

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700357

研究課題名（和文）プルキンエ細胞の誕生日で規定される小脳皮質・縦縞構造の電気生理学的解析

研究課題名（英文）Cerebellar microstructures and their electrophysiological and functional properties

研究代表者

尾関 宏文 (OZEKI HIROFUMI)

独立行政法人理化学研究所・大脳皮質回路可塑性研究チーム・研究員

研究者番号：80553833

研究成果の概要（和文）：アデノウイルスベクターを用いて、発生時期の異なるプルキンエ細胞群にのみチャンネルロドプシン2（ChR2）を発現した遺伝子改変マウスを作成した。ChR2を発現したプルキンエ細胞群は小脳皮質内に縦縞構造を作るが、これら縦縞構造のうち単一構造内のプルキンエ細胞群を局所的に刺激する方法を開発し、青色光刺激が小脳皮質内ネットワークにどのような影響を及ぼすかを調べた。また、同様の実験手法をマウス視覚野に応用した。

研究成果の概要（英文）：

Using adenoviral transfection, Channelrhodopsin-2 was expressed only onto specific Purkinje cells with the same birthday. Since the ChR2-positive Purkinje cells make remarkable microstructures within cerebellar cortex, I made a method to locally activate the Purkinje cells within the same structure and studied the effects on cerebellar network. I also applied the same method to mouse visual cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：チャンネルロドプシン2、マウス小脳皮質、縦縞構造、マウス視覚野、オプトジェネティクス、2光子励起顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

小脳皮質プルキンエ細胞は、新生時期（誕生日）の同じ細胞どうしが集まり、縦縞状構造を形成する。これは、大脳皮質における層状構造に相当すると考えられるが、その機能的意義は明らかでなかった。

また、これら微小構造内の細胞群の活動を選択的に改変したとき、応答特性や行動にどのような影響が見られるかも明らかではなかった。

2. 研究の目的

小脳皮質の各縦縞構造に属するプルキンエ細胞群がどのようなネットワークを構成し、どのような機能を持っているかを明らかにすべく、特定の縦縞構造に属するプルキンエ細胞群を特異的に活動させたとき、ネットワーク全体にどのような改変が生じるかを調べた。

また、各縦縞構造内および構造間のプルキンエ細胞対について、入出力の違い・活動の同期性の有無などを電気生理学的に調べた。

3. 研究の方法

誕生日の同じプルキンエ細胞群に選択的にチャンネルロドプシン2（ChR2）を発現させるべく、アデノウイルスベクターを胎児期マウスに感染させた。つぎに、2-3週間生育し、成マウスの小脳皮質プルキンエ細胞および大脳皮質視覚野興奮性細胞から *in vivo* ホールセルパッチ細胞内記録を行った。また、局所的に ChR2 を発現した細胞の活動性を操作すべく、青色レーザー光を用いて刺激した。

4. 研究成果

1) 作成した遺伝子改変マウスが小脳皮質に縦縞状に ChR2 を発現することを確認した(図1)。

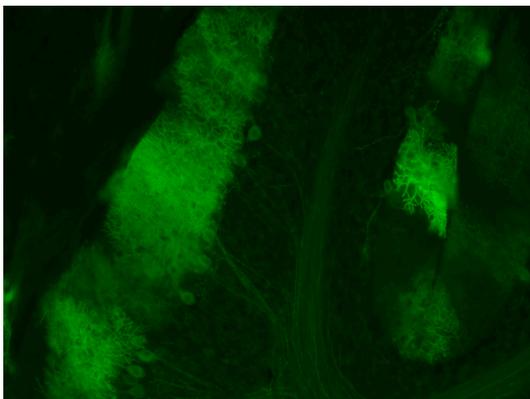


図 1. ChR2 と GFP は同時に発現するように設計してあるため、ChR2 を発現したプルキンエ細胞は GFP を発現する。これらプルキンエ細胞群は、縦縞状に配置していた (Hashimoto et al., 2004)。

2) ChR2 を発現したプルキンエ細胞から青色レーザー光によりスパイク活動を誘発することができた (図2)。また、誘発されたスパイクは、自発発火によるものと同じ波形であった (図3)。

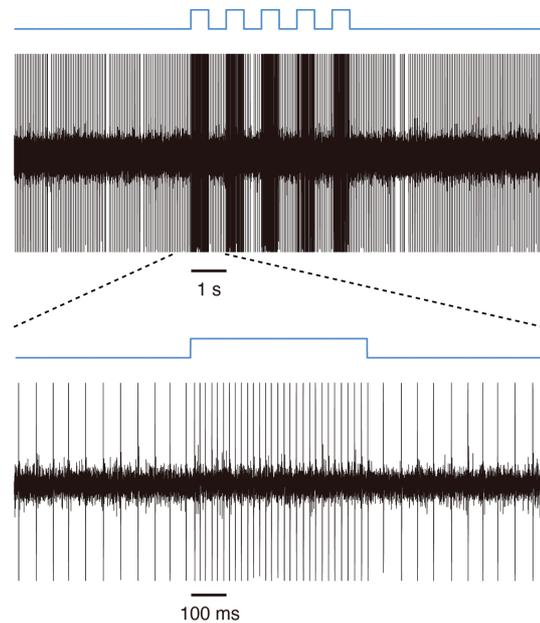


図 2. プルキンエ細胞は数十 Hz の自発発火が観察されるが、青色レーザー光刺激 (500 ミリ秒) による人為的な活動増加が観察された。

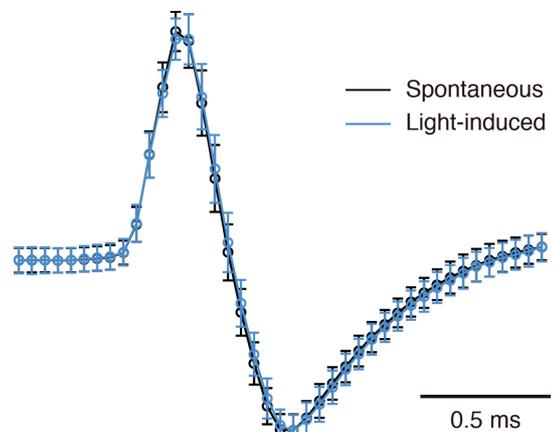


図 3. 自発発火と青色レーザー光刺激由来のスパイク発火の波形の比較。

3) 光ファイバーを用いて青色光を小脳皮質に照射することにより、局所的にプルキンエ細胞の活動を増加させることができた。

4) 2光子励起レーザー顕微鏡を用いることによってターゲット細胞を可視化でき (Alexaを用いたシャドーパッチ、図4)、かつ、対物レンズを通してピンホールを介した青色レーザー光を照射することにより、数十ミクロン程度の範囲の細胞群についてのみ活動を操作できることも確認した。

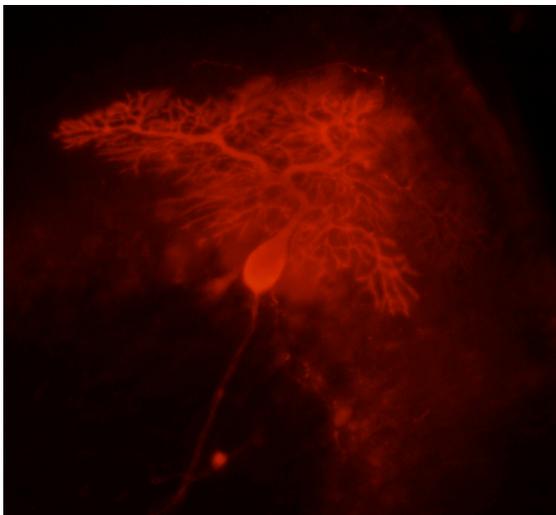


図 4. プルキンエ細胞が電極内液 (Alexa) で充填されている様子。樹状突起のみならず、軸索まで染まり、投射先の解析・同定も可能である。

5) マウスの行動実験を実施すべく、青色LEDライトをインプラントし、小型かつ無線レーザー装置およびコントローラーの開発を行った (Iwai ら、2011、図5)。また、筋電図の計測を行い、青色LED光によって、誘発される足の筋肉が動くことを筋電位により確認した (図6)。

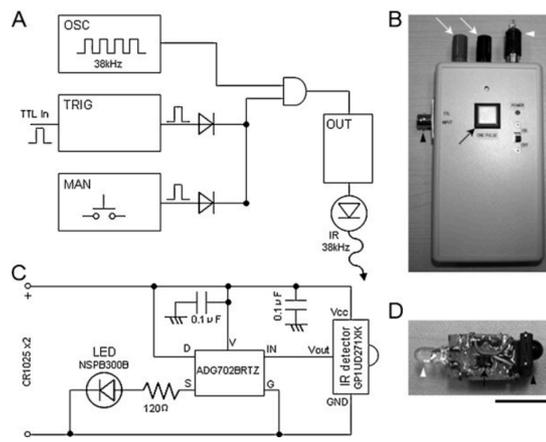


図 5. AとBはコントローラ。主に TTL 信号を発生させる。CとDは TTL 信号の受信とその信号受信のタイミングに同期して青色LEDが発光するように設計してある。

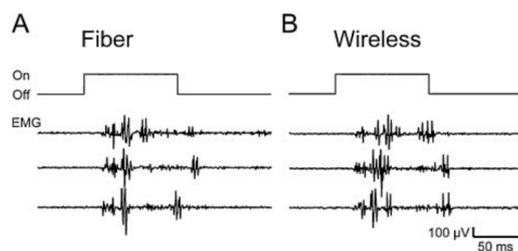


図 6. マウス筋電図計測。ファイバーを用いて直接照射したとき、図5の装置を用いて遠隔操作刺激したときで同様の効果が見られた。

6) マウス視覚野の興奮性細胞を青色光刺激したとき、視覚刺激と組み合わせることによって、視覚応答が消失すること明らかにした。行動実験下では知覚の消失が起こることが期待される。

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 1 件)

Iwai Y, Honda S, Ozeki H, Hashimoto M, Hirae H. (2011) A simple head-mountable LED device for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice. *Neuroscience Research*, 70, 124-127.

(査読有)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

尾関 宏文 (OZEKI HIROFUMI)
独立行政法人理化学研究所・大脳皮質回路可
塑性研究チーム・研究員
研究者番号：80553833

(2) 研究協力者

橋本 光広 (HASHIMOTO MITSUHIRO)
独立行政法人理化学研究所・旧橋本研究ユニ
ット・ユニットリーダー
研究者番号：90311357

平瀬 肇 (HIRASE HAJIME)
独立行政法人理化学研究所・神経グリア回路
研究チーム・チームリーダー
研究者番号：90392084