

2021 年度
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	日置 寛之
研究機関名	順天堂大学
所属部署名	大学院医学研究科
役職名	教授
研究課題名	シナプス構築から探る大脳新皮質の構造原理
研究実施期間	2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日

研究成果の概要

本研究課題は、大脳新皮質の神経回路演算メカニズム解明を目指して、錐体細胞への各種シナプス入力様式と各種受容体の分布を解析する。また、広汎な皮質領域に投射して皮質神経細胞の活動性を制御する神経修飾物質にも注目し、軸索投射様式の解析を行う。令和 3 年度は以下の課題に取り組んだ。

(1) 単一もしくは少数の神経細胞を明瞭に標識

TetOff システムを介したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター二重感染法を開発して、少数の神経細胞のみにレポータータンパクを高発現させることに成功した。また、蛍光タンパクにシグナル配列を付加して、神経突起（樹状突起と軸索）を明瞭に標識することにも成功した。今後は実験効率の向上を目的として、神経細胞の多色標識や軸索線維の蛍光シグナル増強法を開発していく。

(2) 三次元免疫組織化学法の開発

AbSca/e 法 (Hama, Hioki et al., 2015) のプロトコールを改変して、1 mm 厚のスライス標本においてシナプス関連分子を免疫蛍光染色する手法の開発を進めた。抗体の浸透性向上を目指して、インキュベーション時間を 1～2 週間に延ばすと多くの抗体で浸透性が向上したが、幾つかの抗体ではあまり効果がなかった。バッファー溶液の組成変更を引き続き検討すると同時に、スライス標本の厚みも考慮していく（以下参照）。

(3) 透明化技術を用いた三次元再構築法の開発

電子顕微鏡観察にも適した組織透明化技術「Sca/eSF 法」を開発し (Furuta, Yamauchi et al., 2022)、軸索投射を捉える広範囲撮影法と、シナプス入力部位を捉える高解像撮影法の確立を進めた。高解像度で撮影を行う場合は対物レンズの作動距離が短くなるため、観察対象の厚みが 150～200 μm 程度に限定されてしまう。上記 (2) と合わせて、本研究課題にとって最適なスライス標本の厚みを決定していく。