

自己評価報告書

平成23年 4月 1日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20220008

研究課題名(和文) 蛍光分光を応用した神経性棒の個体脳における同定と聴覚神経回路機構の研究

研究課題名(英文) Neuronal identification by fluorescence spectrogram, and the application to auditory neural circuits in vivo

研究代表者 大森 治紀 (OHMORI HARUNORI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30126015

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：FRET、神経細胞、聴覚、神経回路、蛍光タンパク

1. 研究計画の概要

本研究は第1にパッチ電極を用いた新しい蛍光分光電気計測法を開発する。石英ガラス管で作成したパッチ電極を光導体として用いる事で電気活動と同時に神経細胞の FRET 応答など蛍光分光を行う装置である。第2は in vivo 脳機能解析に上記装置を応用する事である。特に動物個体を用いた聴覚機能解析実験系の確立を目標に進めている。

2. 研究の進捗状況

第1の研究による、蛍光パッチ電極を用いた分光電気計測装置の開発では、試作装置の概要と脳切片標本の神経細胞を当面の対象とした FRET 計測を中心に報告する。

分光電気計測装置は現在は3本のレーザーを取り替えて励起光としている。レーザー光は2分岐光ファイバー束の1束に投射する。光ファイバーの他端は電極ホルダーにつながる。検出系は2分岐光ファイバーの1束の蛍光信号を集め蛍光検出用光ファイバー束を介して分光計で解析する。将来の蛍光寿命計測の為に光および電気遅延回路を組み込んでいる。

神経細胞に接着する石英ガラス管電極先端は1-2 μm 径であるが、パッチ電極からのレーザー光による細胞(直径 10 μm)の蛍光イメージは顕微鏡下に肉眼および高感度 CCD カメラで可能である。パッチ電極は石英ガラス管を用いて作製した。細胞の発する蛍光が極めて微弱であり、分光には背景蛍光をできるだけ抑える必要があった。無電解メッキによりガラス管表面をコーティングする事で汚れを防ぎ FRET 応答の記録が可能になった。まだ背景蛍光レベルが不安定であり、電極の特性を安定させる一層の工夫が

必要である。

以上の装置を試作し、FRET などの光計測と電気記録をパッチ電極を通して行っている。Ca 応答性 FRET 蛋白 F2C をニワトリ脳に in vivo 局所注入し聴覚神経細胞に発現させた。その後作製した脳切片標本では 445nm 励起により、KCl 投与で CFP に対応する 500nm 近傍のスペクトル強度が増加し、YFP に対応する 530nm 近傍のスペクトル強度が低下する FRET 応答が起きた。KCl 洗浄により回復した。さらに蛍光色素を逆行性に充填した神経細胞では、同時に膜電位固定および電流固定実験を行い内向き電流と活動電位が記録できた。

第2の研究では、個体脳への分光電気計測装置の応用の為の準備を進めた。動物個体脳からの聴覚応答、特に抑制性神経回路による機能修飾、特定の神経細胞への蛍光トレーサの逆行性充填、形態観察およびチャネルタンパク質の免疫染色は論文発表した。そして Ca 応答性 FRET 蛋白の個体脳局所発現効率の改善を進めている。これらの実験は現時点ではニワトリヒナで行っているが、マウスを用いた実験系も既に整備している。マウスはニワトリに比べて可聴周波数領域が高く特殊なスピーカー・マイクロフォンを用いるので、実験装置に多少の工夫が必要であった。

3. 現在までの達成度

本研究で試作を試みている蛍光パッチ電極を用いる分光電気計測装置は、計画調書の段階では蛍光蛋白を発現するあるいは蛍光色素を

充填した神経細胞を分光データにより同定する事を目的として蛍光記録と同時に電気記録する計画であった。分子動態を反映する FRET 計測への応用は目標として掲げてはいても、検出効率の問題を考えると何年か先の目標であった。しかし、装置開発途中の現時点で既に FRET 計測が可能になっている事は、目標を超える研究の進展があったと考えている。順調に装置の開発が進む事で、FRET 計測を応用した細胞内 Ca イオン動態や、他の様々な細胞内物質と神経活動の関連を生きた動物個体の脳で解析する事が可能となる。これまでは実現不可能であった研究が可能になり、予想以上の成果が見込まれる。

4. 今後の研究の推進方策

第1に FRET 計測の成功確率を高める事など、蛍光パッチ電極計測の基本的な特性を明らかにし幾つかのステップで改良を図る。特に神経細胞電気現象と FRET 応答、および顕微鏡光による FRET 応答と蛍光パッチ電極法による FRET 応答の厳密な比較をする。第2は、個体脳の神経細胞への応用を進める。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計7件)

Sato T, Fukui I and Ohmori H. Interaural phase difference modulates the neural activity in the nucleus angularis and improves the processing of level difference cue in the lateral lemniscal nucleus in the chicken. *Neuroscience Research* 66:198-212. (2010) 査読有り

Iwao Fukui, R. Michael Burger, Harunori Ohmori, and Edwin Rubel. GABAergic inhibition sharpens the frequency tuning and enhances phase locking in chicken nucleus magnocellularis neurons. *J Neuroscience* 30(36) 12075-12083 (2010) 査読有り

Kuba H, Oichi Y & Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na⁺ channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465: 1075-1078. (2010) 査読有り

Kuba, H. and Ohmori, H. Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick. *Journal of Physiology* 2009: 587(Pt1): 87-100. (2009) 査読有り

Eri Nishino and H Ohmori. The modulation by intensity of the processing of interaural timing cues for localizing sounds. *Molecular Neurobiology* 40(2):157-65. (2009) 査読有り

Tomohiko Irie and Harunori Ohmori. Presynaptic GABAB receptors modulate synaptic facilitation and depression at distinct synapses in fusiform cells of mouse dorsal cochlear nucleus. *B BRC* 367:503-508 (2008). 査読有り

Eri Nishino, R. Yamada, H. Kuba, H. Hioki, T. Furuta, T. Kaneko, and H. Ohmori. Sound-Intensity-Dependent Compensation for the Small Interaural Time Difference Cue for Sound Source Localization. *Journal of Neuroscience* 28(28): 7153-7164. (2008) 査読有り

[学会発表] (計21件)

Ohmori H. Sound intensity dependent compensation for the small ITD cue in the chicken. IUPS Congress 2009, Kyoto, July 29, 2009.

[図書] (計1件)

標準生理学第7版、医学書院 (2009)

[その他]

ホームページ

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1603/