

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650205

研究課題名(和文) 蛍光電極法を用いた電気生理学研究的な新たな展開

研究課題名(英文) Development and application of Photometric patch electrode application

研究代表者

西野 恵里 (Nishino, Eri)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70523992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光電極法は脳の深部組織において神経活動を電気信号と光信号の2つの信号として同時に記録する手法である。本研究はこの研究手法を開発すると共に、トリの聴覚神経核に応用し、電気活動と関連した細胞内Ca²⁺応答性が神経情報の処理のレベルに応じて変化することを明らかにした。世界的にも例のない極めて挑戦的な研究である。神経情報の処理には、情報伝達と共に様々な可塑的变化が必用とされる。Ca²⁺イオンは神経可塑性に密接に関わる分子でもあり、動物個体における神経情報処理過程の解明には、本研究により有用性を明らかにした蛍光電極法が今後極めて大きな役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Photometric patch electrode (PME) recording system is a unique experimental method that enables us a simultaneous recording of electrical activity and optic response of neurons in deep brain tissue. We have applied this PME recording method to auditory system of avian, and found that pattern of Ca²⁺ response is different depending on the level of integration of auditory information, from a negligible response in the cochlear nucleus, phase locked response in the inferior colliculus to the robust response in the auditory cortex (Field-L). Therefore, this is a challenging, unique and quite powerful new experimental method even international standard. Processing of neuronal information needs continuous plasticity of neural circuits in which Ca²⁺ ions play pivotal roles; therefore the capability of PME to record both electrical signal and optical Ca²⁺ signal simultaneously will make PME recording system to play a significant role in the study of neuronal information processing in living animals.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：神経科学・神経生理学・神経科学一般

キーワード：パッチ電極 オレゴングリーンバプタ 神経細胞 蛍光分光法 聴覚機能 神経回路

1. 研究開始当初の背景

特定の分子に蛍光タンパクを遺伝子導入したり、蛍光トレーサーで神経細胞を標識した動物はこれまでに多く作られてい。これらを用いて蛍光シグナルを計測する既存の手法として、2光子励起顕微鏡がある。これは非常に高解像度で蛍光を画像化できるが、脳表から1ミリ程度の深さまでしか有効でないという限界がある。2光子顕微鏡は神経活動の解析にブレークスルーをもたらすことを期待されているが、深さの制限は2光子励起顕微鏡を用いた研究手法の大きな限界である。

2. 研究の目的

この問題の解決を図るために我々は、先端径数ミクロンの石英ガラス電極を用いた蛍光分光法を開発した。電気活動と同時に蛍光シグナルとして物質動態をモニターできる手法である。本法を蛍光電極法と呼ぶ。蛍光電極法によれば、2光子励起顕微鏡では観測できない脳深部において、蛍光を指標として細胞内Caなどの物質の動きが計測できる。本法は蛍光シグナルの検出と同時に細胞の電気活動記録が可能である優れた実験手法である。生命機能を担う多くの神経活動が脳幹あるいは深部脳組織で行われており、蛍光電極法の応用を生きた個体の脳で試みる。

3. 研究の方法

本研究は、以下の実験を進める過程で、新しい実験手法がどこまで実際の神経回路機能の解明に安定して応用可能かを、脳切片標本および個体脳の聴覚応答を対象として神経細胞の特定と聴覚情報処理におけるCa応答の解析を行う。

平成23年度はOregon Green BAPTA-1 AMにより染色した聴覚神経細胞を用いて、蛍光電極の特性を脳切片標本を用いて明らかにした。さらに動物個体における聴覚神経活動を電気信号および光信号として明らかにする研究を開始した。

平成24年度および平成25年度は、これまで分光器およびCCDカメラを検出系とした高感度のシステムとしての蛍光電極法を改善して、高い時間分解能を持つシステムを作った。その為に光電子増倍管を検出器として用いるシステムを開発し、ソフトウェアはMATLAB上に

構築した。2種類の検出系を目的に応じて使う事で、神経情報の処理回路機構を明らかにする。

4. 研究成果

脳切片標本を用いて、蛍光電極による光検出能力を明らかにした。これは、eCFP-eYFP複合体、Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB1)などの蛍光指示薬を神経細胞に発現あるいは充填し、測光電極を細胞膜に接触させる、さらに細胞膜から離すことでどの程度の光信号強度の変化が起こるかを調べた。蛍光電極を離すことで平均33%の蛍光シグナルの減少が起こった。さらに、長時間の連続したレーザー光照射を神経細胞に与えた場合の蛍光色素の退色過程を分析した。その結果2時間程度の光照射によっても80%までにしか退色しないことが解った。これらの結果は電極を通した光照射が必ずしも効率の良いものではないことを意味する。しかし、シグナルが記録出来た場合には長時間にわたり安定した光信号の記録が出来る事も意味している。

個体脳を用いた細胞内Ca信号と電気信号の同時記録では、ヒヨコの大脳皮質(Field-L)を対象としてOGB1を用いて、聴覚刺激に伴う細胞内Ca濃度変化を記録した。聴覚刺激によってON-OFFのタイミングに応ずる電場電位および対応する時間帯でのCa応答を記録した。分光器-CCDカメラの時間分解能が0.3秒であるので、電気信号との相関は厳密にはとれないが、それでも対応する時間帯での電気信号およびCa信号の記録が出来た。抑制性シナプスは脳神経系で広く活動している。GABA抑制を押さえる意味で蛍光電極を用いてGABAZineをField-Lに局所投与した。すると、極めて大きな電場電位が自発的に生ずると共に、大きなCa応答も重なって記録出来た。自発的な電場活動は聴覚刺激によって生じた電場活動に完全に重なった。これは聴覚活動も自発活動を起こすメカニズムを同様にトリガーする事で電場活動を起こしていることを示唆する。蛍光電極からNMDA受容体の阻害薬であるAP-5をGABAZineと共に投与すると、電場活動は先鋭化し短縮したがCa応答には大きな変化はなかった。一方AMPA受容体の阻害剤であるDNQXを投与すると、時間と共に電場活動およびCa応答は消失した。一連の結果はField-LにおけるCa応答にはNMDA受容体の活性化は大きな関与をしないことを示唆する。

一連の実験では極めて高い相関が電場活動

と Ca 応答間に得られた。しかし、ここでの問題は Ca 応答が 0.3 秒の時間精度であるのに対して、電気活動は m 秒の精度で起こる事である。この問題を解決するために分光器-CCD カメラの組み合わせではなく、光電子増倍管を用いた計測システムを作成した。光電子増倍管の出力は Lock-in アンプでフィルターし m 秒レベルで電気信号と同時にサンプルすることで、Ca 信号と電気信号間での信号サイズあるいは時間経過の相関計測が可能である。この結果、Ca 信号は電気信号の立ち上がりより 80m 秒程度の遅れを持って発生すること、および電気信号を遙かに超える長時間にわたって、持続することが明らかになった。しかし、蝸牛神経核および下丘における Ca 信号の時間経過は Field-L とは大きく異なった。Field-L では持続の長い Ca 応答が引き起こされるのに対して、下丘では位相応答特性が高く音信号の始まりと終わりに 10m 秒程度の時間遅れで応ずる Ca 信号であり、蝸牛神経核においては、Ca 応答は検出できなかった。Ca 濃度の増加は神経細胞の可塑性の発現に重要ではあるが、高すぎる濃度は細胞死を招く。一方蝸牛神経核には高い頻度で聴神経活動が入力する。従って、何らかの抑制機構が働いて蝸牛神経核細胞の Ca 濃度上昇を抑制している可能性が示唆された。一方 Field-L は鳥類の大脳皮質であり神経情報処理の過程で可塑的な応答が求められる。そうした状況の違いに応じて細胞内 Ca イオン動態の違いが生ずるのであろうか？下丘は上行性・下降性の全ての聴覚情報が集積するために、高い可塑性を持つ神経核と思われがちであるが、我々の研究結果では音の刺激持続時間に対応した Ca 応答が観察されただけである。これは下丘はむしろ可塑性の要求の小さな神経核と考えるべきかもしれない。

本研究は蛍光電極を聴覚神経系という脳の深部に展開する感覚情報の処理回路に応用する事により、神経核の取り扱う情報の質に対応して、神経活動および細胞内 Ca 濃度変化の動態が変わりうることを示すことが出来た研究であり、今までの動物個体脳を用いた細胞外電位記録を主とする実験研究では示すことが不可能であった現象である。Ca イオン動態は、シナプス伝達、および可塑性に関連して古くから注目されていることではあるが、神経情報の処理過程の中で神経の電気活動と同時に脳の深部の神経核で捉える事が出来たのは、まさに蛍光電極法の実現と個体脳への導入によって始めて可能となった事である。聴覚系に限

らず、脳の神経機能研究の展開の中で、神経細胞の機能調節に直接結びつく情報伝達物質である Ca イオン動態に注目した、研究が今後大きく発展する可能性があり、本研究は大きな展開の可能性のある新たな研究領域を開く最初の一步となるものである。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

著者 : Yamada R, Okuda H, Kuba H, Nishino E, Ishii T & Ohmori H

標題 : The cooperation of sustained and phasic inhibitions increases the contrast of ITD-tuning in low-frequency neurons of the chick nucleus laminaris.

雑誌 : J Neuroscience 査読有 33巻 2013 3927-3938頁

DOI : 10.1523/JNEUROSCI.2377-12.2013

[学会発表] (計 3 件)

2012. 3/29

第89回日本生理学会大会 長野県松本市
西野恵里・大森治紀

Development of fluoro patch electrode to detect electrical activity and fluorescence spectroscopy from a single neuron

2013. 3/29

第90回日本生理学会大会 東京都江戸川区船堀

西野恵里・大森治紀

蛍光パッチ電極法による電気記録と蛍光信号の同時計測

Improvement of fluoro-patch-electrode for recording calcium fluorometry and electrical activity from a single neuron

2014. 3/16

第91回日本生理学会大会 鹿児島市郡元
平井康治・西野恵里・大森治紀

測光パッチ電極を用いた膜電位感受性FRET応答と細胞外スパイク電流記録の試み

Attempts to record voltage sensitive FRET signal and extracellular spike current from neuron using a photometric patch electrode

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

本研究に特化したホームページ等はない。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 恵里 (Nishino Eri)

研究者番号：70523992

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし