

平成 22 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700298

研究課題名（和文）

二光子顕微鏡による小脳神経細胞集団の  $Ca^{2+}$  シグナル測定と計算論的解析研究課題名（英文）  $Ca^{2+}$  measurement and computational analysis of population of cerebellar neurons with a two-photon microscopy

研究代表者

土居 智和 (DOI TOMOKAZU)

財団法人 大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員

研究者番号：20435564

研究成果の概要（和文）:

二光子顕微鏡と高速共焦点顕微鏡を用いて、小脳皮質の  $Ca^{2+}$  蛍光イメージングを試みた。後足に電気ショックを与えると、小脳プルキンエ細胞樹状突起で  $Ca^{2+}$  蛍光強度が一過的に増加した。自発的発火では、隣り合ったプルキンエ細胞が同期して活動していた。この同期は、介在ニューロンの stellate 細胞とも相関があり、頭尾方向により強い相関が見られた。同期範囲は、顕微鏡視野内では境界が見つからなかった。

研究成果の概要（英文）:

I performed  $Ca^{2+}$  fluorescence imaging in the cerebellar cortex with a two-photon and confocal microscopes.  $Ca^{2+}$  fluorescence intensity transiently increased by the electrical stimulation of the ipsilateral hindlimb. Spontaneous activity synchronized in neighbor Purkinje neurons. The synchronization also occurred in stellate cells, interneurons in the cerebellar cortex and stronger correlation was observed to the direction of the anterior-posterior axis. A boundary of the synchronization was not found in the field-of-view.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経情報処理、二光子顕微鏡、数理的解析、カルシウム、イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 二光子顕微鏡の特徴

神経回路の情報処理機構を明らかにするためには、局所的な神経回路の活動を調べることが不可欠である。しかし、マルチ電極や

fMRI などの従来手法では、個体が生きたまま  
で細胞 1 つ 1 つの解像度で神経活動を計測  
することが出来なかった。

二光子顕微鏡を用いると、個体が生きたまま  
で組織を 100 マイクロメートル以上深くまで

観察することが可能である。複数の神経細胞に Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素を導入して、神経細胞の活動を見ることが出来る。この方法の優れた点は、生体内で集団内の神経細胞活動の相関を細胞レベルの空間解像度で調べることができることである。マルチ電極や fMRI など従来の方法では、このような空間解像度が得られない。二光子顕微鏡による神経細胞の Ca<sup>2+</sup>イメージングは技術的に難しく、世界中でも数カ所の研究室でしか成功していない。これまで、自然刺激に対する嗅球の応答や視覚野の傾きコラムの境界が報告されている。

## (2) 研究者の経歴

私は、以前から小脳神経回路の情報処理機構をテーマに研究を進めてきた。小脳皮質の回路は規則的で単純な構造をしている。プルキンエ細胞は小脳皮質の唯一の出力細胞で、平行線維と登上線維から興奮性入力を受けている。これまで私は、小脳プルキンエ細胞における Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達の計算機シミュレーションを行った。グルタミン酸代謝型経路に時間遅れがあり、その時間遅れが平行線維と登上線維の入力タイミングの認識に利用される可能性を示した。

しかし、この研究は1個のプルキンエ細胞だけに注目したものであり、小脳回路全体としての情報処理機構に取り組むことができなかった。一方、近年のバイオイメージング技術で定量的データが膨大に得られるようになった。イメージングと理論的解析を組み合わせで、神経細胞は情報をどのように扱っているのかという根本的な謎に迫ることが期待できる。私が注目したのが、二光子顕微鏡による複数の神経細胞の Ca<sup>2+</sup>イメージングである。

## 2. 研究の目的

本研究では、小脳神経回路の情報処理機構を明らかにするために、二光子顕微鏡で神経細胞の集団活動を一細胞レベルの空間解像度で可視化し、スパイク統計や計算神経科学の手法で解析する。

