

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号： 14301
研究種目： 基盤研究（S）
研究期間： 2008 年～2012 年
課題番号： 20220008
研究課題名（和文）
蛍光分光を応用した神経細胞の個体脳における同定と聴覚神経回路機能の研究
研究課題名（英文）
Identification of neurons by fluorescence spectrogram through a patch electrode, and the application to auditory neural circuits in vivo
研究代表者
大森治紀（OHMORI HARUNORI）
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号： 30126015

研究成果の概要（和文）：

本研究は蛍光分光電極法を開発し個体脳での神経活動解析に応用する事を主な目的とした。特に、聴覚系の神経活動解析への応用を目指して研究を進めた。結果として両方の目的はおおむね達成された。蛍光分光電極法はパッチ電極を光導体として、蛍光色素を充填した神経細胞をレーザー照射し、色素が発する蛍光を同じパッチ電極を用いて神経活動に伴う電気信号と同時に記録する手法である。神経細胞に充填した色素の蛍光スペクトルを時系列に記録する手法として確立した。個体脳への応用では細胞内 Ca 濃度に応答するオレゴングリーン BAPTA-1（OGB-1）をトリ聴覚神経核の神経細胞に充填し、聴覚応答の解析が実現できた。聴皮質である Field-L からは神経活動と完全に同期した Ca 応答を記録解析した。GABA 性の抑制性神経活動を阻害することにより 1Hz 程度の徐波が増強され自発的な Ca 応答を引き起こした。さらに下丘からも聴覚応答を Ca 信号として記録し、個体脳深部から蛍光信号を電気信号と同時に記録する当初の目的は達成した。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed at recording optical signal simultaneously with neuronal electrical activity in the deep brain tissue. For that purpose, we developed a photometric patch electrode (PME) recording system by using a patch electrode as a light guide. By filling the neuron in the auditory nuclei of a chick with Oregon green BAPTA-1-AM (OGB-1), intracellular Ca^{2+} signals were recorded simultaneously with electrical signal in response to acoustic stimulus in the Field-L, the avian auditory cortex, and in the inferior colliculus. A slow field current was enhanced after the block of GABA receptor in the Field-L, which enhanced the Ca^{2+} wave that was generated in synchrony with the electrical slow wave. In the inferior colliculus, Ca^{2+} responses were similarly recorded and were enhanced after the block of GABA receptor. Therefore, we succeeded in development of PME recording system to monitor neuronal electrical activity simultaneously with optical signal through the patch electrode in the deep brain tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	29,100,000	8,730,000	37,830,000
2009年度	35,000,000	10,500,000	45,500,000
2010年度	29,800,000	8,940,000	38,740,000
2011年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2012年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
総計	127,100,000	38,130,000	165,230,000

研究分野：

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：パッチ電極、神経細胞、蛍光蛋白、神経回路、聴覚、蛍光トレーサー

1. 研究開始当初の背景

電気生理学を基本的な実験手技とする脳神経生理学研究は、分子生物学の黎明期以前から脳神経機能の詳細を明らかにしてきた。しかし、システムとしての脳の高次機能の解明に至る突破口は未だ開かれていない。一方、分子生物学は脳神経科学の分野にも進出し、神経分化、あるいは神経回路形成を中心に多くの成果を挙げている。さらに近年は多光子顕微鏡法などの光学計測技術が発展し、脳表面あるいは脳切片標本を対象として同時・多点の神経活動の記録・解析も行われている。しかし、依然として脳の高次の働きを解明できる見当しはない。

分子生物学研究の成果を個体脳のシステム解析に直接応用する事が、突破口を作る一つの可能性であろう。その為の手法の一つとして、様々な機能蛋白を蛍光標識して神経細胞に発現させた新しい実験動物を実験系として用いる事で、光計測技術と電気生理学的な手法および分子生物学を融合させて脳の高次機能研究に活用されている。理想的には、個体の脳機能を解析する電気生理学実験中に実時間で、神経細胞の属性を光学的な指標で同定し、そうした神経細胞が具体的にどのような電気活動を行うのかを明らかにする事であろう。しかし多光子顕微鏡を用いても、脳表面近くで分子標識された神経細胞を捉えることは可能であるが、脳実質の深部にわたり展開している多くの神経細胞への応用

