

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(A)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18680034  
 研究課題名（和文） 小脳における感覚情報統合のインビボホールセル記録と  
 2光子イメージングによる解析  
 研究課題名（英文） Integration of sensory information in the cerebellum  
 revealed by *in vivo* whole-cell recordings and two-photon imaging.  
 研究代表者  
 喜多村 和郎 (KITAMURA KAZUO)  
 東京大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：60423159

研究成果の概要：動物個体の小脳において、単一プルキンエ細胞が行う感覚シナプス入力統合メカニズムを明らかにする目的で、2光子イメージングとホールセル記録の同時計測系の開発を行った。2光子イメージングにより個体脳内の単一ニューロンを可視化し、選択的にホールセル記録をおこなう方法を新規に考案、実現し、従来法と比較して格段に実験効率を向上させることに成功した。さらに、覚醒動物におけるホールセル記録法の開発にも成功し、小脳プルキンエ細胞の感覚情報統合を定量的に解析する道を開いた。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 11,100,000 | 3,330,000 | 14,430,000 |
| 2007年度 | 7,300,000  | 2,190,000 | 9,490,000  |
| 2008年度 | 4,500,000  | 1,350,000 | 5,850,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 22,900,000 | 6,870,000 | 29,770,000 |

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学 / 神経・筋肉生理学

キーワード：2光子励起顕微鏡、パッチクランプ法、プルキンエ細胞、シナプス統合

## 1. 研究開始当初の背景

生きた動物の脳においては、外界から同時入力されてくる多数の感覚情報が神経細胞ネットワークにより並列および逐次処理され、最終的に運動出力などとして出力される。脳内におけるこの一連の情報処理メカニズムを理解するためには、まず、その基本構成要素である単一神経細胞が、生きた脳内でどのような感覚情報処理を行っているかを明らかにすることが重要である。すなわち、脳内において単一神経細胞が受ける 1000～100,000 のシナプス入力細胞内でどのよう

に処理・統合され、活動電位として出力されるかという問題は、脳神経科学における最重要課題の一つであると言える。

単一神経細胞におけるシナプス情報統合については、主にスライス標本を用いた実験によって解析がなされて来た。スライス標本を用いた実験では、刺激電極や記録電極の位置をシステムティックに配置する事が可能で、またイメージングなどと組み合わせることで、詳細な解析が可能である一方、それらの刺激が生理的にどのような意味があるのか、すなわち、実際の動物におけるどのよう

な感覚入力に対応しているのかについては、憶測の域を出ない。また、それまで行われていた、個体脳内の2光子イメージングを用いた研究でも、個々の感覚入力を直接可視化した例はなかった。従って、本研究では、生きた脳内の単一神経細胞における感覚入力を直接可視化する技術を開発することを目指した。

これによって、単一神経細胞にどのようなパターンで感覚情報が入力しているのかということをはじめとして、感覚刺激によるシナプス入力間の相互作用やそれらが出力に与える影響について明らかになることが予想される。これまでのスライス標本を用いた *in vitro* の研究と細胞外記録など *in vivo* の研究では、答えられなかった問いに直接回答を与えるものであり、両者の間をつなぐという意味でも大変意義深いものであると考えられる。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を鑑み、本研究では、*in vivo* ホールセル記録と2光子励起カルシウムイメージングを同時に用いることで、生きた動物の脳内における単一神経細胞のシナプス統合メカニズムを明らかにする事を目的とした。具体的には小脳皮質をモデル系として、プルキンエ細胞における感覚情報処理機構について解析を行った。小脳皮質における体性感覚マップ（感覚器からの入力マップ）は、大脳皮質の体性感覚野と異なり、皮質上でパッチ状に断片的に分布している。すなわち、一つのプルキンエ細胞は異なる感覚モダリティからの入力を統合していると考えられ、小脳は単一細胞のシナプス統合メカニズムを解析する上で非常に適したモデルである。

ラットやマウスに異なる感覚刺激（例えば、同側と対側のひげ刺激、皮膚刺激とひげ刺激など）を与えた場合に、これらがどのようなパターンで一つの細胞に入力するのかを2光子イメージングで可視化し、どのような処理、統合をされたのち出力されるのかを明らかにすることが本研究の最終目的である。

## 3. 研究の方法

麻酔下のマウスおよびラットにおいて、頭蓋骨を金属製の固定板で動物固定台にした後、開頭手術を行い、小脳半球（CrusII）を露出させる。蛍光ラベルをしていないニューロンを2光子励起顕微鏡下で可視化し、プルキンエ細胞から選択的にホールセルパッチクランプ記録を行う（詳細は4.研究成果を参照）。記録電極の内液にカルシウム感受性色素を含め、プルキンエ細胞の活動をパッチクラ

