

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14322

研究課題名(和文) 生体新生仔における大脳皮質神経細胞の活動観察法の開発

研究課題名(英文) In vivo imaging of neuronal activity in the developing cerebral cortex

研究代表者

水野 秀信 (Mizuno, Hidenobu)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00567159

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)：大脳皮質神経回路の正確な形成は、認知等の高次機能に必須である。新生仔期の大脳皮質神経回路では神経活動が観察され、この活動は正確な神経回路形成に深く関与する。しかし生きた新生仔動物の大脳皮質内において、個々の神経細胞がどのような活動様式を示すかは、適切な方法がほとんど開発されておらず未だ多くが不明であった。

本研究では、覚醒下新生仔マウスの大脳皮質において個々の神経細胞の活動パターンを二光子顕微鏡観察する手法を確立した。さらに、活動を観察した細胞の形態を同時解析する条件を見出した。

以上は、新生仔大脳皮質神経細胞の活動様式がどのように神経回路形成に関与するかを解明するのに有用な手法となる。

研究成果の概要(英文)：Establishment of precise neuronal wiring in the cerebral cortex relies on activity-dependent circuit refinement during postnatal periods. However, the nature of neuronal activity in the cortex during this period remains largely unknown.

In this study, the method for monitoring activity of individual cortical neurons in awake neonates was developed.

This method should be useful for unraveling activity-dependent refinement of cortical circuits during early postnatal development.

研究分野：神経科学

キーワード：カルシウムイメージング 2光子顕微鏡 単一細胞遺伝子操作 覚醒下イメージング 大脳皮質 新生児
神経回路形成 臨界期

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質神経回路の正確な形成は、認知・思考・記憶等の高次機能に必須である。新生仔期の大脳皮質神経回路では自発的および感覚入力依存的な神経活動が観察され、これらの活動は正確な神経回路形成に深く関与する。しかし、生きた新生仔動物の大脳皮質内において、個々の神経細胞がどのような活動様式を示すか、また神経活動がどのようなメカニズムにより神経回路形成に関わるかは、適切な方法がほとんど開発されておらず、未だ多くが不明であった。

研究代表者は、マウス大脳皮質一次体性感覚野第4層のパレル神経回路(図1)をモデルとし、生体の新生仔脳内における神経細胞形態変化を二光子タイムラプスイメージングすることにより、神経回路の形成過程の解明を進めてきた(Mizuno et al., *Neuron* 2014)。しかしながら、新生仔脳における神経活動様式の解明に不可欠な二光子カルシウムイメージングの条件は、見出されていなかった。

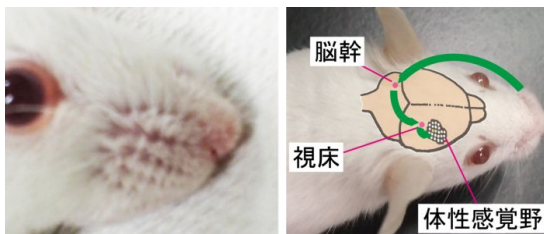


図1、パレル神経回路：マウスにおけるヒゲ感覚の神経回路

(左) マウスのヒゲ。

(右) ヒゲ感覚は、体性感覚野第4層に入力する。第4層には「パレル」と呼ばれる構造が並んで配置しており、個々のパレルは一本ごとのヒゲ感覚を処理する。

2. 研究の目的

本研究の目的は『生体新生仔における大脳皮質神経細胞の活動観察法を開発し、活動依存的神経回路形成のメカニズムを解明すること』であった。

具体的な目標は以下の3点であった。

覚醒下の新生仔大脳皮質第4層において、個々の神経細胞のカルシウムイメージングする条件を決定する。

カルシウムダイナミクスを観察した細胞において、樹状突起等の形態を解析できるように実験法を拡張する。

上記の手法を用い、パレル神経回路の活動依存的形成の分子細胞メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、各種遺伝子組換えマウスに対し、分子生物学的手法・子宮内電気穿孔法・薬理学的手法・形態学的手法・生体二光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせて適用することで行った。

以下に目標達成のために独自開発した手法をまとめる。

パレル地図が RFP 標識されたマウス

生体新生仔脳の二光子観察において、イメージング中にパレルの分布パターンを確認することが不可欠である。これを行うために新しく視床皮質軸索選択的に RFP を発現するマウスを作成した(図2上)。

生体組織で個々の細胞を蛍光標識し、かつ遺伝子操作可能なベクターシステム

これまでに生体組織において個々の細胞を高輝度かつ疎らに蛍光標識するベクターシステム(Supernova 法)を開発している。これを標識細胞で遺伝子ノックダウンおよび遺伝子編集できるように拡張した(図2下)(Luo, Mizuno et al., *Sci Rep* 2016で発表)。

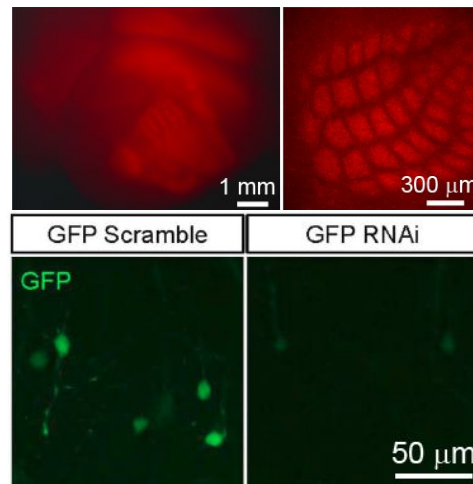


図2、研究目標達成のために開発した手法

(上) 視床皮質軸索で RFP を発現するマウスにより可視化されたパレル地図。

(上左) 全脳サンプル、(上右) パレル皮質の tangential 切片の共焦点画像。

(下) Supernova 法による遺伝子抑制例。

Supernova 法を導入した GFP レポーターマウスから作成した冠状切片の共焦点画像。GFP に対する RNAi を発現させると GFP 蛍光が減弱するが(下右)、スクランブル配列では減弱しない(下左)。

4. 研究成果

目標は達成した。目標はデータの集積に成功し、論文投稿に向け解析中である。目標に関しては、予想外の興味深い結果が得られたため、現在論文投稿中である。以下詳細をまとめる。

カルシウムイメージング条件の決定

Supernova 法により、個々の第 4 層神経細胞にカルシウムインディケータ GCaMP6s を発現させた (図 3 左)。

覚醒下の新生仔においてタイムラプスイメージングを行ったところ、同じバレルに属する神経細胞が同期的に発火することを見出した (図 3 右)。この結果は新生仔期のバレル内同期発火がバレル神経回路の正確な形成に關与する可能性を示している。

現在これらを含む一連の結果をまとめ、論文投稿中である。

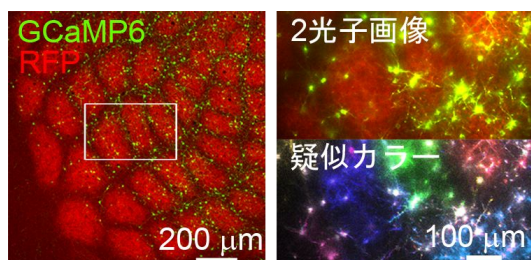


図 3、新生仔における第 4 層細胞の同期発火 (左) 視床軸索で RFP を発現するマウスの第 4 層細胞に GCaMP6 を発現した。

(右) 第 4 層細胞活動の継時的変化の疑似カラー表示 (左の四角部、同じ色がカルシウム濃度変化の同期を示す)。

カルシウムダイナミクスと形態の同時解析法の確立

GCaMP を発現させた細胞に同時に LacZ 等を発現することで活動パターンを同定した細胞の形態を可視化した (図 4)。

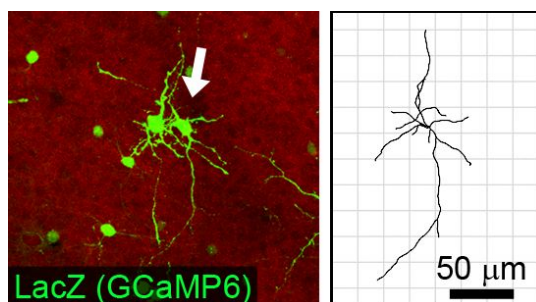


図 4、活動を観察した細胞の形態解析例

(左) 二光子イメージング後に LacZ を染めることで樹状突起形態を可視化した。

(右) 白矢印細胞の樹状突起トレース。

バレル神経回路の活動依存的形成の分子細胞メカニズム解明

上記のカルシウムダイナミクスと形態の同時解析手法および遺伝子操作法を組み合わせることで、NR1 (神経回路形成・認知・記憶に關わる NMDA 型グルタミン酸受容体の必須サブユニット) 等を欠損した細胞のカルシウムイメージング及び細胞形態解析を進めている。データの集積に成功し、論文投稿に向け解析中である。

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 2 件)

Luo W*, **Mizuno H*** (co-first author), Iwata R, Nakazawa S, Yasuda K, Itohara S, Iwasato T.

Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies in vivo.

Sci Rep. 6:35747, 2016. (査読有)

doi: 10.1038/srep35747.

Iwata R, Matsukawa H, Yasuda K, **Mizuno H**, Itohara S, Iwasato T.

Developmental RacGAP $\alpha 2$ -Chimaerin Signaling Is a Determinant of the Morphological Features of Dendritic Spines in Adulthood.

J Neurosci. 35(40):13728-44, 2015 (査読有)

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0419-15.2015.

(学会発表)(計 11 件)

(講演 2 件)

Mizuno H, Sato T, Iwasato T

In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in layer 4 of the neonatal somatosensory cortex. (blitz talk: 招待有)

Cell Symposia: Big Questions in Neuroscience, San Diego 2016 年 11 月 10 日

水野秀信 (セッション企画者兼任)

ミクロとマクロのイメージングの統合による新分野の開拓 (招待講演)

日本発生生物学会秋季シンポジウム: 発生と機能のイメージング 三島市 2016 年 10 月 19 日

(ポスター発表 9 件)

Mizuno H, Sato T, Iwasato T

In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in layer 4 of the neonatal barrel cortex.

Society for Neuroscience annual meeting, San Diego 2016 年 11 月 16 日

Mizuno H, Sato T, Iwasato T

In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in layer 4 of the neonatal somatosensory cortex.

Cell Symposia: Big Questions in Neuroscience, San Diego 2016 年 11 月 11 日

水野秀信、佐藤拓也、岩里琢治
新生仔バレル皮質第4層における神経活動パ
ターンの解析
第39回日本神経科学大会 横浜市 2016年
7月20日

水野秀信、中沢信吾、佐藤拓也、岩里琢治
新生仔大脳皮質第4層におけるポピュレーシ
ョン活動の2光子イメージング
第38回日本神経科学大会 神戸市 2015年
7月29日
(他、海外2件、国内7件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野秀信 (MIZUNO HIDENOBU)
国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号：00567159