

平成23年3月25日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21800091

研究課題名（和文）

i n v i v o慢性神経活動イメージングによる神経回路の動的再編成過程の観察

研究課題名（英文） In vivo chronic imaging of neuronal circuit plasticity using a genetically-encoded calcium sensor

研究代表者

佐藤 正晃 (SATO MASAOKI)

独立行政法人理化学研究所・シナプス機能研究チーム・研究員

研究者番号： 90518325

研究成果の概要（和文）：

本研究では、神経回路の活動を長期的に観察するためのプローブとなる蛍光カルシウムバイオセンサーGCaMP4を、マウス脳内の大脳皮質第5層と海馬CA1野に安定発現するモデル動物を確立した。このマウスの海馬CA1野を二光子レーザー顕微鏡でイメージングすると、神経回路活動の亢進に伴ってGCaMP4の蛍光が増強することが観察できた。このマウスを今後のイメージング実験に用いることで、学習がひきおこす脳の神経回路活動の変化を、より精密に再現性良く観察することが可能になる。

研究成果の概要（英文）：

To establish chronic in vivo two-photon calcium imaging, we generated transgenic mice that stably express a genetically-encoded calcium sensor GCaMP4 in layer 5 of cortex and CA1 of hippocampus. Our in vivo two-photon imaging confirmed that the fluorescence of GCaMP4 in hippocampal CA1 pyramidal cells of these mice increased rapidly and substantially in response to pharmacologically-induced elevation of neuronal circuit activity. These transgenic mice will thus become a valuable tool for longitudinal imaging studies of learning-induced neuronal circuit plasticity in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,350,000	405,000	1,755,000
2010年度	1,250,000	375,000	1,625,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：蛍光カルシウムバイオセンサー、ウイルスベクター、トランスジェニックマウス、子宮内電気穿孔法、二光子レーザー顕微鏡、記憶・学習、可塑性

1. 研究開始当初の背景

二光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージングは、脳の神経回路内の数十の神経細胞の活動を同時に画像化することができる。このため、多数の細胞のネットワークからなる回路の機能を研究する上で極めて有用な手法となっている。

しかし、この実験の多くは、低分子量カルシウム感受性色素を脳に微量注入することで神経細胞を可視化しており、色素が細胞内に安定して保持される期間がわずか数時間に限られていることから、その適用は急性実験に限られていた。

そのため、学習や感覚経験によって脳の神経回路の活動がどのように可塑的に変化するかを、同一個体の慢性 *in vivo* 二光子カルシウムイメージングで、数日から数ヶ月の間、長期間追跡観察するには、まず、カルシウム感受性蛍光タンパク質のような蛍光カルシウムバイオセンサーを、神経活動をモニターするためのプローブとして、マウスの脳に長期間安定に発現させたモデルを確立する必要があった。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究課題では（1）子宮内電気穿孔法、ウイルスベクター、トランスジェニックマウスなどの外来遺伝子導入法を用いて、蛍光カルシウムバイオセンサーをマウス脳に安定発現したモデルを確立すること、および（2）*in vivo* 二光子イメージングによって、発現した蛍光カルシウムバイオセンサーの正しい動作を確認すること、を目的とした。

3. 研究の方法

蛍光カルシウムバイオセンサーには、細胞内カルシウム濃度の上昇によってその蛍光強度が増強する GCaMP4 を用いた。

GCaMP4 の cDNA は、その開発者である埼玉大学の中井淳一教授から分与していただいた。この GCaMP4 と、遺伝子導入細胞のマーカーとなる赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を 2A ペプチド配列で連結したバイシストロニック発現カセットを用いて、後述のように、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入、ウイルスベクターの構築、およびトランスジェニックマウスの作製を行った。

海馬への子宮内電気穿孔法 (Nakahira and Yuasa, *J. Comp. Neurol.*, 483, 329-40, 2005) は、1 μ g 程度のプラスミド DNA をマウス胎児の脳室内に微量注入したあと、海馬原基の存在する脳室内壁に対し、電気パルス (33V, 50msec を 4 回) をかけて遺伝子を導入した。

ウイルスベクターに関しては、遺伝子発現

量は中程度であるが、感染後の組織反応が少なく長期発現に向くアデノ随伴ウイルス

(AAV)ベクターと、遺伝子発現の開始が早く (感染後 1-2 日で観察可能)、発現量も高いヘルペス単純ウイルス (HSV) ベクターの 2 種類を作製した。海馬への注入は、麻酔した 1-2 ヶ月令のマウスの背側海馬 CA1 野に、持続微量注入ポンプに接続したハミルトンシリンジを用いて、ウイルス液を 1-2 μ l 注入することで行った。

二光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングは、改造したオリンパス社製顕微鏡を用い、ウレタン麻酔下のマウスについて行った。背側海馬 CA1 野のイメージングは、その上にある大脳皮質組織を外科的に除去することで行った (Mizrahi et al., *J. Neurosci.*, 24, 3147-51, 2004)。

4. 研究成果

最初に、子宮内電気穿孔法でマウス胎児の海馬にプラスミド DNA を導入する系を確立した。DNA は胎生 13.5 日令で導入し、CAG プロモーターで発現させた GCaMP4 の蛍光を、生後 1 ヶ月令以降のマウス海馬 CA1 で観察した (図 1)。

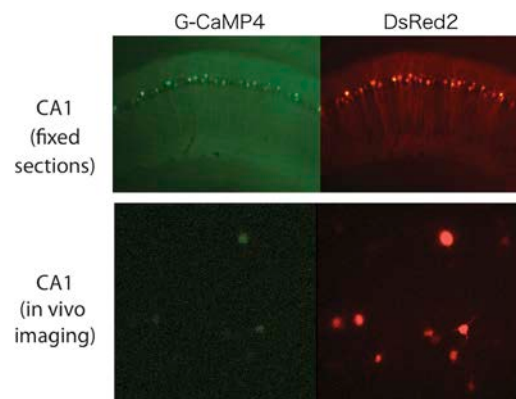


図 1

子宮内電気穿孔法で遺伝子導入したマウス海馬 CA1 野における、GCaMP4 (左) と DsRed2 (右) の発現。上段は固定切片における観察。下段は *in vivo* 二光子イメージングによる観察。この方法では、一細胞あたりの遺伝子発現量は高いが、海馬 CA1 の一部の細胞しか標識されていないことがわかる。

その結果、この方法では、一個体あたりに GCaMP4 で標識される錐体細胞の数が少なく (数個から数十個程度)、また標識される部位にも個体間で大きな差が見られたことから、海馬の背側 CA1 野の回路内のほぼ全ての細胞の活動を画像化することを目的としたカルシウムイメージングには不相当である

と結論した。

次にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターおよび単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターによる遺伝子導入を試みた。

AAV ベクターでは、神経細胞に対する感染性が高いとされる 8 型および 9 型の血清型のベクターを用いた。しかし、これらのベクターでは CMV プロモーターあるいはシナプシン I プロモーターによる GCaMP4 の発現レベルが低く、in vivo イメージングに必要な発現量を得られなかった。

また、HSV ベクターを用いた場合でも、海馬 CA1 野で必要な発現量を安定して得ることは難しかった。さらに HSV ベクターは遺伝子発現が一過性であり、感染後 7 日程度経つと、GCaMP4 の発現が大幅に減弱あるいは消失してしまうため、このベクターも慢性イメージング実験には不相当と結論した。

最後に、トランスジェニックマウスの作製を行った。プロモーターには神経細胞に外来遺伝子を高いレベルで発現することのできる thy 1 プロモーターを用いた。

受精卵注入後に得られた 12 匹のトランスジェニック陽性マウスのうち、2 匹の子孫で海馬 CA1 野の錐体細胞の上半分 (背側) に GCaMP4 と DsRed2 を強く発現するマウスが得られた (図 2)。

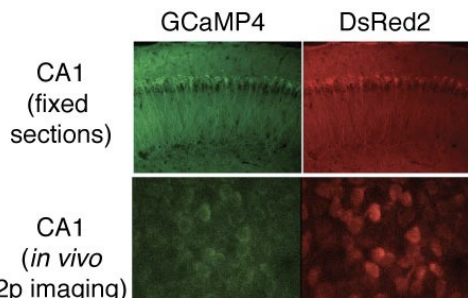


図 2

トランスジェニックマウスの海馬 CA1 野における、GCaMP4 (左) と DsRed2 (右) の発現。上段は固定切片における観察。下段は in vivo 二光子イメージングによる観察。固定切片写真から、GCaMP4 と DsRed2 で二重標識されているのは、海馬 CA1 錐体細胞層の背側の細胞であることがわかる。また in vivo イメージングの写真から、この層に存在するほぼすべての細胞が、GCaMP4 と DsRed2 を共発現していることがわかる。

錐体細胞層の腹側にはトランスジェニックの発現が見られなかった。網羅的遺伝子発現プロファイリングの結果では、マウス海馬の錐体細胞層の背側と腹側は遺伝的に異なる細胞集団に属すると報告されていることから (Thompson et al., Neuron 60, 1010-1021, 2008)、観察された遺伝子発現パターンは、

この 2 つの層の遺伝的な違いを反映しているものと考えられる。また発現レベルは海馬より低いものの、大脳皮質の第 5 層の錐体細胞の一部にも、GCaMP4 と DsRed2 の蛍光が観察された。

次に、これらのマウスの海馬を in vivo 二光子イメージングで観察したところ、海馬の表面から約 150-200um の深さに位置する背側の錐体細胞層において、ほとんどすべての錐体細胞が GCaMP4 と DsRed2 で二重標識されていること観察できた (図 2)。これらの細胞群に GABA 作動性の抑制性入力を遮断する bicuculline を局所投与すると、亢進した神経回路の活動により GCaMP4 の蛍光が増大するのが観察できた。この結果から、トランスジェニックマウスで脳に安定発現した蛍光カルシウムセンサー GCaMP4 は、in vivo でも、神経活動をモニターするプローブとしての活性を保持していることが示された。

慢性イメージングの手技の確立に関しては、以下のことを検討した。はじめに、手術当日のイメージング後に、大脳皮質除去後にできる組織の穴をアガロースで埋め、カバーガラスで上端を封入する方法を試みた。この方法では、術後の組織の健全性を保持することが難しく、組織の浮腫や炎症のために、数日後に同一の細胞をイメージングで同定することが困難であった。

この問題を克服するために、現在はステンレス製の微小リングの一端にカバースリップを接着したイメージング窓を海馬近傍に埋め込むことで、手術後の組織を支持する方法を検討している。今後はこのイメージング窓の埋め込み方法を確立することで、安定した慢性イメージングの手技が確立できるものとする。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 佐藤正晃、河野真子、中井淳一、林康紀 マウス海馬神経回路の構造と機能の in vivo 二光子イメージング Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同大会)、神戸、2010 年 9 月 2-4 日
2. Masaaki Sato, Masako Kawano, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. In

vivo two-photon imaging of
hippocampal CA1 neuronal circuits in
mice. *The 40th annual meeting of the
Society for Neuroscience*, November
13-17, 2010, San Diego, CA, USA

[その他]

ホームページ等

http://glutamate.brain.riken.jp/dokuwiki/doku.php?id=ja:masaaki_sato

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 正晃 (SATO MASAOKI)

独立行政法人理化学研究所・シナプス
機能研究チーム・研究員

90518325

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし