

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06261

研究課題名（和文）新奇標識法による神経回路の3次元高精細高密度解析

研究課題名（英文）Dense and high-resolution reconstruction of 3D architecture of neuronal circuits with novel labeling methods

研究代表者

今井 猛（Imai, Takeshi）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70509851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、組織透明化技術の開発によって、蛍光顕微鏡による神経回路構造のイメージングは飛躍的に進んだが、取得した画像からどのようにして神経突起を認識し、回路のトレースをするかという点が課題である。本研究においては、ポスト透明化の神経回路解析における次の課題の克服を目指した。具体的には、1) 回路機能と関連づけられた任意の神経細胞を標識する手法、2) 高密度多色標識の手法を開発し、1細胞の解像度での神経回路解析を目指す。さらに3) 多色標識標本から神経回路形態の抽出を行うための手法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果によって、特定の神経回路の標識や多くの神経回路の多重標識が可能となった。既に我々が開発した組織透明化技術と組み合わせることで、神経投射や回路構造の大規模かつ定量的な解析が可能となった。この技術によって、神経発達、神経発達障害、精神疾患のモデル動物において、神経回路の定量的な記述が可能となり、この分野の研究の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the development of tissue clearing technology has dramatically advanced the imaging of neural circuit structures by fluorescence microscopy, but the challenge is how to reconstruct neural projections and trace circuits from the acquired images. In this study, we aimed to overcome the following issues: 1) to develop a method to label arbitrary neurons associated with circuit functions, 2) to develop a method for high-density multicolor labeling, and to analyze neural circuits at the resolution of a single cell. Furthermore, 3) we developed a method for extracting neural circuit morphology from multicolor labeled specimens.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路 蛍光イメージング コネクトーム

1. 研究開始当初の背景

我々の精神活動は、1,000億にも上る膨大な数の神経細胞が織りなすネットワークの機能によって成り立っている。我々の脳を構成する神経回路の構造およびその動作原理を解明することは、私たちの精神の基盤を理解するという点に他ならない。神経回路の構築原理、動作原理は物理・化学法則に則っているはずであるから、原理的にはその全貌を理解することは可能なはずである。従来、その複雑さゆえに、神経回路の全貌解明が可能になるとまじめに考える人は少なかったが、この10年ほどで状況は変わりつつある。ゲノミクスをはじめとして、現代の生物学では様々な分野で大量データの取得が可能となりつつある。神経回路についても、様々な解析技術の進歩に後押しされて、以下に述べるようにこれを目指す機運が高まってきている。脳全体におけるシナプス結合様式の全貌のことを最近では“コネクトーム”と呼んでおり、最近では世界的に“コネクトーム”解読の機運が高まっている。

コネクトーム解析には現在、マクロスケール、メソスケール、ミクロスケールの3つのスケールのアプローチが存在する。一つ目のマクロスケールの解析には、MRIを用いた拡散テンソルイメージングと呼ばれる手法が用いられている。これは、水分子の拡散異方性を用いた神経線維の結合様式を明らかにするもので、mmスケールの解像度がある。二つ目のメソスケールの解析には光学顕微鏡、特に蛍光タンパク質や蛍光色素を用いた蛍光イメージングが用いられている。この手法を用いると、光の回折限界付近、すなわち200nm程度までの分解能を得ることができる。第三のミクロスケールの解析には電子顕微鏡が用いられている。シナプス構造は光の回折限界と同程度かそれ以下であるため、シナプス構造を厳密に最高の解像度で見ようとすると、現在のところ電子顕微鏡が唯一の選択肢である。

光学顕微鏡は従来、厚みのある標本の解析が難しいという点が大きな制約であった。しかしながら、ここ数年の間に、申請者を含む複数のグループによって蛍光イメージングに最適化された組織透明化法が開発され、この分野に大きなブレイクスルーがもたらされた。従来は光学顕微鏡では標本深部の観察が難しかったために試料を薄切していたが、透明化を用いると、標本を薄切することなくまるごと蛍光観察が可能となった。現在、例えば、マウス脳であれば数時間から数日のオーダーで全脳規模の光学顕微鏡画像を取得できる。さらに、申請者は超解像顕微鏡に適した透明化試薬 SeeDB2 の開発も行っており、シナプススケールの画像も比較的大規模に取得できるようになった。こうして、光学顕微鏡は今やミクロからマクロに亘るスケールで神経回路構造の情報を取得できるようになりつつある。

現在、神経細胞標識を行う場合にはトランスジェニック動物を用いるかアデノ随伴ウイルス(AAV)などのウイルスベクターで蛍光タンパク質を導入するというのが主流である。しかしながら、いずれの手法も標識の解像度が良くなく、まだ機能回路レベル、一細胞レベルの解像度で標識、トレースできる状況にはない。また、こうした技術の進歩によって、取得した画像からどのようにして神経突起を認識し、回路のトレースをするかという点が次なる大きな課題となっている。現在でも画像データから神経回路をトレースするアルゴリズムやソフトは存在するものの、まだ信頼性が低く、かなり手作業にゆだねられる部分が多い。

2. 研究の目的

そこで、本研究においては、ポスト透明化の神経回路解析における次の課題の克服を目指す。すなわち、1) 回路機能と関連づけられた任意の神経細胞を標識する手法、および2) 高密度多色標識の手法を開発し、1細胞の解像度での神経回路解析を目指す。さらに3) 多色標識標本から神経回路形態の抽出を行うための手法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 機能的に同定された神経細胞の遺伝学的操作・標識

現在のところ、脳の局所を遺伝学的に標識するには、系球内エレクトロポレーション法やアデノ随伴ウイルス(AAV)等のウイルスベクターが用いられている。しかしながら、これらの手法による遺伝子導入の空間解像度は悪く、個々の神経細胞の接続様式を解析することは困難である。一細胞プラスミドエレクトロポレーション法も開発されているが、技術的に難易度が高く、普及には至っていない。そこで、ここでは機能的に同定された神経細胞群に対し、簡便かつ高い空間解像度で遺伝学的標識や操作を可能とする新しい手法の開発を目指した。

プラスミドエレクトロポレーション法は胎仔脳では汎用されているが、成体脳においては極めて困難である。エレクトロポレーションは電気刺激によって細胞膜に小さな孔を空け、そこからプラスミドを導入するという方法である。従って、導入する分子は小さければ小さいほど導入が容易である。そこで、申請者はプラスミドDNA(約3,000kDa)よりもはるかに分子量の小さなリコンビナントCreタンパク質(38kDa)を用いることで簡便な局所遺伝学操作を試みた。

(2) 透明化イメージングに最適化した多色標識法の開発

現在のところ、多くの神経細胞の形態を解析しようとする、電子顕微鏡を用いた高解像画像を得る必要がある。しかしながら得られる画像はモノクロであり、その解析には膨大な労力を要

する。光学顕微鏡を用いた高密度回路解析には3色の蛍光タンパク質による色表現(色相)の多様性を利用した標識法、Brainbow法が知られているが、トランスジェニック動物を用いる必要があること、蛍光タンパク質の発現レベルが低いなどの問題点があった。また、実現できる色相の種類も高々数10色に過ぎなかった。そこで本研究課題では、高輝度かつ拡張性の高い多色標識法の開発を行った。

Brainbow法ではCre-loxPによる組換えを利用し、3種類の異なる蛍光タンパク質をランダムに発現させることで、様々な色相を生み出していた。しかしながら、異なる蛍光タンパク質を確率的に発現させることさえ達成できれば、Cre-loxPは必須ではない。申請者は異なる蛍光タンパク質のプラスミドDNAを混ぜて低濃度で導入すれば、プラスミドのコピー数がポアソン分布に従うため、確率的発現が可能であると考えた。予備実験の結果、この原理で実際に多様な色相を作り出せることを見いだした。しかしながら、コピー数を減らすと蛍光強度が減ってしまう。1コピーあたりの発現量が高いプロモーターについて検討した結果、tTAの存在下でテトラサイクリン応答配列TREを用いることで発現量を向上できる。tTAおよび複数のTRE-蛍光タンパク質のプラスミドを混ぜて子宮内エレクトロポレーション法で遺伝子導入すると、明るくかつ多様な色相で神経細胞を標識できる(Tetbow法と呼ぶ)。

Tetbowの優れた点は、Cre-loxPを利用しないため、蛍光タンパク質の種類を容易に増やせる点である。また、プラスミドに限らず、AAVなどのウイルスベクターにも拡張可能である。

(3) 多色標識標本から神経回路形態を抽出する手法の開発

多色標識した脳標本において、色情報に基づいて神経細胞を識別するため、色相識別プログラムの開発を行った。具体的には、色空間にプロットされる輝度情報の互いの相関を用いて色相の類似性を同定、個々の神経細胞の形態を抽出する。

4. 研究成果

(1) 機能的に同定された神経細胞の遺伝学的操作・標識

大腸菌で生成したCreタンパク質を用いて局所エレクトロポレーションによる組換えの誘導を試みた。Cre依存的にtdTomatoを発現するノックインマウスを用いて、組換えの評価を行った。ガラスピペットの直径や電流条件を工夫することでCreによる組換えの誘導に成功した。マウス嗅球の1個の糸球体を狙ってCreを電流注入し、1個の糸球体に接続する僧帽・房飾細胞のみ組換えを誘導することができた。さらに、それらの軸索もtdTomato標識で可視化することができた。従来のAAVによる標識よりも空間解像度の点で優れていると考えられる。一方で、組換え効率は若いマウスでは高いが、成体においては低いという課題も見出された。

(2) 透明化イメージングに最適化した多色標識法の開発

まずは子宮内エレクトロポレーション法を用いて、Tetbow法の最適化を行った。tTAを発現するプラスミドとTRE-XFPを発現するプラスミドをどのような割合で導入すると発現量が最大化され、色の多様性が確保されるのかについて、ポアソン分布に基づく数値シミュレーションと実際の実験を組み合わせて検討し、最適条件を決めた。この方法を用いて大脳皮質錐体細胞や嗅球僧帽・房飾細胞の多色標識を行った。SeeDB2法による透明化の後でも蛍光輝度が保持されており、共焦点顕微鏡によるイメージングによって立体再構成することができた。さらに、スパインや軸索も明瞭に可視化することができた。

この手法では個々のXFPは別々のプラスミドに載っているため、超多色化も容易である。実際に、7-8色まで標識出来ることを確かめた。また、蛍光タンパク質だけでなく、SNAP, HaloTag, CLIPといったケミカルタグによる多色標識も実現した。これらを確率的に導入後、それぞれに対する蛍光基質と反応させることで、蛍光染色した。これらの利点は、有機溶媒による透明化でも褪色しない点である。

更に、Tetbow法をAAVにも実装した。これを大脳皮質や嗅球に導入し、多色標識を確かめた。さらに、嗅球から嗅皮質へと投射する軸索を多色標識誌、1本1本追跡することにも成功した。

これらの成果はeLife誌に発表され、国内外の多くのメディアから大きな反響を受けた(Forbes誌、The Scientists誌などで2018年神経科学分野で最もインパクトのあるの写真に選出)。

(3) 多色標識標本から神経回路形態を抽出する手法の開発

多色標識標本の色を読み取るプログラムの検討を行った。まずは輝度ベクトルの相関を計算する手法を検討し、良好な結果を得たが、計算時間がかかる点が課題として上げられた。輝度を平均化する、zスタック画像を用いるなどの工夫により、計算量を減らすことに成功した。今後、色情報の定量的な解析により、神経突起の自動解析が加速されるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iwata Ryo, Kiyonari Hiroshi, Imai Takeshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Mechanosensory-Based Phase Coding of Odor Identity in the Olfactory Bulb	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1139 ~ 1152.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2017.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ke Meng-Tsen, Imai Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Optical Clearing and Index Matching of Tissue Samples for High-resolution Fluorescence Imaging Using SeeDB2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Richi, Leiwe Marcus N, Imai Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Bright multicolor labeling of neuronal circuits with fluorescent proteins and chemical tags	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e40350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.40350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki Shigenori, Iwata Ryo, Iwamoto Masakazu, Imai Takeshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Widespread Inhibition, Antagonism, and Synergy in Mouse Olfactory Sensory Neurons In?Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107814 ~ 107814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aihara Shuhei, Fujimoto Satoshi, Sakaguchi Richi, Imai Takeshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 BMPR-2 gates activity-dependent stabilization of primary dendrites during mitral cell remodeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Richi Sakaguchi, Marcus N. Leiwe, Takeshi Imai
2. 発表標題 Tetbow: Bright multicolor labeling of neuronal circuits with fluorescent proteins and chemical tags
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting NEURONAL CIRCUITS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Imai
2. 発表標題 Imaging Neuronal Circuits with Tissue Clearing
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA Imaging Across Scales: Leveraging the Revolution in Resolution (D1) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 猛
2. 発表標題 蛍光イメージングによる神経細胞の形態解析
3. 学会等名 NEURO 2019・第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

SeeDB Resources
<https://sites.google.com/site/seedbresources/>
九州大学大学院医学研究院 疾患情報研究分野 | 今井研究室
<https://www.lab.med.kyushu-u.ac.jp/dn/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------