ンプ記録と同時にカルシウム変化として捉える。ホールセル記録中に、動物の皮膚に空気刺激を行うことで、プルキンエ細胞の体性感覚入力に対する反応を計測する。

## 4. 研究成果

(1) 蛍光標識を必要としない単一ニューロンの可視化とシャドウパッチング法

2光子励起顕微鏡法は、レーザー走査顕微鏡法の一つであり、蛍光顕微鏡に分類される。従って、2光子励起顕微鏡を用いて脳内のニューロンを可視化するためには、観察したいニューロンの中に、あらかじめ蛍光タンパク質や蛍光物質を何らかの方法で導入するというのが一般的な常識である。ところが、我々は、脳内の細胞外領域に細胞内に取り込まれることのない蛍光色素（例えば Alexa dye など）を注入することで、2光子励起顕微鏡によりニューロンの「影」を観察することが可能であることを発見した（図1）。通常、パッチクランプ記録を行う際には、記録電極に陽圧をかけておく必要があるため、このとき電極内液に蛍光色素を含めておくだけで、特に前もって色素を注入しておかなくても十分にニューロンを可視化することができる。この方法では、ただ単に細胞外領域に蛍光色素を入れるだけであり、あらかじめニューロン内に蛍光分子を導入する必要が全くなく、「蛍光顕微鏡では、観察対象を光らせなければ観察できない」という、固定観念とは全く逆の発想により、極めて簡便な方法で脳内の単一ニューロンを可視化することを可能にしたのである。

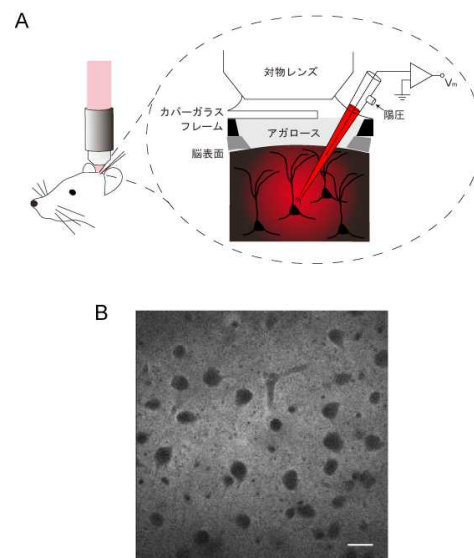


図1. 標識されていないニューロンを動物個体脳内で可視化する。A. 実験概略。B. 「影」観察法で可視化されたマウス個体内のニューロン。

ニューロンの「影」を観察することにより、ニューロンの種類を同定することができる

ことも明らかとなった(図2)。まず、記録をしたいニューロンが存在する脳部位の大まかな位置に電極を刺入する(大脳皮質第2/3層であれば脳表面から200-300  $\mu\text{m}$ 、小脳プルキンエ細胞層は150-200  $\mu\text{m}$ など)。次に、ニューロンの「影」を観察し、細胞体の大きさや形から細胞種を同定する。大脳皮質錐体細胞や小脳プルキンエ細胞などの投射ニューロンの細胞体は直径20  $\mu\text{m}$ 程度であり、抑制性の介在ニューロンは直径10  $\mu\text{m}$ の小型のものが多い。また、大型の投射ニューロンは細胞体付近では太い樹状突起を持つため、さらに正確な同定が可能である。小脳皮質における細胞種(プルキンエ細胞、介在ニューロン)の同定率は100%であり、大脳皮質においては、錐体細胞(87%)、介在ニューロン(56%)であった。これらの値は、脳スライス標本を近赤外微分干渉顕微鏡法で観察した場合とほぼ同様の同定率である。

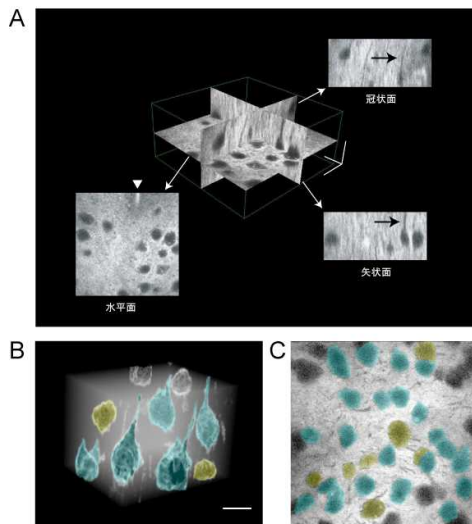


図2. 個体脳内におけるニューロンの可視化と同定。(A)マウス大脳皮質における「影」観察の三次元再構成像。矢じりは記録電極。ニューロンおよび電極先端を同時に可視化することができる。矢状面や冠状面において、錐体細胞の樹状突起が可視化できる(矢印)。(B)細胞種の同定。細胞体の大きさや形、脳表面方向に伸びる太い樹状突起の有無によって、興奮性の錐体細胞(青)か、抑制性の介在ニューロン(黄)かを区別する。(C)一視野の中で同定された細胞の種類。スケールバーは全て20  $\mu\text{m}$ 。

以上のように、脳の細胞外領域に蛍光分子を入れることで、ニューロンの「影」を観察し、そのニューロンを同定することが可能であることがわかった。一方、記録電極は内液の蛍光色素で可視化できるので、目的のニューロンの「影」に記録電極を近づけてパッチクランプ記録を行うことが可能になった。ギガオームシールの形成過程を可視化することが安定で良い記録を行うために重要で

あることが、脳スライス標本におけるホールセルパッチクランプ記録において分かっている。すなわち、ニューロンに対する記録電極の位置や、ギガオームシールを形成するための陰圧をかけるタイミングを最適化することが安定な記録を得るために必要なのである。我々が開発した方法(シャドウパッチング法)では、脳スライス標本で行われている方法を、動物個体の脳内で行うことを可能にしたという点で画期的な方法である。

シャドウパッチング法を用いて、大脳皮質第2/3層の錐体細胞(図4A)や小脳プルキンエ細胞(図4B)などの投射ニューロンだけでなく、小型の介在ニューロン(図4C, D)からも選択的にホールセルパッチクランプ記録を行うことが可能であることが示された。「影」観察による細胞種の同定は、記録したニューロンの電気生理学的性質や形態の2光子励起観察によって確認された。「影」観察時に必要な細胞外の蛍光分子は、記録中に拡散してなくなるため、記録後は記録電極から細胞内に入った蛍光分子により、ニューロンの形態を高いコントラストで観察することが可能である。「影」観察の条件(2光子励起レーザーや電極にかかる圧力など)を最適化することで、ホールセルパッチクランプ記録を70%以上の成功率で行うことが可能となった。また、記録の良し悪しの指標である、アクセス抵抗(低いほど電極による電圧降下が少ない)は20 M未満であり、脳スライス標本での記録と同程度の良い記録をとることができる。記録は多くの場合30分以上行うことが可能で、2時間以上に渡って記録を維持することも難しくはない。これらの改善された記録条件は、シャドウパッチ法によるギガオームシール形成の最適化および記録電極位置の精密なコントロールによってもたらされたものである。

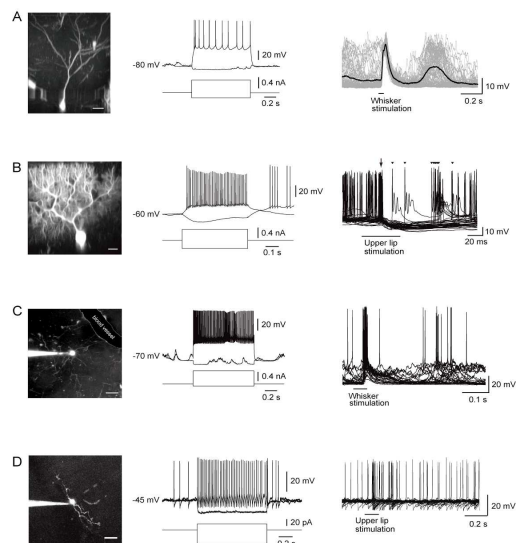


図4 . マウス個体脳における大脳皮質、小脳皮質ニューロンのシャドウパッチング

(左) 細胞形態の2光子励起顕微鏡による観察。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ 。(中央) 電流注入による活動電位の発生。(右) 感覚刺激(髭への空気吹き付け刺激)によるニューロンの応答。(A) 大脳皮質第2/3層錐体細胞。(B) 小脳プルキンエ細胞。(C) 大脳皮質第2/3層介在ニューロン。(D) 小脳介在ニューロン。

#### (2) 覚醒個体脳内における単一ニューロンからの選択的ホールセル記録

従来、動物個体におけるホールセル記録や2光子励起イメージングによる単一ニューロンの機能解析は主に麻酔下の動物において研究が行われてきたが、麻酔薬が中枢神経系に与える影響を無視することはできず、それゆえ用いる麻酔薬の種類によって得られる結果に矛盾が生じることもしばしば見受けられる。しかしながら、無麻酔覚醒時の動物において、これらの解析を行うことは従来の方法(ブラインド法)では非常に困難で、成功例は世界的に見てもごくまれである。本研究で開発した、シャドウパッチング法により麻酔下の動物においては、飛躍的に実験効率が向上したことから、この方法を覚醒動物に用いることによって、無麻酔の状態でもホールセル記録を安定して行うことができると期待された。実際に、無麻酔の動物においてホールセル記録を行った例を図5に示す。麻酔下と比較すると若干実験効率は劣るものの、約50%の成功率で無麻酔のマウスにおいてホールセル記録を行うことが可能となった。

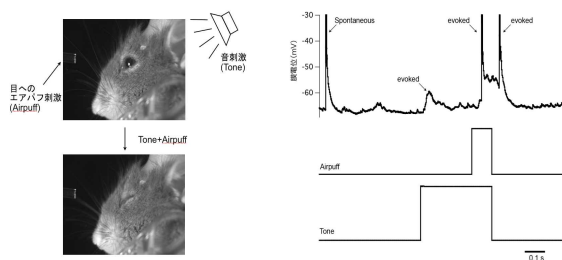


図5 . 覚醒マウスにおける音刺激および眼への刺激に対する、マウスの反応(左)と小脳プルキンエ細胞の応答(右)。刺激に対応した動物の反応(瞬き)をビデオカメラでモニターし、プルキンエ細胞の応答をホールセル記録(右)により測定する。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Kitamura, K., Judkewitz, B., Kano, M., Denk, W. & Häusser, M.: Targeted patch-clamp

recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat. Methods*, 5, 61-67 (2008). 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 喜多村和郎: 動物個体脳における神経活動の多光子励起顕微鏡による観察. 光・量子デバイス研究会, 2009.2.13 (和光)

(2) Y. Kawamura, H. Nakayama, K. Kitamura, M. Kano: Developmental changes in climbing fiber responses of cerebellar Purkinje cells revealed by whole-cell patch-clamp recordings in vivo. *Neuroscience* 2008, 2008.11.18 (ワシントン DC)

(3) 喜多村和郎, 橋爪幹, 狩野方伸: 小脳皮質における登上線維微小帯域の in vivo 2光子イメージングによる解析. 生理学研究所研究会「細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性」, 2008.10.2.(岡崎)

(4) 喜多村和郎: 2光子イメージングを用いた個体脳単一ニューロンからの選択的記録法とその可能性. 第31回日本神経科学大会シンポジウム, 2008.7.11.(東京)

(5) 河村吉信, 中山寿子, 喜多村和郎, 狩野方伸: 発達期小脳プルキンエ細胞の in vivo パッチクランプ法による解析. 第31回日本神経科学大会 2008.7.9 (東京)

(6) Kitamura, K.: Targeted whole-cell recordings from unlabeled neurons in vivo. NIPS-JST 国際研究集会「神経科学における非線形イメージングと蛍光バイオセンサーの最前線」, 2008.4.18.(岡崎)

(7) 喜多村和郎: 単一ニューロンにおけるシナプス統合の in vivo パッチクランプと2光子イメージングによる解析. 「統合脳」ワークショップ「樹状突起・スパイン」, 2007.8.22.(札幌)

(8) 喜多村和郎: 新しい in vivo 可視化パッチクランプ法の開発とその応用. 第84回日本生理学会大会シンポジウム, 2007.3.21.(大阪)

(9) 喜多村和郎: 生体内における神経活動の2光子励起イメージング. 生理学研究所研究会「シナプス可塑性の分子的基盤」, 2006.6.28.(岡崎)

(10) K. Kitamura, W. Denk, M. Häusser: Targeted patch-clamp recordings from unlabeled

neurons in the mammalian brain. Neuroscience  
2006, 2006.10.15 (アトランタ)

(11) 喜多村和郎: Targeted patch-clamp  
recording from unlabelled neurons in vivo. 第2  
9回日本神経科学学会 2006.7.21 (横浜)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 喜多村和郎: 2光子励起顕微鏡法を使っ  
た単一ニューロンの機能計測. バイオインダ  
ストリー, Vol. 26, No. 2, 47-55 (2009).

(2) 喜多村和郎: in vivo における神経活動  
の2光子励起観察法. 実験医学増刊, Vol.26,  
No.12, 157-164 (2008).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA KAZUO)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 60423159

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし