

研究報告書

「哺乳類生体内単一ニューロンの微細構造観察法開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 平林 祐介

1. 研究のねらい

脳神経系は多くのニューロンやその機能を支えるグリア細胞が協調して働き高度な情報処理を行うことで我々の知能を司っている。脳における情報処理は、「入力、情報処理、出力」という単一のニューロンによって行われる一連の素過程の集合に他ならず、「個々の」ニューロンの投射先やそれぞれのニューロンが持つシナプスの種類、空間配置などの 1 細胞単位での解析は脳神経系を理解するために必須である。しかしながら、脳を構成する細胞数の多さや、種類の多様性、それら多様な細胞が作り出す樹状突起と軸索の複雑な分岐、それぞれのシナプス終末の微細さにより、脳内における 1ニューロン単位での解析は非常に難しい。

樹状突起、軸索の形態や、そこで形成されるシナプスの性質、空間配置などについて、それぞれのニューロンは独特の個性を持っていると考えられている。このような個々のニューロンの個性を明らかにする上での大きな障害の一つは、他の細胞に比べてニューロンが特に大きいことにある。ニューロンは比較的小さいマウスのニューロンを例にとっても大脳内に投射するニューロンで数ミリメートル、大脳から脊髄に投射するニューロンの場合には数センチメートルもの軸索を伸ばし、非常に広範囲に多くの細胞とネットワークを作る。一方で脳の中では多くの細胞の軸索が束になったり、交差したりする中でナノメートルレベルのシナプス構造を作る。従って、単一ニューロンの投射パターンの全体像を把握すると同時に末端で作られるネットワークを追うことはナノメートル立方からセンチメートル立方レベルの大きなダイナミックレンジを持つ 3 次元的観察手法が必要となる困難なチャレンジである。このチャレンジは霊長類などの大きな脳を解析する際には指数関数的に困難なものとなり、これまでの解析の速度を高速化することによる解決では到底目的を達成できない。そこで我々はこのスケールの問題を解決するための新しい方法論を開発することにした。

我々は発生時期での遺伝子導入法を応用し大脳皮質全体の中で数個のニューロンのみをラベルすることで、単一ニューロンの三次元的投射パターンを蛍光顕微鏡下で観察することに成功した。さらに、DAB 染色を手掛かりとして蛍光顕微鏡で観察にした細胞を同定しその末端の構造を電子顕微鏡下で観察することに世界で初めて成功した。本研究ではこの革新的な技術を基盤としてより生物学的な意味を明らかにするための手法を確立することを目的とした。そして実際に開発した技術を用いて、脳組織の中の特定の単一ニューロンについて、細胞体、樹状突起から軸索の先端まで投射パターンを蛍光顕微鏡により追ひ、さらにそのニューロンの内部構造、シナプス結合について電子顕微鏡レベルでの解析を目指した。

加えて、研究の後半では、行動中マウスを用いた蛍光顕微鏡観察で観察されたニューロンについて、その内部の微細構造を明らかにするという挑戦的な課題にも着手し、神経科学における重要な課題を明らかにすることをも目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

脳機能の解明を困難にしている理由の一つは脳の情報伝達を担う細胞であるニューロンは非常に大きな細胞であることである。細胞内の局所的な微細構造がその機能に重要であることから、微細構造を観察しつつ大きな細胞全体も観察しなくてはならない。本研究では蛍光タンパク質と同時に発現した peroxidase により触媒される 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 染色を手掛かりとして、3次元電子顕微鏡観察法により取得した数千枚の組織連続切片画像の中から蛍光顕微鏡で観察した細胞を同定し、その末端の3次元構造を電子顕微鏡下で観察することに世界で初めて成功した。この方法を用い、脳組織の中の特定の単一ニューロンについて、細胞全体を蛍光顕微鏡で観察した上で同定し

た樹状突起上のスパインや軸索、ニューロンの内部構造(核構造やオルガネラ構造)などの微細構造を、電子顕微鏡下でさらに詳しく解析した。これによりこれまで非常に困難であった特定のスパイン、軸索の構造の解析を可能にし、この技術の開発を Scientific Reports 誌に報告した(図 1、2、Hirabayashi et al., *Scientific Reports*, 2018 より改変)。本研究によって開発された技術は今後の脳機能の解明において重要なステップになる。

