

平成30年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14568

研究課題名(和文) 超解像イメージングによる神経細胞のシナプスマッピング

研究課題名(英文) Super-resolution mapping of dendritic spines

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に、興奮性シナプスがつくられる樹状突起スパインは子どもの時期に劇的に増えた後、思春期にかけて徐々に減少していくと考えられている。しかしながら、これまでニューロンの樹状突起全体に亘って、スパイン数がどのように変化していくのかを正確にとらえた研究はなかった。そこで、我々は超解像顕微鏡を使って、SeeDB2で透明化した脳標本の解析を行った。その結果、大脳皮質5層ニューロンのapical dendriteでは、樹状突起スパインに極端な偏りがあることが判明した。スパイン密度が極めて高い「ホットスポット」は、思春期にNMDA受容体依存的にスパインが集積することで形成されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It is generally believed that the number of dendritic spines increases during childhood, and then declines during adolescence to form mature neuronal circuits. However, distribution of dendritic spines at a whole-neuron scale is not fully established. Here we performed comprehensive super-resolution mapping of dendritic spines in layer 5 cortical pyramidal neurons in mice. We found that spine density is highly biased at the middle compartment of long apical dendrites (spine density "hotspot"), demonstrating ~10-fold accumulations. In contrast, the spine density was less biased in layer 2/3 neurons and basal dendrites of layer 5 neurons. We also found that spine density at the hotspot increased during adolescence in an NMDAR-dependent manner, when other parts of the dendrites underwent moderate reduction. Thus, the spine density is "reorganized", rather than simply decreased during adolescence to form mature cortical circuits.

研究分野：神経科学

キーワード：超解像顕微鏡 コネクトミクス シナプス 樹状突起スパイン 生後発達

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は神経回路を構成する演算素子であり、1 個の神経細胞においてどのように情報処理が行われているのかを理解することは、回路レベルでの演算原理を理解する上で必須である。しかしながらそれはそれほど簡単なことではない。1 つの神経細胞には約 10,000 個ものシナプス入力があるとされているが、近年の研究で、神経細胞はただ単にそれらの入力を平等に足し算している訳ではないということが判明してきている。樹状突起のシナプスにおける EPSP/IPSP はそのまま細胞体に届いて演算される訳ではなく、樹状突起のコンパートメント単位で演算され、樹状突起スパイクの形で細胞体に入力される。従って、樹状突起の複雑なジオメトリのどこに入力されるか、ということが演算に大きな影響をもたらす。また、近年、シナプス入力は樹状突起のコンパートメントに集中して入力される (clustering) ことも明らかに成りつつある。従って、どのようなシナプスが神経細胞のどこにどのように分布しているのかを理解することは、神経細胞における情報処理原理を理解する上で必須である。

多くの神経細胞では、興奮性入力には樹状突起スパインに見られるが、スパインの形態 (ヘッドサイズやネック径、長さ) も情報処理において大きな意味を持つ。しかしながら、スパインはヘッド部分で約 1 μm 、ネック部分で 120 nm 程度と微細であり、従来の光学顕微鏡で正確に定量することは困難であった。従って、スパイン形体の定量的な解析は現在電子顕微鏡に頼らざるを得ないが、最新の 3 次元解析用の電子顕微鏡 (FIB-SEM など) をもってしても神経細胞 1 個丸ごと解析するような大規模解析は困難な作業である。さらに、特徴的な構造をもたない抑制性シナプスのマッピングはさらに困難である。現在、光の回折限界以下の構造を解像する超解像顕微鏡も存在するが、光散乱と球面収差の制約から、従来はサンプル表面しか撮像出来ないという問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が超解像顕微鏡を前提に独自に開発した透明化試薬 SeeDB2 (Ke et al., *Cell Reports* 2016) を用い、1 つの神経細胞にどのようにシナプス入力があるのかを網羅的にマッピングした。特に、本研究では大脳皮質 5 層ニューロンに着目し、apical、basal、oblique dendrite にそれぞれどのような空間的特長をもってシナプス入力 (樹状突起スパイン) があるのかを定量的に解析した。また、見いだされた空間的配置が発達段階でどのように制御されているのかを解析した。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質 5 層ニューロンにおけるスパインマッピング

