

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22469

研究課題名(和文)脳内小棘構造(spinule)の機能解明に向けた解析基盤の構築

研究課題名(英文)Development of an analytical basis for elucidating the function of small spinule structures in the brain

研究代表者

深澤 有吾 (Fukazawa, Yugo)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：60343745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、機能的意義や正確な脳内分布が未だ不明である超微小で低頻度にしか観察されない生体内構造体の機能的意義を明らかにできる解析基盤を構築することが目的である。この目的のため、小棘構造(spinule)や多胞体(multivesicular body; MVB)の観察に最適化した電子顕微鏡解析法を構築し、種々の条件でこれらの脳内局在と頻度の解析を行った。その結果、収束イオンビーム搭載高分解能走査型顕微鏡を利用して従来法よりも広範囲に超微細構造情報を取得することにより、低頻度微小構造体の定量的な解析が可能になることを確認し、これまで解析できなかった対象構造の解析基盤を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Spinule様構造は1962年に初めて報告されたが(Westrum & Blackstad)、多様性や機能的役割についてのその後の報告は限られ(Spacek & Harris 2004)、その制御メカニズムは未解明であり、従ってその生理的意義も解明されていない。今回の研究成果は、生理的意義の解明に向けた解析基盤を構築した点、また、同様な微小構造体の解析にも応用可能である点で神経科学上の学術的意義があり、今後様々な生体内微小構造体の分布解析を通して、その機能に迫る方法論を提供した点で神経科学研究に留まらず広く医学生物学研究の推進に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop the technical basis and analytical know-how to clarify the functional significance of small, infrequently observed subcellular structures in the brain, whose precise distribution and functional significance in the brain are still unknown. For this purpose, we developed an electron microscopic method optimized for the observation of spinules and multivesicular bodies (MVBs), and analyzed their localization and frequency in the brain under various conditions. As a result, we confirmed that quantitative analysis of low-frequency ultrastructures is possible by using a high-resolution scanning microscope equipped with a focused ion beam to obtain ultrastructural information over a wider area than conventional methods.

研究分野：分子神経解剖学

キーワード：Spinule 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小棘構造(spinule)様構造は 1962 年に初めて報告された神経組織中の超微細構造であるが(Westrum & Blackstad)、その多様性や機能的役割についての報告は限られ (Spacek & Harris 2004)、本研究立案当時でもその制御メカニズムや機能は未解明であった。申請者は高分解能型走査型電子顕微鏡を独自応用してシナプス構造の高分解能で定量的な解析を進める中で、この手法が spinule などの微小な構造体の詳細な構造解析や分布解析に最適であることに気付いた。特に、試料ブロックの表面を 10 nm 単位で削りながら連続撮影して得られた断層画像は、連続性が高く、ゆがみも無いため、70 nm 厚の超薄切片の透過像を取得する従来法に比べて、微小な構造を正確に追跡し、その全体像を精密に可視化できる点で優れていた。しかも、組織の広範囲を容易に撮影できる点も、spinule や多胞体(Multivesicular body; MBV)の様に低頻度で分布する対象構造の観察に適していた。

2. 研究の目的

本研究課題では、独自に開発した生体組織中の超微小構造体を高い分解能で広範囲に解析できる定量的な構造解析手法を駆使し、機能未知の spinule と MBV を対象に、その種類と分布、出現頻度を解析する技術基盤を確立することを目的とした。また、遺伝子改変や神経活動との関連性を明らかにすることにより、「神経系における細胞質移行による情報伝達の役割や制御機構」の解明に向けた研究基盤を世界に先駆けて確立することも目指した。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスを含む 8 週齢マウスを深麻酔下で灌流固定し、海馬と小脳の樹脂包埋試料を作製する。これら試料から収束イオンビーム搭載高分解能型走査型電子顕微鏡 (Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscope: FIB-SEM)を用いて連続電子顕微鏡像を撮影し(分解能; XY = 2 nm, Z = 10 nm, 観察体積約 1000 μm^3)、以下の観察解析を計画した。

(1)Spinule と MVB の種類と形態的特徴、出現部位と頻度の解析

海馬 CA1 放射状層および小脳分子層を対象に、spinule と MVB の分布や構造情報を定量的に取得した。Spinule については、各領域における全ての spinule の種類(由来と陥入相手)を同定しながら構造情報(長さや体積、断片の有無)と頻度を解析し、MVB については形態情報(小胞数や大きさ)と出現部位と頻度を解析した。

(2)神経活動変化やシナプス可塑性と spinule の分布(出現頻度)変化の解析

新奇環境下で行動後の野生型マウスと豊富環境下で飼育された野生型マウスで(1)と同様な解析を行った。

(3)Spinule と MVB の周辺構造と内部構造の解析

開始当初の FIB-SEM 画像は、生体膜構造の可視化に最適化された試料作製法と観察条件に従って取得しているため、タンパク質を主体とした超微細構造の情報に乏しく、微小膜の内外の構造視認性が低い。そこで、電子染色と観察の条件を最適化し、spinule と MVB の周辺構造と内部構造を詳細に解析し、特徴を明らかにすることとした。

(4)Spinule の形成と維持への arc の関与の検証

神経活動依存的に発現増加する arc がキャプシド構造を形成して arc mRNA や arc タンパク質の細胞間移行に関与することが報告されていた(Cell, 2018 2 報)。Arc 遺伝子の欠損マウスと遺伝子導入マウスの海馬 CA1 領域における、spinule と MVB の出現頻度、分布、構造情報について調べることで、これら微小膜構造の形成と維持における arc の役割について解析を行った。

(5)経シナプスウイルス伝播現象への spinule の関与の検討

ある種のレクチン(糖鎖結合タンパク質)やウイルスは経シナプ斯的に神経細胞間を伝搬することが知られる。そこで、順行性に伝搬するレンチウイルスとアデノ随伴ウイルス(AAV)、逆行性に伝搬する狂犬病ウイルスや AAV を、特定の脳部位に微量注入したマウスを作製し、電子顕微鏡観察によりウイルス粒子の局在を可視化し、spinule と MVB への取り込みや集積が起こるかを検討する。

上記の一連の実験により、脳内 spinule と MBV の観察に最適化された定量的解析系を確立しながらその特徴を明らかにし、細胞質移行による情報伝達への関与の有無や制御機構の一端を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1) Spinule と MVB の種類と形態的特徴、出現部位と頻度の解析

図1で示した様に、海馬及び小脳組織において、様々な細胞種や細胞の機能ドメインから突出した spinule 構造が観察され、その出現頻度は海馬放射状層と小脳皮質分子層で異なっていた。さらに、突出した spinule が陥入する相手の組合せも、海馬と小脳で異なっていた(表1)。これらそれぞれの spinule について、他に体積当たりの出現頻度を算出した。また、同様な分布解析を MVB について行い結果を得た。

(2) 神経活動変化やシナプス可塑性と spinule の分布(出現頻度)変化の解析

豊富環境下で1か月間飼育されたマウスの spinule 出現頻度を解析し、通常飼育マウスと比較して、出現部位も頻度も変化が無いことを示唆する結果を得た。

(3) Spinule と MVB の周辺構造と内部構造の解析

Spinule や MVB と周辺組織構造、さらに内部構造を観察可能な試料の電子染色処理条件を検討した。その結果、樹脂包埋前の電子染色の調整では、電子顕微鏡像が改善せず、膜構造以外を安定的に観察・解析することはできなかった。そこで、観察時の電子線カラムと試料の距離(焦点距離)を短縮するなど、電子顕微鏡自体の観察条件の最適化が必要であり、今後検討を行うこととした。

(4) Spinule の形成と維持への arc の関与の検証

Arc KO マウス及び過剰発現マウスの spinule と MVB の海馬放射状層内での出現頻度は、野生型マウスの出現頻度と有意な違いは認められなかった。

(5) 経シナプスウイルス伝播現象への spinule の関与の検討

レンチウイルス、AAV を脳に微量注入した海馬組織、及び、感染させた培養神経細胞に対し、FIB-SEM による解析を行ったが、細胞質中のウイルス粒子は観察されたにもかかわらず、spinule や MVB 中には観察されなかった。

以上の結果から、FIB-SEM による脳神経組織の広範囲、且つ、高分解能観察は、spinule や MVB に代表される低頻度に見られる超微小構造体の観察や分布解析に利用可能であることを確認でき、今後さらに解析を継続することにより、その脳機能創出との関係や役割を明らかにできることが期待された。

これまでに得られた結果は、現在実施中の解析結果と合わせて、論文発表を行う準備を進めている。

<引用文献>

Westrum LE & Blackstad TW. J Comp Neurol 119: 281-309. 1962.

Spacek J & Harris KM. J Neurosci.24: 4233-41. 2004.

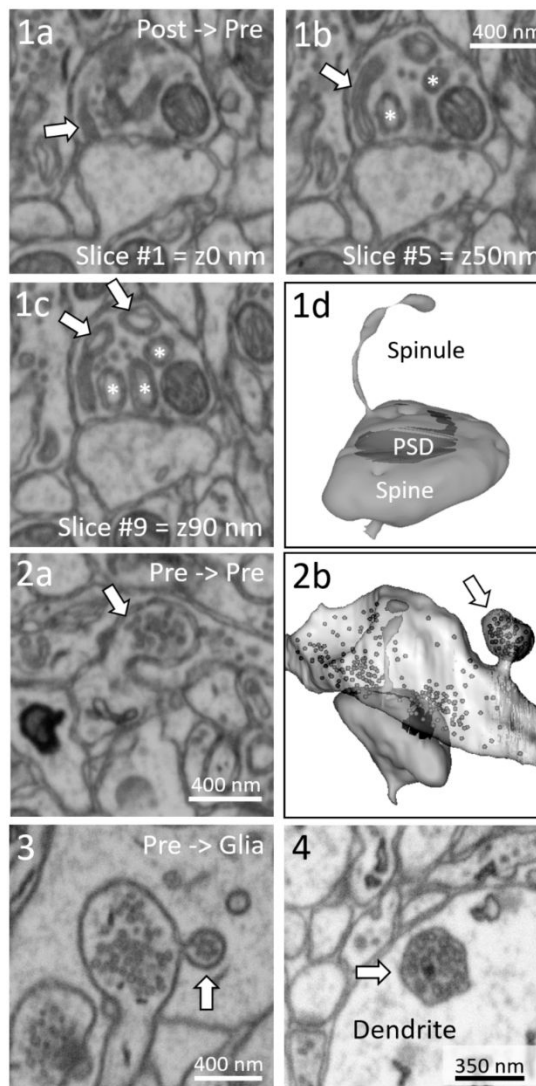


図1. Spinule (矢印) の多様性(種類)

Post->Pre (1a-d), Pre->Pre (2a,b), Pre->Glia (3)のspinule. 1d, 2bは三次元再構築像。1b,cの*は他のspinuleに由来するspinule. 2bの*はシナプス小胞様構造。4の矢印は樹状突起内のMVB。1,2は海馬、3は小脳に頻発。

		由来			
		海馬	Pre	Post	Glia
相手	Pre		O	O	×
	Post		×	×	×
	Glia		×	O	×
		由来			
		小脳	Pre	Post	Glia
相手	Pre		Rare	×	×
	Post		×	×	×
	Glia		O	×	×

表1. Spinuleの由来と陥入相手

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Murata Koshi, Kinoshita Tomoki, Fukazawa Yugo, Kobayashi Kenta, Kobayashi Kazuto, Miyamichi Kazunari, Okuno Hiroyuki, Bito Haruhiko, Sakurai Yoshio, Yamaguchi Masahiro, Mori Kensaku, Manabe Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 GABAergic neurons in the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43580-1	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 Eguchi Kohgaku, Velicky Philipp, Hollergschwandtner Elena, Itakura Makoto, Fukazawa Yugo, Danzl Johann Georg, Shigemoto Ryuichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Advantages of Acute Brain Slices Prepared at Physiological Temperature in the Characterization of Synaptic Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.00063	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 Martin-Belmonte Alejandro, Aguado Carolina, Alfaro-Ruiz Rocio, Moreno-Martinez Esther Ana, de la Ossa Luis, Martinez-Hernandez Jose, Buisson Alain, Shigemoto Ryuichi, Fukazawa Yugo, Lujan Rafael	4. 巻 21
2. 論文標題 Density of GABAB receptors is reduced in granule cells of the hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2459-2459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072459	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 該当する

1. 著者名 Kleindienst David, Montanaro Jacqueline, Bhandari Pradeep, Case Matthew, Fukazawa Yugo, Shigemoto Ryuichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Deep learning-assisted high-throughput analysis of freeze-fracture replica images applied to glutamate receptors and calcium channels at hippocampal synapses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6737-6737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186737	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 該当する

1. 著者名 Murata Koshi, Kinoshita Tomoki, Ishikawa Tatsuya, Kuroda Kazuki, Hoshi Minako, Fukazawa Yugo	4. 巻 528
2. 論文標題 Region- and neuronal-subtype-specific expression of Na,K-ATPase alpha subunit isoforms in the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2654-2678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24924	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 Parajuli Laxmi, Urakubo Hidetoshi, Takahashi-Nakazato Ai, Ogelman Roberto, Iwasaki Hirohide, Koike Masato, Kwon Bae Hyung-, Ishii Shin, Oh Chan Won, Fukazawa Yugo, Okabe Shigeo	4. 巻 0248-20
2. 論文標題 Geometry and the organizational principle of spine synapses along a dendrite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0248-20.2020	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 領家崇、黒田一樹、村田航志、酒井涼、吉村仁志、佐野和生、深澤有吾
2. 発表標題 歯を含む硬組織における感覚受容関連分子の発現と局在についての解析基盤の確立
3. 学会等名 日本解剖学会 第79回中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深澤有吾、Elhanbaly Ruwaida、石川達也、村田航志、黒田一樹
2. 発表標題 FIB-SEM観察法によるシナプス結合における協調的前後構造の構築を支える分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第126回日本神経科学学会全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学医学部脳形態機能学分野
<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/brain/>

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
研究分担者	黒田 一樹 (Kuroda Kazuki) (60557966)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	

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			
スペイン	University of Castilla LaMancha			
オーストリア	Insititute for Science Austria			