

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300136

研究課題名(和文) 顕微内視鏡を使った小脳顆粒細胞層の In Vivoでの情報処理の解明

研究課題名(英文) In vivo analysis of cerebellar granular cell networks using a micro-endoscope

研究代表者

船曳 和雄 (Funabiki, Kazuo)

公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学・研究副部長

研究者番号：00301234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円、(間接経費) 3,780,000円

研究成果の概要(和文)：我々は細胞レベルの解像度で脳深部回路の神経活動をモニターできる顕微内視鏡を開発し、そのシステムを用いて小脳顆粒細胞層の情報処理機構について解析した。実験には小脳顆粒細胞特異的にCaセンサー蛋白(GCaMP2)を発現させた遺伝子操作マウス(Knopfel研より供与)を用いた。まず予備実験として、小脳顆粒細胞からの神経伝達を可逆的に遮断する事のできる遺伝子操作マウス(Wada et al, 2014,)で、小脳顆粒細胞が関与する眼球運動を同定した。そして、その眼球運動時の小脳片葉での顆粒細胞の活動を顕微内視鏡を用いて観察し、in vivoでの生理刺激により小脳顆粒細胞の活動を可視化した。

研究成果の概要(英文)：We developed a micro-endoscope system which enables in vivo Ca imaging of neural circuits located deep brain area at cellular resolution in head-restricted non-anesthetized mice. We applied this system to the analysis of the cerebellar granule cell networks. We used mutants in which Ca sensor protein (GCaMP2) is expressed only in the cerebellar granule cell layers (Knopfel et al). First, we explored the role of synaptic transmission from the cerebellar granule cells in reflexive eye movements, by using a mutant in which synaptic transmission from cerebellar granule cells can be reversibly blocked in Dox dependent manner(Wada et al, 2014). Next, we conducted in vivo Ca imaging experiments in the cerebellar flocculus, which is known to contribute to the control of reflexive eye movement, and could visualize Ca response of cerebellar granule cells of the flocculus in vivo with physiological stimuli.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学

キーワード：小脳 顆粒細胞 顕微内視鏡 情報処理 学習理論

1. 研究開始当初の背景

小脳皮質の神経回路での情報処理については、今まで小脳皮質唯一の出力細胞である小脳プルキンエ細胞を中心に議論されてきた。これは、プルキンエ細胞が平行繊維経由で顆粒細胞からと、登上繊維経由で下オリーブ核からとの2種類の性格の異なった入力を受けること、そして、前者の平行繊維入力はプルキンエ細胞に単純スパイク (Simple Spike:SS) を、後者は複雑スパイク (Complex spike:CS) を引き起こし、それらを *in vivo* で観察することによりスパイク記録された細胞がプルキンエ細胞であると同定できること、さらに SS、CS、それぞれのスパイク数から顆粒細胞、下オリーブ核それぞれからの入力の状態を計測できるという実験上の利点があったことなどが背景にあると考えられる。一方、小脳顆粒細胞は全脳の神経細胞のなかで最も数の多い細胞 (ヒトでは500億程度) であるが、小脳顆粒細胞の細胞体は5 - 8ミクロン程度と小さく、かつ顆粒細胞層に非常に高密度に分布しているため、*In vivo* では通常金属電極、ガラス電極などで神経活動が記録できない。このため、実際に *In vivo* で小脳顆粒細胞がどのように反応し、どのような役割を担っているのかについてほとんど知見が無かった。

2. 研究の目的

本研究は、覚醒マウスにおいて前庭、視刺激入力に対する反射性眼球運動記録と同時に、それらに参与する小脳片葉顆粒細胞層の時空間的な活動パターンを蛍光顕微内視鏡を用いて *in vivo* で観察・解析することにより、全脳の神経細胞の中でもっとも数が多いがその機能が明らかでない、小脳顆粒細胞の *In vivo* での役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、小脳顆粒細胞からのシナプス伝達を DOX 依存的に可逆的に遮断することのできる遺伝子操作マウス (Wada et al, 2007, PNAS) を用いて、小脳顆粒細胞の *in vivo* での働きを明らかにする。具体的には我々が開発したマウス用の反射性眼球運動測定装置 (Iwashita et al, 2001, Neurosci Res) を用いて DOX on, off により影響の受ける眼球運動とその適応性変化について検討する。そして、顆粒細胞からのシナプス伝達遮断で影響の見られた眼球運動に着目して、顕微内視鏡を用いて小脳片葉での小脳顆粒細胞の神経活動を *in vivo* Ca imaging を行うことで、明らかにする。

4. 研究成果

小脳顆粒細胞からの神経伝達を可逆的に遮断することのできる遺伝子操作マウス (Wada et al, 2007, PNAS) で、小脳顆粒細胞が関与する眼球運動の同定を試みた。具体的には 0.2-1Hz の正弦波状の前庭、視運動性刺激に対する眼球運動 (それぞれ、前庭動眼反射 VOR, 視運動性眼球運動 OKR) のゲインを検討した所、小脳顆粒細胞からのシナプス伝達を遮断しても大きな変化は観察されなかった。これより、観察した範囲の反射性眼球運動には小脳顆粒細胞からのシナプス伝達の寄与は大きくないことが示唆された。一方、視運動性眼球運動の適応性変化 (OKR adaptation) に関しては、小脳顆粒細胞からのシナプス伝達を遮断すると、引き起こすことができなかった。しかし、顆粒細胞からのシナプス伝達を遮断した状態で、OKR の適応性変化のトレーニング (OKR training) を行い、後にシナプス伝達を回復させると、OKR の適応性変化が引き起こされるという結果を得た。これは、小脳顆粒細胞からのシナプスを遮断しても OKR トレーニングの記憶は形成されていること、さらに小脳顆粒細胞からのシナプス伝達は、一旦形成された記憶の表出に必要である

ことを示す結果と考えられる。この小脳顆粒細胞からのシナプス伝達を遮断した状態で形成された OKR トレーニングの記憶の場所についての候補とすると、小脳顆粒細胞と脳幹の前庭神経核が挙げられるが、少なくとも後者に関しては、OKR トレーニング中の小脳片葉電気刺激に対する眼球運動解析から前庭神経核で何らかの変化が生じていることが示唆された。一方、小脳皮質は顆粒細胞からのシナプス伝達を回復させると記憶の表出が起こることから、形成された記憶の表出に必要であると考えられた(Wata et al, 2007, 2014, PNAS)。次に小脳顆粒細胞特異的に Ca センサー蛋白を発現させた遺伝子操作マウス(理研 BSI Knopfel 研より供与)と、我々が開発した顕微内視鏡を用いて小脳片葉での顆粒細胞の活動を観察した。現在論文準備中で、詳細は公開できないが、生理刺激に対する顆粒細胞の Ca 応答を観察し、その生理メカニズムの一旦を明らかにしつつある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件、すべて査読あり)

1 , Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens.

Danjo T, Yoshimi K, Funabiki K, Yawata S, Nakanishi S.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 29;111(17):6455-60.

2 , Role of granule-cell transmission in memory trace of cerebellum-dependent optokinetic motor learning.

Wada N, Funabiki K, Nakanishi S.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 8;111(14):5373-8.

3 , Theoretical foundations of the sound analog membrane potential that underlies coincidence detection in the barn owl.

Ashida G, Funabiki K, Carr CE.

Front Comput Neurosci. 2013 Nov 8;7:151.

4 , Biophysical basis of the sound analog membrane potential that underlies coincidence detection in the barn owl.

Ashida G, Funabiki K, Carr CE.

Front Comput Neurosci. 2013 Nov 8;7:102.

5 , Benign paroxysmal positional vertigo and head position during sleep.

Shigeno K, Ogita H, Funabiki K.

J Vestib Res. 2012;22(4):197-203.

6 , Signal-to-noise ratio in the membrane potential of the owl's auditory coincidence detectors.

Ashida G, Funabiki K, Kuokkanen PT, Kempter R, Carr CE.

J Neurophysiol. 2012

Nov;108(10):2837-45.

7 , Spatio-temporal control of neural activity in vivo using fluorescence microendoscopy.

Hayashi Y, Tagawa Y, Yawata S, Nakanishi S, Funabiki K.

Eur J Neurosci. 2012

Sep;36(6):2722-32.

8 , Computation of interaural time difference in the owl's coincidence detector neurons.

Funabiki K, Ashida G, Konishi M.

J Neurosci. 2011 Oct

26;31(43):15245-56.

9 , Clinical and epidemiological study on inpatients with vertigo at the ENT Department of Kyoto University Hospital.

Ogita H, Taura A, Funabiki K, Miura M, Ito J.

Acta Otolaryngol Suppl. 2010

Nov;(563):34-8.

10 , Clinical study of vertigo in the outpatient clinic of Kyoto University Hospital.

Taura A, Ohgita H, Funabiki K, Miura M, Naito Y, Ito J.

Acta Otolaryngol Suppl. 2010

Nov;(563):29-33.

11 , Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior.

Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S.

Neuron. 2010 Jun 24;66(6):896-907.

12 , Protein kinase G dynamically modulates TASK1-mediated leak K⁺ currents in cholinergic neurons of the basal forebrain.

Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y.
J Neurosci. 2010 Apr
21;30(16):5677-89.

13, TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade.
Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5;107(1):332-7.

〔学会発表〕(計 3 件)

Ichiro Nakahara, Akihiro Goto, Kazuo Funabiki

Development of micro-endoscope for in vivo Ca and FRET imaging.

ARO midwinter meeting San Diego, 2014.2.22

Kazuo Funabiki, Go Ashida, Masakazu Konishi

‘ Computation of Interaural Time Difference in the Owl ’ s Auditory Coincidence Detector Neurons. ’ 35th The Association for Research in Otolaryngology 2012.2.25 SanDiego, USA

Kazuo Funabiki

‘ How the owl ’ s coincidence detectors work? ’

16th Auditory Research Form 滋賀 2011年12月2日

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

船曳 和雄 (FUNABIKI Kazuo)

大阪バイオサイエンス研究所 システム

ズ生物学部門 研究副部長

研究者番号 : 0030123