

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14767

研究課題名(和文)収束イオンビーム切削走査電顕FIB-SEMによるシナプスの3次元形態計測

研究課題名(英文)3D morphometry of synapses with focused ion beam-scanning electron microscopy

研究代表者

木下 専 (KINOSHITA, MAKOTO)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30273460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：透過型電顕試料用のプロトコルにより、野生型および遺伝子改変マウス脳組織から試料(非標識)を作製した。従来のssTEM法と福井大学深澤教授グループが最適化したFIB-SEM法で並行して解析し、両者の結果を比較した。ssTEM法では認められなかったシナプス形態異常をFIB-SEM法により見出すことができた。これは深さ方向の切片厚の差(50nm vs. 5nm)によるところが大きい。ssTEM法には精細な2次元像を広い範囲で取得できるメリットがあるため、両者の利害得失を知って併用することが重要と思われる。3D免疫電顕の比較は現在進行中である。

研究成果の概要(英文)：In this study we acquired serial 2D images from conventionally prepared tissue samples from wild type and genetically engineered mouse brain and compared 3D reconstructed images by using conventional ssTEM and FIB-SEM (in collaboration with the Fukazawa lab at Fukui Univ.). FIB-SEM, but not ssTEM, found a unique anomaly in synapse morphology, mainly due to the thickness along Z-axis (5nm vs. 50nm), whereas ssTEM could cover wider volume than FIB-SEM. Comparison of the two methods with immunogold-labeled samples is under investigation.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：シナプス 形態計測 ノックアウトマウス 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

問題点：グルタミン酸作動性シナプスの伝達効率と最も強く相関する指標はアクティブ・ゾーン表面に集積する AMPA 型グルタミン酸受容体の分子数であるが、計測手法が凍結割断レプリカ標識(SDS-FRL)法に限られ、普及していない。次いでシナプス伝達効率と相関する形態的代理指標とされているのがアクティブ・ゾーンの面積(2次元)やスパイン体積(3次元)などである。これらは連続超薄切片から取得した一連の TEM 画像を積層・整列して3次元再構築する ssTEM(ss=serial section)法で計測可能である。3次元再構成されたシナプスからは、シナプス小胞の数・分布、アクティブ・ゾーン面積、スパイン体積、スパイン全長および頭部-頸部-基部の長径および短径、スパイン内小胞体(=spine apparatus)などシナプス再編成に伴って変動する重要な形態学的パラメータが抽出できる。immunogold 法の併用で標識金粒子数から蛋白質密度分布も概算できる。応募者らは学部～修士課程学生のような未経験者でも短期間のトレーニングでルーティンに施行できるよう ssTEM + immunogold 法のプロトコルを最適化した(深澤、木下ら *Methods in Cell Biol* 2016)。しかし、ssTEM 法の技術的なボトルネックとして、深さ(z軸)方向の分解能が超薄切片の厚さ(50nm)で制約されることと、時間的・作業的コストの高さが問題となっている。

2. 研究の目的

従来型の TEM 用試料に準じた方法で脳組織試料(非免疫標識)を作製し、新規導入された FIB-SEM 装置を用いて3D解析用高画質 2D 画像が安定して取得できるよう条件検討を行う。1) 試料の固定・染色、2) 切削・撮像条件、の各ステップで最適化を図ることで取得画像からのシナプス要素のセグメンテーションが容易になるよう画質(特にコントラスト)改善を試みる。

3. 研究の方法

1) 試料作製：従来型の TEM 用と同様にホルムアルデヒド固定液にて灌流固定したマウス脳組織試料を half Karnovsky 液(グルタルアルデヒド+ホルムアルデヒド)にて浸漬固定し、細切後 en bloc で四酸化オスミウム、酢酸ウラン、クエン酸鉛による固定+重金属染色を1~数回行う。脱水後、TEM 用レジンに包埋する。以上の複数ステップにおいて複数の条件による最適化を試みる。

2) 共同研究者の深澤教授の技術協力の下に FIB-SEM 装置(Scios, FEI 社製)にて厚さ 5nm で連続断面画層を自動取得する。上記試料から情報量の多い画層が安定して取得できるよう、複数の切削条件、撮像条件を試行する。同一試料を ssTEM で解析し、両者を比較する。3) 2D 画像データからの 3D 再構築、体積・面積を算出する。シナプス小胞数と分布

(FIB-SEM のみ) アクティブ・ゾーン(PSD)面積、スパイン体積、スパイン長、頭部-頸部-基部の長径・短径、spine apparatus などシナプス再編成に伴って変動する定量的形態指標を計測・抽出し、同腹の野生型および遺伝子改変マウス群間の有意差を統計学的に検定する。

4. 研究成果

1) 透過型電顕試料用のプロトコルにより、野生型および遺伝子改変マウス脳組織から試料(非標識)を作製した。従来型の ssTEM 法と福井大学深澤教授グループが最適化した FIB-SEM 法で並行して解析し、両者の結果を比較した。ssTEM 法では認められなかったシナプス形態異常を FIB-SEM 法により見出すことができた(投稿準備中)。これは深さ方向の切片厚の差(50nm vs. 5nm)によるところが大きい。但し ssTEM 法には精細な 2次元像を広範囲で取得できるメリットがあるため、解析の目的に応じて選択すべきと考えられる。3D 免疫電顕の比較は現在進行中である。

2) 上記解析により、CDC42EP4 欠損マウスでは小脳の Bergmann グリア突起先端がシナプス間隙から後退する一方、前後シナプス膜の接着領域が辺縁部でのみ拡大していることがわかった(アクティブゾーンの幅は正常)。N-cadherin や非筋型ミオシン重鎖 B/MYH-10 などニューロン側の接着関連分子の増加や、最近報告された GLAST 欠損マウス(宮崎、渡辺ら *PNAS* 2017)との類似性から、この異常は過剰なグルタミン酸に対するニューロン側の 2 次的反応と推測される。グルタミン酸滞留に起因するこのようなシナプス再編成は、細胞外死腔を拡大することでグルタミン酸クリアランスをさらに遅延させ、悪循環をもたらす可能性があることを報告した(*Neurochem Int* 2018)。

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 6 件)

1. Parajuli LK, Ageta-Ishihara N, Ageta H, Fukazawa Y, Kinoshita M. Methods for immunoblot detection and electron microscopic localization of septin subunits in mammalian nervous systems. *Methods in Cell Biology* 136, 285–294, 2016.

2. Torii H, Yoshida A, Katsuno T, Nakagawa T, Ito J, Omori K, Kinoshita M, Yamamoto N. Septin7 regulates inner ear formation at an early developmental stage. *Developmental Biology* 419, 217–228, 2016.

3. Mujal AM, Gilden JK, Gérard A, Kinoshita M, Krummel MF. A septin requirement differentiates autonomous and contact-facilitated T cell proliferation. *Nature Immunology* 17, 315–322,

2016.

4. Horigane S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H. Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI pathway during neuronal polarization. *Molecular Brain* 9:8, 2016.

5. Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M. CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. *Neurochem International*, in press, 2018.

6. Shindo A, Audrey A, Takagishi M, Takahashi M, Wallingford JB, Kinoshita M. Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing. *Journal of Cell Science*, in press, 2018.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. October 7, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septins as multifunctional cytoskeletal scaffold for the structural and functional organization of neurites and synapses. The 4th Neural Circuits Joint Workshop (Nagoya, Japan).

2. October 26-28, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septins as multifunctional cytoskeletal scaffold for the structural and functional organization of neurites and synapses. NIPS Symposium "Decoding Synapse" (Okazaki, Japan).

3. December 6, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. CDC42EP4/BORG4-septin complex beneath perisynaptic membrane domains of Bergmann glial processes facilitates GLAST-mediated glutamate clearance and motor learning. ASCB Annual Meeting 2016 (San Francisco, USA).

4. February 19-20, 2017. Elhanbaly E, Ishikawa T, Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Fukazawa Y. A FIB-SEM-based Method for High-Resolution Measurement of Morphological Parameters of Axospinous Synapses. The 1st ABiS Symposium (Okazaki, Japan).

5. May 28, 2017. Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. A septin-mediated synaptic regulation required for spatial discrimination. Gordon Research Conference "Excitatory Synapses & Brain Function" (Les Diablerets, Switzerland).

6. October 13, 2017. Kinoshita M. CDC42EP4, a major septin-binding protein in astroglia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. EMBO Workshop on Molecular and Cell Biology of Septins (Berlin, Germany).

7. December 19, 2017. Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. Entorhinal cortex-hippocampal dentate gyrus synapse

anomaly underlying spatial discrimination defects in Sept3-null mice. International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2017 "Integrative Neural Network Linking Multiple Brain Areas for Behavioral Adaptation" (Tokyo, Japan).

8. February 10, 2018. Kinoshita M. Unexpected motor and histopathological phenotype found in cerebellum-selective Sept7 knockout mice. The 8th Brain Research Institute International Symposium "Innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models" (Niigata, Japan)

〔図書〕(計 1 件)

木下 専 「19 章：神経ネットワークの形と機能を制御する細胞骨格系分子群」DOJIN BIOSCIENCE SERIES 28 脳神経化学 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか (森泰生、尾藤晴彦編) 京都廣川書店

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/2016-26/01.html>

http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/topics/151207_kinoshitaageta.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 専 (名古屋大学・教授)

研究者番号：30273460

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

深澤有吾（福井大学・教授）

上田-石原奈津実（名古屋大学・講師）