には光拡散の問題による限界がある。

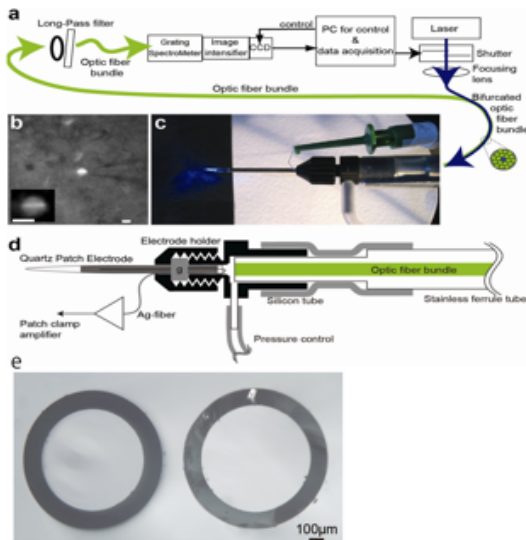
2. 研究の目的

本研究では蛍光分子標識された神経細胞を脳の深部で同定し、光計測する事を可能にする新しいパッチ電極計測システムを開発して個体動物脳の電気生理学研究に応用する。さらに、研究代表者が豊富な経験を持ち、かつ神経回路構成が確立している聴覚神経核の機能解明にこの方法を応用する事で、実験手法としての問題点を整理解決し、脳の高次システム解析に有効な新しい実験手技として確立する事を目指した。

3. 研究の方法

蛍光分光電極装置は以下のような構成である(図1-a)。レーザーの投射系として、レーザー、シャッター、NDフィルターおよびサイドバンドカット干渉フィルター、集光レンズにより光ファイバー束へレーザー光を投射する。検出系ではレーザーカット干渉フィルター、集光レンズで光ファイバー束に蛍光を集め、分光計で分光し、イメージインテンシファイヤーで増幅の後CCDカメラで画像計測することで分光データとして神経細胞に由来する蛍光を時系列解析する。レーザーは532nm 固体パルスレーザー(15kHz, 1.3ns, 4μJ), 488nm 固体連続レーザー(20mW), 445nm 固体連続レーザー(40mW)を取り替えて使用する。光ファイバー束は2分岐形式であり、励起レーザーを通す中央8本、蛍光を通す周辺80本からなる外径3mmの光ファイバー束

である。光透過性は高いが集光系を通る事で40mW、445nm レーザーの場合2分岐ファイバーを通り電極先端に至る過程で出力は低下し最終的に1mW程度となる。



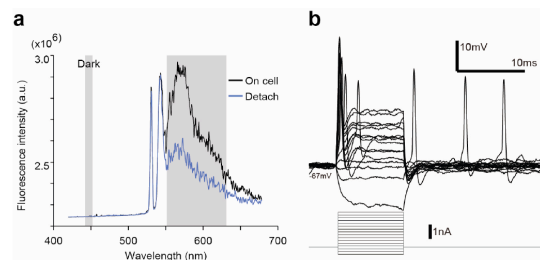
(図1) 蛍光分光電極装置 (a) 全体図、(b) 蛍光発光する神経細胞、(c) 電極ホルダー全体図、(d) 電極ホルダー構成図、(e) 研磨した電極端面(左)、右は未研磨で粗い光反射面が生ずる。

パッチ電極からのレーザー光で発する細胞(直径 $10\mu\text{m}$)の蛍光は微弱であるが蛍光色素を充填した細胞体内部にビーム状の蛍光発光が観察できる(図1-b 挿図)。神経細胞に接触するパッチ電極先端はレンズではないので集光力は限られ検出系に至る蛍光は極めて微弱である。従って、背景蛍光をできるだけ抑える必要がある。その為、光透過性の高い光ファイバー仕様の合成石英ガラス管を用いてパッチ電極を作製している。この結果背景蛍光レベルを天然石英管の30%程度に抑える事ができた。さらに、背景蛍光を減らす試みとして、無電解メッキによってガラス管表面を金属コートし表面の汚れから生ずる蛍光を最小化している(図1-c)。さらに、電極基部端面を研磨し光の乱反射をなくす事で蛍光の検出感度が上がり安定した蛍光測光が可能となった(図1-e)。電極ホルダーは光ファイバー束から石英電極端面に光を通しかつ戻ってくる蛍光を光ファイバーに伝え、更に電気現象を検出する銀線を通し、そして電極内の空気圧を制御する必要があり複雑な構造になる(図1-c, d)。基本はパッチクランプ用の電極ホルダーを黒色デルリン素材で作製し、軸方向に光ファ

イバー束を連結している。空気圧は光ファイバー束と電極ホルダー外面をシリコンチューブでつなぐ事で漏れを防いでいる。内面はシリコンチューブをO-リングとして用いてガラス電極周辺からの空気漏れを防いでいる。シリコンチューブが僅かに蛍光を出すので、電極表面同様金属皮膜で無電解コートしている。

4. 研究成果

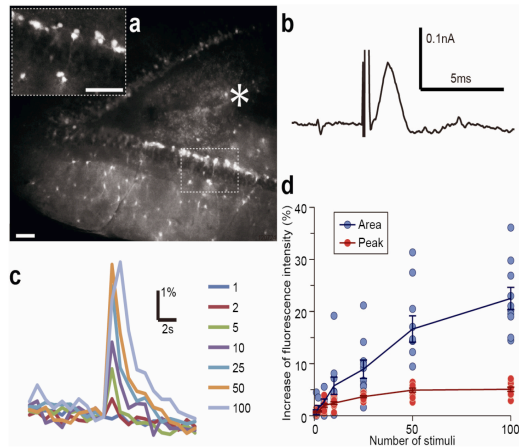
蛍光分光電極(PME, photometric electrode)の開発は脳切片標本を用いて光学顕微鏡下で行った。始めにAlexa 545 Dextranを充填したトリの蝸牛神経核の亜核である大細胞核神経細胞に応用した。PMEが細胞表面に接触する事で蛍光スペクトル強度が2倍程度に上昇し(図2 a 黒線 on cell; 青線 detach)、全細胞パッチ電極法で活動電位を記録した(図2 b)。背景スペクトルに対する神経細胞由来の蛍光強度は12-58%であり平均では32%程度であった。



(図2) (a) 大細胞核神経細胞からの蛍光スペクトル、(b) 全細胞記録による活動電位

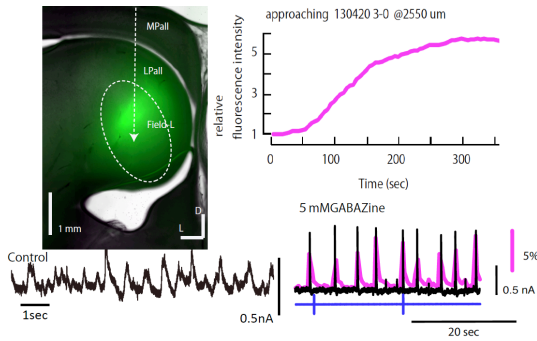
次に、オレゴングリーン BAPTA-1-AM (OGB-1) でマウス海馬切片標本の歯状回顆粒細胞を逆行性染色し、神経活動と神経活動に伴う細胞内Ca²⁺応答を記録した(図3)。逆行性電気刺激による活動電位に応じて顆粒細胞に接触したPMEは1-5%の蛍光強度変化を検出した。1発から25発(10 m秒間隔)までは活動電位数に応じてCa²⁺応答は増大し、その後は活動電位数に応じてCa²⁺応答の持続が伸びた。活動電位数の多い時に持続が伸びる事は現状の分光器を用いたPMEによる0.3秒の時間解像度に影響される事でもあり、Ca²⁺応答の大きさと活動電位数の関係はより早い時間解像度を持つシステムでの詳細な検討が必要

である。その為の、光電子増倍管を用いた高速測光システムは現在構築中である。



(図3) 海馬歯状回顆粒細胞からの蛍光および電気応答。(a)海馬切片標本、(b) PME で記録した顆粒細胞細胞外電気応答、(c、d) 活動電位数に対応した Ca 応答

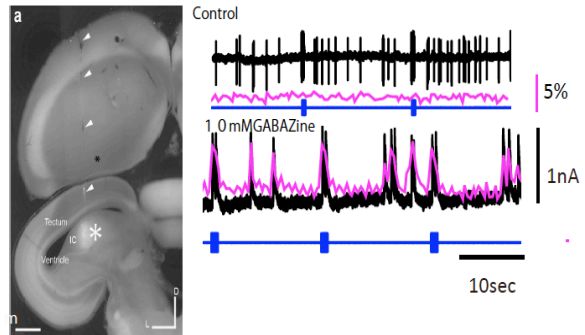
続いて、動物個体脳での聴覚刺激に応答する Ca シグナルおよび電気信号の記録を、ニワトリの聴覚皮質である Field-L で行った。鳥類の場合大脳の構造がほ乳類とは内外が逆転しており、表面にほ乳類の海馬に相当する構造があり、大脳皮質に相当する Field-L は脳表面から 2~3mm 深部に位置する (図4)。



(図4) ニワトリ Field-L からの PME 記録。(左上) OGB-1 染色像、(右上) PME のアプローチ過程における蛍光強度の増強、(左下) Field-L における徐波、(右下) GABA_Zine で増強された Ca 応答および徐派。マゼンダ; Ca、黒; 局所電流、青; 音刺激

OGB-1 注入 1-2 時間の後に Field-L に PME を刺入する過程で、PME で記録する蛍光強度は増大し (図4 上右)、ある一定レベルに達した所で、電気記録と蛍光記録を同時に行った。Field-L での詳細な電気記録はこれまでに報

告されておらず、初めての所見であるが、数 Hz の徐派が記録され (図4 下左)、ほ乳類で議論されているように、視床-大脳皮質相互作用を反映するものと考えている。この状態での Ca 応答は小さい。しかし、PME を通して GABA_Zine を局所投与し GABA 受容体を抑制する事で、極めて大きな局所電流 (Local Field Current, LFC) と LFC に完全に同期した大きな細胞内 Ca 応答を検出した (図4、下右)。大脳皮質における徐派は視床-大脳皮質回路における神経情報の学習あるいは固定に関連する役割が議論されている。この時 Ca 応答が同期して生ずる所見はこれまでの議論を強化する意義がある。



(図5) 下丘での PME 記録。(左) 下丘における記録部位は脳表面から 6 mm 程度の深部にある。(右上) 下丘の神経活動、(右下) GABA_Zine により増強された Ca 応答および局所電流。自発発火および音応答。

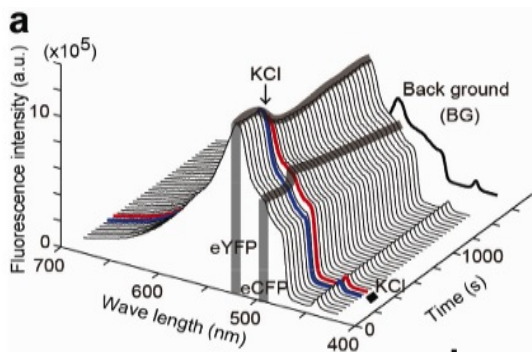
より深部の聴覚神経核である下丘から聴覚刺激に応ずる局所電流および Ca 応答を次に記録した。下丘は、脳表面から 6-7mm の深部に位置する。OGB-1 を充填し 1-2 時間後に PME を刺入した。生理的条件下では聴覚刺激による Ca 応答は小さく最大でも 1-2% 程度であった。さらに下丘では Field-L で記録された様な徐派は観察できなかった。しかし GABA_Zine の局所投与により大きな局所電流が自発性および聴覚刺激に応じて発生し大きな Ca 応答を生じた。下丘においては、生理的条件下では Ca 応答は GABA 受容体活性で抑制されているものの、おそらく小さなレベルでは神経活動に伴い細胞内 Ca イオン濃度の上昇は起こり、神経回路機構の恒常性維持に働いているものとする。

以上の様に、PME の開発は実現し脳の深部に

おける電気記録と光応答の同時解析が行える様になった。空間的な解像度ではPMEは多光子顕微鏡に対抗できる光計測装置ではない。しかし多光子顕微鏡の応用が不可能な脳の極めて深部組織における光計測を実現できる事は多光子顕微鏡に勝る機能である。また、電気記録を同時にできる事および電極を通して試薬の投与が可能である事など、多光子顕微鏡では実現できない応用性も備わっている。

また、光刺激によるチャンネル活性化あるいはcaged化合物の活性化への応用も可能であり、神経回路機能の解析に大きな役割を果たす事ができる実験装置であると確信している。

さらに、今回試作したPME計測装置は分光器を備えており広い波長領域にまたがって光計測が可能である。従って、複数波長の蛍光シグナルの同時計測も可能でありFRET計測にも対応できる。



(図6) 海馬神経細胞におけるFRET計測。マウス海馬にCa応答性FRETタンパクをsindbis-virusで発現させKClに対するFRET応答をPME観察した。図はスペクトルを時系列表示した。KCl投与により530nm近傍の蛍光強度が減少し490nm近傍の蛍光強度が増加した。

図6はCa感受性蛍光タンパク(F2C, Takatsuka et al, 2005, BBRC 336:316)を用いたFRET計測にPMEを用いた例である。今後は様々な蛍光タンパクを遺伝学的手法で脳の特定の場所に発現させる事で、当初目指した分子生物学研究の成果を神経生理学研究に取り込む為の手段として活用したい。すでに幾つかの学会で研究成果は断片的に発表しているが、論文発表を行う事により、多くの研究者が使える実験手技として普及させたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

以下に主な論文(全て査読有り)。

Okuda H, Yamada R, Kuba H & Ohmori H (2013). Activation of metabotropic glutamate receptors improves the accuracy of coincidence detection by presynaptic mechanisms in the nucleus laminaris of the chick. *Journal of Physiology* 591.1 365-378.

doi: 10.1113/jphysiol.2012.244350

Nakashima N, Ishii TM, Bessho Y, Kageyama R & Ohmori H (2013). Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice. *J Physiology* 591:1749-1769.

doi: 10.1113/jphysiol.2012.247361.

Yamada R, Okuda H, Kuba H, Nishino E, Ishii TM & Ohmori H (2013). The cooperation of sustained and phasic inhibitions increases the contrast of ITD-tuning in low-frequency neurons of the chick nucleus laminaris. *J Neuroscience* Feb 27;33(9):3927-38.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.2377-12.2013.

Kasai M, Ono M, Ohmori H. (2012) Distinct neural firing mechanisms to tonal stimuli offset in the inferior colliculus of mice in vivo. *Neurosci Res.* 2012 Jul;73(3):224-37.

doi:10.1016/j.neures.2012.04.009.

Burger, R.M., Fukui, I., Ohmori, H., and Rubel, E.W. (2011) Inhibition in the balance: binaurally coupled inhibitory feedback in sound localization circuitry. *Journal of Neurophysiology* 106:4-14.

doi: 10.1152/jn.00205.2011.

Sato T, Fukui I and Ohmori H. Interaural phase difference modulates the neural activity in the nucleus angularis and improves the processing of level difference cue in the lateral lemniscal nucleus in the chicken. *Neuroscience Research* 66:198-212. (2010)

doi: 10.1016/j.neures.2009.11.001.

Iwao Fukui, R. Michael Burger, Harunori Ohmori, and Edwin Rubel. GABAergic inhibition sharpens the frequency tuning and enhances phase locking in chicken nucleus magnocellularis neurons. *J Neuroscience* 30(36) 12075-12083 (2010) doi: 10.1523/JNEUROSCI.1484-10.2010.

Kuba H, Oichi Y & Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na⁺ channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465: 1075-1078. (2010) doi: 10.1038/nature09087.

Kuba, H. and Ohmori, H. Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick. *Journal of Physiology* 2009: 587(Pt1): 87-100. (2009) doi: 10.1113/jphysiol.2008.162651.

Eri Nishino and H. Ohmori. The modulation by intensity of the processing of interaural timing cues for localizing sounds. *Molecular Neurobiology* 40(2):157-65. (2009) doi: 10.1007/s12035-009-8078-8.

Tomohiko Irie and Harunori Ohmori. Presynaptic GABAB receptors modulate synaptic facilitation and depression at distinct synapses in fusiform cells of mouse dorsal cochlear nucleus. *BBRC* 367:503-508 (2008). doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.001.

Eri Nishino, R. Yamada, H. Kuba, H. Hioki, T. Furuta, T. Kaneko, and H. Ohmori. Sound-Intensity-Dependent Compensation for the Small Interaural Time Difference Cue for Sound Source Localization. *Journal of Neuroscience* 28(28): 7153-7164. (2008) doi: 10.1523/JNEUROSCI.4398-07.2008.

[学会発表] (計 41 件)

以下は代表的なもの 3 件。

Ohmori H (2009) Sound intensity dependent compensation for the small ITD cue in the chicken. 第 36 回 国際生理学会 京都 2009 年 7 月 29 日

Ohmori H (2011) Two modes of inhibition enhances the contrast of ITD tuning in the chick. 7th FAOPS, Special Lecture, Taipei, Taiwan, September 11-14, 2011.

Ohmori H (2012) Tonotopic specializations in the timing coding pathway in the avian auditory nuclei; NM and NL. Gordon Research Conference, Auditory System, Bates College, Lewiston, ME USA July 8-13, 2012.

[図書] (計 1 件)

大森治紀 (2009) 聴覚 234-256、標準生理学 第7版、監修 小沢瀨司、福田康一郎、編集 本間研一、大森治紀、大橋俊夫、医学書院

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
なし

[その他]

www.nbiol.med.kyoto-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森治紀 (OHMORI HARUNORI)
京都大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 30126015

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし