

平成23年3月1日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700372

研究課題名(和文)

無麻酔動物に対する2光子励起イメージング法の適用と脳機能への覚醒作用の解明

研究課題名(英文) The application of two photon excitation imaging to unanesthetised animal and the analysis of awakening brain function.

研究代表者

惣谷 和広 (SOHYA KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・大脳皮質回路可塑性研究チーム・研究員

研究者番号： 80415207

研究成果の概要(和文)：

本研究では、抑制性ニューロンにだけ黄色蛍光たんぱく質を発現する遺伝子改変ラット(VGAT-Venusラット)もしくは遺伝子改変マウス(VGAT-Venusマウス)を用いた *in vivo* 二光子励起機能的カルシウムイメージング法を覚醒下の大脳視覚野の脳機能イメージングに適用し、覚醒状態における大脳皮質一次視覚野における興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの光反応の研究を行った。

研究成果の概要(英文)：

In this study, I applied *in vivo* two-photon functional calcium imaging of VGAT-Venus transgenic rats/mice, in which GABAergic neurons express Venus, a yellow fluorescent protein to the unanesthetized condition. And I analyzed response properties of excitatory and inhibitory neurons in the awakening brain function

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	720,000	4,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1)二光子レーザー走査型顕微鏡(2)カルシウムイメージング(3)大脳皮質視覚野(4)方位(傾き)選択性(5)*in vivo*(6)光反応(7)蛍光タンパク質(8)GABAergic Neuron(抑制性神経細胞)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質神経回路網は、大きく分けて、興奮性ニューロン、抑制性ニューロンとグリア細胞の3種類の細胞から成り立っている。

この中で、近年、大脳視覚野神経回路網の方位選択性といった視覚情報処理の機能発現や大脳皮質視覚野回路網の眼優位可塑性の機能発現に抑制性ニューロンの活動が大きな役割を果たしていることが示唆されている。

しかしながら、今までの研究報告では、脳全体に抑制性ニューロンの活動を阻害する薬を投与したり、動物の視覚を遮断することで大脳皮質視覚野の活動を全体的に抑制することでしか実験が行われておらず、具体的に、実際の抑制性神経細胞のどのような活動や機能が、大脳視覚野神経回路網の方位選択性といった視覚情報処理の機能発現や大脳皮質視覚野回路網の眼優位可塑性の機能発現の何の役割を担っているのか、その詳細は未だ明らかになっていない。

さらに、眠気や注意と言った脳の内部状態に抑制性ニューロンの抑制作用が作用し、覚醒脳の機能に大きく影響を与えることが知られているが、上述した大脳視覚野神経回路網の方位選択性といった視覚情報処理の機能発現や大脳皮質視覚野回路網の眼優位可塑性の機能発現と同様、覚醒脳における大脳皮質視覚野神経回路網の抑制性ニューロンの機能について、その詳細は、明らかになっていない。

今まで、このような疑問が未解明のまま残されてきた理由には、大脳皮質神経回路網内に抑制性ニューロンの存在する割合が少ないこと（大脳皮質ニューロン全体のおよそ20%）、また、従来行われてきた電気生理学的な計測方法（例えば、微小電極法など）では抑制性ニューロンのような小型なニューロンは補足しにくく、さらには興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの混在した少数の神経活動をいわばブラインドでしか計測できず、各々の種類のニューロンを個別に判別しながら同時に計測することは不可能であるという電気生理学的な計測方法の限界が挙げられる。

そこで、大脳皮質視覚野神経回路網における抑制性ニューロンの機能を明らかにするためには、神経回路網の動態、つまり、一つ一つの興奮性ニューロンの活動とそれに結合する抑制性神経回路の機能を神経回路網内の個々のニューロンの空間的な配置と各々のニューロンの機能の観点から、一つ一つのニューロンの活動を計測できる分解能を有した実験系で解析を行う必要がある。

一方、近年の蛍光観察技術の発展により、大脳皮質神経回路網内のニューロン活動を観察する新しい方法が発展しつつある。その中でも、二光子励起法を用いた二光子レーザ

一走査型顕微鏡は、1990年にDenk,Webbらによって生物試料を蛍光観察する新しい方法で、その励起過程のユニークな特色から、試料に対する光障害の少なさ、近赤外のレーザー光源を用いることによる試料の深部に達する断層的な蛍光観察など、その有用性が注目されている。この方法と多点電極計測装置や分子生物学的な手法の融合によって、複雑な大脳皮質神経回路網の解析に強力な手段になることが期待されている。

その中で、*in vivo*の脳標本において二光子レーザー一走査型顕微鏡とカルシウム蛍光指示薬を用いて、ニューロンが活動電位を発生する時に生じるカルシウム上昇をモニターする新しい光学的大脳皮質神経回路網内のニューロン活動の計測方法が開発された（*in vivo*二光子励起機能的カルシウムイメージング法）。これを利用すれば、*in vivo*の生理的な状態において、大脳皮質神経回路網内の多数のニューロン活動の継時的計測及び、大脳皮質神経回路網内に存在する各々のニューロンの空間配置との相関解析などが同時に出来るので、この*in vivo*二光子励起機能的カルシウムイメージング法は、従来行われてきたニューロンの活動を一個からせいぜい数十個のレベルで記録する電気生理学的の限界を克服できる新しい脳機能法として期待されている。

そこで、本研究課題申請者は、2007年に抑制性ニューロン特異的に緑色蛍光タンパク質EGFPを発現する遺伝子改変マウスGAD67-GFP Δ neoマウスにグリア細胞特異的染色色素Sulforhodamine101とEGFP/Sulforhodamine101とは二光子励起波長特性の異なるカルシウム蛍光指示薬Fura-2を用いることによって、マウス大脳皮質神経回路網内の興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、グリア細胞の三種類の細胞群を染め分け、各々の細胞の活動を同時に計測することに成功し、*in vivo*二光子励起機能的カルシウムイメージング法をさらに発展させ、この方法による大脳皮質神経回路網の動態を解析への有用性を改めて報告した。

このような背景の下、今後、*in vivo*二光子励起機能的カルシウムイメージング法にさらに改良を加え、大脳皮質神経回路網内の3次元に配置する抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの活動を同時に捉え、大脳皮質神経回路網の動態を解析することは、脳の機能発現のメカニズムを探求する上で非常に重要な分野となってくることが予想される。さらには、今まで研究課題にすることが困難であった覚醒脳へのアプローチの可能性が考えられ、高次脳機能の基盤となる注意や記憶・学習といった大脳皮質神経回路網の動作原理解明の突破口となることが考えられる。

2. 研究の目的

眠気や注意と言った脳の内部状態は、覚醒脳の機能に大きく影響を与えることが知られており、また、脳の可塑性にも大きく作用することが知られている。しかしながら、その作用機序について、大脳皮質神経回路網内の空間的な構造と機能の関

係や一つ一つのニューロンの分解能を有した大脳皮質神経回路網レベルでの解析はあまり進んでいない。さらに極最近になってその作用メカニズムに抑制性ニューロンが関与する抑制系神経回路の関与が注目されるようになってきたことから、覚醒の大脳皮質神経回路網の動態を明らかにするためには、興奮性神経回路の動態とそれに結合する抑制性回路の機能を神経回路網レベルで探求する必要があると考えられる。

そこで、本研究では、申請者が 2007 年に開発した抑制性ニューロンにだけ蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変動物を用いた *in vivo* 二光子励起機能的カルシウムイメージング法を覚醒下のマウス大脳皮質視覚野の脳機能イメージングに適用し、覚醒下の大脳皮質神経回路網内の興奮性と抑制性ニューロンの活動を同時にイメージングする。これにより、覚醒下のマウス大脳皮質視覚野における大脳皮質視覚野神経回路網内の興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動の同期生や光反応の方位（傾き）選択性を指標に、脳内部の覚醒状態の違いによる神経回路網の活動変動のメカニズム解明を目指すものである。

3. 研究の方法

① *in vivo* 二光子励起機能的カルシウムイメージング法の確立

覚醒脳における抑制性ニューロンにだけ黄色蛍光たんぱく質を発現する遺伝子改変ラット (VGAT-Venus ラット) もしくは遺伝子改変マウス (VGAT-Venus マウス) を用いた *in vivo* 二光子励起機能的カルシウムイメージング法を覚醒下の大脳視覚野に適用し、覚醒脳における興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの光反応を解析する。

② 覚醒状態における大脳皮質視覚野神経回路網における抑制系の活動解析ならび機能解明

脳波計測や活動電位の細胞外記録などの知見から、脳の覚醒状態の違いは、刺激の知覚などに大きく作用し、それは各々のニューロン群の同期活動性に作用していると考えられている。そこで、脳の覚醒状態の違いによって大脳皮質視覚野ニューロン群の自発発火活動の同期性はどのように変動するのか、脳波と *in vivo* 2 光子励起機能的 Ca^{2+} イメージングの同時計測によって明らかにする。そして、さらに同期活動の調節への関与が示唆されている抑制系の機能を探るため、興奮性ニューロン群と抑制性ニューロン群の自発発火パターンなどにどのような違いがあるのか解析する。また、*in vivo* 2 光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング計測後、免疫染色法で、抑制性ニューロンをサブタイプ特異的マーカー抗体で染色することにより、抑制性ニューロンのサブタイプの違いは、機能的

な違いをもつのか詳細に解析する。

③ 覚醒状態における興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの方位（傾き）選択性光反応の解析

本研究申請者によって、麻酔下のマウス大脳皮質視覚野では、抑制性ニューロン群は、興奮性ニューロン群よりも特徴選択性が弱いことが示された (Sohya K, et al. J Neurosci. 2007.)。

そこで、この麻酔下で示されたニューロンの反応性は、脳の覚醒状態の違いによって修飾されることがあるのか、またあるとしたら、注意や覚醒に関係していると考えられているアセチルコリンなどの物質によって作用されるのか、そのメカニズムを解明する。

4. 研究成果

覚醒下の大脳視覚野 2/3 層のニューロン群の *in vivo* 二光子励起機能的カルシウムイメージング法は、麻酔動物の大脳視覚野 2/3 層のニューロン群の *in vivo* 二光子励起機能的カルシウムイメージング法と比較し、非常に不安定で、安定して光反応を記録できない点が問題視された。そこで、画像ゆれ補正プログラムなどを作成し、色々な改良を加え、安定した実験系を構築することが可能となるよう更なる改良を加えた。これにより、安定して覚醒下の大脳皮質視覚野から興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの視覚反応を同時に記録することに成功した (第 33 回日本神経科学大会にて発表)。

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 3 件)

Laminar-specific maturation of GABAergic transmission and susceptibility to visual deprivation are related to endocannabinoid sensitivity in mouse visual cortex.

Jiang B, Sohya K, Sarihi A, Yanagawa Y, Tsumoto T. The Journal of Neuroscience 2010(30) P14261-14272 査読有

Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development.

Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, Kimura F, Washburn C, Zhou R, Ninan I, Tsumoto T, Ziff EB. PLoS One 2010(5) e12486(p1-20) 査読有

Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons.

Kameyama K, Sohya K (equal contribution), et al. The Journal of Neuroscience 2010(30) P1551-1559 査読有

[学会発表] (計 3 件)

Three-dimensional clusters of functional GA

BAergic neurons in the mouse visual cortex.

Ebina T, Sohya K, Yanagawa Y, Tsumoto T. 第33回日本神経科学大会 (日本神経科学学会) 2010年9月2日 神戸国際会議場

Response properties of GABAergic and excitatory neurons in visual cortex of awake rats, revealed by two-photon functional calcium imaging.

Kimura R, Sohya K, Ebina T, Isomura Y, Yanagawa Y, Cateau H, Tsumoto T. 第33回日本神経科学大会 (日本神経科学学会) 2010年9月2日 神戸国際会議場

Differences in binocular responsiveness and ocular dominance plasticity between excitatory and GABAergic neurons in the mouse visual cortex.

Sohya K, Kameyama K, Ebina T, Yanagawa Y, Tsumoto T. 2009年9月17日 名古屋国際会議場

〔図書〕 (計0件)
特に無し。

〔産業財産権〕
○出願状況 (計0件)
特に無し。
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◇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

惣谷 和広 (SOHYA KAZUHIRO)
独立行政法人理化学研究所・大脳皮質回路可塑性研究チーム・研究員
80415207

(2) 研究分担者

特に無し。

(3) 連携研究者

特に無し。