

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01961

研究課題名(和文) 測光電極を用いた中枢神経回路機能の解析

研究課題名(英文) Study of central processing of neural information by PME

研究代表者

大森 治紀 (Ohmori, Harunori)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：30126015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は動物個体脳にCa感受性蛍光蛋白(GCaMP6)を発現させる、あるいはCa感受性色素(OGB-1-AM)を注入することで、感覚刺激に応ずる神経電気活動とCa濃度変化を蛍光信号として測光電極で同時に記録し、脳の感覚情報の統合機構の解明に至る実験手法を確立することを目指す。マウス海馬およびトリ終脳聴皮質領域(Field L)で局所の電気信号とCa信号を同時に記録し解析した。さらにトリでは上行する聴覚神経回路をmCherry標識することで、皮質のField Lを明示した。なお、嗅上皮細胞にも研究対象を広げることで測光電極法を広く一般の研究者が使用できるようにする事も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は測光電極法を応用する事で、神経活動に伴う電気信号と細胞内Ca蛍光信号を同時に同一の脳部位で記録する事を示した。さらに測光電極に備わる逐次スペクトル計測機能を応用する事で燐光スペクトルによる光エネルギー遷移を記録し分子間相互作用解析にも応用した。従って本研究では電気信号と細胞内情報の関連を明らかにした学術的な意義がある。社会的にもニワトリ聴覚系、マウス海馬、マウス嗅上皮など多様な実験系に応用できる事を示し、測光電極法を神経科学領域の研究者に周知できた意義もある。

研究成果の概要(英文)：This project is intended to find a clue for the understanding how sensory signals are processed in the brain, by using Photometric patch electrode (PME) recording system which enables recordings of neural electrical and Ca fluorescence signals simultaneously in the deep brain region. Ca signals were measured by using the indicator either GCaMP6 or OGB-1-AM. GCaMP6 was expressed in adult mice hippocampus and measured the neural spontaneous activity or sensory evoked activity in awake mice. Processing of auditory information was studied in field L (avian auditory cortex) of the chick after acute injection of OGB-1-AM. Ascending auditory projection to field L was separately visualized by mCherry expressed by Avian Adeno Associated virus. Furthermore, application of PME was extended to olfactory receptor epithelium for promoting the technology among other researchers in the field of neuroscience.

研究分野：神経科学

キーワード：測光電極 GCaMP OGB-1 海馬 聴覚 嗅覚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳の神経活動は歴史的には電気生理学現象として研究されてきた。最近ではシナプス可塑性など細胞レベルの所見、さらに知覚応答、運動制御など脳領域に特異的な多くの所見も得られてきた。しかし学習、記憶、認知、言語などに関連した脳活動の解明には至っていない。一方では分子生物学手法を用いて遺伝子を操作し、主として行動実験から脳の機能解明を目指す研究も進んでいる。さらには fMRI や多光子顕微鏡などの画像化手法も広く脳機能の解析に応用されている。しかし多くの情報は得られているが、未だに脳の働きの解明に至らないのはおそらくそれぞれの実験手技とデータに関連性が少ないことによるのではないかと考えられる。神経活動には神経細胞内での情報の統合と神経回路機能の強化が逐次必用とされる。そこで、本研究では電気生理学による神経活動の記録と同時に同一の脳の局所で神経細胞内の情報を蛍光信号として記録解析する事を目指した。幸い本研究代表者は、既に測光電極法を確立していた(基盤研究(S) 202200008、2008~2012)。それを用いることで脳の深部領域での電気記録と蛍光信号記録を同時に行い、さらには薬液の局所注入も可能であった。

## 2. 研究の目的

本研究は測光電極を応用し、脳の神経回路機能を電気活動と Ca 信号として記録する。さらには神経科学領域の他の研究室にも広く測光電極法の応用を勧めることで、測光電極法の認知度を高め多くの研究者が実験応用できる手技として完成させることを目指した。

測光電極は光伝導特性を高めたパッチ電極である。パッチ電極として神経組織から電気活動を記録すると同時に、光導体として蛍光の励起および記録が可能であり、さらに電極先端から溶液の局所注入もできる。本研究では Ca センサー色素(OGB1)あるいは遺伝子発現させた Ca 蛍光蛋白(GCaMP 等)を用いて、大脳皮質に至る上行性神経投射回路において、神経情報の統合処理が Ca イオンを始めとする細胞内情報系のどの様な活動を伴うか否かを動物個体脳で明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

実験にはニワトリヒナの聴覚神経系および成体マウス海馬を主として用いた。ニワトリヒナでは、Ca 感受性色素である OGB-1-AM で終脳聴覚領域(field L)を染色する。さらに鳥類に発現効率の高いトリ型アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて mCherry を聴覚神経系に発現し上行性聴覚投射系を可視化し field L の終脳における部位を明示した。マウス海馬には AAV を局所注入し Ca センサー蛋白である GCaMP6 を発現させた。この実験は金沢医科大学の小野宗範准教授、加藤伸郎教授との共同研究として行った。GCaMP6f を発現させた無麻酔のマウスで自発行動あるいは感覚刺激により引き起こされた電場電位および Ca シグナルを記録した。GCaMP6f の発現は、始めにトリでも試みたが、トリは個体も成長が著しくウイルス発現を待つ間に脳の形状が大きく変化し、注入位置がずれることで GCaMP6 発現領域の特定が困難であった。従って急性実験で OGB-1 を用いて Ca 信号を検出した。一方、AAAV は mCherry をトレーサーとして発現することで聴覚神経回路を標識し、field L の深部脳での局在領域を確認し OGB-1-AM の注入時に参考とした。さらにマウス嗅上皮細胞では BRET (Biological Resonance Energy Transfer)を用いた研究を行った。BRET は測光電極の記録法として開発した逐次スペクトル解析法を応用し、燐光スペクトルの変化から cAMP と OMP の相互作用を光エネルギー転移として明らかにした。一連の実験では、ヒヨコ聴覚系、マウス海馬、そして嗅上皮細胞へと研究対象を広げることで一般の研究者が広く測光電極法を知る事となり、今後の応用の為の一步となる事が期待できた。

## 4. 研究成果

### (1) トリ終脳聴皮質での Ca シグナルと神経情報の統合機能

トリ聴覚神経機構では終脳聴皮質 field L の神経回路機能を電気活動、細胞内 Ca 動態そし

て軸索投射の3点から解析した。下丘から大脳皮質に至る上行性の軸索投射は初めに AAV で発現した mCherry を用いて観察した。下丘から上向性の回路は両側性に視床、さらに偏側性に視床から大脳皮質に投射した。大脳皮質の神経活動は主に対側音に応答しながらも左右差は下丘に比べて小さく、しばしば活動電位は大きく変動する電場電位に重なった。これは左右両側性の投射を受ける視床の解剖学的な構造と整合性がある。測光電極による Ca 応答計測は OGB-1-AM を急性的に局所注入する事で行った。大脳皮質で特徴的な電気活動は電場電位の自発的な UP-DOWN 活動であった。UP 状態からは活動電位が発生し、細胞内 Ca 応答を伴った。自己相関は電気活動が Ca 信号より遙かに短く、細胞内信号である Ca 応答が神経情報の持続を機能的に延長していると考察した。測光電極を用いて局所的に NMDA-受容体阻害剤(AP5)を投与することで自発的および音入力に同期した UP-DOWN 電場応答は減衰し細胞内 Ca 応答は消失した。従って UP-DOWN 神経活動は NMDA 受容体活性により生ずる事を明らかにした。Ca シグナルは様々な神経情報の入力で細胞内に一様に発生する。音入力で電気活動と Ca 応答の相関時間が延長する事でもあり、Ca イオンが感覚入力情報などの多様な神経情報の統合を担う細胞内メッセージとして機能的な意義を持つことが示された。

## (2) マウス海馬での GCaMP6 の発現と神経病態。

次に、アデノ随伴ウイルス(AAV)注入により GCaMP 6 を安定してマウス海馬に発現した。AAV 注入後十分な日時を経ることで充分量の GCaMP 6 を海馬 CA1 領域に発現することができた。GCaMP6 からの自発的な蛍光信号を電場電位と同時に記録した。野生型マウスとアルツハイマー型マウスで記録する事により、活動電位の発生頻度がアルツハイマーマウスで顕著に高く、一方 Ca 信号の持続は野生型マウスで長いことが明らかになった。さらに水迷路学習で評価する神経病態の程度と電場電位スペクトル、細胞内 Ca 動態の相関を解析する事により、認知機能と神経活動の関連を明らかにし、病態解明に至る手がかりを捉えることができた。一連の研究は金沢医科大学の小野宗範准教授、加藤伸郎教授との共同研究として行ったものである。

## (3) 嗅上皮における OMP による cAMP の緩衝機構

嗅細胞には OMP (Olfactory marker protein)が発現している。神経細胞にも多く発現することから OMP の嗅覚神経系での働きも不明であった。久留米医科大学生理学教室の中島則行講師および鷹野誠教授との共同研究により OMP の機能的役割を明らかにする事ができた。嗅細胞が匂い物質に反応することで繊毛内 cAMP 濃度が上昇し、これによって cAMP でゲートされるイオンチャンネルが開き細胞膜脱分極が起こる。従って強い匂い刺激では多くの cAMP が発生し、嗅細胞膜は持続的に脱分極する。Na チャネルの不活性化が起こり活動電位は止み嗅細胞の感覚受容器としての機能は失われるはずである。しかし現実には持続的な匂い刺激でも嗅細胞は活動電位の発射を続ける。嗅細胞の応答持続性が OMP による cAMP の緩衝作用により実現することを証明した。即ち OMP は cAMP と結合することにより緩衝体として作用し効果的に cAMP 濃度を低く維持する結果である。これは測光電極法に備わる逐次スペクトル解析法を応用して証明した。即ち Renilla-Luciferase を結合し蛍光を発生する OMP(480nm)と蛍光色素 8NBD を結合した cAMP(536nm)とが相互作用する事により光エネルギー遷移が生じて、480nm から 536nm にスペクトルピークが移動する。これを経時的なスペクトル変化として検出した。さらに、OMP を遺伝学的に除去した嗅上皮細胞では繰り返し刺激で活動電位発射が急速に失われることから、OMP が cAMP 緩衝系として作用し、嗅細胞における神経活動を持続させる事を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima Noriyuki, Nakashima Kie, Taura Akiko, Takaku-Nakashima Akiko, Ohmori Harunori & Takano Makoto	4. 巻 in press
2. 論文標題 Olfactory marker protein directly buffers cAMP to avoid depolarization-induced silencing of olfactory receptor neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NATURE COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井康治 大森治紀
2. 発表標題 トリ個体の上行性聴覚路－皮質・下丘・蝸牛神経核－における神経活動と関連したカルシウム動態の計測
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中島則行 中島輝恵 田浦晶子 高久晶子 大森治紀 鷹野誠
2. 発表標題 嗅覚神経細胞におけるcAMP動態を調節するタンパク質の役割
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakashima N, Nakashima K, Taura A, Takaku A, Ohmori H, Takano M
2. 発表標題 Buffering cAMP in olfactory receptor neurons
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野宗範 大森治紀 許峰 加藤伸郎
2. 発表標題 アルツハイマーモデルマウス海馬領域からの局所電位とカルシウム蛍光信号のin vivo同時記録
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤哲史, 大森治紀
2. 発表標題 聴覚神経回路解析の新戦略-新規に発見した順行性経シナプストレーサーと電気記録を 併用した機能的神経回路網の可視化
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ohmori, Harunori	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 144
3. 書名 Auditory Information Processing	

1. 著者名 Ohmori, Harunori (ed. Nicholas DJ Wright)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 (24) 352
3. 書名 Chapter 6, Photometric Patch Electrode to Simultaneously Measure Neural Electrical Activity and Optical Signal in the Brain Tissue	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----