

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650083

研究課題名（和文） 大脳感覚シナプス入力の可視化

研究課題名（英文） In vivo imaging of sensory synaptic inputs in neocortex

研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA KAZUO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60423159

研究成果の概要（和文）：大脳体性感覚野バレル皮質の第2/3層錐体細胞からホールセル記録を行い、基底樹状突起および尖樹状突起においてカルシウムイメージングにより単一スパインレベルのシナプス入力を可視化し、自発活動および洞毛刺激に対する応答を記録した。個々のスパインの活動を見ると、約80%の入力がわずか25%のスパインに限局している事がわかった。また、空間的に近傍に位置するスパインは同期した入力を受ける確率が高いことがわかった。すなわち、機能的に共役しているニューロン集団は、投射先ニューロンの樹状突起上で近い位置に入力することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We performed simultaneous whole-cell patch-clamp recordings and two-photon calcium imaging in layer 2/3 of mouse barrel cortex in vivo. Calcium signals in individual spines of layer 2/3 pyramidal cells induced by spontaneous and sensory-evoked activities could be clearly observed. We found that approximately 80% of synaptic inputs were localized only in 25% of total spines. Furthermore, we found that nearby spines were tended to be activated simultaneously. Thus, our results suggest that functionally coupled neurons innervate to nearby spines in dendrites of postsynaptic pyramidal neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：ニューロン、シナプス、2光子イメージング、シナプス統合、樹状突起

1. 研究開始当初の背景

マウス大脳バレル皮質錐体細胞において、2光子イメージングを用いた in vivo ホールセル記録とカルシウムイメージングを行い、

個々の感覚シナプス入力、すなわち洞毛からの感覚入力が、細胞内および樹状突起内においてどのように分布しているのかを直接可視化する。同一の刺激に対して、個々のシナ

プス入力がどの程度の信頼性を示すのかを明らかにし、シナプス入力にシナプス後部スパインの形態やネットワーク活動とどのように相関しているかを明らかにする。さらに、異なる刺激を与えた時の、これらの感覚シナプスの入力パターンの変化を観察し、感覚入力が脳内の単一ニューロンでどのように統合されているのかを明らかにする。これらにより、大脳感覚野の単一ニューロンにおける情報処理のメカニズムが解明されると期待される。

申請者は、これまで個体脳における単一ニューロンの機能、特に樹状突起におけるシナプス統合メカニズムを明らかにするために、2光子イメージングとホールセル記録を組み合わせた実験系の開発を行い、マウスやラットの個体脳において従来法に比べて格段に効率よくホールセル記録を行う方法の開発に成功した(Shadowpatching法; Nature Methods, 2008; Nature Protocols, 2009)。さらに、この方法を用いることで、大脳皮質第2/3層錐体細胞において、単一の感覚シナプス入力をカルシウムシグナルとして捉えることに世界で初めて成功した。これらの技術開発によって、細胞内における感覚シナプス入力の空間的配置に依存したシナプス統合メカニズムを解析できる道が開かれたことになり、本研究では、シナプス入力に単一ニューロン内でどのように統合されているのかを明らかにしていく。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を踏まえ、大脳パレル皮質第2/3層錐体細胞において、洞毛からの感覚シナプス入力、どのような時空間パターンで入力するのかを定量的に明らかにし、これらの入力パターンがニューロンの微細形態(スパイン)やネットワーク活動とどのように相関しているかを明らかにする。また、同様の実験を異なる刺激を組み合わせることで、異なる感覚刺激の情報が単一ニューロン内でどのように表現されているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

麻酔下マウス大脳皮質パレル野において、shadowpatching法を用いて、ホールセル記録とカルシウムイメージングを同時に行う。脳内の細胞外領域に蛍光色素を導入し、個々のニューロンの「影」を可視化することで、錐体細胞から選択的にホールセル記録を行う。単一スパインの解像度を持つ2光子励起顕微鏡を用い、カルシウム感受性色素および形態観察用色素を同時に電極内液から細胞内に導入することで、個々のスパインの活動と形態を同時に可視化する。ホールセル記録された第2/3層錐体細胞を電位固定下で脱

