

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460282

研究課題名(和文) 大気圧走査電子顕微鏡を利用したニューロン微細構造観察のための新技法の確立

研究課題名(英文) Development of novel techniques for visualizing fine structures of neurons employing atmospheric scanning electron microscope

研究代表者

松本 英子 (MATSUMOTO, Hideko)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00312257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧走査電子顕微鏡 (Atmospheric scanning electron microscope; ASEM) と呼ばれる新型の電子顕微鏡を用いて培養ニューロンのもつ微細構造を観察する方法を確立することを目指した。電子線を透過する耐圧薄膜を備えた専用ディッシュに、ポリ-D-リジンによるコーティングを施し、マウス胎仔由来の大脳皮質ニューロンを培養した。得られたニューロン試料に対してリンタングステン酸染色を行うことにより、糸状仮足のASEM検鏡に成功した。この検鏡法を、軸索ガイダンス因子ネトリン-1が大脳皮質ニューロン軸索シャフトにおいて示す糸状仮足生成促進作用の解析に活用した。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to establish techniques for visualizing fine structures of cultured neurons employing a new type of electron microscope called atmospheric scanning electron microscope (ASEM). A specimen for ASEM must be set in the specialized sample dish (ASEM dish) equipped with an electron-permeable film window in its base. In this study, cerebral cortical neurons prepared from mouse embryos were cultured on the ASEM dish coated with poly-D-lysine, and fixed cells were stained with phosphotungstic acid. We thus successfully visualized filopodia in the cortical neurons with ASEM. We then utilized this technique to analyze the sprouting of filopodial protrusions on the shafts of cortical axons in response to an axon guidance cue netrin-1.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：走査電子顕微鏡 大脳皮質ニューロン 糸状仮足 ネットリン-1 軸索ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

本研究では大気圧走査電子顕微鏡 (Atmospheric scanning electron microscope; ASEM) と呼ばれる新型の装置を用いて、培養ニューロンのもつ微細構造を観察するための新たな検鏡法を編み出すことを目指した。ASEM では、電子線を通す窒化シリコン製の耐圧薄膜を備えた専用ディッシュを用いて、溶液中など大気圧下において試料の電子顕微鏡観察を行う (Nishiyama et al. (2010) J. Struct. Biol. 169, 438-449)。旧来の電子顕微鏡観察で試料を真空試料室内に保持するために行われていた前処理が不要となるため、より本来の状態に近い試料を電子顕微鏡で観察できることなど多くの利点があるが、生物学・生命科学分野における活用法は未開拓であった。

2. 研究の目的

軸索ガイダンス因子ネトリン-1 は、様々なニューロンにおいて、軸索の伸長、成長円錐の誘引および反発、軸索分岐の形成など種々の生理作用を示すことが知られている。我々は近年、大脳皮質ニューロンにおけるネトリン-1 の軸索分岐形成作用に注目し研究を進めてきた。

ニューロンにおける軸索分岐形成には成長円錐を介する様式と、軸索シャフトに糸状仮足が生じ、その一部が後に側枝となる様式の二通りが知られる。(従ってシャフト上の糸状仮足生成は軸索側枝形成の初期段階といえる。) 大脳皮質ニューロンをネトリン-1 で刺激した際には後者の、糸状仮足生成に端を発する軸索側枝形成の促進がおこることが知られている。

ネトリン-1 依存的な大脳皮質ニューロン軸索側枝形成に関する一連の研究の過程で、光学顕微鏡では拡大倍率が不足する事態に直面し、より高倍率における検鏡法を求めて本研究課題を着想するに至った。窒化シリコ

ン製の耐圧薄膜を備えた専用ディッシュ中で大脳皮質ニューロンを培養し、ニューロンのもつ微細構造の ASEM 観察を行う方法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

マウス胎仔ならびにハムスター新生仔の大脳皮質より初代分散培養を調製した。耐圧薄膜部分にポリ-D-リジンによるコーティングを施すことにより、ASEM 専用ディッシュ上での大脳皮質ニューロンの培養が可能であることが判明した。培養 5 日目のニューロンを材料として利用し、ASEM 撮像における種々の染色法を試みるとともに、適切な固定条件と退色防止剤についても検討した。

