

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14324

研究課題名(和文) 錐体細胞回路解析への光顕・走査電顕関連法の適用

研究課題名(英文) Application of correlative light and scanning electron microscopy to pyramidal neuron circuits

研究代表者

川口 泰雄 (KAWAGUCHI, Yasuo)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・教授

研究者番号：40169694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちがこれまでに進めてきた大脳皮質の単シナプス性結合解析を発展させ、特定シナプスに関連した結合連鎖を明らかにするために、サブタイプを同定した樹状突起・軸索の光顕・電顕関連解析に走査型電子顕微鏡を適用することを試みた。そのために、蛍光標識構造と電顕像の対応技術と、走査型電子顕微鏡に適した電子染色法・超薄切片積載テープを開発した。これらの技術開発によって、抑制性軸索シナプス構造とシナプス後部サイズの相関や、錐体細胞スパインへの興奮性入力様式のサブタイプ間での違いを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to more precisely probe the selective synaptic connectivity occurring between neuron subtypes within local cortical circuits, we have developed a scanning electron microscope (SEM) observation that allows correlative light and electron microscopy of dendrites and axons originating from specific cortical cell subtypes. Using electron staining procedures and conductive section tapes suitable for SEM, we can now overlap fluorescent and electron microscopic images. Using this technique, we have found that the size of inhibitory synaptic junctions is correlated with the diameter of postsynaptic dendrites, and identified differences in synaptic input pattern across pyramidal cells subtypes.

研究分野：神経科学

キーワード：新皮質 シナプス構造 走査型電子顕微鏡 光顕電顕関連

1. 研究開始当初の背景

私たちは大脳皮質、特に多様な脳領域に投射する前頭皮質のシナプス結合解析を行うことで、この領域が関与する統合機能の回路基盤を明らかにしようとしてきた。これまでは、複数の皮質細胞から同時生理記録を行い、一つの細胞のスパイク発射で他の細胞に誘発されるシナプス電流の解析や、透過型電子顕微鏡を使って、サブタイプを同定した細胞の軸索・樹状突起の連続切片の電顕像を取得し、標識要素の部分的立体再構築によって、主に単シナプス性の結合解析を進めてきた。これらによって、新規のシナプス結合則のいくつかを明らかにできたが、局所回路の限定的な結合情報の解析に止まっていた。電子顕微鏡はシナプス構造を確実に同定できる強力な手法であるが、これを従来のやり方で回路解析に適用すると多大な時間を要してしまう。近年、走査型電子顕微鏡の画像取得時間・解像度が大幅に改善され、連続走査型電顕像の三次元再構築によって、シナプス構造から局所回路までをシームレスに解析することが可能になってきた(容量電子顕微鏡法(volume electron microscopy))。しかし、走査型電顕画像取得法は発展段階にあり、データ取得のパイプラインで確立したものはない。そこで、私たちの回路解析スタイルである、サブタイプを同定した樹状突起・軸索の光学顕微鏡像と電顕像を対応させ、その部位のシナプス入力・出力を網羅的に調べ、シナプス結合連鎖を明らかにすることに適した、光顕・走査型電顕相関解析パイプラインを構築することを目指した。

2. 研究の目的

(1) 細胞サブタイプを同定した軸索終末・樹状突起スパインの光顕・電顕像対応手法の確立

細胞内記録標識や蛍光免疫組織化学によって光顕レベルで同定した樹状突起・軸索から作成した連続超薄切片からの電顕像を広範囲にわたって再構築し、光顕像・電顕像の厳格な対応を取れるようにする。光顕電顕像対応に当たっては、diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 発色しないことで、シナプス微細構造を明瞭に同定できるようにする。

(2) 軸索・樹状突起の光顕電顕相関と立体構築パイプラインによるシナプス回路解析法の確立

走査型電顕観察法に適した電子染色法や切片作成法を探索し、皮質回路解析に適用できる光顕・走査電顕相関解析のパイプラインを作る。

3. 研究の方法

(1) 光顕電顕相関のためのサブタイプ標識法と光顕・電顕像対応手法

GABA 作動性 FS 細胞と錐体細胞を切片標本で同時記録し、抑制性結合が見られたものに

ついて、DAB 発色して電顕用に包埋して、ニューロシダを使って再構築した。FS/錐体細胞間の抑制性シナプスは透過型電顕の再構築によって、シナプス後部の細胞体・樹状突起を三次元再構築した。

逆行性蛍光標識で同定した錐体細胞投射サブタイプを色素注入によって細胞内蛍光染色し、その樹状突起上のシナプス前入力を蛍光免疫組織化学で同定した。それらを共焦点蛍光顕微鏡とニューロシダを使って再構築した上で、電顕観察を行った。

(2) 容量走査電顕観察

2種類の走査型電子顕微鏡(ダイヤモンドナイフ切削型とテープ回収型)を用いた。

4. 研究成果

(1) 脳切片標本を使った非錐体細胞と錐体細胞からの同時記録で、抑制性結合を確認できたペアーを細胞内染色し、電顕観察を行った。光顕で非錐体細胞軸索と錐体細胞樹状突起を再構築して、軸索・樹状突起コンタクト部位を同定した。各コンタクト部位近傍の樹状突起から超薄切片を作成し、透過型電顕からの連続像を重ねることで立体再構築し、樹状突起形態やシナプス微細構造に関する、定量的形態パラメーターを取得する方法を確立した。その結果、抑制細胞の軸索終末が作るシナプス構造と、シナプス後部の樹状突起の大きさには相関があることが分かった。

(2) 投射先を同定した新皮質錐体細胞に色素を注入して、主要興奮性入力である視床と錐体細胞軸索終末を選択的マーカーで蛍光標識した。異なる蛍光で標識された樹状突起と2種類の軸索終末を、共焦点顕微鏡で立体的に再構築した。その後、錐体細胞だけをDAB発色した上で、改良した重金属染色を適用し、ダイヤモンドナイフ切削型走査型電顕(serial block-face SEM, SBEM)で取得した連続電顕像から再構築を行った。その結果、シナプス前要素が無染色であっても、各スパインへの入力が視床由来か錐体細胞由来かを同定することができ、錐体細胞投射サブタイプごとにグルタミン酸作動性入力様式の違いを明らかにすることができた。この手法は皮質回路におけるニューロンサブタイプ・入力タイプ依存的な結合を明らかにするのに有用だと考えられた。

(3) 走査電顕観察における解像度低下を以下の二つの方法で克服し、連続電顕像におけるシナプス微細構造の同定を容易にした。一つ目に、走査電顕観察に適した重金属染色法を開発した(OsO_4 (2%) と potassium ferrocyanide (1.5%) の溶液で処理した後に、 OsO_4 (2%) だけの溶液で処理し、lead aspartate 染色する)。二つ目に、走査型電顕観察時における電荷蓄積を防ぐ為に導電性の高いテープを開発した。そのテープに超薄連続切片を載せ、走査型電顕で観察したところ、興奮性非対称型、抑制性対称型シナプス共に、その微細構造の解析が容易になった。

さらに、マックスプランク研究所との共同研究によって、この新規の組織処理法・テープは通常の走査型電顕だけでなく、マルチチャンネル走査型電顕の観察にも有用であることが分かった。これらの技術改良は、今後の走査型電顕による局所回路解析の推進に大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. Kubota Y, Sohn J, Hatada S, Schurr M, Straehle J, Gour A, Neujahr R, MiKi T, Mikula S, Kawaguchi Y, A carbon nanotube tape for serial-section electron microscopy of brain ultrastructure, *Nature Commun*, 査読有、9巻、2018、437
DOI: 10.1038/s41467-017-02768-7
2. Morishima M, Kobayashi K, Kato S, Kobayashi K, Kawaguchi Y, Segregated excitatory-inhibitory recurrent subnetworks in layer 5 of the rat frontal cortex, *Cereb Cortex*, 査読有、27巻、2017、5846-5857
DOI: 10.1093/cercor/bhx276
3. Kawaguchi Y, Pyramidal cell subtypes and their synaptic connections in layer 5 of rat frontal cortex, *Cereb Cortex*, 査読有、27巻、2017、5755-5771
DOI: 10.1093/cercor/bhx252
4. 森田賢治, 川口泰雄, 大脳皮質局所回路: 古典的競合選択モデルの実験的検証と混合選択性細胞、生体の科学、査読無、2017、68巻、43-47
5. Shigematsu N, Ueta Y, Mohamed AA, Hatada S, Fukuda T, Kubota Y, Kawaguchi Y, Selective thalamic innervation of rat frontal cortical neurons, *Cereb Cortex*, 査読有、26巻、2016、2689-2704
DOI: 10.1093/cercor/bhv124
6. Hatanaka Y, Namikawa T, Yamauchi K, Kawaguchi Y, Cortical divergent projections in mice originate from two sequentially generated, distinct populations of excitatory cortical neurons with different initial axonal outgrowth characteristics, *Cereb Cortex*, 査読有、26巻、2016、2257-2270
DOI: 10.1093/cer-cor/bhv077
7. Ushimaru M, Kawaguchi Y, Temporal structure of neuronal activity among cortical neuron subtypes during slow oscillations in anesthetized rats, *J Neurosci*, 査読有、35巻、2015、11988-12001
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5074-14.2015
8. Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F,

Luebke J, Kawaguchi Y, Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons, *eLife*, 査読有、4巻、2015、e07919
DOI: 10.7554/eLife.07919

9. Morita K, Kawaguchi Y, Computing reward prediction error: an integrated account of cortical timing and basal-ganglia pathways for appetitive and aversive learning, *Eur J Neurosci*, 査読有、42巻、2015、2003-2021
DOI: 10.1111/ejn.12994

[学会発表] (計43件)

1. Tanaka YH, Tanaka YR, Kondo M, Terada S, Kawaguchi Y, Matsuzaki M, Dynamics of thalamocortical activities during motor execution and learning, 第95回日本生理学会大会、2018
2. Ueta Y, Kawaguchi Y, Ipsilateral and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2/3 of rat frontal cortex, 第95回日本生理学会大会、2018
3. Kawaguchi Y, Local recurrent subnetworks correlated with long-distance projections in frontal cortex, International symposium on Brain Information Dynamics 2018, 2018
4. 川口泰雄, 前頭皮質ニューロンと再帰的結合の多様性、次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム2017、2017
5. Kawaguchi Y, Morishima M, Innervation differences of layer 5a and 5b Martinotti cells in frontal cortex, 47th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2017
6. Kubota Y, Sohn J, Hatada S, Schurr M, Straehle J, Gour A. G, Neujahr R, Mikula S, Kawaguchi Y, A conductive novel tape material and a new staining protocol for volume electron microscopy applications, 47th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2017
7. Nonomura S, Nishizawa K, Kobayashi K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Nambu A, Yamanaka K, Enomoto K, Isomura Y, Kimura M, Action-specific reinforcement and update by direct- and indirect- pathway striatal projection neurons, 47th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2017
8. 川口泰雄, 前頭皮質のニューロン構成と標準回路、新学術領域研究「脳情報動態を規定する多領域連関と並列処理(脳情報動態)」特別講演会「コネクティクス

- から AI へ」、2017
9. Morishima M, Kawaguchi Y、Pyramidal cell subtype-dependent inhibitory innervations in layer 5 of the rat frontal cortex、第 40 回日本神経科学大会、2017
 10. Nonomura S, Yamanaka K, Nishizawa K, Kobayashi K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Nambu A, Isomura Y, Kimura M、Activity of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons identified by optogenetics during adaptive choice task with probabilistic reward、第 40 回日本神経科学大会、2017
 11. Tanaka YH, Tanaka YR, Hira R, Kondo M, Terada S, Kawaguchi Y, Matsuzaki M、Thalamocortical dynamics mediate learning and execution of self-initiated movement、第 40 回日本神経科学大会、2017
 12. Otsuka T, Kawaguchi Y、Cortical pyramidal cell-subtype dependent motor learning and oscillatory activities、第 40 回日本神経科学大会、2017
 13. Hatanaka Y, Hirata T, Kawaguchi Y、Labeling of neurons derived from intermediate neuronal progenitors in the mouse cerebral cortex、第 40 回日本神経科学大会、2017
 14. Kubota Y, Sohn J, Hatada S, Kawaguchi Y、A novel tape for ATUMtome and high resolution electron microscopy、第 40 回日本神経科学大会、2017
 15. Kimura M, Nonomura S, Nishizawa K, Kobayashi K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Nambu A, Yamanaka K, Isomura Y、Differential involvement of direct- and indirect-pathway spiny projection neurons in action valuation and update in the dorsomedial striatum、第 40 回日本神経科学大会、2017
 16. 窪田芳之, 孫在隣, 畑田小百合, 川口泰雄、ATUMtome 用の新開発テープと高解像画像用組織処理法、第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会、2017
 17. Kubota Y, Sekigawa A, Mohamed AA, Kondo S, Karube F, Tanaka Y, Kawaguchi Y、Synapse density and estimated number on various neurons of the rat frontal cortex、第 94 回日本生理学会大会、2017
 18. 川口泰雄、前頭皮質における錐体細胞と抑制スタイルの多様性、第 12 回日本統合失調症学会、2017
 19. Kawaguchi Y、Layer 5 GABAergic circuits in the frontal cortex、The 7th International Neural Microcircuit Conference-Recent advances in the analysis of cortical microcircuits-、2016
 20. Otsuka T, Kawaguchi Y、Oscillatory activities in the cortical networks、The 7th International Neural Microcircuit Conference-Recent advances in the analysis of cortical microcircuits-、2016
 21. Morishima M, Kawaguchi Y、Interaction between GABAergic cells and two types of target-specific pyramidal cells in layer 5 of the rat frontal cortex、The 7th International Neural Microcircuit Conference-Recent advances in the analysis of cortical microcircuits-、2016
 22. Mohamed AA, Yamaguchi N, Hatada S, Luebke J, Kawaguchi Y, Kubota Y、Conserved dimensions of dendritic trees in cortical pyramidal cell、The 7th International Neural Microcircuit Conference-Recent advances in the analysis of cortical microcircuits-、2016
 23. Kubota Y, Kawaguchi Y、GABAergic/non-GABAergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurons、46th annual meeting of the Society for Neuroscience、2016
 24. Morishima M, Kawaguchi Y、Interaction between GABAergic cells and two types of target-specific pyramidal cells in layer 5 of the rat frontal cortex、第 39 回日本神経科学大会、2016
 25. Nonomura S, Yamanaka K, Nishizawa K, Kobayashi K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Nambu A, Isomura Y, Kimura M、Activity of dopamine D2 receptor-expressing striatal neurons during decision-making task、第 39 回日本神経科学大会、2016
 26. Tanaka YH, Tanaka YR, Hira R, Kondo M, Terada S, Kawaguchi Y, Matsuzaki M、Distinct thalamocortical inputs mediate learning and execution of self-initiated movement、第 39 回日本神経科学大会、2016
 27. Ueta Y, Hirai Y, Kawaguchi Y、Corticocortical cell diversity in superficial layers of the rat frontal cortex、第 39 回日本神経科学大会、2016
 28. Kubota Y, Kawaguchi Y、GABAergic inputs to spine of striatal medium spiny neuron、第 39 回日本神経科学大会、2016
 29. Hatanaka Y, Kawasaki T, Kawaguchi Y, Hirata T、Proper termination of migration for uppermost part of layers 2/3 neurons requires PlexinA2/A4-Semaphorin6A signaling

- in the mouse cerebral cortex、第 39 回日本神経科学大会、2016
30. Kubota Y, Sekigawa A, Mohamed AA, Kondo S, Karube F, Tanaka Y, Kawaguchi Y、An excitatory and inhibitory synapse density on various neurons in the rat frontal cortex、EMBO Dendrites 2016 meeting、2016
 31. Kawaguchi Y, Morishima M、Pyramidal cell diversity and inhibition styles in the frontal cortex、International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016、2016
 32. Hatanaka Y, Kawasaki T, Hirata T, Kawaguchi Y、Plexin A2/A4-Semaphorin 6A signaling is involved in termination of migration for uppermost layer neurons in the mouse cerebral cortex、International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016、2016
 33. Kawaguchi Y, Kubota Y、Synapses from fast-spiking GABAergic neurons are tuned to specific postsynaptic target domains、新学術領域「大脳新皮質構築」終了公開国際シンポジウム、2016
 34. Hatanaka Y, Kawasaki T, Hirata T, Kawaguchi Y、PlexinA2/A4 signaling is necessary for proper termination of migration for uppermost part of layers 2/3 neurons in the mouse cerebral cortex、新学術領域「大脳新皮質構築」終了公開国際シンポジウム、2016
 35. 川口泰雄、大脳皮質パルブアルブミン細胞の歴史と謎、生理研研究会「行動システム脳科学の新展開」、2015
 36. Kubota Y, Sekigawa A, Hatada S, Kawaguchi Y、An excitatory and inhibitory synapse density on various nonpyramidal cells in the rat cerebral cortex、The 2nd East-Asia Microscopy Conference、2015
 37. Kawaguchi Y、Temporal organization of pyramidal neuron output to the striatum、International Symposium on Prediction and Decision Making 2015、2015
 38. Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F, Luebke J, Kawaguchi Y、Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons、45th annual meeting of the Society for Neuroscience、2015
 39. Kondo M, Morishima M, Kawaguchi Y, Morita K、Multi-compartmental models of corticopontine- and crossed corticostriatal neurons of rat frontal cortex、11th Bernstein Conference 2015、2015
 40. Kubota Y, Villa KL, Berry KP, Subramanian J, Cha JW, So PT, Nedivi E, Kawaguchi Y、Correlative light and electron microscopy of brain tissue using two-photon microscope and FIB/SEM、Microscopy & Microanalysis 2015、2015
 41. Morishima M, Kawaguchi Y、Interaction between two types of pyramidal cells and GABAergic cells in the layer 5 of the frontal cortex、第 38 回日本神経科学大会、2015
 42. Ushimaru M、Kawaguchi Y、Temporal order of firing activity among cortical neuron subtypes in slow wave、第 38 回日本神経科学大会、2015
 43. Mohamed AA, Kubota Y, Kondo S, Yamaguchi N, Hatada S, Nomura M, Younes HA, Tanaka YR, Abdalla KEH, Luebke J, Kawaguchi Y、Conserved morphology of dendritic trees in cortical pyramidal cell、第 38 回日本神経科学大会、2015
- [その他]
ホームページ等
生理学研究所大脳神経回路論研究部門
<http://www.nips.ac.jp/circuit/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
川口 泰雄 (KAWAGUCHI, Yasuo)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・教授
研究者番号：40169694