

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500476

研究課題名(和文) 機能的イメージングと3次元再構築法による小脳皮質における情報処理機構の解析

研究課題名(英文) The study for cerebellar cortical information processing using functional imaging and three-dimensional reconstruction

研究代表者

道川 貴章 (MICHIKAWA, TAKAYUKI)

独立行政法人理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員

研究者番号：90282516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルス注入法により小脳プルキンエ細胞特異的にCa²⁺感受性蛍光タンパク質を発現させ、生きたマウスの小脳から二光子励起レーザー顕微鏡によってニューロン活動をリアルタイムで計測することで、特定の情報処理に関与するプルキンエ細胞群の網羅的同定というアプローチが可能となる。本研究では、小脳皮質上の機能単位の解明の為に、小脳皮質の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞に1波長励起2波長蛍光型Ca²⁺感受性蛍光タンパク質yellow cameleon2.60を発現させ、マウスの小脳から光学計測によりプルキンエ細胞の個々のスパイク発火を検出する実験手法およびデータ解析方法の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：Adenovirus can be used to express genetically encoded calcium indicators into specific types of neurons, such as cerebellar Purkinje cells. In vivo two-photon imaging of a large population of Purkinje cells will be useful to identify functional circuits that participate in information processing in cerebellar cortex. In this study, I have established experimental procedures and deconvolution-based data analysis methods suitable for inferring single complex spike firings of Purkinje cells from two-photon calcium imaging data acquired from living mice expressing a genetically encoded ratiometric calcium indicator, yellow cameleon 2.60.

研究分野：神経生理学

キーワード：カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

小脳皮質は分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層の三層構造からなり、形成される神経回路は小脳の部位に依らず一様である。一方、小脳の異なる部位は脳や脊髄などの多様な神経部位と結びつき、身体平衡や眼球運動の制御、反射運動の適応、条件付け、歩行運動、随意運動の実行と計画、感覚情報の評価、さらには言語や思考などのヒト高次認知機能を含むさまざまな機能制御に参与している。

小脳皮質への入力の一つである登上線維の投射パターンや小脳皮質唯一の出力であるプルキンエ細胞の軸索の投射パターン等の解剖学的解析や電気生理学的解析から、大脳皮質のコラム構造とは異なり、マイクロゾーンと呼ばれる身体の前後方向に伸びた帯状の構造が小脳皮質の機能単位であると考えられている。一方、体性感覚入力による小脳顆粒細胞およびプルキンエ細胞の応答の記録から、特定の体部位からの体性感覚入力に応答する複数の領域が小脳皮質上でパッチ状に散在していることが示されており、このパッチ状の分布がマイクロゾーンとは一致しないことから小脳皮質上で体性感覚入力を処理するための部位については見解が分かっている。

2. 研究の目的

アデノウイルス注入法により、小脳皮質のほぼすべての領域でプルキンエ細胞特異的にCa²⁺感受性蛍光タンパク質を発現させることができる。この方法に *in vivo* での二光子励起レーザー顕微鏡によるニューロン活動の計測を組み合わせることで、従来行われてきた細胞外記録による単一ニューロン活動計測を指標にした体表面上の受容野の探索ではなく、特定の体性感覚刺激に反応するプルキンエ細胞群の網羅的同定という全く逆のアプローチが可能となる。本研究では、小脳皮質上の機能単位の解明の為に、小脳皮質の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞特異的にCa²⁺感受性蛍光タンパク質 yellow cameleon2.60 (YC2.60) を発現させ、生きたマウスの小脳からプルキンエ細胞の個々の

スパイク発火を検出する実験手法およびデータ解析方法の確立を行った。

3. 研究の方法

すべての実験は理化学研究所脳科学総合研究センターの組換え遺伝子取扱規則および実験動物取扱規則に従って行った。

(1) Ca²⁺感受性蛍光タンパク質の発現

胎生 11 日のマウス胎児の脳室にCa²⁺感受性蛍光タンパク質を組み込んだ組み換えアデノウイルスを注入した。生後 1-3 日の間に頭部の蛍光を観察することで、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質を発現するマウスを同定した。Ca²⁺感受性蛍光タンパク質発現マウスは、生後 20 日から 220 日の間に蛍光観察および電気生理学的計測を行った。

(2) 頭部固定プレートの取り付けおよびガラス観察窓の作成

マウスはフェンタニル (0.05 mg/kg)、ミダゾラム (5.0 mg/kg)、メドトミジン (0.5 mg/kg) 混合液で麻酔し、以下の手術を行った。急性実験では、観察当日にステンレス製の頭部固定用プレートを手術用アロンアルファおよび歯科用セメントを用いてマウス頭蓋骨に接着させた。その後、頭蓋骨の一部および硬膜を除去し、2%アガロースで小脳表面を覆った。呼吸および心拍による脳の振動を低減するために、1 mm 厚のカバーガラスでイメージング面のみを覆い、歯科用セメントで固定した。慢性実験では、イメージング開始の少なくとも 2 週間前に上記と同様の手法で頭部固定用プレートの取り付け手術を行った。また、頭蓋骨を除去することで露出した脳表面を完全に覆うようにガラス観察窓を作成した。

(3) *in vivo* における二光子励起レーザー顕微鏡による蛍光観察および細胞外記録による電気生理学的計測

頭部固定マウス小脳からの蛍光シグナルは、カールツァイス社製正立顕微鏡 (LSM710MP) に 20 倍の水浸対物レンズ (W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC D=0.17 M27

70mm) を装着し、256 x 256 ピクセル、2-20 Hz の時空間解像度で取得した。820 nm に設定したコヒレント社製の二光子励起レーザー (Chameleon Ultra) を励起光として用いた。蛍光シグナルは 630 nm のローパスフィルターを通して励起光と分離し、510 nm のダイクロイックミラー、460-500 nm および 525-560 nm のバンドパスフィルターを用いて、Venus の蛍光シグナルと ECFP の蛍光シグナルに分離し、GaAsP 検出器により記録した。細胞外シングルユニット記録は、細胞外溶液 (150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.3, 300 Osm) を充填したガラスピペット (1-3 Mohm) により計測した。シングルユニット信号はモレキュラーデバイス社製のパッチクランプアンプ Multiclamp700B および pClamp10 ソフトウェアを用いてサンプリング周波数 100 kHz で取得した。イメージングと電気生理記録は、イメージング用ソフトウェアが生成するトリガー信号により同期させた。

(4) データ解析

画像データおよび電気生理データの解析は、MATLAB を用いて作成した自作ソフトウェアにより解析した。カールツアイス社による画像データの読み込みには LSM File Toolbox (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/8412-lsm-file-toolbox/content/lsm/lsminfo.m>) および tiffread2.m (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/10298-tiffread2-m>) を用いた。画像の位置補正には TurboReg (<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/turboReg/>) を用いた。独立成分分析には FastICA (<http://research.ics.aalto.fi/ica/fastica/>) を利用した Cellsort (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/25405-cellsort>) を用いた。逆畳み込み演算には fdeconv.m (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/5465-fast-deconvolution/content/fdeconv.m>) を用いた。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 二光子イメージ画像データに含まれるノイズの解析

生きたマウスの脳から蛍光画像を取得する際には、麻酔条件下であっても心拍や呼吸等による脳自身の振動に由来するノイズにより、本来取得すべき神経細胞の活動電位発生に伴う蛍光シグナルが大きく歪められる。そこで画像に含まれるノイズ成分を調べるために、麻酔条件下で取得された画像データの全ピクセルについて周波数解析を行ったところ、1.5 Hz から 2.5 Hz の帯域にノイズが含まれることがわかった。ノイズは、同一実験内では単一の周波数を示したが、マウス個体により上記の範囲内で周波は異なっていた。得られたノイズの周波数はマウスの心拍数に比べ十分低いため、呼吸に伴う脳の振動がノイズの主な要因であると考えられた。また、YC2.60 では分子内に含まれる青色蛍光タンパク質 (ECFP) および黄色蛍光タンパク質 (Venus) の間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の効率の変化によって細胞内カルシウム濃度を測定するため、2 種類の蛍光シグナルを測定する必要がある。通常 Venus より分子吸光係数および量子収率が低い ECFP の蛍光強度は低く測定される。実験に使用した二光子励起レーザー顕微鏡ではバックグラウンドの蛍光の値が非常に小さくなり、ECFP の蛍光画像を解析したところ構成する全ピクセル数のうちおよそ 10% のピクセルで蛍光強度がゼロになっていることがわかった。特に ECFP シグナルは FRET 効率を計算する際に Venus の蛍光シグナルを割るための分母として用いる必要があり、ECFP の値がゼロの場合、そのままレシオ値を求めると値が無限大となってしまうため、なんらかの操作が必要である。なお、生きたマウスの脳から測定した蛍光画像では上記の振動に伴って各ピクセル蛍光強度は時間の経過とともに検出器のダイナミックレンジに対して十分大きな範囲で変動する。このため、単に励起光強度や検出器の印加電圧を上げただけでは輝度が最大値以上になる飽和ピクセルが大量に作られてしまうことになり、この問題を解決することはできない。

(2) レシオ画像の作成

上記の *in vivo* で FRET センサーを用いる際に生じる問題点を解決するために、以下のレシオ画像作成法を用いた。Venus の画像および ECFP の画像それぞれについて、各ピクセルの時間平均値を差し引くことで補正した画像を作成し、最小輝度を持つピクセルの輝度値を元にすべてのピクセルが正の値を持つように線形変換を施した後に両者の比を取りレシオ画像を得た。このようにして作成したイメージは、多くのピクセルにおいて振動に伴う変動がキャンセルされて小さくなり、また FRET 効率を計算する際に分母がゼロとなる演算も避けられている。

(3) レシオ画像からプルキンエ細胞樹状突起シグナルの検出

上記の方法で計算したレシオ画像は、線形変換した後の Venus 画像および ECFP 画像に含まれる振動成分の大きさが厳密には異なっているため、振動によるノイズ成分を完全に除去し切れていないものの、独立成分分析により個々のプルキンエ細胞の樹状突起の蛍光シグナルを効率よく分離可能であった。

(4) 抽出されたプルキンエ細胞樹状突起シグナルから振動ノイズの除去

独立成分分析により決定した region of interest (ROI) を用いて、改めて Venus 画像および ECFP 画像の ROI 内ピクセルの平均値の時間変化を計算した。それぞれの時間変化曲線から平均値、および分散を計算し、これらの値により正規化した時間変化曲線を求めた。この曲線についてすべてのデータポイントが正の値になるようにオフセット値を加えた後に Venus/ECFP 曲線の比を計算することで、振動によるノイズの大部分を消去できることを見出した。

(5) 1 回の複雑スパイク生成に伴うプルキンエ細胞樹状突起における FRET シグナル変化の推定

上記の振動ノイズを除いた FRET シグナルをもとに、1 回の複雑スパイク生成に伴う蛍光シグナル変化の動態を推定した。プルキンエ

細胞の複雑スパイク発生頻度は通常 1 Hz 程度であるが、YC2.60 シグナルは減衰速度が遅いためこのように低い発火頻度であってもいくつかのスパイクによって生じた蛍光シグナルが重なり合い、一回のスパイクに伴う蛍光シグナルの時間変化を求めることは困難である。このため、二光子イメージングと同時に計測した細胞外単一ユニット記録により求めた複雑スパイクの時系列パターンと、以下の式で表されるダイナミクス (R はレシオ値、 t_0 はスパイク発生時刻を表す) の畳み込み演算を行い、測定された FRET 変化を最もよく再現する以下の 3 つのパラメータを推定した。

$$R = A(1 - e^{-(t-t_0)/\tau_{on}}) \cdot e^{-(t-t_0)/\tau_{off}}$$

A: 振幅

t_{on} : 上昇時の時定数

t_{off} : 減衰時の時定数

(6) FRET シグナルから複雑スパイク発生タイミングの推定

上記で得られたパラメータを用いて、測定されたプルキンエ細胞樹状突起の FRET シグナルの逆畳み込み演算を行ったところ、細胞外単一ユニット記録で計測した複雑スパイクの 90%以上が FRET シグナルから計測できることを見出した。

これらの結果から、波長の異なる 2 種類の蛍光シグナルの比を取ることで Ca^{2+} 動態を計測可能な FRET センサーである YC2.60 は、呼吸によって大きな振動ノイズが生じる生きたマウスの小脳からプルキンエ細胞の個々の複雑スパイク発生を光学的に検出するために極めて有用であることが明らかとなった。今後この実験系を用いて小脳皮質上の機能単位を明らかにしていきたい。

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 3 件)

¹ Ishida S, Matsu-Ura T, Fukami K, Michikawa T, Mikoshiba K.

“Phospholipase C- β 1 and β 4 contribute to

non-genetic cell-to-cell variability in histamine-induced calcium signals in HeLa cells”

PLoS One. 9: e86410. (2014)

10.1371/journal.pone.0086410 査読有り

² Miyamoto A, Bannai H, Michikawa T, Mikoshiba K. “Optimal microscopic systems for long-term imaging of intracellular calcium using a ratiometric genetically-encoded calcium indicator” Biochem Biophys Res Commun. 434:252-257 (2013)

10.1016/j.bbrc.2013.02.112. 査読有り

³ Nakamura, H., Bannai, H., Inoue, T., Michikawa, T., Sano, M. and Mikoshiba, K. " Cooperative and Stochastic Calcium Releases from Multiple Calcium Puff Sites Generate Calcium Microdomains in Intact HeLa Cells"

J. Biol. Chem. 287, 24563-24572 (2012)

10.1074/jbc.M111.311399 査読有り

{学会発表}(計 5 件)

¹ Michikawa, T., Itohara, S., and Miyawaki, A. “Optical recording of neural activity using yellow cameleon 2.60-expressing mice”

理研シンポジウム:第2回「光量子工学研究」(2014年11月25-26日) 仙台市情報産業プラザ(宮城県・仙台市)

² Kuroki, S., Tsutsui, H., Michikawa, T., Iwama, M., Miyawaki, A. and Itohara, S. "Cell-type selective wide-field calcium imaging, combined Yellow Cameleon 2.60 Tg mice and macromicroscopy"

第36回日本神経科学大会(2013年6月20-23日) 国立京都国際会館(京都府・京都市)

³ Michikawa, T., Miyawaki, A., Kakei, S., Hausser, M., Itohara, S. and Nakai, J., "*In vivo* calcium dynamics in cerebellar Purkinje cell dendrites"

Society for Neuroscience (2012年10月13-17日) New Orleans (USA)

⁴ Kuroki, S., Michikawa, T., Tsutsui, H., Manita, S., Shimozono, S., Murayama, M., Miyawaki, A. and Itohara, S. "Cell-type selective wide-field calcium imaging, combined Yellow Cameleon 2.60 Tg mice and macromicroscopy"

Molecular and Cellular Cognition Society (2012年10月11-12日) New Orleans (USA)

⁵ Kuroki, S., Michikawa, T., Manita, S., Tsutsui, H., Shimozono, S., Murayama, M., Miyawaki, A. and Itohara, S.

"Establishment of transgenic mice expressing calcium sensor Yellow Cameleon 2.60 and applications to analysis of the thalamocortical pathway"

第35回日本神経科学大会(2012年9月18-21日) 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

道川 貴章(MICHIKAWA, Takayuki)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域 生命光学技術研究チーム・研究員

研究者番号: 90282516