### (1) 研究者の課題研究への適正

Ca<sup>2+</sup>イメージングにスパイク統計などの理論的解析を適用することは、マルチ電極などよりも細胞の位置情報がより局所的であるため、極めて発展性があると考えられる。しかし、Ca<sup>2+</sup>イメージングとスパイク解析は両方とも習得が困難である。私は、二光子顕微鏡による複数細胞の Ca<sup>2+</sup>イメージングにも成功しており、大学院生のときに計算神経科学やシステム生物学の訓練を積んでいるので、困難な状況を克服できる状況にある。

### (2) 小脳皮質回路が単純であることの優位

性プルキンエ細胞は、平行線維に対して垂直な平面に樹状突起を扇状に張り巡らしている。この小脳神経回路の幾何学的に単純な構造から、Ca<sup>2+</sup>イメージングの結果を見て、どのような入力があったのか、どのように入力情報が統合されているかを推定することができる。平行線維は、2つの神経細胞の距離が同じ場合でも、平行線維に対して平行に並んでいるプルキンエ細胞なら、同じ平行線維束から入力を受けているといえるし、平行線維に対して垂直に離れているものは、異なる平行線維束の入力を受けているはずである。プルキンエ細胞の活動は、平行線維に平行な細胞は同期すると予想される。なぜなら、それらの細胞は同じ平行線維から入力を受けているからである。平行線維に平行に並んだ細胞でも、距離が離れると、かなり違った応答を示すかもしれない。このときは、受ける入力と同じでも、それぞれの細胞は異なる情報処理をしていることが示唆できる。また、プルキンエ細胞の同期発火は、登上線維の同期発火と同じかもしれない。このようにして、小脳神経回路の規則性をふまえて、Ca<sup>2+</sup>イメージングから情報処理機構にせまることができる。

## 3. 研究の方法

### (1) AM (アセトキシメチル) エステルによる Ca<sup>2+</sup>蛍光色素の細胞への導入

麻酔下マウスに、微小ピペットを用いて Oregon Green 488 BAPTA-1 の AM エステル体を小脳プルキンエ細胞層に注入する。AM エステル体は細胞膜を透過してプルキンエ細胞内に入り、細胞内の AM エステル分解酵素の作用を受けて Oregon Green 488 BAPTA-1 は細胞内にとどまる。微小ピペット液内に別の蛍光物質である Alexa 594 も混ぜておけば、Oregon Green 488 BAPTA-1 が細胞内で緑色に光り、Alexa 594 が細胞外で赤色に光ることを確認済みである。Oregon Green 488 BAPTA-1 と Alexa 594 の組み合わせは、800-840 nm の波長で同時に二光子励起できるので便利である。

### (2) Ca<sup>2+</sup>イメージングと電気スパイク活動の同時記録

Ca<sup>2+</sup>濃度変化が、細胞活動を反映していることを確かめるために、二光子顕微鏡でプルキンエ細胞の活動を Ca<sup>2+</sup>イメージングしながら、細胞外電極記録を試みる。生体内で記録できるのが理想ではあるが、技術的に困難な場合は、スライス実験で代替する。私たちの研究室の船曳和雄副部長が生体内電気生理実験に詳しく、協力して研究を進めることができる。

### (3) 感覚刺激種類とプルキンエ細胞応答パ

## ターンの関係

マウスに与える感覚刺激として、ヒゲへのエアパフ、光刺激、音など、さまざまな刺激を提示する。Ca<sup>2+</sup>シグナルの測定データを元に、どの刺激を受けたか神経活動から推定して当てることができるか試みる。とりわけ、感覚刺激が定量的に操作できる場合（音の高さや強さなど）、定量的な情報が、プルキンエ細胞活動としてどのように表現されているかを調べる。

### (4) Ca<sup>2+</sup>シグナル解析による入力元の分離

プルキンエ細胞は平行線維と登上線維から興奮性入力を受けており、この2つの入力を分離することは計算論的に重要である。平行線維入力は登上線維入力と比べてはるかに弱いので検出が難しいことが予想される。そこで、平行線維入力に異常がある遺伝子改変マウスを用いて、検出を試みる。私たちの研究室では、小脳運動学習に異常が見られる遺伝子改変マウスを作製済みである。小脳ゴルジ細胞からの抑制が無くなり平行線維入力が過剰な遺伝子改変マウス、シナプス小胞放出機構を阻害して平行線維入力が全くない遺伝子改変マウスで、Ca<sup>2+</sup>シグナルを計測する。

また、まとまった平行線維入力ならCa<sup>2+</sup>シグナルとして検出できる可能性がある。細胞体でCa<sup>2+</sup>変化が見られない場合には、Ca<sup>2+</sup>濃度変化がより激しい樹状突起で計測を試みる。

### (5) 細胞の位置と活動パターンの解析

平行線維に対して平行に並んだプルキンエ細胞集団は、同じ平行線維束からの入力を共有しているので、似かよった活動パターンを示すはずである。しかし、すべてのプルキンエ細胞が全く同じ活動パターンを示すならば、プルキンエ細胞は複数存在する意味がなく、1個で十分である。すなわち、発火パターンは似通っているけれども微妙に違うことが予想される。平行線維に平行なプルキンエ細胞の活動の相関を求め、情報量論的に情報処理の効率を考察する。

### (6) 小脳学習前後のCa<sup>2+</sup>応答の変化

マウスを二光子顕微鏡ステージの環境に慣らしておけば、無麻酔下でも生体内でCa<sup>2+</sup>応答が観測できると考えられる。小脳学習課題の1つである瞬目反射を、光刺激を条件刺激、目へのエアパフを無条件刺激として与える。小脳学習には、平行線維からプルキンエ細胞へのシナプス伝達効率が数十分以上弱まる長期抑圧(LTD)と呼ばれるシナプス可塑性が必要と考えられている。学習後にCa<sup>2+</sup>応答が弱まるプルキンエ細胞があれば、LTDが小脳学習と関係していることを支持できる。逆に、Ca<sup>2+</sup>応答が強まるプルキンエ細胞

が多数派であったならば、小脳学習のメカニズムについて根本的な疑問を投げかけることになる。

### (7) 感覚刺激種類とプルキンエ細胞応答パターンの解析

小脳には、複数種類の感覚刺激に反応する部位がある。感覚刺激として、ヒゲへのエアパフ、視覚刺激、音など、さまざまな刺激を提示して、その部位のCa<sup>2+</sup>応答を観測する。Ca<sup>2+</sup>応答を元に、どのような刺激を受けたか推定して当てることができるか試みる。とりわけ、感覚刺激が定量的に操作できる場合（音の高さや強さなど）、定量的な情報が、プルキンエ細胞活動としてどのように表現されているかを調べる。

### (8) 刺激条件とCa<sup>2+</sup>応答のフィードバックシステムの構築

光刺激や触覚刺激を定量的に操作して、意図したCa<sup>2+</sup>応答パターンを生み出せるか試みる。例えば、共通の平行線維から入力を受けているプルキンエ細胞がそろって活動するように刺激を調節することを試みる。刺激に対する細胞活動を受動的に調べるのではなく、細胞活動に応じて刺激条件をリアルタイムで変えてゆく。このフィードバック制御はブレイン・マシン・インターフェイスと同様に、細胞活動をリアルタイムで画像処理して自動的に次に与えるべき刺激を決定する必要がある。このように積極的に細胞活動パターンを解析することで、Ca<sup>2+</sup>応答を解析に都合の良いパターンに操作できるだけでなく、神経回路がどのように情報処理しているのかを深く調べることが可能である。

### (9) 単純な神経回路数理モデルによるCa<sup>2+</sup>イメージングの再現

Integrated-and-firing neuronなどのできるだけ単純な神経細胞モデルの回路で、Ca<sup>2+</sup>イメージング結果を再現できるか試みる。神経回路モデルでは、シナプス伝達効率は場所に関係なくランダムに決めることが多いが、ランダムであるという実験的根拠はない。Ca<sup>2+</sup>イメージング結果が再現できた神経回路モデルで、シナプスの位置と伝達効率に規則性があるか調べる。たとえば、1本の平行線維において、あるシナプス結合がきわめて強く、そこから遠いシナプスほど伝達効率が低くなっている可能性が考えられる。

## 4. 研究成果

### (1) マウスが生きた状態での小脳皮質の神経回路構造の観察

小脳皮質の層構造である、分子層、プルキンエ層、顆粒層をマウスが生きたままで観察することに成功した(図1)。

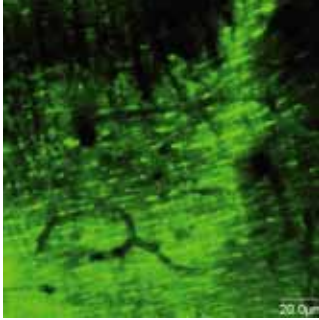
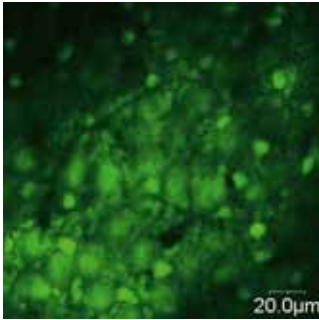
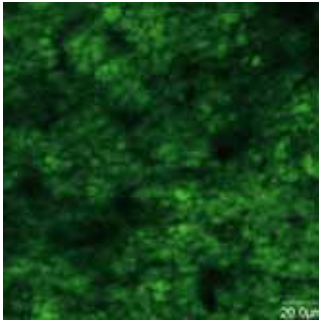
	深さ 0-100 μm 分子層
	深さ 100 μm プルキンエ層
	深さ 100- μm 顆粒層

図 1 二光子顕微鏡による生きたマウスの小脳皮質神経回路の観察

次に、麻酔下マウスの小脳皮質の細胞集団の Ca<sup>2+</sup>活動を観測した。プルキンエ細胞の樹状突起部で自発的 Ca<sup>2+</sup>活動を捉えた。この活動は隣のプルキンエ細胞と著しく同期して活動することを見つけた。隣のプルキンエ細胞という空間解像度レベルでの同期は、現時点の技術では Ca<sup>2+</sup>イメージングのみ観測できるものである。また、プルキンエ細胞の入力元の下オリブ核の電気活動が同期しているという知見とも合致する。

#### (2) 自然刺激に対する Ca<sup>2+</sup>応答の観察

マウスに自然刺激を与えて、Ca<sup>2+</sup>応答が検出できるか調べた。使った自然刺激は光、髭と眼へのエアパフ、白色ノイズ音、後足への電気刺激であった。刺激依存の Ca<sup>2+</sup>応答を見いだしたのは、後足への電気刺激のみであった。刺激の 200 ミリ秒以内に Ca<sup>2+</sup>応答があらわれた。1 試行だけでは Ca<sup>2+</sup>活動が自発的なものか刺激依存なものか判別できないので、60 試

行の Ca<sup>2+</sup>応答の平均を求めた。

(3) 高速共焦点顕微鏡の併用と自動画像処理  
二光子顕微鏡は画像取得に時間がかかるという弱点を補うため、ニポウ型ディスクの高速共焦点顕微鏡を導入した。二光子顕微鏡とニポウ型ディスク高速共焦点顕微鏡の光路をレバー1 つで切り替えられるように光学系を改造した。高速共焦点顕微鏡で高速 (30 Hz) かつ広範囲 (300 マイクロメートル四方) に Ca<sup>2+</sup>活動を測定することができるようになった。また、データ量が膨大 (1 分間の測定データが 1 ギガバイト) になるので、解析の自動化が必要になってきた。画像処理技術により、目的の細胞の形を検出して関心領域として自動的に抽出できるようにした。一般に細胞の画像自動認識は、ケースバイケースで細かな条件検討が必要である。私の細胞画像自動認識は、具体体の 1 つとして貢献することができる。

高速共焦点顕微鏡による Ca<sup>2+</sup>イメージングの結果、全体的に小脳皮質の細胞は一斉に活動しており、とりわけ縦方向 (頭尾方向) で Ca<sup>2+</sup>活動に強い相関があることが分かった。つまり、縦方向に並んだ細胞は、同時に活動しているということである。また、電気生理と Ca<sup>2+</sup>イメージングの同時記録により、登上線維入力による電気活動と Ca<sup>2+</sup>活動が対応することを確かめた。この縦方向の同期は、強力な登上線維入力の元にある下オリブ核が同期していること、1 本の登上線維は縦方向に並んだプルキンエ細胞に入力しているという過去の知見と合致する。

#### (4) プルキンエ細胞と Stellate 細胞との活動相関

プルキンエ細胞と、分子層の介在ニューロンである stellate 細胞の活動を比較した。同じ種類の細胞同士だけでなく、プルキンエ細胞と stellate 細胞でも、縦方向に並んだ細胞は相関が高かった。Stellate 細胞が登上線維入力を受けるという報告は、スライス電気生理実験や覚醒ラットの電気生理実験より示唆されていたが、実際の脳で登上線維から stellate 細胞へ入力があるか不明であった。高速かつ広範囲の Ca<sup>2+</sup>イメージングによって、生きたマウスでも stellate 細胞が登上線維入力を受けて活動している可能性が高まった。

#### (5) 小脳皮質の活動同期範囲

小脳皮質は Zebrin II というタンパク質の発現の有無により縦縞状に分かれる。この縦縞は、マイクロゾーンといわれる区画を反映しているという説もあるが、Zebrin II 縞の脳科学における意味は全く分かっていない。縦方向の Ca<sup>2+</sup>活動同期と、縦方向の Zebrin II

発現の空間パターンが一致していれば、縦縞状のタンパク質の発現に意味があることになる。高速共焦点顕微鏡で Zebrin II 縞をまたぐ程度の広範囲で Ca<sup>2+</sup>活動を測定したが、Zebrin II 縞の有無で Ca<sup>2+</sup>活動の相関は見られなかった。現在、実験技術の限界で相関が見つからないのか、それとも本当に相関がないのか、条件を検討中である。

#### 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4件)

A kinetic model of dopamine- and calcium-dependent striatal synaptic plasticity.

Nakano T, Doi T, Yoshimoto J, Doya K. PLoS Comput Biol, 査読あり、vol. 6(2), 2010, pp. e1000670.

Systems biology perspectives on cerebellar long-term depression.

Ogasawara H, Doi T, Kawato M NeuroSignals, 査読なし、vol. 16, 2008, pp 300-317,

Ca<sup>2+</sup> requirements for cerebellar long-term synaptic depression: role for a postsynaptic leaky integrator.

Tanaka K, Khiroug L, Santamaria F, Doi T, Ogasawara H, Ellis-Davies GC, Kawato M, Augustine GJ. Neuron, 査読あり、vol. 54(5), 2007, pp. 787-800

Nitric oxide regulates input specificity of long-term depression and context dependence of cerebellar learning.

Ogasawara H, Doi T, Doya K, Kawato M PLoS Computational Biology, 査読あり、vol. 3, 2007, pp. e179

##### [学会発表](計2件)

定量生物学の会 第一回年会  
東京大学生産技術研究所(駒場) An 棟  
コンベンションホール・会議

2009年01月10日(土)-12(月)

土居 智和(大阪バイオサイエンス研究所・所長研究部)

チュートリアル画像解析入門「ImageJとMATLABを使った蛍光変化率の計算」

2007年度 シナプス研究会『シナプスの形成と成熟の分子機序』

自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県岡崎市) 1階会議室

2007年12月06日(木)-07日(金)

土居 智和(大阪バイオサイエンス研・システムズ生物学)

「小脳シナプス可塑性におけるシグナル伝達の計算機シミュレーション」

[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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

土居 智和(DOI TOMOKAZU)

大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員

研究者番号: 20435564