

平成 14 年度日米科学技術協力事業「脳研究」分野共同研究者派遣実施報告書

所属機関・職名・氏名：徳島大学医学部・助教授・樋田 一 徳

研究課題：嗅球系状体：細胞性神経回路機能の微細構造的基礎

米国側研究機関・共同研究者：メリーランド大学医学部・Michael T. Shipley 教授

派遣期間：

平成14年 7月18日～平成14年 9月13日

研究の概要：

別紙記載

～研究の概要～

1 滞在の概要：

7月18日、関西国際空港より出国し、現地時間で同日にサンフランシスコ国際空港にて米国に入国し、同空港を経由後、同日シアトル国際空港に到着した。シアトルにおいて翌19日、付加用務として日米合同組織細胞化学会議のミニシンポジウムに出席口演し、神経内分泌の専門家との討論を行なった。

翌20日早朝、シアトル国際空港を出発し、途中デンバー国際空港を経由し同日夜刻にボルチモア・ワシントン国際空港に到着した。空港では受入先ホストの Michael T. Shipley 教授自らの出迎えを受け、同日よりボルチモアでの滞在が始まった。

7月20日より9月12日まで、ボルチモアのメリーランド大学医学部 Department of Anatomy and Neurobiology において共同研究及びセミナーを実施した。（後述）

約1ヶ月半の共同研究を終えて、ボルチモア・ワシントン国際空港を9月12日早朝発ち、途中サンフランシスコ国際空港を経由して米国を同日出国し、翌13日夕刻に関西国際空港に到着、帰国した。

本共同研究実施中、病気やケガもなく、また治安の悪い場所にも関わらず事故や事件にも一切巻き込まれず、公私共に全く問題のなかったことは何よりも幸いであった。

2 研究の目的と実施計画：

到着直後の週明け7月22日に、受入先ホストの Michael T. Shipley 主任教授と同教授のラボのスタッフ Dr. Adam Puche, Dr. Abdallah Hayar, Dr. Sergei Karnup（共に Assistant Professor）を交えて、滞米2ヶ月間の共同研究、および今後の継続的な国際共同研究の為の様々な環境作りを目的とした実効性のある現実的かつ具体的な実験計画を討論した。

本研究の目的は、電気生理学的特性と形態的特徴を同定した嗅球ニューロンを電子顕微鏡によりそのシナプス結合を定性的・定量的に同定することである。更に我々が過去10年間一貫して遂行してきた、免疫細胞化学法により化学的性質を同定した嗅球ニューロンのシナプス結合との対比を試みることも目的としている。

これらの目的を達成するために、まず、同研究室が日常的に行なっている生理学的実験を行なったサンプルの微細構造を電子顕微鏡により解析すること、そしてシナプス結合をより確実に同定できるようにサンプル作りの条件設定を行なうべく具体的な実験計画を策定し、毎週大小規模のミーティングを行い、実験結果を全員で検討することとした。具体的には、Dr. Abdallah Hayar と Dr. Sergei Karnup が嗅球スライスを経理学的に解析後、Dr. Adam Puche と私が共焦点レーザー顕微鏡により、また Dr. Sergei Karnup が Neuro Lucida でニューロンの三次元的構造を解析した後、私が電子顕微鏡観察用のサンプル作りを行なうといった共同実験計画を立てた。

3 共同研究実施の概要と成果：

まず、同研究室が通常行なっている方法で作成されたサンプルの微細構造を電子顕微鏡により検証することから共同実験を開始した。同研究室では厚さ400ミクロンの新鮮な嗅球スライス内ニューロンをパッチクランプ法で電気生理学的に記録し、記録したニューロンをバイオサイチンで標識した後、このスライスを更に50～100ミクロンに再スライスし、そのサンプルをABC-DAB法により発色可視化して最終的にエポン包埋している。そして包埋後に Neuro Lucida によって三次元的全体像を記録したニューロンを、シナプス結合を中心とした微細構造について電子顕微鏡で観察を行なった。その結果、スライス表面及び標識ニューロンの細胞体の微細構造の変性の程度が大きいものの表面より20ミクロンより深いところでは微細構造が比較的良好に保持され、少なくとも標識ニューロンを含めた各種ニューロンのシナプス結合の同定が可能であることを確認した。

しかしながら DAB 法では標識ニューロンの小胞をはじめとするシナプス前部の微細構造が壊れやすい。この為、DAB 発色をせずに Streptavidin-FluoroNanogold により蛍光染色をし、共焦点レーザー顕微鏡にて記録後に銀増感を施す方法で作成したサンプルを電子顕微鏡にて解析を行なった。20～30 nm 程に増感された金コロイド粒子は電子顕微鏡下で容易に同定が可能である。一方でこの方法は銀増感の浸透度が悪い為、表面から三次元的に追跡する必要がある。

以上の2つの異なる方法を基本として、固定液の選択や反応条件など様々な条件設定を行ないながら、匂い識別機構に関わる嗅球介在ニューロンのうち、生理学的特性を同定した糸球体近傍介在ニューロン

群 (External Tufted Cell, Short-Axon Cell, Periglomerular Cell) の主に糸球体内樹状突起シナプス結合の同定を行なった。その結果、少なくとも External Tufted Cell には嗅受容細胞終末からの高頻度のシナプス結合が認められたこと、異なる糸球体に軸索を投射する Short-Axon Cell には嗅受容細胞終末からの直接のシナプス結合はほとんど見られないこと、一方 Periglomerular Cell は嗅受容細胞終末からの直接のシナプス結合の頻度の高いものと低いものがあるなど、シナプス結合の多様性を初めて明らかにした。これらについては現在も更に詳細な解析を進めている。

嗅覚情報処理に関する神経回路を構成するニューロンの構造 (形態学) と機能 (生理学) を結びつけるためには、ニューロン間のコミュニケーションの場であるシナプス結合をいかに正確に同定するかが重要である。頻繁な討論と密接な共同実験を通じて、互いに異なる技術的背景を有する研究者が直接共同研究することの重要性を今回改めて認識した次第である。

このような共同研究の意義と今後の方向性、そして嗅覚研究における本共同研究の位置づけについて、今回得られた結果の一部を含めて、来年出版予定の Journal of Comparative Neurology の invited Review Article として、Michael T. Shipley 教授との連名で発表する予定である。

4 今後の共同研究計画：

今回、多くの実験と試行錯誤を繰り返した結果、電気生理学と電子顕微鏡を組み合わせた統合的解析のためのサンプル作りについて、より適切な条件を設定できた。そして今後も相互理解に基づく国際間での共同研究を継続遂行する為、より確実に再現性の高いサンプルの相互間送付のシステムも確立することができた。更にインターネットを利用したデータ及び情報交換とネット会議を通じてリアルタイムで密接な討論を進めることも可能となった。

これにより今後も国際間での密接な共同研究の継続が可能となり、腰を据えた、より質の高いレベルの研究成果をめざして、現在も双方で解析を進めている。

また、両大学間での特に大学院生・ポスドクレベルの若手研究者の交流の重要性を認識し、今後も双方でその可能性を発展させるべく努力している。

5 付記1： ～メリーランド大学医学部における講演～

現地時間7月30日午後3時よりメリーランド大学医学部 Health Science Facility ビルのカンファレンスルームに於て「Special Neurobiology Seminar; Synaptic Organization Constructed by Chemically-Defined Neurons in the Olfactory Bulb」と題する講演を行なった。本セミナーは報告者のこれまでの研究概要を紹介し、今回の共同研究実施の為に相互の理解を深めることを目的としたものである。

1時間の講演に引き続いて、30分ほど活発な質疑応答がなされた。質問の多くは電気生理学者からの、特定な化学物質を内在するニューロンが形成するシナプス結合に関するものであった。特に嗅球を構成するニューロンの数と全体の細胞の中に占める比率、そしてこれらニューロンが形成する多様かつ特徴的なシナプス結合についての定量的データに関して、具体的な数字を挙げて活発な討論を行なった。

6 付記2： ～今般の共同研究を通じての感想～

コンピューターをはじめとする高度な科学技術により、分子・遺伝子レベルから行動レベルまで急速に進歩している脳研究の中で、形態学、特にシナプス結合を直接同定できる電子顕微鏡の応用の可能性がますます広がり、脳科学における必要性がますます高まっていることを実感した。これは最近数年の米国および日本の神経科学会議においても感じていたことでもある。一方で、電子顕微鏡技術を習得する研究者の数は世界的に見ても年々急速に減少し、今や絶滅を危惧されるとも言われている。このような現状を鑑み、脳研究領域における統合的解析のために、自身の研究のみならず後進の研究者の指導にも生かしていくべきと感じた次第である。

今般の共同研究を通じて、米国の研究の現状を直接肌で触れることができ、日本のシステムとの大きな差異を認識した。より現実的に運営されている米国の研究システムの良き点を、必要に応じて日本の研究システムに早急に導入すべきである。また、次世代を担う大学院生・ポスドクの教育・トレーニングを最重要視し、基礎科学にも深い理解と多大なサポートを行なう米国の姿勢こそ、欧米のシステムを参考にしたとする「効率性を重視した改革」を進める最近の日本の研究機関は見習うべきである、と痛感した次第である。

今般の共同研究実施により、研究内容のみならず、日米間の研究者同士の理解と友情が深まったことは得がたい経験であり、改めて日米科学協力事業に対し深甚なる謝意を表する次第である。