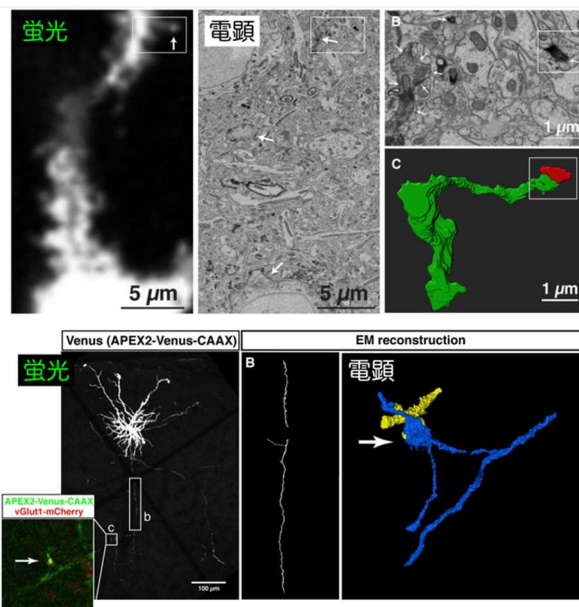


図1 蛍光顕微鏡画像と電子顕微鏡画像の相関観察

蛍光顕微鏡で観察したマウス大脳皮質ニューロンの樹状突起(上段)および軸索(下段)を電子顕微鏡で再度観察して構造を3次元再構築した。

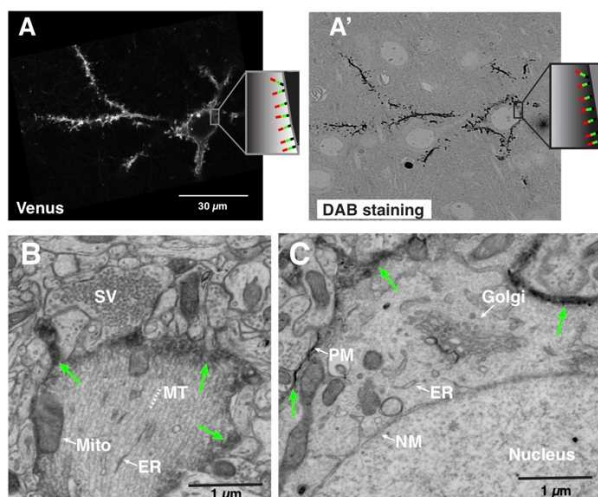


図2 (a) 共焦点顕微鏡によるニューロンの蛍光画像。(a') (a) に示したニューロンの電子顕微鏡による画像 (DAB 染色により認識する)。(b、c) 細胞膜が黒くラベルされた細胞の内部構造。SV-シナプス小胞, Mito-ミトコンドリア, ER-小胞体, MT-微小管, PM-細胞膜, Golgi -ゴルジ体, NM-核膜。

(2) 詳細

研究テーマ 1. 発現させるタンパク質、及びサンプル作成法の最適化

本研究では、蛍光—電子相関顕微鏡技術を可能にするために遺伝子コードされたタグを発現する方法をとった。その為に、タグの最適化を行った。まず、細胞膜の内部をラベルすることを目的として図3(A)に示すタグを開発した。このタグは鮮明に細胞膜をラベルするため、細胞の同定に非常に有用であり、同時に細胞内の観察も観察であったため、研究期間の前半においてはこのタグを用いて実験を行なった。サンプルの作成に際しては、細胞の膜構造を保つための固定の強さとタグのラベルの染色強度とがtrade offの関係にあることが分かり、最も膜構造が保たれたままタグによる染色が出来る条件を探した(図3B)。その結果、図3(B)に太字で示した条件が最適な条件であることが明らかになった。一方で、このタグを用いるとスパインやシナプス前終末のような細かい構造では細胞内構造がマスクされてしまったので、核局在タグの作成などを行なった。核局在タグは非常に強く細胞をラベルしたため、細胞固定を強くすることが可能になり、このタグも有用であることが分かった。

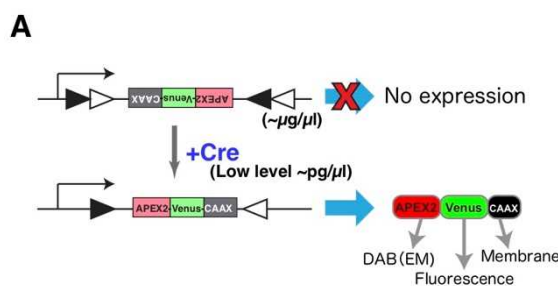


図3 (A) 蛍光—電子相関顕微鏡技術を可能にするために設計し発現した遺伝子の模式図。APEX2-Venus-CAAX プラスミドと Cre プラスミドが共に導入された場合にのみ、タンパク質が発現する。(B) 蛍光—電子相関顕微鏡を可能にするための最適化の結果。

B

Parameter	Values
Plasmid (AVC) Concentration	0.2, 0.4, 1 μg
Glutaraldehyde Concentration	0.25, 0.7 , 1.25, 2.5%
Thickness of vibratome section	50, 100 μm
Mounting solution for confocal imaging	75% Glycerol , VECTASHIELD
Substrate for APEX2	DAB , DAB with cobalt enhancer
DAB pretreatment	5, 20, 30 , 60 minutes
H ₂ O ₂ incubation time	5, 7, 15, 30 minutes
Temperature	On ice, Room temperature

2. 特定のシナプスの電子顕微鏡観察

これまで行われてきたシナプスの観察はランダムなシナプスの観察に過ぎなかったが、本研究では特定のニューロンの特定のシナプスを観察することを目的にした。これまでも蛍光

顕微鏡で観察したシナプスを観察する試みは行われて来たが、非常に効率が悪く、また偶然周囲に血管などのランドマークがある場合にしか特定のシナプスの観察は出来なかった。本研究で開発した蛍光—電子相関顕微鏡技術を用いたところ、図1に示すように蛍光顕微鏡を用い同定した特定の大脳皮質2層由来興奮性ニューロンの樹状突起状のスパインや、軸索の構造や投射先スパインの構造を明らかにすることに成功した。

2. 特定の単一ニューロンにおけるオルガネラ構造の電子顕微鏡観察

オルガネラ構造はナノメートル単位の構造であり、電子顕微鏡による観察が必要であったが、神経細胞におけるオルガネラ構造の研究は電子顕微鏡のレベルではあまり行われていなかった。そこで、本研究では特定のニューロンの特定の部位のオルガネラ構造を解析した。その結果、特定の単一大脳皮質興奮性ニューロンの細胞体や樹状突起におけるミトコンドリアの3次元再構築を効率よく行うことが出来た(図4)。また、大脳皮質興奮性ニューロンのゴルジ体や小胞体などの構造も観察することが出来た(図2)。

A

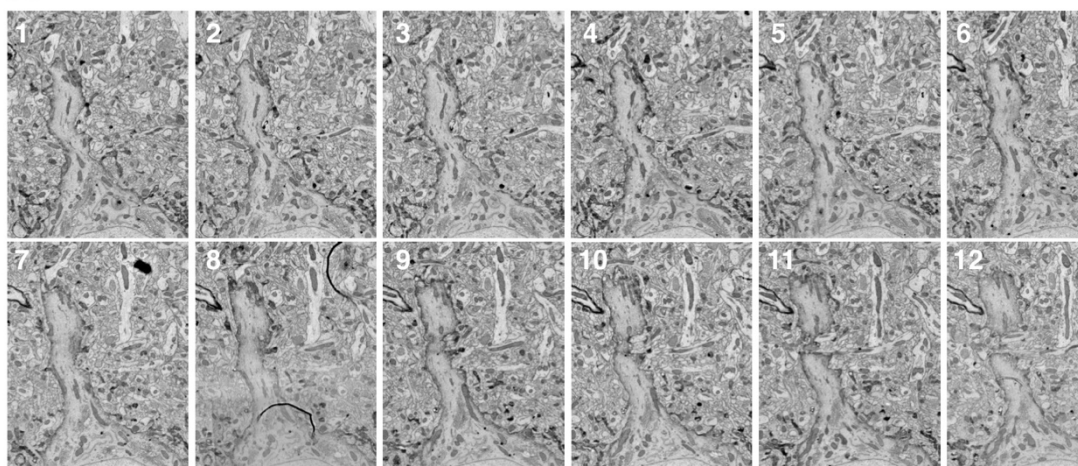
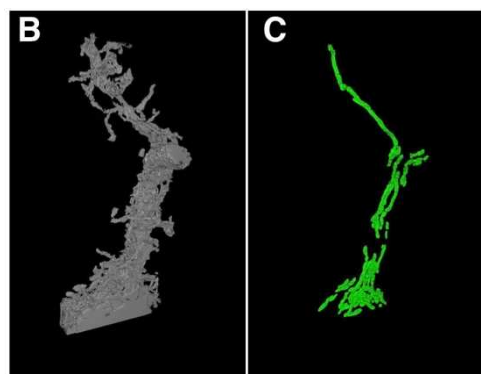


図4 (A) 蛍光—電子相関顕微鏡技術用のタグを発現した大脳皮質興奮性ニューロンの連続切片電子顕微鏡画像。(B、C) A の連続切片電子顕微鏡画像からラベルされたニューロンの細胞膜(B)ニューロン内のミトコンドリア(C)を3次元再構築した。



3. 今後の展開

本研究によって開発した技術を元に、我々は国立研究開発法人日本医療研究開発機構の革新脳プロジェクトにおいて遠距離に投射するニューロンのシナプス構造、及び内部構造の解析プロジェクトを行うことになった。これは本研究結果が今後広く展開していく可能性を示す良い例であると考えている。様々な蛍光顕微鏡を用いた神経系、非神経系細胞の観察と電子顕微鏡観察を

結びつけることによって様々な新規の発見が期待できる。

4. 自己評価

本さがけ研究で目標としていた研究のうち、効率的に一細胞の光学—電子相関顕微鏡観察を行う技術の開発に関しては、高いレベルで達成できたと考えている。その応用としてより高度な蛍光顕微鏡観察を用いた光学—電子相関顕微鏡観察も目標としていたが、こちらは2019年度中の達成を目指し現在取り組んでいる。研究費のうち多くは東京大学での研究室の立ち上げに際しての物品や試薬の購入に投じたが、その結果コロンビア大学での研究と遜色のない実験系を立ち上げることが出来た。

本さがけ開始前から光学—電子相関顕微鏡技術は多くの研究者にとって、実現可能性を感じるものの実際に個々の研究者の研究に取り込むことに関してはハードルが高い技術であった。本研究計画で実際の研究への光学—電子相関顕微鏡技術の導入可能性を示したことは、光学—電子相関顕微鏡技術にとって大きな進歩であったと考えている。今後は光学—電子相関顕微鏡技術が細胞生物学分野での標準的な技術となり、本研究が細胞生物学研究の標準を一段階引き上げるきっかけとなることが出来たのではないかと考えている。特に疾患の原因を明らかにするためには、疾患の原因となっている細胞に絞って微細構造を明らかにすることが重要であり、本研究により開発された技術が疾患の原因解明の一助となる可能性が大いにある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yusuke Hirabayashi, Juan Carlos Tapia, and Franck Polleux
Correlated Light-Serial Scanning Electron Microscopy (CoLSSEM) for ultrastructural visualization of single neurons in vivo **Scientific Reports** 2018, 8;14491
2. *Yusuke Hirabayashi, *Seok-Kyu Kwon, Hunki Paek, Wolfgang M. Pernice, Maëla A. Paul, Jinoh Lee, Parsa Erfani, Ashleigh Raczowski, Donald S. Petrey, Liza A. Pon and Franck Polleux
ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca^{2+} dynamics in mammalian neurons **Science** 2017, Nov 3;358(6363): 623-630 (Research Article) * Equal contribution
3. Fan Shi, Fuun Kawano, Seon-hye Emily Park, Shinji Komazaki, Yusuke Hirabayashi, Franck Polleux and Masayuki Yazawa
Optogenetic control of endoplasmic reticulum-mitochondria tethering neurons **ACS Synthetic Biology** 2018, 7(1), pp 2-9
4. *Annie. Lee, *Yusuke. Hirabayashi, *Seok-Kyu Kwon, *Tommy L. Lewis, Franck Polleux
Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration **Current Opinion in Physiology** 2018, Vol. 3;82-93 * Equal contribution
5. George Mountoufaris, Weisheng Victor Chen, Yusuke Hirabayashi, Sean O'Keeffe, Maxime Chevee, Chiamaka Nwakeze, Franck Polleux, Tom Maniatis
Multi-cluster Pcdh diversity is required for neural circuit assembly **Science** 2017, ;356(6336): 411-414

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

平成 30 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

招待講演(国際学会)

20th International Neuroscience Winter Conference (Solden, Austria) 2018 年 4 月 12 日

The 16th International Membrane Research Forum (Onna-son, Okinawa) 2019 年 3 月 18 日