

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 29 日現在

機関番号：63905
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010 ～ 2011
 課題番号：22650069
 研究課題名（和文） 機能共役的コネクトミクスの開発

研究課題名（英文） Functional connectomics

研究代表者

重本 隆一（Shigemoto Ryuichi）
 生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授
 研究者番号：20221294

研究成果の概要（和文）：機能共役的コネクトミクスの開発を行うために、分子標識法の開発を進め、コネクトミクス解析を行うための最適な機器の選択と試料調整法の検討を行った。その結果、新たな化学プローブの合成法、重金属染色によりコントラストを強調することで連続画像の自動取得が効率的に行えること、Zeiss 社の走査電子顕微鏡 Sigma と 3view により一日で 500 枚以上の連続画像取得ができること、などが分かり同機種を 2011 年度に生理学研究所に導入することに至った。

研究成果の概要（英文）：To develop functional connectomics, we synthesized new chemical probes, tested heavy metal counterstaining to facilitate automatic image collection, selected Zeiss Sigma SEM+3 view as the most suitable machine for the reconstruction, managed to collect 500 EM pictures in one day using this set up and staining method, and succeeded to install this model to NIPS this year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	0	2,200,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

コネクトミクスは神経回路を網羅的に解析

する手法で今後 10 年で広く普及していくことが見込まれるが、いまだ日本では本格的に

導入されていない。

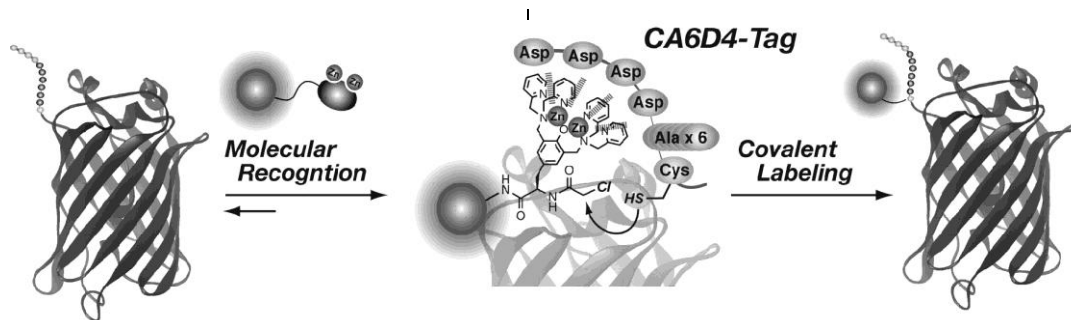
2. 研究の目的

本課題ではコネクトミクスによる網羅的な全神経要素の電子顕微鏡レベルでの解析と機能マーカーの高解像度標識を組み合わせることによって、単に超微形態のみの情報による現在のコネクトミクスを機能共役のコネクトミクスに革新することを目指した。このために必要な機能標識法を開発することを目的として、まず電顕的に検知可能な分子タグとその網羅的検出法を開発することを試みた。次にこれを応用し、神経活動依存的な可塑性を発現したシナプスを標識する方法を開発する。

3. 研究の方法

ヒトやマウスの全遺伝子配列が明らかになったことから、genomics や proteomics といった手法が一般化して久しい。現在では生体の環境適応や恒常性維持の破綻にともなう遺伝子発現変化や蛋白質変化が網羅的に解析できるだけでなく、個人に特異的な配列情報を基にしたオーダーメイド医療の実現が視野に入っている。その複雑さゆえに最も遅れていた脳機能の解析にもこれらの手法は当然有効であるが、1000億個という数の細胞からなる神経回路の結合性の変化は、genomics や proteomics だけでは到底解析できるものではない。それを直接網羅的に解析する手法が connexomics と呼ばれるものである。これは標本に含まれるすべての神経細胞の結合性を電子顕微鏡的な解像度で大量の純形態データを基に再構築し、その全貌を明らかにするものである。これによって前世紀の後半から行われてきた電気生理的方法や解剖学的方法による神経回路解析が

