

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14315

研究課題名(和文)自由行動下での標的細胞特異的な細胞内記録技術の開発

研究課題名(英文)Development of measuring neural activity in a freely behaving animal

研究代表者

渡邊 大(Watanabe, Dai)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90303817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：認知行動課題を実行中の動物個体から脳の電気的活動を計測することは、脳機能を理解する上で、最も直接的かつ基本となる技術である。さらに脳のマクロ的な機能をシナプスが媒介する微細な神経情報と結びつけて理解するためには、活動電位だけではなくシナプス電位等の閾値以下の微弱な電位変化を計測し、高次脳機能を担う神経活動の生成プロセスを明らかにすることが重要である。しかしながら、従来の電気生理学機器は巨大で携帯性が悪く、非拘束下の行動中の動物個体での計測は困難であった。本研究では、自由行動下の生体の脳から閾値以下の微細な神経活動を計測する細胞内記録システムを開発した。

研究成果の概要(英文)：To measure electrical activity of the brain while a model animal is conducting cognitive-behavioral tasks is one of the most fundamental techniques for studying the brain function. To further understand how the neurons integrate synaptic inputs and generate action potentials, it is important to measure not only action potentials but also sub-threshold small potentials such as postsynaptic potentials. However, it is very difficult to measure sub-threshold potentials in a freely behaving animal, because the conventional electrophysiological devices for measuring sub-threshold potentials is very large and not suitable to the neural recording of behaving animals. In this study, we developed a small and light-weight electro-physiological device which enables us to conduct intracellular recording to detect sub-threshold postsynaptic potentials.

研究分野：神経科学

キーワード：電気生理学 細胞内記録 光学的計測

1. 研究開始当初の背景

自由行動下のモデル動物から単一神経細胞の神経活動を計測する技術は、海馬における place cell の発見が示すように、高度な認知プロセスや脳機能の理解に欠かすことはできない。研究代表者らは、ヒトと同様に音声スキルを学習するソングバードにも、従来ヒトのみに可能と考えられていた文法規則による音声の識別能力があることを見だし (Abe and Watanabe, *Nature Neuroscience* 2011)、さらに独自に開発した超小型の神経活動計測機器を用いて、音声コミュニケーション中のソングバードの脳から単一神経細胞の活動を計測することで、文法情報をコードする音声制御系神経細胞の同定に成功した (Fujimoto et al., *Journal of Neuroscience* 2011)。海馬や鳥類音声制御系よりはるかに多様な神経細胞により構成される大脳皮質神経回路の解析に、このような生体での単一神経細胞レベルの電気活動計測技術を適用するためには、各神経細胞の細胞タイプの特異性に基づき解析することが重要となる。

光遺伝学による細胞機能操作技術の登場により、チャンネルロドプシンなど光駆動性タンパク遺伝子を導入することで、特定の細胞種選択的に電気活動を誘導することを利用して、その神経細胞を同定することが可能となりつつある。しかしながら、行動中の動物個体の解析で使われてきた従来の細胞外記録法では、検出した電気活動が遺伝子導入した神経細胞由来か、或いは、これらと連絡する他の神経細胞由来かを正確に区別することは困難であり課題も多い。また自由行動下の神経活動計測技術の多くは、活動電位検出を目的としており、シナプス電位など閾値以下の微弱な神経活動の計測は極めて困難であり、実際の生体の中で神経細胞の活動電位生成に関わるプロセスについて不明な点が多い。

2. 研究の目的

認知行動課題を実行中の動物個体から脳の電氣的活動を計測することは、脳機能マップ作成において最も直接的かつ基本となる技術である。さらに脳のマクロ的な機能をシナプスが媒介する微細な神経情報と結びつけて理解するためには、活動電位だけではなくシナプス電位等の閾値以下の微弱な電位変化を計測し、高次脳機能を担う神経活動の生成プロセスを明らかにすることが重要である。しかしながら、従来の電気生理学機器は巨大で携帯性が悪く、非拘束下の行動中の動物個体での計測は困難である。

そこで本研究の第一の目的として、自由行動下の生体の脳から閾値以下の微細な神経活動を計測する細胞内記録システムを開発する。微小な神経の電気信号を増幅するヘッドステージ、ガラス電極を細胞内へ刺入するためにサブミクロンの精度で動作するモーター駆動式マイクロドライブを一体化した計測システムを開発する。

次に光遺伝学技術を組み合わせて、ターゲットとなる神経細胞を正確に同定する技術も包括した計測技術へ発展させる。

3. 研究の方法

・超小型軽量の細胞内記録用マイクロドライブの開発:

電流固定アンプ用のヘッドステージ (神経信号の増幅回路)、超小型モーター付マイクロドライブおよびその制御システムの電子回路を作成し、3Dプリンティング技術により作成した樹脂製のシステムへ組み込みを行なった。モーターは Micromo 社製のブラシレスモーターを使用した。

吸入麻酔下に動物の頭皮を切開し、頭蓋骨に bar hole を設置し、マイクロドライブをデンタルセメントにより固定した。

マイクロドライブのヘッドステージは、電気生理用アンプ (Axonclamp 2A or 2B、Molecular Devices、Sunnyvale CA USA) と接続して、current clamp mode で制御可能とするために、Axon Instruments の HS-2A ヘッドステージと同等の仕様とした。

・光学的技術の開発:

光遺伝学的操作・光計測用のオプティカルファイバーの両端は、ベアファイバ研磨機 (Oshima OPBF-03、雄島試験製作所、武蔵野市) により研磨し、光源光学系に組み込みを行なった。光源としては、レーザー光源 (Coherent OBIS、Santa Clara CA, USA) および LED 光源 (Lumencore SPECTRA light engine、Beaverton OR, USA) を使用した。レーザー光源の場合、光源の ON/OFF のために音響素子を光路に設置した。

4. 研究成果

1. 細胞内計測技術の開発:

開発したマイクロドライブの概略を図 1 に示す。研究代表者らは、これまでも有線方式およびワイヤレス方式の超小型のモーター付きのマイクロドライブを作成し、遠隔操作により電極のポジションをコントロールすることで自由行動下の動物個体から単一細胞精度の神経活動計測を実施してきた (Fujimoto et al., 2011 *Journal of Neuroscience*; Hasegawa et al., 2015 *Scientific Reports*)。これらのマイクロドライブ技術と同様のモーター制御機構を用いて、ガラス製の記録電極の動きを制御する方式とした。マイクロドライブ本体のパーツ数を減らし、かつ重量を軽減するために、3Dプリンターにより作成した。連携研究者の濱口らが報告 (Hamguchi et al., 2016 *Neuron*) したように、電気生理実験用のアンプとの接続を前提として、閾値以下の膜電位測定に必要な低ノイズのヘッドステージの電子回路の設計および回路基板を開発した。以上により、アンプ側から電流固定 (current clamp) が可能となっている。

動物頭部に設置したマイクロドライブと電気生理機器およびモーター制御機器を接続するケーブルが過度にねじれて動物の行動を阻害しないように、コミューターの作成も併せて実施した。ケーブルのねじれを感知するセンサーを設置し、ねじれが解消するように自動的に機器側のケーブル端子が回転する。

以上の細胞内記録システムを使って、麻酔下および自由行動下の動物個体（ソングバード）より細胞内記録実験を行なった。その結果、活動電位及びシナプス後電位と考えられる閾値以下の電位変化の記録に成功した（data not shown）。

2. 光学的手法による細胞同定技術

電気生理学的な生体での神経活動計測手法の欠点として、計測している細胞のタイプを同定することが困難であることが挙げられる。比較的神経細胞が均一な海馬等の領域は別として、多様な神経細胞から構成される大脳皮質のような領域については、正確に細胞タイプピンングした上で計測する技術を開発する必要がある。

オプティカル・ファイバーを使って、光遺伝学的な神経活動操作可能なデバイスの作成を行なった。光源としては、レーザー光源（Coherent OBIS, Santa Clara CA, USA）および LED 光源（Lumencore SPECTRA light engine, Beaverton OR, USA）の比較を行なった。特定部位へピンポイントに照射する場合、両者に大きな差はなく、より光量の大きな光源が選択可能なレーザー光源が有利といえる。一方、照射領域に広がりやを要求する場合、レーザー光源では単波長レーザーの干渉により生じるスペックル・パターンが出現する。したがって、光操作に加えて、光計測による2Dの画像取得も考慮する場合には、この点を考慮して設計する必要がある。今後は、これらの知見を生かして、マイクロドライブと組み合わせ可能になるように、光学的デバイスの小型化をすすめていく。

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 4 件）

- Tohyama, T., Kinoshita, M., Kobayashi, K., Isa, K., Watanabe, D., Kobayashi, K., Liu, M., and Isa, T. (2017) Contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after corticospinal tract lesions in monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 114, 604-609. DOI: 10.1073/pnas.1610787114 (査読有)
- Deguchi, Y., Harada, M., Shinohara, R., Lazarus, M., Chérasse, Y., Urade, Y., Yamada, D., Sekiguchi, M., Watanabe, D., Furuyashiki, T., and

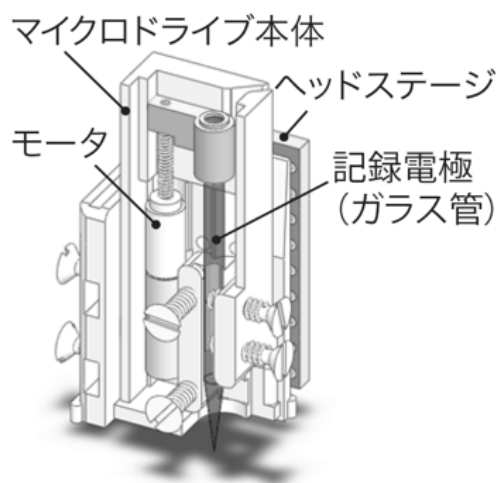


図 1: マイクロドライブの外観。モータの駆動力を増大させるために、モータの出力軸は遊星ギアと直結している。遊星ギアの出力軸には記録電極を装着した「シャトル」が設置されており、出力軸が回転することで、記録電極は上下に移動する。

- Narumiya, S. (2016) mDia and ROCK Mediate Actin-Dependent Presynaptic Remodeling Regulating Synaptic Efficacy and Anxiety. *Cell Rep.* 17, 2405-2417. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.088 (査読有)
- Imamura, K., Sahara, N., Kanaan, N. M., Tsukita, K., Kondo, T., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Kawakami, K., Hotta, A., Yawata, S., Watanabe, D., Hasegawa, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y., Suhara, T., Higuchi, M., and Inoue, H. (2016) Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. *Sci. Rep.* 6, 34904. DOI: 10.1038/srep34904 (査読有)
 - Abe, K., Matsui, S., and Watanabe, D. (2015). Transgenic songbirds with suppressed or enhanced activity of CREB transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 7599-7604. DOI: 10.1073/pnas.1413484112 (査読有)

〔学会発表〕（計 6 件）

- 安部健太郎、渡邊 大（ポスター） CREB-mediated interplay of genes and environment in the postnatal song learning in songbirds. Neuroscience 2016 (Society for Neuroscience). 2016.11.12-16. San Diego Convention Center (USA).
- Takamichi Tohyama, Masaharu Kinoshita, Kenta Kobayashi, Kaoru Isa, Dai Watanabe, Kazuto Kobayashi, Meigen Liu, and Tadashi Isa. (ポスター) Contribution of propriospinal neurons

to recovery of hand dexterity after corticospinal tract lesions in monkeys. Neuroscience 2016 (Society for Neuroscience). 2016.11.12-16. San Diego Convention Center (USA).

3. 渡邊 大 (招待講演) The Science of Birdsong. 科学と音楽の出会い(チャンネル). 2016.9.24.、京都大学清風荘(京都府・京都市).
4. 渡邊 大 (講演) Genetic and neural circuit basis of learned vocalization. 新学術領域「適応回路シフト」国際シンポジウム. 2016.3.3. 同志社大学寒梅館(京都府・京都市).
5. 渡邊 大 (講演) 社会学習によるスキル獲得の神経機構. 国際高等研究所研究プロジェクト「精神発達障害から考察する decision making の分子的基盤」. 2016.1.30-31. 国際高等研究所(京都府・木津川市).
6. 渡邊 大 (講演) 音声スキル獲得・制御の神経回路機構. 生理研研究会「大脳皮質の機能原理を探る」. 2015.12.3-4. 岡崎カンファレンスセンター(愛知県・岡崎市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

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 0 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

<http://www.phy.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 大 (Dai Watanabe)

(京都大学・医学研究科・教授)

研究者番号：90303817

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

濱口 航介 (Kosuke Hamaguchi)

(京都大学・医学研究科・講師)

研究者番号：50415270

(4) 研究協力者

()