4. 研究成果

ASEM による微細形態観察のための一般染色法として、ニューロン試料に対しリタングステン酸染色を試みた。グルタルアルデヒドによる固定 (2.5%、30 分間) の後にリタングステン酸染色 (2%、30 分間) を行ったところ ASEM 像が得られた。デキストロース・没食子酸プロピルには、撮像時の添加で退色防止効果が認められ、ASEM 用の退色防止剤として有用であるものと考えられた。

この ASEM 検鏡法を、マウス胎仔に由来する大脳皮質ニューロンの軸索シャフト上にみられる糸状仮足の観察に適用し、ネトリン-1 刺激時の変化について解析した。胎生 16 日 (E16) マウス大脳皮質ニューロンの軸索シャフトでは、30 分間のネトリン-1 刺激に応じて糸状仮足の増加が観察された。また、これはネトリン-1 受容体の一つ DCC に対する機能阻害抗体を培地に添加した際に阻害された。一方、E14 ニューロン軸索シャフトにおいては、糸状仮足様突起がネトリン-1 の有無にかかわらず豊富に認められた。

先に微分干渉画像の定量的解析により我々が得た結果においては、4 時間のネトリ

ン-1 刺激によって、E16 ニューロンで一次軸索上の分岐数の増加、E14 ニューロンで一次軸索長の増大が認められている。ASEM 観察結果と微分干渉画像の解析結果をあわせると以下の結論に至った。

(1) マウス大脳皮質由来の培養ニューロンにおいて、軸索伸長の促進と、軸索シャフト上の糸状仮足生成に端を発する軸索側枝形成の促進という二つの異なるネトリン-1 作用が認められた。

(2) ネトリン-1 はE14ニューロンで軸索伸長、E16ニューロンで軸索側枝形成を促進し、大脳皮質ニューロンにおけるネトリン-1 の作用が発生段階で変化する可能性が考えられた。

(3) ネトリン-1 受容体の一つ DCC が、軸索伸長と側枝形成の両方に関与していることが示唆された。

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2件)

Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: “Shift in the function of netrin-1 from axon outgrowth to axon branching in developing cerebral cortical neurons” BMC Neurosci. 18, 74 (2017), 査読有

DOI: 10.1186/s12868-017-0392-x

Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: “Responses of cultured mouse cerebral cortical axons to netrin-1 depending on developmental stages: outgrowth and collateral branching starting with filopodial protrusion” Mol.

Biol. Cell 28, 3727, abstract #P3241 (2017), 査読無

DOI: 10.1091/mbc.E17-10-0618

[学会発表](計5件)

Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: “Responses of cultured mouse cerebral cortical axons to netrin-1 depending on developmental stages: outgrowth and collateral branching starting with filopodial protrusion” ASCB | EMBO 2017 meeting. (2017年12月5日). Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, Pennsylvania, USA)

松本 英子、永島 雅文: “ネトリン-1により引き起こされる大脳皮質ニューロン軸索伸長と軸索分岐形成の関連” 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2017年3月28日). 長崎大学(長崎県)

Hideko Matsumoto, Masabumi Nagashima: “Shift in the function of netrin-1 in cerebral cortical neurons during development” 10th FENS Forum of Neuroscience. (2016年7月6日). Bella Center (Copenhagen, Denmark)

松本 英子、永島 雅文: “齧歯類大脳皮質ニューロンの発生過程における軸索ガイダンス因子ネトリン-1の機能変化(Function of netrin-1 in rodent cerebral cortical neurons during development)” 日本動物学会第86回大会. (2015年9月19日). 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県)

松本 英子、永島 雅文: “大脳皮質ニューロンでみられるネトリン-1/DCCによる軸索伸長と軸索分岐形成

(Netrin-1/DCC-mediated axon outgrowth and branching in cerebral cortical neurons) ” 第 37 回日本分子生物学会年会.
(2014 年 11 月 27 日). パシフィコ横浜 (神奈川県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 英子 (MATSUMOTO, Hideko)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00312257