



Visualizing Neurons One-by-One In Vivo: Optical Dissection and Reconstruction of Neural Networks With Reversible Fluorescent Proteins

荒巻, 真介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4315

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004315>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 荒巻 真介
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第 1915 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Visualizing Neurons One-by-One In Vivo: Optical Dissectionand Reconstruction of Neural Networks With Reversible Fluorescent Proteins(单一神経細胞の生体内での可視化：可逆的蛍光タンパク質を用いた神経回路網の光学的分解および再構築)

審 査 委 員

主 査 教 授 寺島 俊雄
教 授 片岡 徹
教 授 南 康博

神経回路網においては、網膜視蓋投射に見られるように、形態と機能の間に強い関連性が見られることが多い。したがって神経回路網中の神経細胞の形態および位置関係を单一細胞レベルで理解出来れば、機能推定やモデリングにおいて極めて有益な情報となることが予想される。しかしながら神経回路網はその名が示すとおり、シナプスを介して複雑かつ正確に接続された神経細胞群からなるのが一般的であり、詳細な解析が困難となることが多い。

神経細胞の形態を解析する手法としては古くから Golgi 染色法が用いられ、神経生物学の発展に寄与してきた。Golgi 染色法では、固定された神経組織において少数の神経細胞が無作為に染色され、それらの形態が明らかとなる。しかしながら、この方法では生きた胚中の任意の神経細胞を指定して染色したり、同一試料を使用して繰り返し染色を行い、神経細胞の接続形態を統合的に明らかにすることは不可能である。

蛍光タンパク質 GFP の発見以来、器官形成過程を生きた胚の中で非侵襲的に観察することが可能となった。しかし、特に神経回路網の解析においては、GFP のような通常の蛍光タンパク質がある組織で一様に発現させたとしても、絡み合った神経細胞群から任意の神経細胞を特異的に識別することは一般に極めて困難である。

従来法におけるこれらの難点を解消する目的で、我々は光転換蛍光タンパク質として知られる Kaede を用い、回路内の单一神経細胞を光学的に単離標識することに成功している。しかしながら Kaede の光転換は不可逆であるため、3 つ以上の神経細胞が絡まっている場合には同様の解析が困難であった。そこで我々は機能性蛍光タンパク質 Dronpa を利用する系を考案した。Dronpa はキッカサンゴ由来の蛍光タンパク質であり、発現当初は緑色蛍光を発するが、強い青色光の照射により速やかに蛍光の性質を失う。さらに、この状態から微弱な紫色光または紫外光を照射すると再び発現当初とほぼ同強度の蛍光を回復する（フォトクロミズム）。この過程は蛍光強度をほぼ維持したまま複数回繰り返すことが出来る。

本研究で実験動物として採用したゼブラフィッシュは、医学・発生生物学を始めとして複数の分野でモデル生物として研究されてきた経緯があり、数多くの知見や実験手法が蓄積している。胚が透明であり、器官形成の様子を生きたまま詳細に観察することができる。また、レーザー光が深部まで透過するため、共焦点レーザー生物学顕微鏡（以下、共焦点顕微鏡と称す）を用いた蛍光観察や機能性蛍光タンパク質の状態操作が容易であるなど数々の利点を有しており、本研究の材料として最適である。

in vivo 解析に用いる準備として、Dronpa がゼブラフィッシュ生体内で発現し、かつフォトクロミズムを示すかを検討した。受精直後の卵に *dronpa* の mRNA を顕微注入し、胞胎期および以降の時期で共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、Dronpa は胚全体で強く発現しており、488 nm および 405 nm レーザーの照射によってそれぞれ速やかに蛍光の消

失、活性化できた。胞胎期においては、蛍光の消失／再生を利用して胚表面に様々な幾何学的パターンをある時間間隔をもって繰り返し描き、その変形を逐次観察することで、細胞集団の移動、胚の形態形成を観察することが出来た。また、Prim-5 期の单一胚において後脳の菱脳節それぞれを独立して蛍光標識することが出来た。このことにより、共焦点顕微鏡を用いれば、ゼブラフィッシュの生体内で Dronpa の蛍光状態を精密に操作できることがわかった。

神経回路中の個々の細胞の形態を観察する目的で、神経細胞を中心に活性を持つ *delta* プロモータの制御下で *gal4* 遺伝子を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュ (*delta-Gal4* 系統) の受精卵に UAS プロモータ下に *dronpa* を連結したプラスミドベクターを顕微注入し、神経細胞を含む細胞群で Dronpa を発現させた。神経回路形成期において、比較的複雑な回路を選択したのち、視野内蛍光の全消去、单一神経細胞での再活性化という過程を各細胞について繰り返し、個々の細胞の位置および形態情報を独立に収集した。最後にこれらの情報を電子計算機上で統合し、神経回路を構成する個々の細胞をそれぞれ異なる色で示した画像を得た。すなわち Dronpa を用いれば、神経回路網を個々の細胞の位置情報の集合として光学的に分解出来ることを示した。

神経回路解析の一手法として、ある軸索（群）がどの細胞体に由来するかを知るために、軸索に標識物質を導入し、それらが細胞体へと拡散する様子を観察する逆行性染色法が用いられてきた。しかしこれらの方法には標識物質の物理的注入が必要（侵襲的）であること及び单一細胞レベルの特異性が得ることが難しい短所があった。そこでこの考え方をもとに、Dronpa を軸索先端部分で活性化すればそれらの細胞体への拡散によって非侵襲的・特異的な逆行性染色が可能となると考えた。UAS プロモータの制御下で *dronpa* を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュ (*UAS-dronpa* 系統) を作成し、*delta-Gal4* 系統と掛け合わせて得られた神経回路形成期の胚を実験に供した。脊髄の運動性神経細胞と介在神経細胞が混在する部分を選択し、視野内の蛍光を消去したのち、比較的大い軸索を標的として 405 nm レーザーを一定の時間間隔をもって複数回照射し、蛍光を再活性化させた。その結果、軸索部分で活性化された蛍光タンパク質が拡散によって徐々に細胞体方向に移動し、最終的に細胞体の位置及び姿が明らかとなつた。このことより Dronpa を用いた非侵襲的な逆行性染色法が可能であることが示された。

Dronpa の性質として、蛍光を消去する波長と観察に用いる波長が同一であるため、長時間にわたる経時観察においては、退色の影響が著しくなり、解像度の高いデータが得られなくなる。そこで我々は観察過程に、試料の走査に加えて適当な部位・タイミングでの再活性化を組み込むことを検討した。その結果、*dld-Gal4* 系統と *UAS-dronpa* 系統を掛け合わせて得られた胚において、Dronpa を比較的強く発現している単一神経細胞に着目し、細胞体での再活性化を行いつつ、少なくとも 15 時間の間、形態の変化（軸索の出芽と伸長）を立体

的・経時に高解像度で観察することに成功した。

ここまで実験は、普及度が高く、調整が比較的簡単な通常の共焦点顕微鏡を用いて行つてきた。しかしながら共焦点顕微鏡のレーザーは、焦点以外の光路においても相対的に弱いながら Dronpa 蛍光を再生させるエネルギーをもつ。そのため、標識したい細胞が、Dronpa を全体に発現する厚みを持った組織に存在する場合、焦点以外のレーザー光路上に存在する標的外の細胞で蛍光が再活性化してしまい、標識の特異性が失われてしまう現象が観察されていた。そこで、2 倍波長のレーザーを用いることで焦点に限局して必要なエネルギーを生み出せる二光子レーザー顕微鏡を用い、その弊害を克服することを試みた。標的細胞として *ddl-Gal4* 系統と *UAS-dronpa* 系統を掛け合わせて得られた胚の後脳、菱脳節第 4 番内部に存在するマウスナーカ細胞（単一細胞）を選択した。従来通り共焦点顕微鏡を用いて特異的再活性化を試みたところ、光路上に存在する標的外の細胞においても蛍光が活性化した。しかしながら、同一胚に対して二光子レーザー顕微鏡を用いると、焦点に存在するマウスナーカ細胞のみで蛍光を再活性化することが出来た。このことから Dronpa を発現する細胞が重層している組織であっても、二光子レーザー顕微鏡を用いれば、単細胞レベルでの精密な蛍光標識が可能であることが明かとなった。

本研究のように機能性蛍光タンパク質を神経回路の形態解析に応用した例は他に類を見ない。さらに、神経回路を非侵襲的に単一細胞レベルで解析することを世界で初めて可能とした点で、我々の研究成果は画期的である。現在では本研究の成功を受けるかたちで、*dronpa* 遺伝子改変マウスも利用可能となり、大脳皮質において同様の実験が行われている（共同研究者 八田ら 未発表データ）。哺乳類での応用が可能となったことで、本研究の成果が、行動疾患機序の神経回路 レベルでの理解およびその効果的治療法の開発などへの貢献を通して神経生物学、ひいては医療の発展に大きく寄与することが期待される。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1916 号	氏名	荒巻 真介
論文題目 Title of Dissertation	Visualizing Neurons One-by-One In Vivo: Optical Dissection and Reconstruction of Neural Networks With Reversible Fluorescent Proteins 单一神経細胞の生体内での可視化：可逆的蛍光タンパク質を 用いた神経回路網の光学的分解および再構築		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 寺島俊介 副査 Vice-Examiner 片岡 徹 副査 Vice-Examiner 角 康博		
審査終了日	平成 20 年 2 月 20 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

神経回路網の形態と機能には強い関連性が見られることが多い。ゆえに、神経回路網中の神経細胞の形態および位置関係を单一細胞レベルで理解出来れば、機能推定やモデリングにおいて極めて有益である。神経細胞の形態を解析する手法として、古くから Golgi 染色法が用いられ神経生物学の発展に多大な寄与をしてきたが、この方法では生きた胚の中の任意の神経細胞を指定して染色したり、同一試料を使用して繰り返し染色を行い、神経細胞の接続形態を統合的に明らかにすることは不可能である。従来法におけるこれらの難点を解消する目的で、我々は機能性蛍光タンパク質 Dronpa を利用する系を考案した。Dronpa は発現当初は緑色蛍光を発するが、強い青色光の照射により速やかに蛍光の性質を失う。さらに、この状態から微弱な紫色光または紫外光を照射すると再び発現当初とほぼ同強度の蛍光を回復する（フォトクロミズム）。この過程は蛍光強度をほぼ維持したまま複数回繰り返すことが出来る。

Dronpa がゼブラフィッシュ生体内で発現し、かつフォトクロミズムを示すかを検討した。受精直後の卵に *dronpa* の mRNA を顕微注入した結果、Dronpa は胚全体で強く発現し、488 nm および 405 nm レーザーの照射によってそれぞれ速やかに蛍光の消失、活性化出来た。神経回路中の個々の細胞の形態を観察する目的で、神経細胞を中心に活性を持つプロモータの制御下で Dronpa を発現させた。比較的複雑な回路を選択したのち、視野内蛍光の全消去、单一神経細胞での再活性化という過程を各細胞について繰り返すことで、神経回路を構成する個々の細胞の位置および形態情報を独立に収集することが出来た。神経回路解析の一手法として、ある軸索（群）がどの細胞体（群）に由来するかを知るために、軸索に標識物質を導入し、それらが細胞体へと拡散する様子を観察する逆行性染色法が用いられてきた。これらの方法には標識物質の物理的注入が必要（侵襲的）であること及び单一細胞レベルの特異性が得ることが難しい短所があった。そこでこの考え方をもとに、Dronpa を軸索先端部分で活性化すればそれらの細胞体への拡散によって非侵襲的・特異的な逆行性染色が可能となると考えた。Dronpa を発現している細胞が混在する脊髄の一部分を選択し、視野内の蛍光を消去したのち、比較的太い軸索を標的として 405 nm レーザを一定の時間間隔をもって複数回照射し、蛍光を再活性化させた。その結果、軸索部分で活性化された蛍光タンパク質が拡散によって細胞体方向に移動し、細胞体の位置及び姿が明らかにすることが出来た。

Dronpa の性質として、蛍光を消去する波長と観察に用いる波長が同一であるため、長時間にわたる経時観察においては、退色の影響が著しくなり、解像度の高いデータが得られ

なくなる。そこで我々は観察過程に、試料の走査に加えて適当な部位・タイミングでの再活性化を組み込み、少なくとも 15 時間の間、形態の変化（軸索の出芽と伸長）を立体的・経時的に高解像度で観察することに成功した。

ここまで実験は、普及度が高く、調整が比較的簡単な通常の共焦点顕微鏡を用いて行ってきた。しかしながら共焦点顕微鏡のレーザーは、焦点以外の光路においても相対的に弱いながら Dronpa 蛍光を再生させるエネルギーをもつ。そのため、標識したい細胞が、Dronpa を全体に発現する厚みを持った組織に存在する場合、焦点以外のレーザー光路上に存在する標的外の細胞で蛍光が再活性化してしまい、標識の特異性が失われてしまう現象が観察されていた。そこで、2 倍波長のレーザーを用いることで焦点に限局して必要なエネルギーを生み出せる二光子レーザー顕微鏡を用い、その弊害を克服することを試みた。標的細胞としてゼブラフィッシュ後脳、菱脳節第 4 番内部に存在するマウスナーメ細胞（単一細胞）を選択した。従来通り共焦点顕微鏡を用いて特異的再活性化を試みたところ、光路上に存在する標的外の細胞においても蛍光が活性化した。しかしながら、同一胚に対して二光子レーザー顕微鏡を用いると、焦点に存在するマウスナーメ細胞のみで蛍光を再活性化させることが出来た。

本研究のように機能性蛍光タンパク質を神経回路の形態解析に応用した例は他に類を見ない。さらに、神経回路を非侵襲的に单一細胞レベルで解析することを世界で初めて可能とした点で、我々の研究成果は画期的である。本研究の成果が、個体の行動機序の神経回路レベルでの理解などへの貢献を通して神経生物学、ひいては医療の発展に大きく寄与することが期待される。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。