

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500405

研究課題名(和文)高解像度イメージング法を用いた興奮性シナプスの構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of excitatory synapse by using high-resolution imaging method

研究代表者

岩崎 広英(Iwasaki, Hirohide)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30342752

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文):脳は神経細胞がシナプスを介してネットワークを構築することで様々な高次機能を実現する。神経回路の結合様式をシナプスレベルで解析するためには広範囲に亘る高分解能イメージング法の確立が必要である。本研究では光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術の融合的手法による神経回路解析法の実現を目指し、Array Tomography法による神経組織の三次元再構築およびシナプス構成分子の分子局在解析の技術的基盤を確立した。さらに走査型電子顕微鏡によるシナプス解析法を確立した。これらの技術的基盤を用いて発達期における興奮性シナプスの形態および分子局在解析を行った。

研究成果の概要(英文):Neurons are connected via synapses to form neural circuits. In order to understand how neurons are involved in various brain functions at neural circuit level, it will be useful to analyze the wiring diagram of the brain at synapse level with high-resolution imaging technique which can cover large area. From this point of view, I established the hybrid method of light and electron microscopy, Array Tomography, for the three-dimensional reconstruction of neural tissue and synapse localization. I also established the method to observe synapses by using scanning electron microscopy. By using these technologies, I analyzed the morphology of excitatory synapses at developmental stage of mice.

研究分野：神経解剖学

キーワード：シナプス 光学顕微鏡 電子顕微鏡 コネクトーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は無数の神経細胞が互いにシナプスを介して結合し、ネットワークを構築することで多彩な高次機能を実現する。神経細胞がどのようなネットワークを構築しているのかについて明らかにすることは脳の機能を理解する上で重要な手がかりをもたらすと考えられる。実際、そのような観点から、神経細胞の結合様式を網羅的に記載する、いわゆる「コネクトーム」プロジェクトが全世界的に推進・展開されている。

(2) 神経細胞の結合様式をシナプスレベルで網羅的に解析するためには、広範囲に分布する神経細胞をカバーしつつ、微細構造であるシナプスを可視化する必要がある。しかし従来の電子顕微鏡によるシナプス観察では狭い領域しかカバーすることができず、広い範囲に分布する神経細胞どうしがどのように結合しているかを明らかにすることはできなかった。一方、光学顕微鏡を用いた神経組織観察では、広範囲にわたり神経細胞を同定することが可能であるが、通常の光学顕微鏡の分解能ではシナプス観察に不十分であり、シナプス結合の有無を判定することが困難であった。したがって、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両者の長所を活かした神経組織解析法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術の融合的手法によりシナプス結合を広範囲に亘って網羅的に解析するための技術的基盤の確立を目指した。

(2) (1) で確立した技術を用いて発達期における興奮性シナプスの形態およびシナプス構成分子の分子局在について解析し、シナプスリモデリングの分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、Array Tomography 法を用いたシナプス解析法の確立を目指した。Array Tomography 法は脳試料を電子顕微鏡用樹脂に包埋し、ミクロトームで 70-200nm 程度の厚さの超薄連続切片化したものを抗体染色する手法である。

通常の光学顕微鏡の分解能は試料と平行な平面においては約 250nm であるのに対し、試料に垂直な方向では 750-1000nm と低分解能であり、微細なシナプス構造を観察するには不十分である。しかし電子顕微鏡用樹脂に包埋して試料を光学顕微鏡の分解能以下に超薄化することで、分解能の向上が期待できる。

さらに親水性の樹脂を用いることで免疫組織化学染色に供することができる。したがってシナプス局在分子の抗体を用いて染色することで、シナプスの位置や興奮性・抑制

性シナプスの判別およびシナプス局在分子の分布パターンを解析することが可能となる。このように Array Tomography 法は光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術のまさに融合的手法であり、広範囲に亘る神経細胞の結合様式解析に適した手法といえる。

(2) 本研究では Array Tomography 法に加え、走査型電子顕微鏡によるシナプス解析法の確立を目指した。従来はグリッド上に回収した超薄切片を透過型電子顕微鏡観察により観察するのがシナプス観察の一般的な手法であったが、近年の走査型電子顕微鏡の分解能の向上により、走査型電子顕微鏡を用いたシナプス観察が行われるようになりつつある。

走査型電子顕微鏡を利用するメリットとしては、グリッドに切片を回収するのに比べて大きな切片を取り扱うことができるため、広範囲に亘る神経組織解析に適していることや、蛍光を保持したまま電子顕微鏡観察に堪えうる試料が作成できれば、同一試料を電子顕微鏡と光学顕微鏡で観察する、いわゆる光 - 電子相関顕微鏡 (Correlative Light-Electron Microscopy: CLEM) 法による解析に適していることなどが挙げられる。

(3) 従来の Array Tomography 法は、内在性のシナプス局在分子を抗体染色により可視化することで神経組織におけるシナプスの分子局在やシナプスの分類などに利用されている。本研究では、このような Array Tomography 法の利用のみならず、遺伝子導入により蛍光タンパク質でラベルして可視化したスパインの三次元再構築および分子局在解析を行った。具体的には子宮内穿孔法により導入した GFP-PSD95 を用いて興奮性シナプスのシナプス後部を、DsRed を用いて神経細胞全体を可視化し、発達期における興奮性シナプスの形態およびシナプス構成分子の分子局在解析を行った。さらに連続切片より得られた画像の三次元再構築化を行った。

4. 研究成果

(1) まず、Array Tomography 法を用いるにあたり、蛍光を保持したまま電子顕微鏡用樹脂に脳切片を包埋する手法の確立を行った。蛍光タンパク質 YFP (Yellow Fluorescent Protein) を神経細胞に発現しているトランスジェニックマウス YFP-H を用い、脳の固定法および電子顕微鏡用樹脂 LRWhite への包埋の条件検討を試みた。その結果、YFP の蛍光を保持したまま樹脂へ包埋する手法を確立した。さらに、1 次抗体として抗 GFP 抗体、2 次抗体に蛍光標識した抗体をそれぞれ用いて YFP-H マウスの脳スライスをあらかじめ免疫組織化学染色してから、エポキシ樹脂に包埋する手法も併せて確立することができた。

(2) (1) で述べた LRWhite 包埋試料プロ

ックを電子顕微鏡用ウルトラミクロトームを用いて超薄連続切片化し、免疫組織化学染色に供した。その際、各種1次抗体を用いて染色条件の検討を試みたが、LRWhite樹脂に包埋された切片で使用できる抗体はかなり限定的であることが明らかとなった。しかしその中でも、蛍光タンパク質 GFP に対する抗体の中で利用可能なものを見出した。さらにシナプス関連分子については VGluT1, PSD-95 に対する抗体が再現性良く染色できることを見出した。

(3)(2)で免疫組織化学染色を施した超薄連続切片を用いて、連続する切片から同じ領域の切片像を共焦点レーザー顕微鏡により取得し、得られた画像のアラインメントおよび三次元再構築を行った。FIJI/ImageJ を利用して画像のアラインメントおよび三次元再構築を行い、神経細胞およびシナプスの三次元再構築像を取得する手法を確立した。

(4)(3)で行った神経組織の蛍光像の三次元再構築を広い範囲から自動的に行うため、広域からの画像の自動取得システムの構築を行った。Luminavision(三谷商事製)を用いて蛍光顕微鏡のステージを自動で制御し画像取得するシステムを構築した。さらに得られた画像をつなぎ合わせて三次元再構築する手法を確立した。これまでに YFP-H マウスの大脳皮質体性感覚野を用いて、皮質全層(約 1mm)に亘る領域からの画像の自動取得に成功している。

(5)本研究課題採択後に導入した ATUM (Automated Tape-collecting Microtome) は、ウルトラミクロトームで作成した超薄連続切片をプラスチックテープの上に自動回収する装置であり、1時間あたり 200~300 枚程度の切片を回収することが可能である。ATUM で回収された切片を Array Tomography に利用することで、作業の効率化が飛躍的に進んだ。

(6)走査型電子顕微鏡を用いた連続超薄切片観察を行った。電子顕微鏡観察用にオスミウム酸で固定後に Epon または Durcupan に包埋し、超薄連続切片化して ATUM でプラスチックテープ上に回収した試料を電子染色およびカーボンコーティングを施して観察する手法を確立した。さらに連続切片内の同じ領域から画像取得し、得られた画像を三次元再構築することにも成功した。従来の透過型電子顕微鏡を利用した三次元再構築化は多くの時間と労力を必要とする作業であるが、走査型電子顕微鏡と ATUM の併用により時間や労力を軽減させることができた。

(7)子宮内穿孔法によりマウス胎児脳に GFP-PSD95 および DsRed を遺伝子導入した。GFP-PSD95 は興奮性シナプスのシナプス後部

のマーカーとして、DsRed は細胞全体を可視化させるために用いた。発達期(生後 21 日程度)のマウス脳を灌流固定後に脳スライスを作成し、LRWhite に包埋、Array Tomography 法による三次元再構築を試みた。その結果、スパインに局在する GFP-PSD95 および VGluT1 を可視化することができた。

(8)上記の一連の技術的基盤の確立により、スパインの in vivo での動態と微細形態との関連づけを行うことが可能となった。今後、これらの手法を用いてシナプス形成・除去過程における分子メカニズムに迫ることが期待できる。また、本研究課題を通じて確立した技術的基盤は、神経細胞に限らず、グリア細胞やシナプス-グリア相関など、広域的な情報と局所での微細形態情報の統合的な理解を必要とする課題においても有効であると期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

岩崎広英 「超薄連続切片自動回収機 ATUM を用いた試料作成法」顕微鏡、査読有、49 巻、2014、176-180

Xiaojing Dai, Hirohide Iwasaki, Masahiko Watanabe and Shigeo Okabe
“Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression.”
European Journal of Neuroscience, 査読有、39 巻、2014、531-547、doi:10.1111/ejn.12413

岩崎広英、田中慎二、岡部繁男 「海馬のシナプス維持とグリア細胞」 Clinical Neuroscience、査読無、31 巻、2013、1400-1402

Euikyung Shin, Yutaro Kashiwagi, Toshihiko Kuriu, Hirohide Iwasaki, Teruyuki Tanaka, Hiroyuki Koizumi, Joseph G. Gleason & Shigeo Okabe
“Doublecortin-like kinase enhances dendritic remodeling and negatively regulates synapse maturation.”
Nature Communications、査読有、4 巻、2013、1440、doi:10.1038/ncomms2443

[学会発表](計 13 件)

岩崎広英、一色真明、石田綾、柏木有太郎、岡部繁男「光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術の融合的手法によるスパイン形成解析」第 120 回日本解剖学会総会・全国集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会(招待講演) 2015 年 03 月 21 日~2015 年 03 月 23 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

岩崎広英、岡部繁男「自動切片回収機 ATUM

を用いた神経組織解析」生理学研究所研究会「電子顕微鏡イメージングの医学・生物学への応用」(招待講演) 2014年11月12日~2014年11月13日 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

岩崎広英、岡部繁男「光学顕微鏡による超薄切片化脳の三次元再構築」第37回日本神経科学学会大会、2014年09月11日~2014年09月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

岩崎広英「超薄連続切片回収機ATUMを用いた神経組織解析」光操作研究会(招待講演)、2014年08月21日~2014年08月22日、東北大学民権会館(宮城県仙台市)

岩崎広英「光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術の融合による神経組織の三次元再構築解析」生理学研究所研究会「シナプス機能の普遍性と多様性」(招待講演) 2014年06月05日~2014年06月06日生理学研究所大会議室(愛知県岡崎市)

岩崎広英、岡部繁男「自動切片回収機ATUMを用いた神経組織の解析」日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会(招待講演) 2014年05月11日~2014年05月13日、幕張メッセ国際会議場(千葉県美浜区)

岩崎広英、岡部繁男「電子顕微鏡技術と光学顕微鏡技術の融合による神経組織の解析」第119回 日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演) 2014年3月27日~2014年3月29日。自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

岩崎広英、岡部繁男「自動連続切片回収機ATUMを用いた神経回路解析」第91回日本生理学会シンポジウム(招待講演) 2014年3月16日~2014年3月18日、鹿児島大学キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

岩崎広英、岡部繁男「自動切片回収機ATUMを用いた神経回路のコネクトミクス解析」第54回日本組織細胞化学学会 総会・学術集会(招待講演)2013年9月27日~2013年9月28日。航空会館(東京都港区)

岩崎広英、岡部繁男「コネクトーム解析のための試料作成法の開発」日本顕微鏡学会第69回学術講演会(招待講演) 2013年5月20日~2013年5月23日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

岩崎広英、岡部繁男 Three- dimensional reconstruction of ultrathin- sectioned neural tissue by light microscopy 第118回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2013年03月28日~2013年03月31日 サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

岩崎広英「電子顕微鏡技術と光学顕微鏡技術の融合による神経組織の解析」第13回 医学生物学電子顕微鏡シンポジウム(招待講演) 2012年11月24日、チサンホテル新大阪(大阪府大阪市)

岩崎広英、岡部繁男「コネクトミクスのための電子顕微鏡法と光学顕微鏡法の融合による高解像度イメージング」日本顕微鏡学会第68回 学術講演会 2012年5月15日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://synapse.m.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 広英(Hirohide Iwasaki)
東京大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30342752

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡部 繁男(Shigeo Okabe)
東京大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60204012