

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500320

研究課題名（和文） シナプス及びシナプス局在タンパクの動態解析

研究課題名（英文） The Analysis of dynamic synapses and synaptic proteins

研究代表者

海老原 達彦 (EBIHARA TATSUHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：00344119

研究成果の概要（和文）：

神経細胞またはシナプス部位を安定して可視化するために、蛍光タンパクを用いたトランスジェニックマウスを作製し、可視化技術を確立することを狙った。生きたままの個体観察系として、cre-loxP系のトランスジェニックマウスを作製し、観察の目処をつけた。また、培養細胞系において、シナプス可視化マウスを大気圧走査型電子顕微鏡にて水溶液中で観察することで、神経及びシナプスの生体に近い状態且つ電顕による詳細な観察に成功し、現在更に解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of stable visualizing the neuron and neural synapse, I made some transgenic mouse introduced by (fusion-) fluorescent protein's gene. And the completion of live brain neuron analysis using cre-loxP fluorescent mice and 2-photon microscope is in sight.

Using synapse specific fluorescent mice (made before this grant), I examined a possibility of the atmospheric scanning electron microscope (ASEM). This microscope realized the observation of cultured neuron in dH2O solution by EM. I examined staining condition, and analyzed fine structure of dendrite, spine and growth cone, and continue analysis for dynamic fine structure modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子神経科学

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：シナプス、シナプス後肥厚部 (PSD)、大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM)、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、神経回路網を常に変化させる、形態的にも「動く」細胞であることが、徐々に分かってきた。

この「動き」を調べるためには、生きた状態にて神経細胞やシナプス部位を経時的に観察することが、不可欠と考えられる。生きた神経細胞や脳を可視化させるためには、量的・時間的に安定して蛍光タンパクを発現することが出来る、遺伝子改変マウスが望ましい。

本研究当初、個体脳シナプスの局在を組織中または生きた状態にて特定し、可視化できるトランスジェニックマウスは存在しなかった。そこで、上記を実現可能なトランスジェニックマウスを作製し、かつ観察系を整備する必要があった。

また、 $1\mu\text{m}$ 前後の spine 上に形成されるシナプスの観察には、顕微鏡の解像度の向上も欠かせない。蛍光タンパクやレーザー顕微鏡が日々改良されているが、 $0.4\mu\text{m}$ 程度の解像度であり、シナプスや spine 内のタンパク局在を解析することは、非常に困難と考えられる。

一方で電子顕微鏡は nm レベルの高解像度顕微鏡である。しかし、脱水やエッチングなど、観察前のサンプル加工が複雑であり、サンプル扱いの面倒さに加えて、サンプルの生前の形態をどこまで反映しているか、疑問が呈される。しかしながら電子顕微鏡は、観察サンプルの脱水等の前処理が改善されて、より生体に近いサンプルを観察出来れば、有力なツールとなる。産総研の当部門と日本電子の共同研究によって開発された、大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) は、観察用培養皿上の細胞を、水分を張ったままで直接観察可能な SEM である。つまり、光顕にて継続観察した細胞について、簡単な固定染色後に水溶液中のままに同じサンプルを電子顕微鏡にて観察可能となった。研究開始当時、試作段階であったが、神経細胞の観察の有用なツールとして、使用可能性についての、模索が検討されていた。

2. 研究の目的

(1) 海馬スライス培養あるいは麻酔下の個体の大脳皮質の神経細胞やシナプスを、2 光子顕微鏡にて直接観察することを目指し、トランスジェニックマウスを作製し、且つ観察系を整備することで、観察を実現する事を目指した。

(2) ASEM は定法による一次培養神経細胞を、固定染色するだけで (=細切やエッチン

グをせずに)、液中観察可能な顕微鏡である。更に固定直前までの形態情報を ASEM 内蔵の蛍光顕微鏡によって取得可能である。結果、染色法次第でシナプス内の構造を、電顕観察前の経時的情報 (=電顕観察時まで) にどのような形態変化を行ったか?) をも併せて解析可能な電子顕微鏡ある。そこで、ASEM にて神経及びシナプス構造を解析する事を目指し、各種染色条件を再検討し直し、観察に適した条件を求める。さらに、具体的に神経細胞の細胞体、成長円錐など各部を観察して nm レベルの細かな形態やタンパク局在に関して知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 目的 1 について :

loxP/stop/loxP 配列を可視化マーカータンパクの遺伝子上流にもち、Cre 組み替え酵素によって初めてマーカー遺伝子が発現するデザインにて、トランスジェニックマウスを作製した。作製したマウス系統の E14.5 胎児に、子宮内エレクトロポレーションにて脳室内から海馬神経細胞に Cre 等の遺伝子 DNA を導入し、Cre 組み替え酵素による組換えが起こることを確認した。同時に 2 光子顕微鏡を用いた、個体観察系のセットアップを行い、個体手術から顕微鏡の光路その他まで、諸条件が観察に適しているか、検討した。

(2) 目的 2 について

海馬錐体細胞のスパインなどを可視化したトランスジェニックマウス (Homer1c/GFP) を以前作製した。この系統のマウスから一次培養を行い、Div3 または 14 にて PFA 固定して観察した。ASEM では、サンプル準備法が従来の電子顕微鏡とは大きく異なるため、細胞を壊さない条件での電子顕微鏡向けの染色方法について、全ての条件を検討し直す必要があった。そこで、金属染色や抗体染色 (金コロイドや nano-gold) 等、培養、金属染色 (ウラン、鉛、白金、タンゲステン、オスミウムなど) 等々の条件を検討した。また、培養神経細胞の形態について、経時変化を ASEM 観察用 dish にて、観察出来るかどうか、蛍光顕微鏡にて条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) 目的 1 について :

大脳皮質については、麻酔下にて頭蓋骨を薄くした上で 2 光子顕微鏡観察することで、生体観察の目途を得た。しかしながら、Tg マウス系統の蛍光タンパクの発現量が充分でなかったため、マウス再作製の必要が生じた。結果、目的にかなう発現量のマウスは得られ

たものの、具体的な解析は開始出来なかった。同様に、海馬の組織培養観察に、この系を用いる用途は立っており、フィルター培養による検証を準備していたが、震災により中断している。

今後、系の復興に合わせ、海馬のフィルター培養系から検証を進め、具体的な観察を開始していく。

(2) 目的2について

細胞骨格タンパクに関して、蛍光顕微鏡画像と電子顕微鏡画像とを対比させた。結果、成長円錐や樹状突起におけるアクチンやチューブリンの走行と、Homer1c も含めた局在分布の差異を見いだした。また、シナプス部位のアクチン局在についても確認出来た。以上、光学顕微鏡を超える解像度にて微細構造を検討することが出来たため、交付年度中に論文投稿した。また、ASEM 金属染色の条件についても各種染色液の特徴を調べ、有用な染色法を見いだせた。成長円錐やスパインに関する観察を行い、2011 年度上期に論文投稿した。

現在、シナプス内のタンパク局在を追うために必要な条件について、更に検討を進めており、蛍光顕微鏡による経時変化に 관련된シナプス内構造変化を解析すべく条件検討など、研究を進めている。

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 5 件)

① In-solution observation of Neuronal primary culture by the atmospheric scanning electron microscope (ASEM).

Ebihara T.¹, Ohtani A., Maruyama Y., Manaka S., Memtily N., Nishiyama H., Suga M., Shiga T., and Sato C. 掲載決定 2011 (査読あり)

② Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM) realizes aqueous immuno-cytochemistry

Maruyama Y., Ebihara T., Nishiyama H., Suga M, Sato C. 掲載決定 2011 (査読あり)

③ Inhibitory synaptic modulation of renshaw cell activity in the lumbar spinal cord of neonatal mice.

Nishimaru H, Koganezawa T, Kakizaki M, Ebihara T. Yanagawa Y. J Neurophysiol.;103:3437-47. 2010. (査読あり)

④ Atmospheric Electron Microscope:

Limits of Observable Depth,

Suga M., Nishiyama H., Ebihara T., Ogura T., Sato C. , MICROSCOPY & MICROANALYSIS, 15: 924-925, 2009(査読あり)

⑤ Cre complementation with variable dimerizers for inducible expression in neurons.

Maruo T, Ebihara T., Sato E, Kondo S, Okabe S. J Med Dent Sci., 55:247-54.2008 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

①マウス腰髄 Renshaw 細胞の脊髄運動神経回路網による制御様式、

西丸広史、小金澤禎史、柿崎美代、海老原達彦、柳川右千夫、包括脳 2010 年夏のワークショップ、札幌 2010/7/27

② The New Atmospheric Scanning Electron Microscope observes cells in solution as optical- and electron-correlative microscope,

須賀三雄、西山英利、小泉充、寺本 華奈江、北村真一、露木 誠、石森 能夫、佐藤 猛、海老原 達彦、小椋 俊彦、丸山 雄介、三尾 和弘、佐藤 主税, The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, サンディエゴ、2009/12/08

③バイオイメージング技術の普及を目指した講習会活動 (ライブセルイメージング講習会) ,

加藤 薫、櫻井孝司、小島 亜矢子、海老原達彦、戸井 基道、長崎 晃、小川 昌克、水野 敬文、亀山 仁彦、寺川進、鈴木和男、田口 隆久、バイオテクノロジー分科会合同研究発表会・講演会、つくば、2009/01/29

④大気圧走査電子顕微鏡はどこまで深く見えているか、

須賀三雄、西山英利、海老原 達彦、小椋 俊彦、佐藤 主税, 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会, 仙台、2009/05/27

[図書] (計 1 件)

知りたい!サイエンスシリーズ 光る生き物—ここまで進んだバイオイメージング技術—
加藤薫 監修, 池田圭一, 武位教子 著
2009 年 技術評論社

(ライターへの内容レクチャー。3 頁分)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 達彦 (EBIHARA TATSUHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・研究員

研究者番号：00344119

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし