

令和元年5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19449

研究課題名(和文)聴覚空間地図の可視化の試み

研究課題名(英文)Visualization of auditory space map in the brain

研究代表者

久場 博司(Kuba, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10362469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、聴覚空間地図の実体を明らかにするための技術基盤整備を目指し、以下の結果を得た。まず、Ca感受性蛋白質、電位感受性蛋白質、膜移行型の蛍光蛋白質をTetOn制御下で神経細胞特異的に発現するベクターを作成した。次に、タンゲステン線をガラス電極に挿入することで、音応答記録下にベクターの局所注入が可能な系を確立した。さらに、成熟聴覚神経細胞に発現させた蛍光蛋白質の信号を、神経内視鏡により観察することに成功した。また、Tetbow法、さらに組織透明化と二光子顕微鏡観察を組み合わせることで、多細胞投射解析に必要な神経回路の三次元再構築の手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、神経内視鏡を用いた多細胞活動解析と組織透明化を用いた多細胞投射解析の技術基盤を確立することができた。これらの手法により、個々の神経細胞の活動パターンと投射・結合様式を同時に明らかにする、すなわち「点」と「線」の情報を繋ぐことができ、脳における情報表象の神経回路基盤の理解が可能になると考えられる。この手法は、聴覚回路のみならず脳神経回路全般に適用できる手法であり、神経回路研究の進展に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This project was aimed to establish technical basis for visualization of auditory space map in the brain. We had the following achievements. First, we created plasmid vectors that express Ca²⁺-sensitive protein, voltage-sensitive protein, and membrane-targeting fluorescent proteins under control of TetOn system specifically in neurons. Second, we created an electrode that enabled vector injection and field potential recording during sound stimuli. Third, we succeeded in observing fluorescent signals in auditory neurons using a neuro-endoscope. Finally, we optimized methods for 3D reconstruction of neural circuits, using Tetbow system, tissue-clearing technique and two-photon imaging.

研究分野：神経生理学

キーワード：聴覚 神経回路 空間地図

1. 研究開始当初の背景

我々は左右の耳に到達する音の時間差(両耳間時差)を聞き分けることで、周囲の位置状況を把握することができる。この聴覚による空間検知の能力はスポーツやコミュニケーションなど日常の様々な場面に重要であり、我々の脳には両耳間時差に基づく聴覚の空間地図が形成されると考えられている。聴覚空間地図の詳細を明らかにするためには、聴覚神経核もしくは領野内で異なる両耳間時差応答を示す神経細胞の空間分布を明らかにすることが必要である。しかしながら、聴覚神経核の多くは脳深部にあり、複数の神経細胞の活動と位置を同時に評価することが困難であるため、聴覚空間地図が哺乳類の聴覚伝導路のどこで、どのように形成されるのかはよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、神経内視鏡を用いた多細胞活動解析と組織透明化を用いた多細胞投射解析を組み合わせた解析を、聴覚伝導路の各神経核に適用することにより、哺乳類の聴覚地図の実体を明らかにすることを目指している。従って本課題では、このために必要な技術基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

A) プラスミドベクター

Ca 感受性蛋白質 (GCaMP6)、電位感受性蛋白質 (GEVI)、光駆動型陽イオンチャンネル蛋白質 (ChR2)、蛍光蛋白質 (YFP、CFP、RFP、GFP)、TetOn 制御蛋白質 (TetOn3G、TRE3G) のプラスミドを Addgene から購入し、TetOn 制御下で神経細胞特異的にこれらの蛋白質を発現するベクターを作成した。

B) 遺伝子導入

先端が 70~80 μm 径のガラス電極に 50 μm 径のタングステン線を挿入したものをを用いて、聴覚神経核へのベクターの局所注入と電気穿孔法による遺伝子導入を行った。具体的には、上記電極を聴覚神経核へ脳定位的に刺入し、さらにガラス電極内に充填したベクターを圧投与により注入し、タングステン線を用いて電気刺激を行った。

C) 神経内視鏡イメージング

麻酔下の動物の脳に GRIN レンズを脳定位的に挿入し、in vivo の蛍光顕微鏡システム(Doric)を用いて蛍光観察を行った。

D) 神経回路の三次元再構築

膜移行型の蛍光蛋白質により聴覚神経核の神経細胞が可視化された動物から、厚さ 1-2 mm の脳ブロック標本を作成した。さらに、CUBIC 法による組織透明化処理を行い、20x 対物レンズを用いて二光子顕微鏡 (Zeiss) による大規模イメージングを行った後、神経回路の三次元再構築を行った。

4. 研究成果

A) プラスミドベクターの作成と動作確認

多細胞活動解析を行うために、Ca 感受性蛋白質 (GCaMP6) と電位感受性蛋白質 (GEVI) を TetOn 制御下で神経細胞特異的に発現するためのプラスミドベクターを作成した。これらのベクターをニワトリ胚の脳幹の聴覚神経細胞に導入し、急性切片もしくは脳ブロックを作成したところ、蛍光を確認することができた。さらに、高カリウム溶液 (50 mM) 刺激を行ったところ、蛍光強度の変化を確認することができた。また、神経回路構築を解析するため

に、蛍光蛋白質（RFP、YFP、CFP、GFP）を TetOn 制御下で神経特異的に発現するためのプラスミドベクターを作成した。詳細な形態解析を行うために、蛍光蛋白質には膜移行シグナル（pal）を付加したものをを用いた。これらのベクターをニワトリ胚の脳幹の聴覚神経細胞に導入したところ、蛍光蛋白質の細胞膜への発現を認め、樹状突起と軸索、神経終末を鮮明に観察できることを確認した。

B) 遺伝子導入法の確立

成熟聴覚神経細胞への *in vivo* での遺伝子導入法として、本課題では電気穿孔法を試みた。上述の通り、ガラス電極にタングステン線を挿入したものを脳定位的に聴覚神経核へ刺入した。ガラス電極からベクターの圧投与を行い、さらにタングステン電極を用いて電気刺激を与えた。電極径、圧強度、持続時間を調節することで注入条件を検討するとともに、電気刺激の強度、持続時間、刺激間隔、刺激数などの条件を変化させることで導入効率の向上を試みた。しかしながら、いずれの条件においても導入効率は低く、今後はタングステン電極を絶縁することで刺激効率を改善することを検討している。一方、成熟動物では、核膜孔の透過には選択的なしくみが必要になるとの報告がある。特に、電気穿孔法で導入された遺伝子は拡散により核膜孔を透過するため、成熟動物での透過効率は低いことが予想される。本課題では成熟動物を用いていることから、このことが低い遺伝子発現効率の原因である可能性があり、ウイルスベクターを用いての遺伝子導入が必要であると考えられた。従って、GFP を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入したところ、聴覚神経核に GFP の発現が認められた。従って、今後は上記コンストラクトをウイルスベクターに搭載することを予定している。

聴覚神経核を *in vivo* で正確に同定し、遺伝子導入と蛍光観察を行うことが重要である。従って、本課題では音提示と電気記録のシステムも構築した。防音箱内の脳定位装置に固定した動物へ、スピーカーからイヤホンを通して純音や白色雑音を提示し、聴覚神経核から上記電極を用いて電場電位記録を行ったところ、音入力に対する応答を記録することができた（図 1）。さらに、この電極によりベクターの注入が可能なことも確認した。

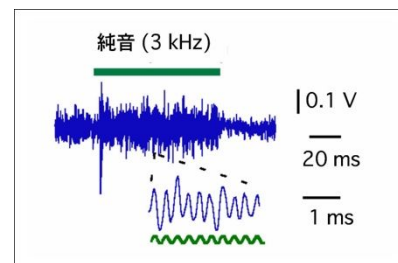


図 1 タングステン電極による電場電位記録

C) 神経内視鏡イメージング

聴覚神経細胞に GFP を発現させた動物において、脳定位的に GRIN レンズを挿入し、内視鏡観察を行なったところ、GFP の信号を認めることができた（図 2）。今後は、GCaMP6 を発現するウイルスベクターを用いて Ca イメージングを行うことで、聴覚神経細胞の音応答の空間分布解析を進めていく予定である。

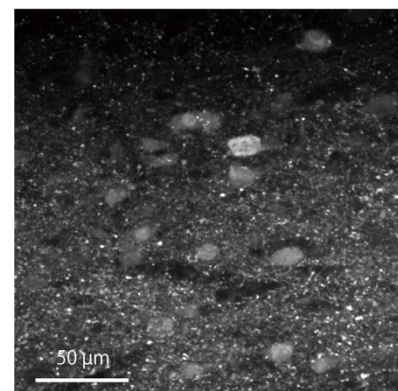


図 2 神経内視鏡によるイメージング

D) 神経回路の三次元再構築

聴覚空間地図を明らかにするためには、複数の神経細胞の投射・結合様式を解析することが必要である。従って、上述の蛍光蛋白質を同時に注入する Tetbow システムを試みたところ、多数の神経細胞を明るく、かつ異なる色で可視化することができた。すなわち、多数の神経細胞の同時観察を行うことができる系を確立することができた。また、本課題では、回路構築の解析を効率化するために、CUBIC 法による組織透明化と二光子イメージングの条件最適化を行った。その結果、樹状突起形態と軸索投射様式を含む神経回路構築の詳細な解析を、切片を作成することなく行うことができた。

今後はさらに、多細胞活動解析と多細胞投射解析が同時に可能なベクターを作成し、哺乳類

(スナネズミ)の聴覚神経核に適用することで、聴覚空間地図の詳細を明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Adachi R, Yamada R, [Kuba H](#)

Tonotopic differentiation of coupling between Ca^{2+} and Kv1.1 expression in brainstem auditory circuit

iScience 13:199-213 (2019). 査読有

2. [久場博司](#)

軸索起始部コンパートメントの構造可塑性と聴覚チューニング
生体の科学 70:1-4 (2019). 査読無

3. Akter N, Adachi R, Kato A, Fukaya R, [Kuba H](#)

Auditory input shapes tonotopic differentiation of Kv1.1 expression in avian cochlear nucleus during late development

J. Neurosci. 38:2967-2980 (2018). 査読有

4. Fukaya R, Yamada R, [Kuba H](#)

Tonotopic variation of the T-type Ca^{2+} current in avian auditory coincidence detector neurons

J. Neurosci. 38:335-346 (2018). 査読有

5. [久場博司](#)

軸索起始部の構造と機能による神経興奮性の制御
生化学 90:69-74 (2018). 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Sekikawa H, Egawa R, [Kuba H](#)

3-D visualization of avian brainstem auditory circuits using Brainbow labeling and tissue clearing

FAOPS2019 (神戸)

2019年3月30日

2. Furuta T, Yamada R, [Kuba H](#)

Src kinase regulates the presynaptic transmitter release in avian cochlear nucleus

FAOPS2019 (神戸)

2019年3月29日

3. Al-Yaari M, Yamada R, [Kuba H](#)

Inhibition expands dynamic range of inputs in low-tuning frequency neurons in avian cochlear nucleus

FAOPS2019 (神戸)

2019年3月29日

4. Yamada R, [Kuba H](#)

Synaptic clustering regulates the auditory coincidence detection in low tuning frequency neurons

FAOPS2019 (神戸)

2019年3月29日

5. Akter N, Adachi R, Kuba H

Development of tonotopic differentiation of axon initial segment in avian nucleus magnocellularis

FAOPS2019 (神戸)

2019年3月29日

6. Muto K, Yamada R, Kuba H

Developmental regulation of Ca channel expression in avian cochlear nucleus

FAOPS2019 (神戸)

2019年3月29日

7. Kuba H

Tuning of excitable domains in central auditory neurons

Axon in the hills (Heidelberg)

2018年10月4日

8. 久場博司

Activity-dependent tuning of Kv1.1 expression in brainstem auditory circuit

第41回日本神経科学大会 (神戸)

2018年7月27日

9. 久場博司

音源定位の神経回路機構

第95回日本生理学会大会 (高松)

2018年3月30日

10. Kuba H

Roles of auditory input in tonotopic differentiation of Kv1.1 expression in avian nucleus magnocellularis

ARO 2018 MidWinter Meeting (San Diego)

2018年2月12日

11. Kuba H

Tonotopic differentiation of dendritic computation in sound localization circuit

The 48th NIPS International Symposium (Okazaki)

2017年11月2日

〔図書〕(計 2 件)

1. 久場博司 (翻訳)

第13章 聴覚と平衡感覚 (18頁)

ギャノン生理学 原著25版 丸善出版 (2018年)

2. 久場博司 (翻訳)

第 53 章 聴覚 (10 頁)

ガイトン生理学 原著第 13 版 エルゼビア・ジャパン株式会社 (2017 年)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/saibouseiri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。