connexomics に取って代わられる日もそう遠くない。しかしながら、単に形態学的な回路をすべて明らかにしてもすぐに機能変化が予測できるわけではない。電子顕微鏡による純形態データだけでは、各シナプスの強度、樹状突起における情報統合、各神経細胞の発火パターンを予測するに十分なデータとは言えない。この問題を突破するために本研究開発においては、1) 従来の機能分子局在の解析法を革新し connexomics と結合することを可能にする。2) これを用いてシナプス可塑性が誘導された機能痕跡を可視化するための機能標識法を確立する。1) については分担者の王子田が最近光学顕微鏡用に開発した CA6D4 タグと新規化学プローブを電子顕微鏡用に検出可能なものに改変する。このプローブは従来の抗体等による結合とは全く異なり小分子の共有結合を伴う斬新なものである。ただし電子顕微鏡で検出可能にするためには金などの重金属のナノ粒子を持つ化学プローブを新たに合成し、これを厚みのある脳組織に浸透させて共有結合を飽和させる必要がありチャレンジ性は高い。従来の免疫電子顕微鏡法では標的分子のごく一部を可視化しているにすぎなかったが、この方法が成功すれば基本的に発現している分子の全てがプローブを介して重金属で標識され電子顕微鏡で検出可能となることが期待され、電顕レベルでの可視化法の卓越した進化である。さらに2)の課題は、この新しいプローブを「シナプス可塑性誘導後速やかに GluR1 分子がシナプス外からシナプスに移動する」という我々の発見と組み合わせることによって、神経活動依存的な変化を起こしたシナプスを特異的に可視化する、という斬新な着想に基づいている。



まずは、標本に含まれるすべての神経細胞の結合性を電子顕微鏡的な解像度で大量の純形態データを基に再構築し、その全貌を明らかにする。電子顕微鏡による純形態データの解析に加え、1) 従来の機能分子局在の解析法を革新し connectmics と結合することを可能にする。2) これを用いてシナプス可塑性が誘導された機能痕跡を可視化するための機能標識法を確立する。

4. 研究成果

本課題では、まず電子顕微鏡レベルで利用可能な GFP のような分子タグを開発することを目指した。さらにこのタグをパルスラベルできる化学プローブと組み合わせることで、時間情報の入った電顕的データの収集が可能である。さらに最新の 3 次元再構築用マイクローム組み込み型走査電子顕微鏡と走査型透過電子顕微鏡に EDX による元素分析を付加することで、電子顕微鏡の形態データの上に複数の分子種の定量的データを付加することを試みた。その結果、少なくとも従来の DAB 標識は、マイクローム組み込み型走査電子顕微鏡で可視化することが可能であること、最新型の EDX を使えば 1.4nm の金粒子の元素同定が可能であることが明らかになった。分子標識が成功すれば、遺伝子発現の時間的空間的特異性と新たに合成するプローブによる GluR1 のパルスラベルを組み合わせ、シナプス可塑性の電子顕微鏡的な可視化を行う。具体的にはまず化学プローブでパルスラベ

ルできる分子タグとして CysAlaAlaAlaAlaAlaAlaAsp AspAspAsp (C6AD4) タグ (上図) を採用した。この配列を特定の受容体に遺伝子工学的に付与した。分担者の王子田はこの配列に極めて特異的に共有結合する蛍光プローブを合成することに既に成功している (Ojida et al., J Am Chem Soc. 2006, 2009)。また、我々の依頼によりビオチンを付加したプローブも既に合成し、脳レプリカ標識標本で金コロイドストレプトアビジンと結合させることによって、標的分子を可視化することを試みた。残念ながら、現時点では 10nm という大きな金粒子を用いても、標的分子の明確な標識は得られていない。しかしながら、プローブの結合特異性を向上させることで、これを克服したい。しかしこの方法では、せつかく小分子である化学プローブを用いても金コロイドストレプトアビジンが 10nm 以上のサイズを持っているために、解像度は従来の免疫電顕法と変わらず、厚みを持った組織に十分浸透させることもできない。そこで、金原子約 13 個からなる 1nm 以下のナノ金粒子を付加した化学プローブを新たに合成する。これにより反応を一段階減らせると同時に、標識のサイズをはるかに小さくすることで解像度と浸透性、反応性を高めることが期待できる。また一旦標識が完成してしまえば、視認性を挙げるためにはナノ金粒子を核とする金増感反応を行って粒子サイズを拡大することができる。また金以外の重金属

を用いることで複数の分子を標識でき、これらの金とカドミウムについては EDX による元素分析を行うことによって凍結切断レプリカ標本上で区別できることを既に確認した。この方法が成功すれば、コネクトミクスによって神経細胞のシナプス結合のみならず、例えばそのシナプスに存在する AMPA 型グルタミン酸受容体を定量することによって、それぞれのシナプス強度のデータを付加することができる。我々はすでに EDX によって金と明確に区別できるパラジウムについて、ナノサイズのクラスターを抗体に結合させる計画をスタートしている。AMPA 型受容体の分子タグ化にも着手しており、次はシナプス終末における伝達物質放出に重要な電位依存性カルシウムチャンネルについても同様の検討を進める。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重本 隆一 (SHIGEMOTO RYUICHI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授
研究者番号：20221294

(2) 研究分担者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

九州大学大学院・薬学院・教授
研究者番号：20221294