分極することにより、個々のシナプス入力をNMDA受容体を介したカルシウム流入として捉える。スライス標本での研究から、単一シナプス刺激によるNMDA受容体を介したカルシウム流入はスパイン内に限局し、隣接するスパイン間でのクロストークがないことが示されており、2、観察されたカルシウムシグナルは、単一のシナプス入力由来のものであると考えられる。これまでに、この方法を用いることで、洞毛刺激による感覚シナプス入力および自発ネットワーク活動によるシナプス入力を単一スパインで可視化できることを確認している。このように、単一の感覚シナプス入力を可視化した上で、個々のシナプス入力の性質について、以下の点に着目して解析を行う。

まず、単一の洞毛刺激とそれに対応するパレルにおける記録により、同一の洞毛刺激が繰り返し与えられたときに、感覚シナプスがどの程度の信頼性(=反応回数/試行回数)で入力しているのか、すなわち、同じ感覚刺激がどのくらい確実に同じシナプス入力として単一ニューロンに入るのかを定量化する。また、シナプス入力の刺激頻度依存性を調べ、同一の感覚シナプス入力、どの程度の頻度まで確実に追従できるのかを明らかにする。

洞毛刺激による感覚シナプス入力および自発活動によるシナプス入力、どのような時空間パターンで入力するかを可視化する。特に、感覚および自発シナプス入力、同時にかつ近接したスパインに入力するのかに着目して解析を行う。スライス標本における研究から、近接した複数のスパインに同時に入力があった場合に、樹状突起スパイクが発生することが知られており、5、単一ニューロン局所での非線形演算能力として注目されている。実際の脳内で同様の現象が起こるためには、感覚もしくは自発シナプス入力、同時に近接したスパインに入力することが必要となるため、このようなパターンの入力が存在するのかどうかを直接可視化して明らかにする。

洞毛刺激の入力に錐体細胞内における位置依存性があるのかを解析する。これまでの形態学やチャネルロドプシンを用いた機能マッピング6などから、第2/3層錐体細胞への興奮性入力は、基部樹状突起には主に視床後内側腹側核および第4層から、先端樹状突起には主に第2/3層からの反回性入力および第一次運動野からのフィードバック入力を受けることが分かっているが、これらハードウェアとしての神経結合を感覚情報がどのように伝達されているかはあまり明らかでない。同じ刺激に対して樹状突起内の位置に応じて感覚シナプス入力、どのように異なっているかを可視化し、異なる入力線

維からの感覚シナプス入力に違いがあるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

大脳体性感覚野バレル皮質の第2/3層錐体細胞からホールセル記録を行い、基底樹状突起においてカルシウムイメージングにより単一スパインレベルのシナプス入力を可視化し、自発活動および洞毛刺激に対する応答を記録した。自発活動および洞毛刺激誘発活動とともに、過去の電気生理学計測による第4層ニューロンの活動とほぼ一致したことから、観察された応答は第4層-第2/3層間結合の活動を正しく反映していると考えられた。スライス標本において、ケイジドグルタミン酸の光解除による単一スパイン内AMPA電流のマッピングやNMDA受容体を介したカルシウム流入のイメージングから、AMPA電流やNMDA電流およびカルシウムシグナルがスパインサイズと相関することが示され、また、シナプス可塑性によりスパインサイズが変化することが示されている。これらの事実は、スパイン形態とその変化がシナプス機能に関する重要な因子であることを意味していることから、各スパインの大きさと入力頻度の関係を調べた。その結果、弱いながらスパインの大きさと入力頻度に正の相関が認められたことから、*in vivo*においても、入力を多く受けるスパインが増強されてスパインサイズが大きくなる傾向にあると考えられる。

次に、感覚入力に対して、個々のシナプス入力がどのような空間分布で入力しているかについての解析を行った。大脳体性感覚野バレル皮質の第2/3層錐体細胞からホールセル記録を行い、基底樹状突起および尖樹状突起においてカルシウムイメージングにより単一スパインレベルのシナプス入力を可視化し、自発活動および洞毛刺激に対する応答を記録した。活動するスパインを同一細胞内の様々な樹状突起で観察したところ、異なる樹状突起の間で入力頻度にばらつきがあり、多くの入力を受けている樹状突起分枝とそうでないものがあることが明らかとなった。また、個々のスパインレベルで見ると、約80%の入力がわずか25%のスパインに限局している事がわかった。すなわち、感覚情報の多くは限られたスパインにのみ入力しているということを示唆する。さらに、これらの入力分布を詳細に解析したところ、空間的に近傍に位置するスパインは同期した入力を受ける確率が高いことが分かった。このことは、共通入力を受けているかお互いにシナプス結合を作って局所回路を形成しているニューロン集団は、受け手側ニューロンの樹状突起上で近い位置に入力する傾向があるということであり、神経回路が1シナ

プスのレベルで精緻に配線されていることを示す直接の証拠である。近傍のスパインでは、シナプス可塑性が同期して起こりやすいというスライス標本での先行研究とも一致する結果であり、興味深い。

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5件)

- ① 喜多村和郎, 橋本浩一, 狩野方伸, 小脳プルキンエ細胞樹状突起活動の *in vivo* イメージング. 生体の科学, 63, 26-33 (2012) 査読無
- ② Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. Locally synchronized synaptic inputs. *Science*, 335, 353-356 (2012). 査読有、DOI: 10.1126/science.1210362
- ③ Kitamura, K. & Häusser, M. Dendritic calcium signaling triggered by spontaneous and sensory-evoked climbing fiber input to cerebellar Purkinje cells *in vivo*. *J. Neurosci.* 31, 10847-10858 (2011). 査読有、DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2525-10.2011
- ④ Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki, M., Shin, H.-S., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano M: Postsynaptic P/Q-type Ca²⁺ channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9987-9992 (2011). 査読有、DOI: 10.1073/pnas.1101488108
- ⑤ Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M. & Kasai, H.: *In vivo* two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Physiol.* 589, 2447-2457 (2011). 査読有、DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207100

[学会発表] (計 11 件)

- ① Kazuo Kitamura Two-photon imaging of neuronal population activities in cerebellar cortex. 分子生物学会 (ワークショップ)、平成 23 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② Kazuo Kitamura Heterogeneous organization of sensory synaptic inputs in the mouse barrel cortex. 生理研国際研究集会 (招待講演)、平成 23 年 12 月 9 日、岡崎カンファレンスセンター (愛知県)
- ③ Miki Hashizume, Kazuo Kitamura, Kenji Sakimura and Masanobu Kano. Enhanced synchrony of climbing fiber-induced Ca²⁺ signaling in cerebellar Purkinje cells caused by elevated synchronous activity of inferior olivary neurons in Glu_{D2} (GluR δ 2) knockout mouse. Neuro2011、平成 23 年 9 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ Jean-Marc Good, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano Desynchronization of cerebellar Purkinje cell population activity during postnatal development. Neuro2011、平成 23 年 9 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑤ Kazuo Kitamura Two-photon imaging of Purkinje cell dendritic activity in vivo. IBRO World Congress (シンポジウム) 平成 23 年 7 月 16 日、(Florence, Italy)
- ⑥ K. Kitamura & M. Hausser Dendritic activities of cerebellar Purkinje cell in vivo. 第 88 回日本生理学大会、平成 23 年 3 月 28 日、誌上開催 (震災のため)
- ⑦ 橋本浩一、辻田美加、宮崎太輔、喜多村和郎、山崎真弥、Shin, H.-S.、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸. 登上線維の発達過程における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割. Neuro2010 (シンポジウム)、平成 22 年 9 月 4 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)
- ⑧ 橋爪幹、喜多村和郎、崎村建司、狩野方伸. Glu_{D2} (GluR δ 2) ノックアウトマウスの小脳プルキンエ細胞集団の 2 光子カルシウムイメージング解析. Neuro2010、平成 22 年 9 月 2 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)

- ⑨ K. Kitamura, M. Hausser & M. Kano Simultaneous two-photon calcium imaging and patch-clamp recordings in vivo. Jacques Monod Conference “Imaging brain circuits in health and disease”、平成 22 年 7 月 1 日、(Roscoff, France)
- ⑩ 喜多村和郎 生体内における神経活動の 2 光子イメージング. 第 5 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (招待講演)、平成 22 年 5 月 22 日、ピアザ淡海 (滋賀県)
- ⑪ 橋本浩一、辻田美加、宮崎太輔、喜多村和郎、山崎真弥、Shin, H.-S.、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸. 小脳登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの生後発達における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割. 第 87 回日本生理学大会、平成 22 年 5 月 19 日、盛岡市民文化ホール (岩手県)

[図書] (計 1 件)

- ① 喜多村和郎. 第 12 章 in vivo イメージングパッチ法 (最新パッチクランプ実験技術法、岡田泰伸 編) 吉岡書店、p. 121-128、(2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA KAZUO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60423159

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし