

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14313

研究課題名(和文) 覚醒マウス脳深部からの細胞種特異的パッチクランプ記録法の確立

研究課題名(英文) Cell-type-specific patch-clamp recordings from deep brain of awake behaving mice

研究代表者

山下 貴之 (Yamashita, Takayuki)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：40466321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物行動の基盤となる神経回路の動作原理を解明するためには、行動中の動物において細胞種ごとに電気活動を高時間分解能で明らかにしていくことが必須である。本研究では、覚醒状態のマウスにおける細胞種特異的なパッチクランプ記録法の応用拡大を目的として、光遺伝学的手法や連合学習課題との組み合わせを検討し、実験系の確立を行った。その結果、大脳皮質一次体性感覚野での軸索投射先を同定した活動電位記録や連合学習課題を遂行中のマウスからの細胞種特異的な膜電位記録を行うことに成功し、マウスの頬にあるヒゲ(洞毛)の触覚情報処理機構の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：To understand the neuronal mechanisms underlying animal behavior, it is essential to perform electrophysiological measurements of membrane potential dynamics of neurons in awake behaving animals with a high temporal resolution in a cell-type specific manner. In this study I verified technical feasibility of cell-type (or projection-target) specific patch-clamp recordings combined with optogenetics using task-performing mice. I successfully recorded membrane potentials of specific cell-types in multiple layers of primary somatosensory cortex of mice exhibiting spontaneous behavior or performing a simple learning task and addressed important questions on neuronal processing of whisker-related tactile information.

研究分野：神経生理学

キーワード：パッチクランプ 大脳皮質 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳は、マーカー遺伝子の発現や軸索投射先によって同定される様々な細胞種が混在して機能を発揮している。したがって、動物行動の基盤となる神経回路の動作原理を解明するためには、行動中の動物において、細胞種ごとに電気活動を高時間分解能で明らかにしていくことが必須である。このために有効な方法の一つとして、単一細胞からの精度の高い電気記録を可能とする *in vivo* パッチクランプ記録を細胞種特異的に行う方法がある。しかしながら、本研究を開始した当初、細胞種特異的な *in vivo* パッチクランプ記録は、2光子励起顕微鏡で観察可能な脳表面に限定され、脳深部ではほとんど未開拓であった。また、例えば脳表面からの細胞種特異的な *in vivo* パッチクランプ記録であっても、組み合わせることができる行動が比較的マイルドな運動を伴うものに限られ、解析可能な行動レパートリーを広げることが求められていた。

## 2. 研究の目的

前項の問題点を克服するべく、本研究では、(1) 光遺伝学と *in vivo* パッチクランプ法を組み合わせ、行動中のマウス脳深部における細胞種特異的な電気記録と神経回路解析を可能とする手法の確立と、(2) 細胞種特異的な *in vivo* パッチクランプ記録が連合学習課題を遂行中のマウスに適用可能であることの実証を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 光遺伝学と *in vivo* パッチクランプ記録との組み合わせ

まず、青色光により活性化する光感受性陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2 (ChR2) を特定神経細胞に特異的に発現させた。そのため、すべての細胞種において Cre 存在下に ChR2 を発現する遺伝子改変マウス (LSL-ChR2 マウス) と細胞種特異的に Cre を発現する遺伝子改変マウス (Rbp4-Cre マウスまたは DAT-Cre マウス) を掛け合わせた。Rbp4-Cre マウスでは、大脳皮質第5層の興奮性神経細胞に特異的に Cre が発現しており、DAT-Cre マウスはドーパミン神経に特異的に Cre が発現している。

マウスを頭部固定して、無麻酔下に大脳皮質一次体性感覚野第5層あるいは中脳腹側被蓋野をターゲットとしてパッチクランプ記録を試みた。記録が成功した場合は、記録細胞の細胞体を光刺激することによって ChR2 細胞を同定し、さらにマウスが自発運動中の電気活動を記録した。また、推定上の軸索投射部位に光刺激を行って、逆行性に記録される活動電位を記録することによって細胞の

軸索投射先を同定し、さらにマウスが自発運動中の電気活動を記録する実験も行った。

研究開始当初は Cre 依存的に ChR2 を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを Rbp4-Cre マウスまたは DAT-Cre マウスの脳内に局所注入して、特定神経に ChR2 を発現させる方法を用いた。しかしながら、AAV 注入のための外科手術により脳表面の組織変化が起きてしまい記録用ガラス電極に粘着性の組織が付着してパッチクランプ記録が難しくなる問題や、十分な数の ChR2 発現細胞が得られず記録の成功率が低い (実際に記録が成功したことはない) こと、軸索投射先における ChR2 の発現が少なく軸索投射先の同定が行えないといった問題から、AAV を用いた方法は断念し、遺伝子改変マウスの掛け合わせによって ChR2 を発現させる方法へ移行することとした。

### (2) 連合学習課題と *in vivo* パッチクランプ記録との組み合わせ

大脳皮質一次体性感覚野 (S1) における洞毛 (ウイスキー) の感覚情報処理機構の学習変化を実験モデルとして、洞毛刺激 - 水報酬の連合学習課題をマウスに学習させた。特に S1 から別の大脳皮質領野 (一次運動野 (M1) または二次体性感覚野 (S2)) へと長距離の軸索を投射する別々の細胞群に着目し、それらの細胞における電気活動が学習前と学習後のマウスにおいて如何に変容しているかについて検討した。投射細胞の同定のためには、蛍光標識された逆行性神経トレーサー (この場合はコレラ毒素サブユニット B) を用いて、投射細胞を蛍光標識した。マウスを頭部固定し、上記課題を遂行中に、蛍光標識された細胞を 2光子励起顕微鏡にて *in vivo* 観察しながらパッチクランプ記録を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 光遺伝学と *in vivo* パッチクランプ記録との組み合わせ

上記のように、研究開始当初には AAV を用いた方法を試みたが、成功に至らなかったため、遺伝子改変マウスを用いた方法へと変更し、Rbp4-Cre マウスと LSL-ChR2 マウスを掛け合わせた Rbp4-Cre;LSL-ChR2 マウスにおいて細胞種特異的な *in vivo* パッチクランプ記録を試みた。まずは大脳皮質第5層から M1 や S2 へ投射する別々の細胞群に着目し、軸索投射先を同定する手法の確立を行い、セルアタッチモードにて、逆行性の活動電位の記録や順行性の活動電位との衝突による逆行性活動電位の消失 (collision) に成功した (図1)。

さらに、S1 から M1 に投射する M1p 細胞群の中に洞毛の位置を非常に正確にコードする細胞や洞毛運動と相関を持つ細胞を発

見した(図2)。これらの成果は現在投稿準備中である。

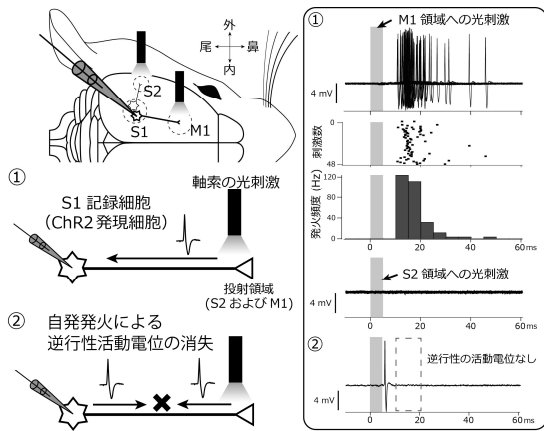
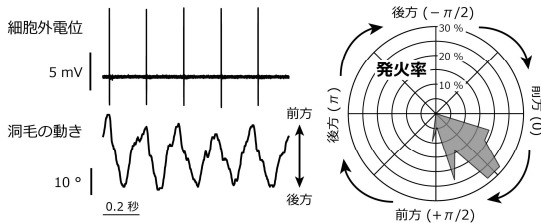


図1. 光遺伝学を用いた長距離投射細胞の投射先同定

洞毛の動きに位相同期する発火を持つ M1 投射細胞



洞毛の動きが停止すると発火が増加する M1 投射細胞

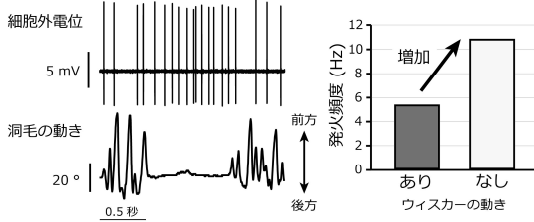
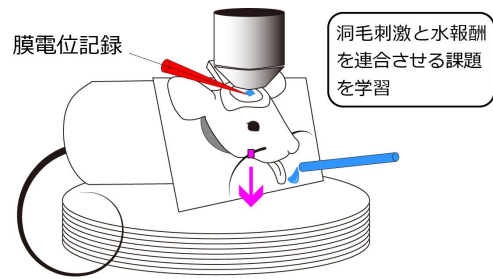


図2. M1 投射細胞における洞毛の位置・運動情報の記号化

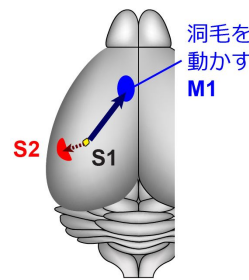
また、上記の技術をさらに脳深部の中脳ドーパミン神経へと応用するため、DAT-Cre;LSL-ChR2 マウスを用いて細胞種特異的な in vivo パッチクランプ記録を行う実験系の構築を行った。

(2) 連合学習課題と in vivo パッチクランプ記録との組み合わせ

上記の行動課題を遂行中のマウスに in vivo パッチクランプ記録法を応用して、S1 から S2 に情報を送る S2p 細胞と S1 から M1 に情報を送る M1p 細胞からホールセル膜電位記録を行った。そして、学習成立後の S2p 細胞と M1p 細胞の洞毛刺激に対する反応性を比較すると、S2p 細胞がより反応性が高いことが分かった。学習成立前のマウスでは、逆に、M1p 細胞のほうが S2p 細胞に比べて感覚刺激に対する反応性がより高かったことから、学習成立前後において S1 から送出される情報の方向性が変化していることが示唆された(図3)。



学習前



学習後

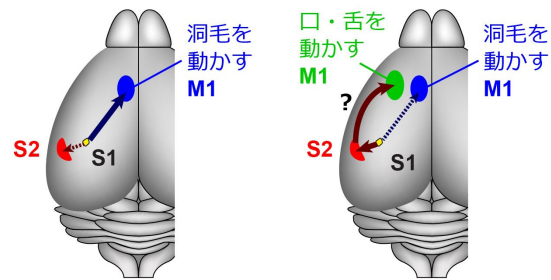


図3. 学習前後で変化する脳内情報経路

さらに、課題の成功/失敗と関連した細胞活動が、学習後には S2p 細胞に見られて M1p 細胞に見られないのに対し、学習前には M1p 細胞に見られて S2p 細胞に見られないということも明らかになった。また、興味深いことに、S2p 細胞は学習成立後にも、水舐め行動と関連する活動を示した。こういった活動は、学習成立前の S2p 細胞には見られず、M1p 細胞には学習状態に関わらず見られなかった。この結果は、学習に伴って運動に相關する投射特異的な活動が表出したことを示しており、このような現象が観察されたのは初めてであった。

以上の本研究成果は、eLife 誌に報告済みである(論文)。

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 4 件)

山下 貴之. 「触覚の腹側系と背側系」  
*Clinical Neuroscience* 35, 166-168, 2017. 査読なし

山下 貴之, 山中章弘. 「オレキシン受容体の生理的および薬理的機能」  
*Clinical Neuroscience* 34, 612-613, 2016. 査読なし

Takayuki Yamashita #, and Carl C.H. Petersen #. Target-specific membrane potential dynamics of neocortical projection neurons during goal-directed behavior. *eLife* 5, e15798, 2016. (#, 責任著者) 査読有 DOI: 10.7554/eLife.15798

Shoko Hososhima, Hideya Yuasa, Toru

Ishizuka, Mohammad R. Hoque, Takayuki Yamashita, Akihiro Yamanaka, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, and Hiromu Yawo. Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics. *Scientific Reports* 16533, 2015. 査読有 DOI: 10.1038/srep16533

〔学会発表〕(計 12件)

山下 貴之. "Projection-specific regulation of large-scale sensorimotor signaling in the neocortex" 『5th CiNet Monthly Seminar』吹田、2017年3月6日(招待講演)

山下 貴之. 「動物行動の神経基盤解明に向けた重要神経経路の探索と新規技術開発」 『名古屋大学環研カンファレンス』名古屋、2017年2月22日(招待講演)

山下 貴之. 「快樂が欲求を生み出す脳内機構の解明」 『ひと・健康・未来研究財団 2016年度・第14回助成研究発表会』京都、2016年11月5日(口頭・ポスター)

山下 貴之、湯浅 英哉、八尾 寛、山中 章弘. 「近赤外光を利用した低侵襲的神経活動操作法の開発」 『第6回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム』名古屋、2016年9月24日(口頭・ポスター)

Yamashita T., Yuasa H., Yawo H., and Yamanaka A. "Low-invasive optogenetical stimulation of neurons using near infra-red light" 『第39回日本神経科学学会』横浜、2016年7月22日(ポスター)

山下 貴之. "Cellular mechanisms of information segregation in primary sensory cortex" 『第8回 NAGOYA グローバルリトリート』大府、2016年2月12日(招待講演)

Yamashita T., Yuasa H., Yawo H., and Yamanaka A. "Fiberless optogenetics using upconversion nanoparticles" 『第7回光操作研究会』東京、2015年12月4日(ポスター)

山下 貴之. 「大脳皮質領域間をつなぐ長距離投射細胞の膜電位ダイナミクス」 『平成27年度生理学研究所研究会「大脳皮質の機能原理を探る」』岡崎、2015年12月3日(招待講演)

Yamashita T., and Petersen C.C.H. "Membrane potential dynamics of specific cortico-cortical projection neurons correlated with goal-directed behavior" Society for Neuroscience 2015 米国・シカゴ、2015年10月19日(ポスター)

山下 貴之. "Sensorimotor learning

induces motor representation in sensory cortex" 『第5回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム』岡崎、2015年9月19日(口頭・ポスター)

山下 貴之. 「覚醒マウスを用いた神経生理学研究の最前線」 『名古屋大学環研カンファレンス』名古屋、2015年9月11日(招待講演)

Yamashita T., and Petersen C.C.H. "Differential sensorimotor processing in specific cortico-cortical projection neurons during goal-directed behaviour" 『第38回日本神経科学学会』神戸、2015年7月30日(一般口演)

〔その他〕

論文 に関する内容紹介ホームページ：  
[https://docs.wixstatic.com/ugd/be64f0\\_148221f22b1a49829256a9e5896044e0.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/be64f0_148221f22b1a49829256a9e5896044e0.pdf)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下貴之 (YAMASHITA TAKAYUKI)  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号：40466321