

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18371

研究課題名(和文) 覚醒マーモセットにおける2光子Caイメージング法と行動課題の開発

研究課題名(英文) Development of two-photon calcium imaging system for behaving marmoset

研究代表者

定金 理 (Sadakane, Osamu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90446261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：覚醒個体でのカルシウムイメージング法はこれまで主にげっ歯類を使った実験に適用され、動物の感覚、運動、認知機能と神経細胞活動の関連を調べる研究に貢献してきた。当研究課題の目的は、霊長類のモデル動物であるマーモセットにおいて覚醒下でカルシウムイメージングを行う方法を開発、確立することである。頭部固定装置の開発、頭部固定条件への動物の馴致などの手法の確立、GCaMPの発現手技の改善を行った結果、覚醒下マーモセットが自然画像を含む視覚刺激を自由視している際の一次視覚野の活動を2光子イメージングにより単一細胞レベルで、また1光子イメージングで広範囲(~3mm)に観察することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Calcium imaging of neuronal activity from awake rodents has contributed to the study of sensory, motor, and cognitive function of the brain. The purpose of this research is to develop and establish the methods for calcium imaging from the neocortex of marmoset, a model animal for primate research. Development of head-fix apparatus, acclimation of the animals to the head-fixed condition, and the improvement in the expression of calcium indicator, GCaMP6, led to the successful imaging of visual responses from the primary visual cortex of awake marmoset, while the animal is freely looking at various visual stimuli including natural images. Imaging can be performed both under two-photon excitation condition at single-cell resolution and under one-photon condition at wide (~3mm) field of view. This method should be the basis of the future study of the brains of behaving primates.

研究分野：神経生理学

キーワード：大脳皮質 霊長類 2光子顕微鏡 マーモセット カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

カルシウムイメージング法は神経細胞の活動を可視化する有用な手法の1つである。特に近年、遺伝的にコードされたカルシウム指示剤 (Genetically encoded calcium indicator) である GCaMP を用いた実験が広く行われている。GCaMP を用いた 2 光子および 1 光子カルシウムイメージング法は、げっ歯類、特にマウスにおいて覚醒個体での実験に適用され、動物の感覚、運動、認知機能と神経細胞活動の関連を調べる研究に貢献してきた。

覚醒下個体でのカルシウムイメージング法が人間により近い霊長類に適用可能となれば、神経科学の発展に大きく寄与することが期待される。筆者を含むグループはこれまでに、霊長類のモデル動物として新世界ザルのマーモセット大脳皮質の神経細胞に GCaMP を発現させ、麻酔下で多細胞神経活動をイメージングすることに世界に先駆けて成功し報告した (Sadakane et al., Cell Reports, 2015)。

2. 研究の目的

当研究課題の目的は、我々の方法をさらに発展させ、麻酔下だけでなく覚醒下のマーモセットからカルシウムイメージング法を用いて神経細胞活動を記録する方法を開発、確立することである。標的領域として、大脳皮質領域の中で一次視覚野を選択した。一次視覚野は大脳皮質の中で最も多くの研究知見の蓄積がある領域の1つであり、新しい手法を適用してその有効性を検証する目的にもふさわしいと判断した。

3. 研究の方法

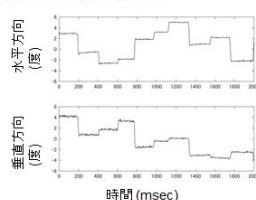
マーモセットは顕微鏡下で頭部を固定装置に固定した。頭部固定条件に時間をかけて徐々に慣らすことで動物の体の動きを抑えた。

マーモセットの眼前に LCD ディスプレイを置き、自然画像やゲーティングなどの視覚刺激を呈示した。本研究ではマーモセットに視覚刺激を自由視させた。マーモセットの眼球運動は赤外線カメラによる眼球運動追跡システム (iRecHS2、産業技術総合研究所・松田圭司博士が開発提供) でモニターし、視覚刺激呈示中のどのタイミングでディスプレイ上のどの位置を見ているのか推定した。眼球運動追跡システムの出力とディスプレイ上の位置とのキャリブレーションには、マーモセット顔画像のパターンを用いた。

キャリブレーション画像

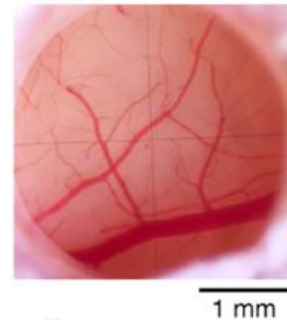


眼球運動の検出



マーモセット一次視覚野に AAV を用いて GCaMP6 を発現させた。発現期間はおよそ 1 か月から 2 ヶ月程度とした。標的部位にイメージング窓を設置した。

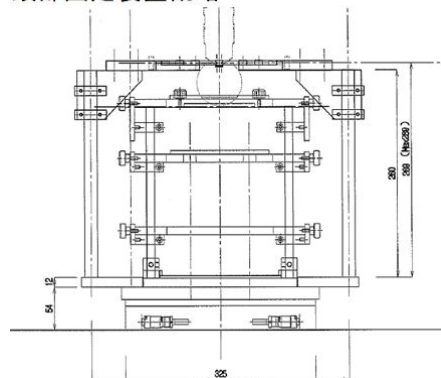
2 光子カルシウムイメージングには Thorlabs 社製の多光子顕微鏡 Bergamo II を用いた。この顕微鏡は対物レンズの角度を自由に換えられる特徴を持ち、動物にとって自然な姿勢のまま様々な脳部位にアクセスできる。2 光子励起のために 940nm のレーザー光源として Spectra Physics 社の MaiTai eHP を用いた。1 光子イメージングは Thorlabs 社製の CCD あるいは sCMOS カメラを使用した。



4. 研究成果

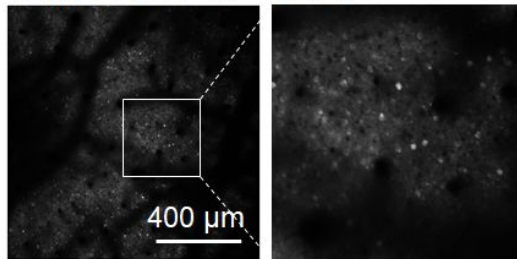
平成 28 年度に覚醒下イメージング用の頭部固定装置の準備、頭部固定条件への動物の馴致などの手法の確立を行った。特に 2 光子イメージングを行う際には、動物の動きがイメージングに与える影響が大きな問題となる。動物が動くことでイメージングしている部位が XY 方向、さらには Z 方向に動いてしまうと、同じ細胞の活動を継続して観察できなくなるからである。XY 方向の動きは記録後のデータ処理である程度補正可能だが、Z 軸方向に動いてしまうと観察中の細胞がイメージング面から外れてしまい、データ処理でも補正が不可能である。動きを抑制するために、強固な頭部固定と、頭部固定条件に動物を慣らすことが重要だった。

頭部固定装置概略



平成 29 年度は覚醒下でのイメージング技術の発展を目指した。2 光子顕微鏡を用いると単一細胞のレベルで神経細胞活動を観察することができるが、GCaMP の発現手技の改善によって、28 年度よりさらに広い範囲 (28 年度は約 300 x 300 micron、今年度は約 1200 x 1200 micron) からのイメージングが可能となった。

覚醒下2光子イメージング

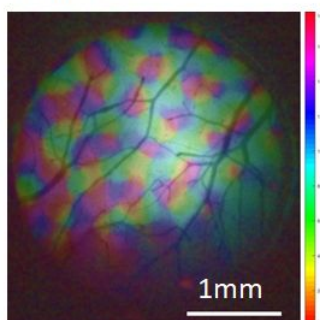


また、1光子励起条件で低倍(4倍)の対物レンズを使用することにより、単一細胞レベルの空間解像度はないが局所細胞集団の活動を広く(約3×3mm)捉える手法を確立した。このイメージング視野の中には異なる方位や空間周波数などの刺激特徴選択性と、異なる受容野位置を持つ場所が混在している。マーモセットが自然画像などの視覚刺激を自由視しているとき、イメージング視野の各部位が複雑な時空間パターンで活動していることが明瞭に観察可能となった。これらの手法を組み合わせることで、覚醒下のマーモセットにおいて単一細胞レベルの解析とより広域の細胞集団の解析を行うことが可能となった。

さらに、麻酔下で眼球運動を抑制した状況でイメージングを行うことで、よりコントロールされた状況で視覚刺激を呈示する実験も行うことができる。例えば、古典的に一次視覚野で研究されてきた視覚刺激の方位選択性マップを明瞭に可視化することに成功した。麻酔下で得られた刺激特徴選択性の詳細なマップの情報をを用いることで、覚醒下での視覚応答の解析が促進されると考えている。

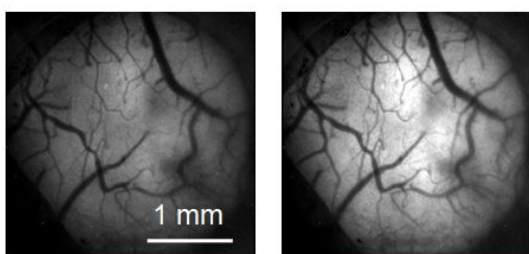
今後はこれらの手法を使って覚醒下での視覚野の活動解析を進めるとともに、これら

麻酔下1光子イメージング 方位マップ



の手法を視覚野以外の領域にも適用して霊長類の脳機能を理解する研究を推進する。

覚醒下1光子イメージング



視覚刺激呈示前

視覚刺激呈示中

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)

Application of viral vectors to the study of neural connectivities and neural circuits in the marmoset brain.

Watakabe A, Sadakane O, Hata K, Ohtsuka M, Takaji M, Yamamori T.

Dev Neurobiol. 2017 Mar;77(3):354-372.

doi: 10.1002/dneu.22459 (査読有り)

〔学会発表〕(計4件)

定金 理, Declan Rowley, 谷利樹、阿部央、渡我部昭哉、水上浩明、一戸紀孝、山森哲雄

Calcium imaging in marmoset neocortex under awake and anesthetized condition

第7回マーモセット研究大会

2018年1月17日

京都大学芝蘭会館(京都)

定金 理, 上田光人、渡我部昭哉、水上浩明、山森哲雄

Two-photon calcium imaging using genetically-encoded calcium indicator in awake marmoset

北米神経科学学会

2016年11月14日

サンディエゴ(アメリカ)

定金 理, 上田光人、正水芳人、渡我部昭哉、寺田晋一郎、大塚正成、高司雅史、水上浩明、小澤敬也、河崎洋志、松崎政紀、山森哲雄

Two-photon calcium imaging using genetically-encoded calcium indicator in primate brain

Fluorescent Proteins and Biological Sensors V

2016年11月8日

バージニア(アメリカ)

定金 理, 上田光人、渡我部昭哉、水上浩明、山森哲雄

Two-photon Ca²⁺ imaging using GCaMP6f in awake marmoset neocortex

第39回日本神経科学大会

2016年7月20日

パシフィコ横浜(横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定金 理 (SADAKANE, Osamu)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：90446261

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

渡我部 昭哉 (WATAKABE, Akiya)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：40290910