本研究では、大脳皮質の中でも特に特徴的な異なる形態の樹状突起を有する、5 層ニューロンに着目した。また、特に、まずは興奮性入力の分布を調べる目的で、樹状突起スパインの分布を調べた。Thy1-YFP-H トランスジェニックマウス (成体) を用いて、大脳皮質一次体性感覚野にある 5 層ニューロン (主として 5B 層の SCPN) を観察した。まず、脳スライスを見透しで透明化し、サンプルを作製した。SeeDB2 を用いると、油浸レンズで観察する際に球面収差を小さくすることができるため、深部まで高解像度で観察することが可能である。まず、我々は 20x の対物レンズを使って神経細胞の樹状突起の全体像を捉えた。その後、それぞれの樹状突起に着目し、63x の対物レンズを使って、Zeiss 社 Airyscan 超解像モード (実測値で x-y 分解能約 150nm、z 分解能約 350nm) で形態を端から端まで可能な限り撮影した。これらの画像データを貼り合わせた後、神経細胞形態の再構成ソフト NeuroLucida を用いて立体再構成を行った。この再構成データに基づき、スパインの数、大きさ、分布等のデータを抽出した。

(2) 発達過程の解析

5 層ニューロンにおけるスパインの分布が発達段階でどのように変化するのかを詳しく解析するため、この Thy1-YFP-H トランスジェニックマウスを用いて、P7、P14、P21、および成体 (8-12 週齢) の解析を行った。

(3) 遺伝学的解析

更に、どのような分子機構でスパイン分布制御が行われているのかを解析するため、遺伝子改変を行った。具体的には、NMDA 受容体の必須サブユニット NR1 に着目し、NR1 の floxed マウスに対して、子宮内エレクトロポレーション法で Cre 遺伝子と蛍光タンパク質を導入、その形態を観察した。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質 5 層ニューロンにおけるスパインマッピング

我々は、まず成体マウスを用い、大脳皮質一次体性感覚野にある 5 層ニューロン (Thy1-YFP-H トランスジェニックマウス、SCPN) の解析を行った。Apical、basal、oblique dendrite のそれぞれについて、樹状突起の根本から先端までをできるだけ網羅的に超解像撮像し、スパインの分布を解析した。その結果、apical、basal dendrite では根本付近でスパインが少ない傾向が見られた一方、oblique dendrite ではそのような傾向は見られなかった。残りの部分については、basal、oblique dendrite では比較的スパイン密度が一様に分布している傾向が見られたが、一方 apical dendrite ではスパイン密度に顕著な偏りが見られた。細胞体に近い部分ではスパインがほとんど無い一方、細胞体から遠くなるにつれてスパイン密度は顕著に増え、樹状突起の真ん中あたり、ちょうど枝分かれが生じるあたりで密度は最も高か

った。更に細胞体から遠くなり、大脳皮質表層に近づくるとスパイン密度は再び減少した。スパイン密度(μm 長さ)にして、約10倍もの偏りがあることが判明した。

我々は同時に樹状突起の幹部分の直径についても調べ、樹状突起表面の面積当たりの密度も解析したが、apical dendriteにおいては、面積当たりの密度においても、樹状突起の真ん中あたりで顕著な集積が認められた。この集積部位をここではホットスポットと呼ぶことにする。

次に、この集積が、大脳皮質の特定の層に対応しているのかについて調べるため、抗Vglut2抗体で4層を染色し、同様の解析を行った。この結果、ホットスポットの位置は特定の層と対応すると言うよりは、apical dendriteの枝分かれ部位とより明瞭な対応があることが分かった。すなわち、枝分かれ部位の直前でスパインが最も高密度になっていることが判明した。

我々は同様の解析を2/3層のニューロンについても行ったが、2/3層ではこのようなスパイン密度の極端な偏りは見いだされなかった。

(2) 発達過程の解析

このようなスパイン分布の偏りがいつどのように形成されるのかについて更に解析するため、発達過程の解析を行った。Thy1-YFP-Hトランスジェニックマウスを用い、P7、P14、P21、及び成体(8-12週齢)の解析を行った。

発達過程におけるスパイン密度については、これまで多くの研究がなされており、ヒト、サル、マウスにおいて、子どもの時期に劇的に増えた後、思春期以降は徐々に減少していくと考えられている(Huttenlocher 1990; Rakic et al., 1986; Penzes et al., 2011)。このような傾向は、確かにbasal dendrite、oblique dendriteでは観察された。これらの領域では、P14でスパイン密度が最大になり、その後は穏やかに減少した。しかしながら、apical dendriteのホットスポットでは全く当てはまらないことが判明した。

Apical dendriteのホットスポット領域では、P14の時点ではそれほど偏りが見られなかったものの、その後、P21以降にわたってスパイン密度は上昇し続けた。3ヶ月齢以降についても観察を行ったが、スパイン密度が減少する様子は全く観察されなかった。こうしたことから、思春期以降にスパインが減少するというのは、全ての樹状突起において当てはまるわけではないことが判明した。むしろ、思春期以降には樹状突起スパインが再配置されると考える方が適切かも知れない。

(3) 遺伝学的解析

我々は、樹状突起スパインがホットスポットに集積する仕組みについて更に解析するため、遺伝学的な解析を行った。

NMDA受容体の役割について調べるため、必須サブユニットNR1の遺伝学的解析を行った。

NR1のfloxedマウスを用い、子宮内エレクトロポレーション法でCre遺伝子および蛍光タンパク質を導入することで、ノックアウトを行い、細胞自律的NR1の役割について解析した。その結果、NR1ノックアウトニューロンにおいては、basal、oblique dendriteではスパイン密度が変わらなかったが、P21以降におけるapical dendriteホットスポットへのスパイン集積が損なわれていることが判明した。したがって、思春期以降のホットスポットへのスパイン集積はNMDA受容体によって制御されていることが判明した。

今回の研究結果から、同じニューロンであっても樹状突起コンパートメントごとにスパイン密度の制御が異なっていること、特に思春期にそのような制御が働いていることが明らかになった。これまで数10年間に亘って信じられてきたスパイン密度制御モデルに対し、再考を促す結果であると考えられる。以上の成果は2018年6月現在、論文投稿中である。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Ryo Iwata, Hiroshi Kiyonari, Takeshi Imai
Mechanosensory-Based Phase Coding of Odor Identity in the Olfactory Bulb
Neuron, Volume 96, Issue 5, p1139–1152, 6 December 2017
査読あり

Aya Murai, Ryo Iwata, Satoshi Fujimoto, Shuhei Aihara, Akio Tsuboi, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Kazunori Nishizaki, Takeshi Imai
Distorted coarse axon targeting and reduced dendrite connectivity underlie dysosmia after olfactory axon injury
eNeuro, September/October 2016, 3(5) e0242-16.2016 1–13, October 5
査読あり

[学会発表](計 60 件)

以下、特に関連の高いものを抜粋

Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Dynamic regulation of spine density in cortical pyramidal neurons
第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
2018.03.28, 東京都武蔵野市(日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学)

今井 猛

透明化脳を用いた高解像度蛍光イメージング

と神経回路再構築
第43回レーザ顕微鏡研究会 & シンポジウム
2018.01.19, 大阪府吹田市 (大阪大学フ
トニクス先端融合研究センター)

Takeshi Imai

Dynamic regulation of spine density in
cortical pyramidal neurons
遺伝研研究会 哺乳類脳の機能的神経回路
の構築メカニズム
2017.12.04-12.05, 静岡県三島市 (国立遺伝
学研究所)

Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai

[日本語タイトル] 発達段階および樹状突起コン
パートメント特異的スパイン密度制御
[同英語タイトル] Dynamic regulation of spine
density in layer 5 cortical pyramidal
neurons

第40回日本神経科学大会
2017.07.22, 千葉市 (幕張メッセ)

Meng-Tsen Ke, Junko Hara, Satoshi
Fujimoto, Takeshi Imai

Dynamic regulation of spine density in
layer 5 pyramidal neurons
第7回国際神経局所回路会議 -Recent
advances in the analysis of cortical
microcircuits-
2016.12.09 岡崎市 (岡崎コンファレンスセ
ンター)

Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai

Dynamic regulation of spine density in
cortical pyramidal neurons
International Symposium 2016 - Circuit
Construction in the Mammalian Brain
2016.08.08-09 大阪府吹田市 (大阪大学吹
田キャンパス 生命システム棟 2階セミナ
ー室)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称: 生物材料の観察方法および透明化方
法

発明者: 今井 猛、柯 孟岑

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: 2015-55325 PCT/JP2016/55229

取得年月日: 2017年8月30日

国内外の別: 国内、国外

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<https://dn.med.kyushu-u.ac.jp/>

SeeDB Resources

<https://sites.google.com/site/seedbresources/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 猛 (Imai, Takeshi)

九州大学 大学院医学研究院

教授

研究者番号: 70509851

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし