

顕微鏡との関わりを振り返って

渡辺 雅彦

北海道大学大学院医学研究院解剖発生学教室 特任教授



学部学生の頃から解剖学教室に通い、そのまま大学院に進学し解剖学研究の道に進んだ。もうすぐ解剖学の教育研究から離れる者として、これまでの顕微鏡との関わりについて振り返ってみたい。

学生時代は、研究用の顕微鏡といえば電子顕微鏡をイメージしていた。一方、光学顕微鏡は、電子顕微鏡

観察のための、レジン包埋組織の面出し確認とトリミングのための前座的な装置程度にとらえていた。その認識が大きく変わったのが、1990年代の中頃に北大13条門近くのホテルの会議室で開催された、バイオラッド社製共焦点レーザー顕微鏡のデモである。

マウス胎児の脊髄横断切片をマウントしたスライドグラスをデモ会場に持ち込み、その切片にはクローニングされて間もないグリブ型グルタミン酸輸送体 GLAST と GLT-1 に対する抗体を用いて二重蛍光抗体染色を施していた、デモ担当の企業研究者に、低倍率の脊髄全体像から油浸レンズを使った高倍率画像を取得してもらった。ハレーションが強い従来の蛍光顕微鏡画像とは異なり、モニター画面の上から下に現れる走査画像を見て、その解像度の高さで得られる結論の明快さに驚いた。その時取得した画像を MO ディスクに保存して持ち帰り、論文のデータの1つに加えて投稿した (Yamada et al., J Neurosci, 18: 5706-5713, 1998 : 図4がその写真)。この共焦点レーザー顕微鏡画像は、成体では星状膠細胞に選択的な2つの輸送体が、胎児期では GLAST が神経幹細胞である放射状グリブに、GLT-1 はニューロンの成長軸索に、別々に発現していることを如実に示した。この論文以降、私の研究室での組織化学研究は、まず結論の大半を光学顕微鏡データで固めた上で、電子顕微鏡でその確認と押さえとして使うようになった。

バイオラッド MRC1024 に代表される初期の共焦点レーザー顕微鏡の最大の難点は、2つのレーザービームを同時に照射するために生じる「カブリ」、英語では shine-through, bleed-through, と呼ばれる問題であった。検出対象とする複数の分子の発現量が大きく違っていたり、使用する抗体の力価に大きな違いがあると、一方のレーザー光により生じる強い蛍光シグナルが、他方の検出器にも捉えられてしまう。こ

のカブリに気づかないでいると、緑と赤の疑似カラーが融合して一様に黄色になる偽共陽性シグナルが得られ、それを無邪気に発表してしまう研究もよく目についた。しかし、そのようなカブリ問題も、複数のレーザービームを交互に照射するシーケンシャルモードの開発や、蛍光物質の蛍光波長特性に応じてテールカットする画像処理の進歩により克服された。さらに、様々な蛍光タンパク質や蛍光物質が利用可能となり、遺伝子工学による蛍光タンパク質の改良も進み、新規の蛍光プローブや蛍光センサーが次々と開発された。また、従来の光学顕微鏡が持つ回折限界を超えた分解能を有する超解像顕微鏡も登場し、今や光学顕微鏡によるバイオイメージング技術は、生命科学の王道になっている。

このような日進月歩の蛍光イメージングの中で、私の研究室で細々と続けてきたもう一つの顕微鏡解析法が、標識された登上線維の連続電子顕微鏡解析である。これは、脳幹下オリブ核から投射する登上線維を順行性トレーサーで標識し、それが支配する小脳プルキンエ細胞の細胞体と樹状突起を千数百枚の連続電子顕微鏡切片を作成し、透過型電子顕微鏡写真を撮影し、それから神経回路を再構築する手法である。このような泥臭い方法をやることになったキッカケは、東京大学の三品研で作成され Cell 誌に報告された GluD2 ノックアウトマウスとの出会いであった (Kashiwabuchi et al., Cell, 81: 245-252, 1995)。このマウスでは平行線維シナプス形成が障害され、登上線維による多重支配が残存するのだが、この両者の表現型がどのようにリンクしているのかをどうしても知りたかったのである。この解析を通して、GluD2 遺伝子が欠損すると、この分子が局在している遠位樹状突起の平行線維シナプス数が半減し、樹状突起上にはシナプス結合を持たないフリースパインが多数出現する。このフリースパインを目掛けて、本来は近位樹状突起にとどまっている登上線維支配が遠位に拡大し、この異所性支配が周囲のプルキンエ細胞にも及ぶことにより、多重支配が生じることを解明することができた (Ichikawa et al., J Neurosci, 22: 8487-9503, 2002)。

現在、走査型電子顕微鏡 (SEM) を中心に、電子顕微鏡解析法も大きな進化を遂げている。注目すべきは、収束イオンビーム SEM、連続ブロック面 SEM、連続切片 SEM など、組織ブロックや切片の表面画像を連続して自動的に撮影して立体再構築を効率的に行う技術で、そのデータ解析処理法の高度化とともに進化を続けている。このような SEM がもっと早く開発普及していれば…というような残念な気持ちはないわけではないが、当時のワクワク感を今でも懐かしく楽しんでいる。

渡辺雅彦 (Masahiko Watanabe)

- 1984年 東北大学医学部卒業
- 1988年 筑波大学大学院医学研究科博士課程修了 (医学博士)
- 1988年 金沢大学医学部解剖学第1講座 助手
- 1990年 東北大学医学部解剖学第2講座 助手
- 1992年 北海道大学医学部解剖学第1講座 助教授
- 1998年 北海道大学医学部解剖学第2講座 教授
- 2023年 北海道大学大学院医学研究院解剖学分野 特任教授, 現在に至る