

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04122

研究課題名（和文）多光子4Dイメージングによる生後発達期における新生ニューロンの機能的意義の解明

研究課題名（英文）Deciphering functional significance of newly generated neurons at postnatal stage investigated by multi-photon 4D imaging

研究代表者

坂本 雅行（Sakamoto, Masayuki）

京都大学・生命科学研究科・特定准教授

研究者番号：00777865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを含めた哺乳類の生後発達期の脳においてもニューロン新生が起こっており、新生ニューロンは顆粒細胞として嗅球神経回路に組み込まれる。ところが、これらニューロンが匂い刺激に対してどのように応答するかはよく分かっていなかった。本研究では、カルシウムイメージングによって顆粒細胞の機能解析をおこなった。まず、生体4Dイメージング技術を確立し、嗅球の異なる層から活動を記録する方法を確立した。次に、顆粒細胞の活動イメージングをおこない、同じ匂い刺激を繰り返し提示することで顆粒細胞の活動は減衰することが分かった。一方、嗅覚弁別課題においては、顆粒細胞の活動は学習が進むにつれて増大することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症をはじめとする発達障害のメカニズムの解明および治療法の確立は最重要課題のひとつとなっているが、これら多くの病態について、生後発達期～若年成人期におけるニューロン新生低下による高次脳機能障害が示唆されている。したがって、生後発達期に産まれたニューロンの機能について、単一ニューロンレベルあるいはネットワークレベルで理解することは、ニューロン新生の基礎的理解にとどまらず、発達障害などの脳機能障害の治療法の確立し、健康・医療の質の向上のために重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neurogenesis occurs continuously in the mammalian postnatal brain, including humans, and newborn neurons are incorporated into the neural circuit in the olfactory bulb as granule cells. However, it is not well understood how these neurons respond to odor stimuli. In this study, we analyzed the function of granule cells using calcium imaging. First, we established an in vivo 4D imaging technique to monitor activity from different layers of the olfactory bulb. Then, we performed in vivo calcium imaging of granule cells and found that their activity was attenuated by the repeated presentation of the same odor stimulus. On the other hand, the activity of granule cells increased as learning progressed during the go/no-go olfactory discrimination task.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅覚 2光子イメージング カルシウムセンサー 顆粒細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた多くの哺乳類の生後脳においても神経幹細胞が存在し、海馬・歯状回や側脳室周囲・脳室下帯ではニューロン新生が起こっている。新生ニューロンのうち、側脳室周囲・脳室下帯で生まれたニューロンは吻側細胞移動経路を通り、最終的に嗅球の神経回路に顆粒細胞として組み込まれる。ところが、これら嗅球の顆粒細胞がいつ、どのタイミングで機能しているかについてはよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、4Dイメージング技術を創出し、嗅球神経回路における生後発達期に生まれた新生ニューロン(顆粒細胞)の機能的意義を明らかにする。カルシウムイメージングによって嗅覚関連課題中における匂い刺激に対する顆粒細胞の活動の経時的な計測をおこない、顆粒細胞の活動がどのように変化していくかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子にコードされたカルシウムセンサーGCaMP6fを嗅球・顆粒細胞にアデノ随伴ウイルスによって発現させ、2光子励起顕微鏡を用いた生体(*in vivo*)カルシウムイメージングをおこなった。まず、ピエゾを2光子励起顕微鏡に導入し、嗅球の異なる深さから活動を計測可能な実験系の確立をおこなった。次に、頭部固定条件下、2光子励起顕微鏡下で嗅覚学習課題をおこない、匂い刺激に対する顆粒細胞の応答の経時的な計測をおこなった。

4. 研究成果

① 嗅球神経回路における4Dイメージング技術の確立

これまでの嗅球ニューロンの神経活動イメージングは、単一平面(2次元)でおこなわれてきた。嗅球の神経ネットワークや深さの違いによるニューロンの機能を理解するためには、単一平面からの活動計測だけでは不十分であり、深さ情報を含めた3次元レベルでニューロンの活動を同時に記録する必要がある。そこで本研究ではまず、嗅球神経回路のニューロンの活動を多平面で計測するための実験系の確立をおこなった。本研究では、2光子励起顕微鏡にピエゾの導入し、同一個体において房飾細胞(Tufted cell)と僧帽細胞(Mitral cell)の匂いに対する応答を同時に計測する技術を確立した(図1A-C)。その結果、匂い刺激に対する蛍光変化率は、房飾細胞の方が有意に高いことが明らかとなった(図1D)。また、僧帽細胞と房飾細胞の匂い刺激に対する活動の相関について比較したところ、房飾細胞の方が同期発火する割合が高いことも明らかとなった(図1E)。

② 受動的な匂い刺激に対する顆粒細胞の活動計測

先行研究より、嗅覚関連課題における僧帽細胞や房飾細胞の活動パターンは明らかになってきている。しかしながら、これらニューロンの活動を制御する抑制性ニューロンである顆粒細胞

胞の活動パターンについては未だよく分かっていない。そこで次に、嗅覚関連課題中における匂い刺激に対する顆粒細胞の活動の経時的な計測をおこなった。

まず、受動的な匂い刺激に対する顆粒細胞の活動の計測をおこなった。2光子励起顕微鏡下で同じ匂い分子 (Ethyl Tiglate あるいは Heptanal) を用いた刺激を4日間おこない、匂いに対する顆粒細胞の応答の経時的な計測をおこなった (図 2A)。その結果、匂い刺激に対する個々の顆粒細胞の応答は、初日から4日目にかけて徐々に小さくなっていくことが明らかとなった (図 2B, C)。

③ 嗅覚弁別課題中の顆粒細胞の活動計測

次に、2光子励起顕微鏡下で嗅覚弁別課題をおこない、学習の前後における嗅球顆粒細胞の匂いに対する応答の変化について調べた (図 3A)。マウスは学習開始から4-5日程度で識別が困難な2種類の匂いを嗅ぎ分けることができたようになった (図 3B)。学習前後における匂いに応答する顆粒細胞の活動について調べた結果、匂いに応答する顆粒細胞の蛍光変化率は、受動的な匂い刺激とは対照的に、学習に伴って増加することが明らかとなった (図 3C)。以上の結果から、嗅覚弁別課題では顆粒細胞の匂い刺激に対する応答は増大することが分かった。

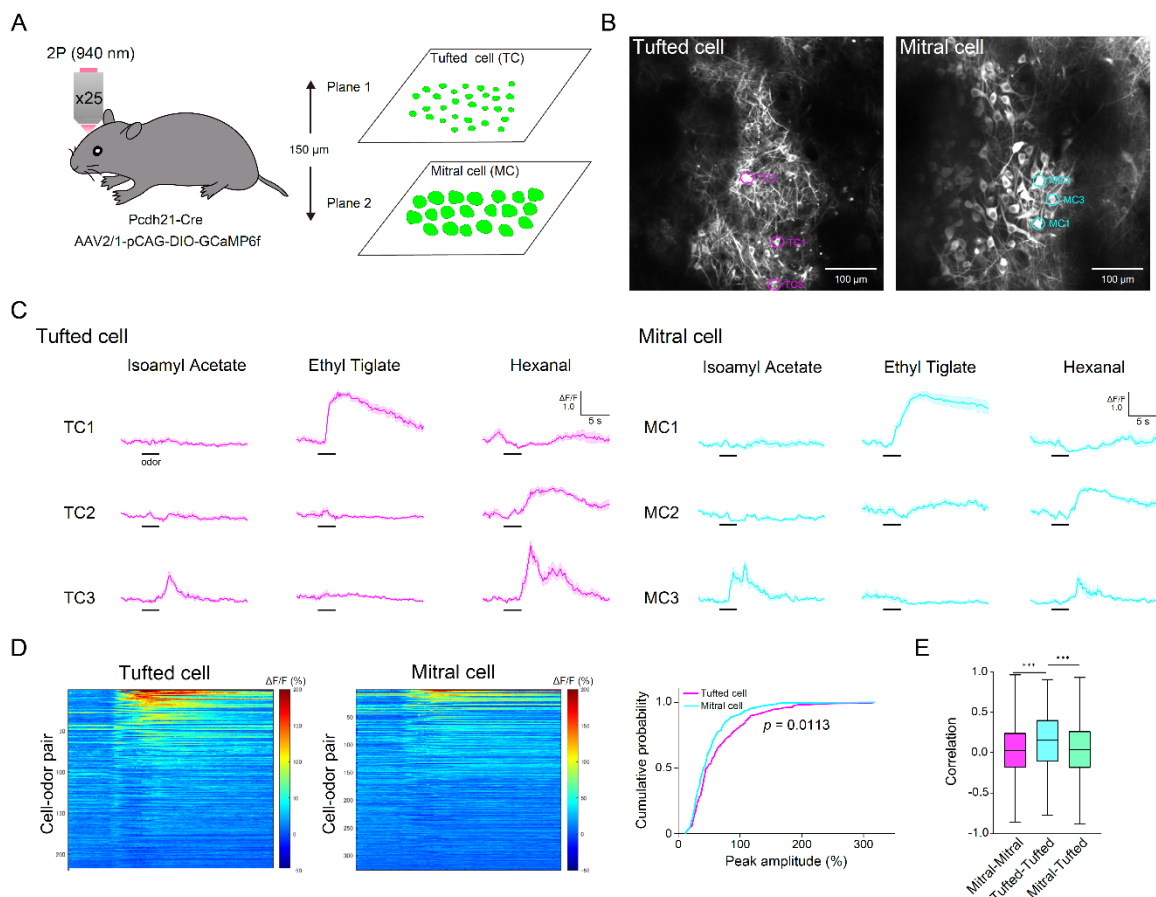


図1 4Dイメージング技術を応用した僧帽細胞と房飾細胞の活動計測

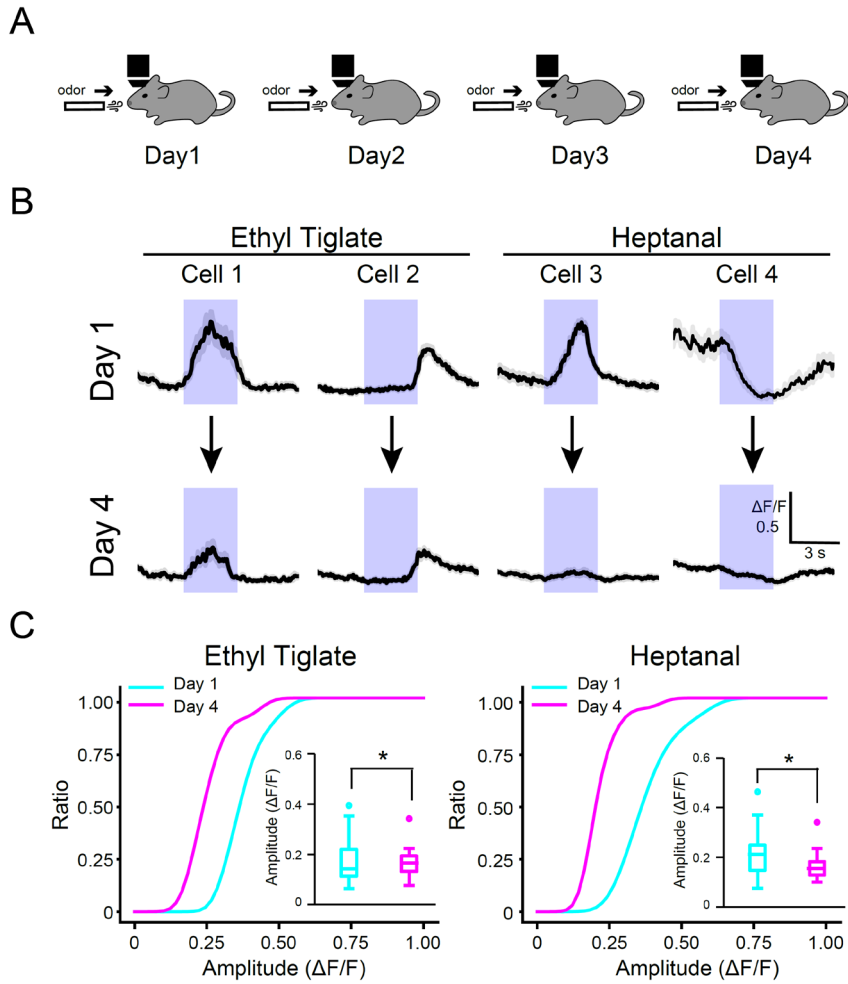


図2 受動的な匂い刺激に対する顆粒細胞の活動計測

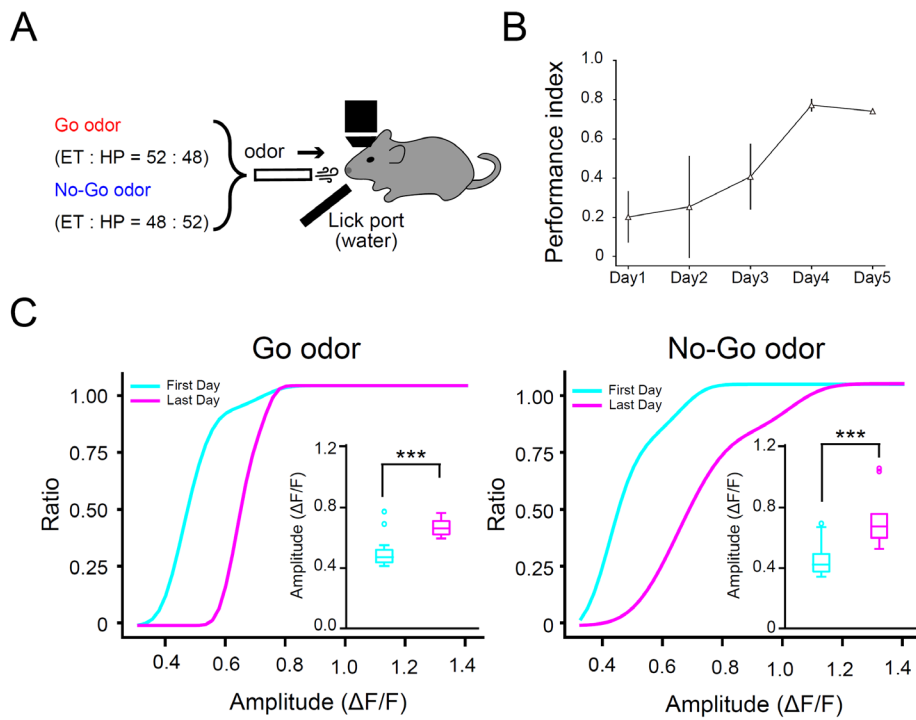


図3 嗅覚弁別課題中の顆粒細胞の活動計測

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yokoyama Tatsushi, Manita Satoshi, Uwamori Hiroyuki, Tajiri Mio, Imayoshi Itaru, Yagishita Sho, Murayama Masanori, Kitamura Kazuo, Sakamoto Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A multicolor suite for deciphering population coding in calcium and cAMP in vivo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.01.06.522686	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Sakamoto Masayuki, Ota Keisuke, Kondo Yayoi, Okamura Michiko, Fujii Hajime, Bito Haruhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 In utero electroporation and cranial window implantation for in vivo wide-field two-photon calcium imaging using G-CaMP9a transgenic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101421 ~ 101421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101421	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 -
1. 著者名 Sakamoto Masayuki, Inoue Masatoshi, Takeuchi Atsuya, Kobari Shigetaka, Yokoyama Tatsushi, Horigane Shin-ichiro, Takemoto-Kimura Sayaka, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Kano Masanobu, Kitamura Kazuo, Fujii Hajime, Bito Haruhiko	4. 巻 2
2. 論文標題 A Flp-dependent G-CaMP9a transgenic mouse for neuronal imaging in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2022.100168	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 -
1. 著者名 Zhang Xiao Min, Yokoyama Tatsushi, Sakamoto Masayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Imaging Voltage with Microbial Rhodopsins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 733829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2021.738829	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 該当する

1. 著者名 Kojima Keiichi, Kurihara Rika, Sakamoto Masayuki, Takanashi Tsukasa, Kuramochi Hikaru, Zhang Xiao Min, Bito Haruhiko, Tahara Tahei, Sudo Yuki	4. 巻 124
