

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2012～2013

課題番号：24700401

研究課題名（和文）小脳プルキンエ細胞群が形成する矢状クラスターの機能的意義

研究課題名（英文）Functional significance of parasagittal clusters formed by cerebellar Purkinje cells

研究代表者山田 義之（Yamada Yoshiyuki）

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：80553685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円、（間接経費） 1,020,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、*in vivo* 2光子イメージングを用いて、マウス・プルキンエ細胞群が形成する矢状クラスターを蛍光タンパク質により可視化した上で、Ca²⁺色素によりプルキンエ細胞群の活動を単一細胞レベルで記録するための実験系の構築を試みた。麻酔下のマウスにおいて、プルキンエ細胞群の自発活動および感覚応答を記録し、矢状クラスターとの関係を解析するための実験系確立に成功した。

研究成果の概要（英文）：Parasagittal clusters formed by cerebellar Purkinje cells were visualized by fluorescent protein introduced by adenovirus vector, the activity of which were monitored by *in vivo* Ca²⁺ imaging. Spontaneous activity and sensory responses of Purkinje cells were successfully recorded with a single-cellular resolution and in reference to the parasagittal clusters.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学・脳神経科学

キーワード：小脳、神経回路、*in vivo*、2光子イメージング、Ca²⁺イメージング

1. 研究開始当初の背景

小脳は、運動学習において重要な役割を果たしていることが知られており、限られた種類の細胞が整然と配列した組織であることから、神経回路網研究のモデルシステムとして優れた標本である。

小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は、下オリーブ核および橋核から入力を受け取り小脳核に出力を送るが、共通の入出力線維を持つプルキンエ細胞群は複数の小葉をまたいで矢状方向にクラスターを形成することが知られている（Apps&Hawkes 2009 Nat. Rev. Neurosci.）。一方、zebrinIIをはじめとする様々な分子が特定のプルキンエ細胞群のみに発現し、その発現パターンも矢状クラスター構造を示すことが明らかにされている（Herrup&Kuemerle 1997 Annu. Rev. Neurosci.）。さらに、発生的にも同じ日に分化したプルキンエ細胞は矢状クラスター

を形成すること（Hashimoto&Mikoshiba 2003 J. Neurosci）、そのクラスターは上述のzebrinIIの染色によって示される矢状クラスターと高い相関を示すこと（Namba et al. 2011 J. Comp. Neurol.）、が近年明らかになった。他方、*in vivo*細胞外記録による活動解析からも、小脳における感覚応答時の刺激選択性が矢状方向で高い相関を示すことが分かり、小脳は生理学的・機能的にも矢状方向にクラスターを形成している可能性が示唆されている。

以上のように、小脳の基本的な構成単位として矢状クラスターが存在することは、解剖学的・分子生物学的・生理学的手法からそれぞれ独立に示唆されており、これらが互いどのような関係にあるかを解明することは小脳の機能構築を理解する上で極めて重要な課題である。先行研究から、解剖学的クラスターと他のクラスターの関係は調べられ

ているが、これらがどのような機能的意義を持つかについては、未解決の点が数多く残されている。

この問題に取り組むためには、矢状クラスターを同定した上で、同一の標本においてプルキンエ細胞群の活動を高い空間分解能でマッピングすることが必要になるが、従来主に用いられてきた電気生理学的記録手法では、1) 記録している細胞の位置を正確に知ることができない、2) 同時に記録できる細胞数が限られている、という技術的制約が大きな障壁となっており、その解決が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、小脳プルキンエ細胞群が構成する解剖学的な矢状クラスター構造が小脳の機能的ユニットであるという仮説を検証するために、矢状クラスターを同定した上でプルキンエ細胞群の活動を単一細胞レベルで記録するための実験系を構築することを試みた。これにより、活動の空間パターンを高い解像度でマッピングし、矢状クラスターの機能的な均一性・独立性を解析することにより、小脳の機能構築を理解するための基礎的知見を得ることを目的とした。

具体的には、高い空間分解能を持った神経活動記録法、すなわち *in vivo* Ca²⁺イメージング法 (Stosiek et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA) を導入することにより、上記問題の解決に取り組んだ。近年確立された *In vivo* Ca²⁺イメージング法は、脳組織の深部まで観察することができる2光子励起顕微鏡と、生きた動物脳内の細胞群に Ca²⁺感受性色素を導入する bolus loading 法とを組み合わせた手法であり、神経細胞の活動に伴う細胞内 Ca²⁺濃度上昇を記録するため、時間的分解能は電気生理学的手法に劣るものの、1) 神経細胞を可視化した上でその活動を記録できること、2) 多数の神経細胞から同時に応答を記録できること、が大きな利点であり、本研究の目的に最適の手法である。

本研究では、まずプルキンエ細胞群が形成する分子生物学的な矢状クラスターを蛍光タンパク質で可視化すると同時に、*in vivo* Ca²⁺イメージングを用いてプルキンエ細胞群の活動を単一細胞レベルで記録するための実験系を確立した。その上で、プルキンエ細胞群から記録した自発活動および感覚応答の空間的パターンを解析することにより、矢状クラスターが機能的ユニットであるという仮説の検証を試みた。

具体的には、以下の点を明らかにすることを目指した。

1) 矢状クラスターの機能的均一性：

- ・同一クラスター内に属するプルキンエ細胞

間で、自発活動および感覚応答に相関はあるか。

- ・クラスター内部にさらに小さな機能的な秩序構造 (サブクラスター) が存在するか。

2) 矢状クラスターの機能的独立性：

異なるクラスターに属するプルキンエ細胞間で、自発活動および感覚応答に相関はあるか。

3. 研究の方法

本研究では、分子生物学的手法と生理学的手法を融合させた新しい実験系を構築して解析を進めることにより、神経回路網の研究において長年未解決だった問題の追究を試みた。

(1) アデノウイルスベクターによる誕生日特異的な遺伝子導入法

特定のプルキンエ細胞群が形成する矢状クラスターを蛍光タンパク質により可視化できるマウスを作成し、二光子励起顕微鏡による *in vivo* Ca²⁺イメージングを行なう系を確立した。先行研究から、プルキンエ細胞が分化する胎生 10~12 日目のマウス胎児脳室にアデノウイルスベクターを注入することにより、共通の誕生日を持つ矢状クラスターを形成するプルキンエ細胞群に特異的に遺伝子導入できることが示されている (Hashimoto&Mikoshiya 2003 J. Neurosci.)。本研究ではこの手法に着目し、条件の最適化を行なうことにより、実験効率を改善した。

(2) *In vivo* Ca²⁺イメージングによるプルキンエ細胞群の活動記録

(1)で作成したマウスの皮膚・頭蓋骨を麻酔下で切除し、小脳に細胞膜透過性の Ca²⁺感受性色素を bolus loading 法で投与することにより、プルキンエ細胞群の活動を *in vivo* 二光子イメージングにより記録する。先行研究から、複雑スパイク (下オリブ核からの投射線維である登上線維入力時にプルキンエ細胞が示す電氣的シグナル) に対応したシグナルを *in vivo* Ca²⁺イメージングにより記録できることが分かっている (Ozden et al. 2009 J. Neurosci.)。蛍光タンパク質と Ca²⁺感受性色素のシグナルを別々に記録するためには、励起または蛍光波長が十分に離れている組合せを選択する必要がある。まずは先行研究で用いられている組み合わせ (例：RFP と Oregon Green BAPTA-1 AM ; GFP と Fura-2 AM など) を実際に試して条件検討を行ない、最適な組合せを選択した。

(3) プルキンエ細胞の活動記録とデータ解析

動物に何も刺激を与えていない状態でのプルキンエ細胞の自発活動、および皮膚への電気刺激やヒゲへの air puff 刺激を与えた際の感覚応答を記録する。データ解析においては、特に以下の点に着目する。

① 矢状クラスターの均一性

矢状クラスター内に属するプルキンエ細胞が同期した自発活動を示すか、同一の体部位刺激に応答するか否か（受容野の共通性）、同一クラスター内部でプルキンエ細胞の応答の相関性がどの程度保たれているか（クラスター内の均一性、サブクラスターの有無）を調べる。

② 矢状クラスターの独立性

異なるクラスターに属するプルキンエ細胞間で応答を比較することにより、各矢状クラスターが機能的に独立しているか否かを調べる。

③ 個体間での再現性

複数の個体間で矢状クラスターを参照にプルキンエ細胞の応答マップを比較し、受容野の特徴をはじめとする矢状クラスターの機能性が個体間でも保たれているか否かを調べる。

4. 研究成果

アデノウイルスベクター子宮内注入法による誕生日特異的遺伝子導入技術を用いて、プルキンエ細胞の矢状クラスターに蛍光タンパク質を発現するマウスの作成に成功した（図1）。

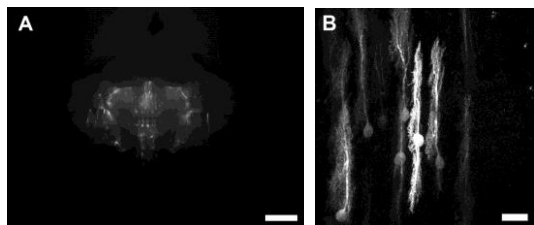


図1. 蛍光タンパク質による小脳プルキンエ細胞の矢状クラスターの可視化

A. Whole-mount 低倍率画像。Scale: 1 mm
B. *In vivo* 二光子励起顕微鏡で取得した高倍率画像（XY 平面への最大輝度値投影像）。Scale: 50 μm

次に、*in vivo* 2光子イメージングのセットアップ・実験手技を確立した。小脳を覆う頭蓋骨は比較的曲率が高く、頭蓋骨切除、ヘッドプレートの取り付けを含めた外科手術に習熟し、条件を最適化する必要があった。Ca²⁺イメージングは、上記蛍光タンパク質（赤色）と励起/蛍光波長の重なりが小さい緑色色素（Oregon Green BAPTA-1 AM）を bolus loading 法で投与することにより行なった。

上記を組み合わせることで、麻酔下のマウスにおいて、プルキンエ細胞の矢状クラスターを同定した上で、自発活動および感覚応答を *in vivo* で記録する実験系の確立に成功した（図2）。

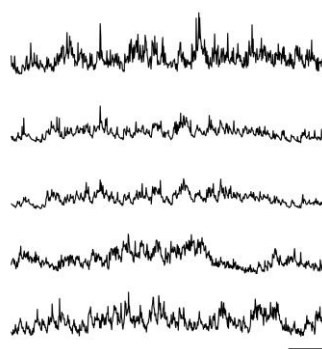


図2. マウス小脳プルキンエ細胞の自発活動 *in vivo* 2光子イメージング
イソフルラン麻酔下マウスより記録した自発応答。5細胞から記録（Scale: 400%, 10 s）。

ただし、複数の個体において実験を繰り返す過程で、矢状クラスターにおける蛍光タンパク質の発現量・発現パターンが個体間で大きく異なる場合があるため、複数の個体から得られたデータを集積する際に問題が生じることが判明した。アデノウイルスベクターの子宮内注入法では、ウイルスの注入量・注入部位・拡散の正確な制御が困難であることが原因であると推定された。今後はウイルス注入に代わる手法として、矢状クラスターに蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスまたはノックインマウスを作成し、本研究で確立した *in vivo* Ca²⁺イメージングと組み合わせることでこの問題を解決するための有効な方法になると考える。

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 2 件）

- ① Tsutsui, H., Jinno, Y., Tomita, A., Niino, Y., Yamada, Y., Mikoshiba, K., Miyawaki A., and Okamura Y. (2013) Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase. *J. Physiol.* 591:4427-37. 査読有

- ② **Yamada, Y.** and Mikoshiba, K. (2012). Quantitative comparison of novel GCaMP-type genetically encoded Ca^{2+} indicators in mammalian neurons. **Front. Cell. Neurosci.** 6:41. doi: 10.3389/fncel.2012.00041 査読有

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 義之 (YAMADA YOSHIYUKI)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：80553685