種の神経ペプチドをはじめとするさまざまな伝達物質によるニューロンの興奮性の調節やシナプス伝達効率の調節（神経修飾）がおこなわれ、脳の全体としての機能統御が実現している。すなわち、グルタミン酸および GABA による基本的な神経伝達を基礎として、神経ペプチドをはじめとする各種因子による神経修飾神経により、特定の回路が選択的に活性化されたり、またはその逆に抑制されるなどすることを通じて、環境に応じた柔軟な脳機能の応答が実現されると考えられる。その全容を明らかにする上では神経ペプチドなどの作用する部位を明らかにすることが必須である。ことにペプチドの場合、典型的なシナプスの領域に加えシナプス以外の領域からの放出が示唆されており、その機能を理解する上では放出の領域を特定する必要があると考えられるが、特定のニューロンを同定しつつ細胞小器官レベルの微細構造の解析は一般的には困難であった。

### 2. 研究の目的

ペプチド系による伝達の特異性は、リガンドであるペプチドとその受容体間の結合の特異性に加えその分布により規定される。したがってその機能を理解する上では、当該するペプチドニューロンの線維走行と放出部位の形態学的な同定と、標的ニューロンの形態学的な把握とが必須である。本計画では、ペプチドニューロンとその受容体を発現するニューロンとを GFP などで標識して、その微細構造を解明したいと考え、まずリガンドを放出するペプチドニューロンに対して免疫電顕を実行し、放出領域を重点的に微細形態の観察を行うこととした。ここで問題となったのは、従来の免疫電顕では抗原性に与えるダメージを最小限にするために膜系の固定を行わないのが通例であったことであった。このため、膜構造の保存の極めて不十分な標本における形態学的観察を強いられ、本計画では抗原性の維持と膜系の形態の保持の両立を図る試料作製条件を見出すことを第一の目的とした。

### 3. 研究の方法

まず特定のペプチドニューロンの形態を明らかにするため、メダカにおいて行動との関連など機能の理解が進んでいる GnRH3 ニューロンを研究対象としてその微細構造を電子顕微鏡レベルで解析することとした。抗体としては、入手の容易さを考慮し、当該ニューロンに共局在することが判明しているニューロペプチド FF を検出する抗 FMRF アミド抗体、また同ニューロンが GFP 標識されたメダカに対しては GFP に対する抗体を用いて免疫電顕を実行した。この中で試料の固定、切片の後処理などに関して条件を検討した。

### 4. 研究成果

固定条件等の改良により、抗原性を維持しつつ膜系の形態の満足すべき保存を伴った結果を得ることができた。抗 FMRFa 抗体を使用した実験ではペプチドの分泌顆粒が標識され、ペプチド小胞を良好な形態を保存しつつ同定できることがわかった。これのみでは、ニューロンのように線維に富む細長い細胞では細胞の全体像が分からなくなってしまうため、GnRH3 ニューロンを GFP 標識した動物を試料とした GFP に対する免疫電顕についても条件を検討した。その結果、細胞質を全面的に標識した電顕像を得ることができた。これにより、ニューロンの細胞体から、軸索突起、樹状突起もほぼまんべんなく二次抗体に結合した金コロイド粒子により標識され、なおかつ膜系の良好な保存から、細胞膜はもとより分泌小胞等の微細構造も観察することができた。以上の成果を通じて、特定のペプチド作動性ニューロンについてその全体像とペプチドの分泌顆粒とを特異的に電子顕微鏡レベルで染め出す、安定した技術を確立することができた。

脳機能を解明するうえで、線維走行に加え神経伝達物質放出部位を解明することは必須であり、そのためには電子顕微鏡レベルでの微細構造の分析が不可欠である。しかし脳はニューロンが隙間（細胞マトリックス）なくぎっしりと詰め込まれた構造をとっており、しかも軸索突起のような細長い細胞質が密に入り組んで配置されている。このような状況で特定のニューロンについて微細構造を明らかにするためには、膜系の良好な保存に加え、細胞質を均一に標識できる手法が必要であった。In situ hybridization 等では細胞体のみ標識され軸索突起の標識が不十分であるため、免疫組織学的な手法が有効であったが、一般的な電子顕微鏡標本の調製では抗原性の保持が難しかった。この他に、GFP 等でニューロンを標識した上で photoconversion を行う方法等も開発されていたが、この場合細胞内が一様に黒化してしまい微細構造の観察に堪えなかった。今回免疫電顕の手法を最適化することにより細胞小器官の微細形態を維持しつつ特定のニューロンの形態を解明する手法を確立できた。すなわち、神経終末のシナプス前膜や、軸索突起、シナプス後膜の微細構造を、しかもそれがいかなるニューロンであるかを identify しつつ詳細に検討する手段を得ることができた。現在の脳研究は精神のしくみを解き明かすことを企図して connectome 解析のデータ集めの段階に置かれていると思われるが、この次の段階として

は connectome の big data からいかにして興味ある回路を切り出すかを問われることとなろう。本研究の成果はこの特定の回路の切り分けに道を拓くものであると考えられる。ことに GFP をはじめとする汎用性も高い分子標識に対して条件を決めることができたことは、本方法の広い応用可能性を予感させるものであり、脳研究に画期をなすものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----