2. 論文標題 Comparative Studies of the Fluorescence Properties of Microbial Rhodopsins: Spontaneous Emission Versus Photointermediate Fluorescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7361 ~ 7367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c06560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Imaging voltage and biochemical signaling in vivo
3. 学会等名 Merocyanine 540/Flash meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Fluorescent biosensors for probing neuronal activity and biochemical signaling
3. 学会等名 Cell Biology, Developmental Biology, and Systems Biology Course Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 神経活動可視化のための蛍光プローブの開発と応用
3. 学会等名 東京理科大学 第11回パラレル脳研究部門勉強会・セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Fluorescent biosensors for probing neuronal activity and biochemical signaling
3. 学会等名 Hamburg University - Kyoto University Joint Symposium "Cellular mechanisms of learning and memory" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 神経活動可視化のための蛍光プローブの開発と応用
3. 学会等名 第五回これからの神経回路研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Engineering microbial rhodopsins for genetically encoded voltage indicators
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会JNS-CAN合同シンポジウム「Understanding of synaptic and neural circuits through advanced optical technologies.」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 膜電位感受性プローブを用いた神経活動計測
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会シンポジウム「先端的イメージング技術で読み解く高次脳機能の仕組み」(招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 膜電位感受性プローブを用いた神経活動計測
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 膜電位感受性プローブの開発とその応用
3. 学会等名 鹿児島大学医歯学総合研究科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Imaging voltage in neurons with genetically encoded indicators.
3. 学会等名 生理研記憶研究会 “Synapse and System Plasticity of Learning and Memory”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Genetically encoded voltage indicators and their application.
3. 学会等名 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------