

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700402

研究課題名(和文) イン・ビボ - マウス脳における単一神経細胞のカルシウム動態の解明

研究課題名(英文) In vivo dendritic calcium imaging of a single neuron

研究代表者

真仁田 聡 (Satoshi, Manita)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：80584135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：新型多光子レーザー顕微鏡を用いて樹状突起からのカルシウムイメージング法を確立した。この方法とさらに複数の手法を用いて次の点について研究の進捗があった。マウス一次体性感覚野(S1)と二次運動野(M2)との間に相互的な投射が存在することを確認した。M2からの入力がか樹状突起スパイクを誘起しそれによりS1における5層神経細胞の選択的な発火を引き起こすことを明らかにした。触覚を用いる行動実験において、M2からの入力を光遺伝学的手法を用いて抑制するとマウスの知覚が不正確になると解釈できる結果を得た。本研究によって樹状突起のカルシウム応答が知覚形成の基本的な構成要素となっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established calcium imaging methods from dendrites using a new multi-photon laser microscope. There is the progress of research on the following points using multiple techniques. We confirmed that the reciprocal projection between the primary somatosensory cortex (S1) and the secondary motor cortex (M2) in mouse. We revealed that the input from M2 causes firing of selective layer 5 neurons in the S1, which is following dendritic spikes. From behavioral experiments, which is related with haptic perception in mouse, we found that an inhibition of M2 inputs with the optogenetical methods disturbed the haptic perception. From this study, we have found that the dendritic calcium response is a building block of a basic component of the perception.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：樹状突起 カルシウム in vivo

## 1. 研究開始当初の背景

当初の研究目的は、カルシウムウエーブを *in vivo* 脳で観察することであった。この目的のために、マウスの後肢を刺激し、その刺激によって誘起する皮質のシナプス活動や樹状突起活動を観察した。すると、マウスの後肢刺激によって、皮質の第一体性感覚野(S1)が活性化するだけでなく、第二体性感覚野(M2)も活性化することを見いだした。これまでの研究でM2は高次な脳機能を担っていると示唆されている。また、M2の活動を薬物によって抑制すると、S1の樹状突起活動も減少することを発見した。これらの発見は、知覚情報の流れがS1からM2だけでなく、M2からS1にも存在することを示唆する。高次脳領域からのシナプス入力(トップダウン入力)が知覚にとって不可欠であることがこれまでの研究で知られていたが、そのメカニズムについてはほとんど知られていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、知覚形成における、トップダウン入力の生理的意義を明らかにすることを目的とした。まず、知覚形成時における皮質応答の時空間的特性を観察し、トップダウン入力の詳細を検討した。つぎに、他の細胞からの情報を受け取る場所である樹状突起の活動がトップダウン入力によってどのように応答するか検討した。さらに、そのトップダウン入力と知覚の因果関係を検討した。

## 3. 研究の方法

実験には28日齢以上の野生型マウス(C57BL/6JmsSlc)、あるいは遺伝子改変マウス(G-CaMP7 transgenic mice)を用い、麻酔下で生理実験、あるいは行動実験を行った。広範囲な皮質の活動を記録するために、膜電位感受性色素(RH1691)の蛍光変化をマウス皮質から高速CMOSカメラによって測定した。膜電位感受性色素を皮質に負荷することで神経細胞を染色した。

神経細胞の投射を可視化するために、順行性神経トレーサーAAV-GFPをS1あるいはM2へ圧力注入した。3週間後に脳スライス標本作製し、トレーサーの分布を観察した。

5層錐体細胞の樹状突起のカルシウム応答を記録するために、新型多光子レーザー顕微鏡を用いて、ホールセル記録法を行い単一神経細胞にカルシウム色素を充填した。または、カルシウムプローブを遺伝的に発現している遺伝子改変マウス(GCaMPマウス)を用いた。 piezo素子を用いて対物レンズを20Hzで上下に数百マイクロメートル振動させ、樹状突起の複数の場所からイメージングを行った。

皮質の異なる深さから同時に神経細胞の

発火活動を記録するために、16チャンネルのシリコンプローブを用いて局所的細胞外電位とマルチユニット活動を記録した。

M2からS1へのシナプス入力を制御するために、光照射によって開口するチャンネルタンパク質ArchTをウイルスベクターを用いてM2の軸索へ特異的に発現させた。光照射によりArchTが活性化すると、ArchTを発現する細胞は過分極するため、その細胞の活動を抑制することができる。ウイルス感染から8週間後、生理実験を行った。この方法を用いて、M2からS1へのシナプス入力を制御できるか確認するために、後肢刺激によって生じる神経活動をマルチユニットレコーディング法、あるいはホールセル記録法を用いて観察し、検討した。無線LED照射装置をArchT発現マウスのS1部位の頭蓋骨へ接着させ、マウスの後肢を手がかりとする行動実験を行った。M2からS1へのシナプス入力を制御した時のマウスの行動の変化を観察した。

薬理的にS1あるいはM2を特異的に抑制するために、Naチャンネル阻害薬であるテトロドトキシ(TTX)、あるいはグルタミン酸受容体阻害薬であるCNQXを圧力注入により脳内へ(1  $\mu$ L)投与した。

## 4. 研究成果

第一に、後肢刺激によってS1とM2が活動するか膜電位イメージング法を用いて確認した。広範囲な皮質から脳活動を記録すると、後肢刺激によってS1が活動し、それに引き続きM2が活動することを確認した。つぎに、S1とM2が相互に連絡しているかを検討するために、それぞれを薬理的に抑制すると、M2およびS1の応答が抑制された(図1)。

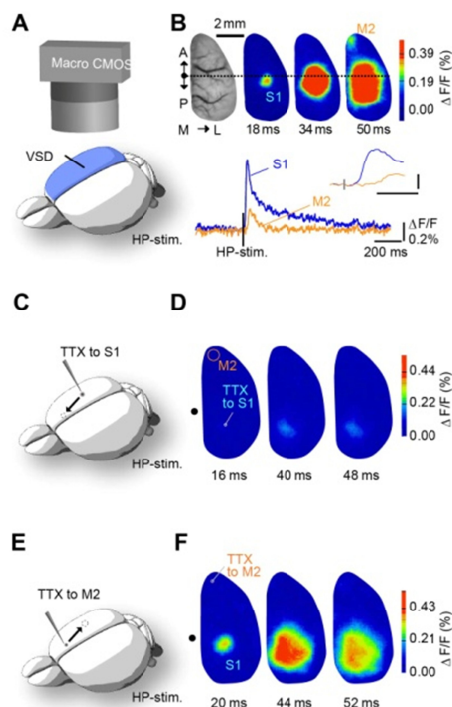


図1 .A.実験の概要図。B.後肢刺激によってS1とM2の活動が誘起された。C,D.薬物注入によりS1の活動を抑制するとM2の活動が減少した。E,F. S1の活動もM2に依存する。

第二に、神経トレーサーをS1あるいはM2へ注入すると、S1からM2、あるいはM2からS1へ軸索が投射していることを確認した。これらの結果より、S1とM2は相互に情報を伝達していることが明らかになった(図2)。

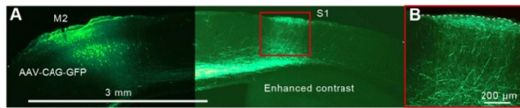


図2 .A.神経トレーサーによってM2からS1への軸索を可視化した。B.Aの赤線で囲まれた部位の拡大図。

第三に、M2からのトップダウン入力がある層に反応をもたらすかマルチユニット記録法を用いて検討した。後肢刺激によって潜時の短い応答と長い応答が生じた。M2の活動を薬理的に抑制すると、潜時の長い応答だけが抑制された。これは、潜時の短い応答は感覚器視床S1を介し、潜時の長い応答はS1-M2そして再びS1へ戻ってくることを示す。また、そのM2からの入力はまずS1の深い層で生じ、次に浅い層で生じていることを示した(図3)。

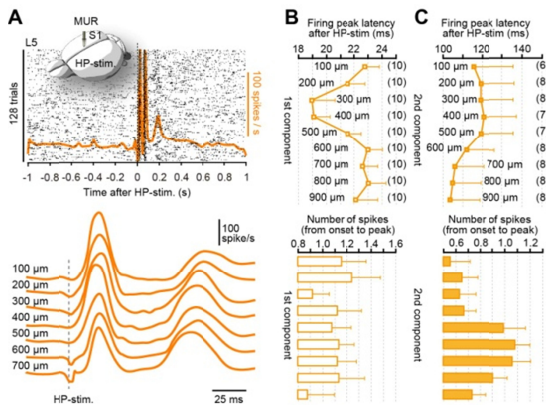


図3 A.マルチユニット記録による神経細胞の発火パターン。(下図)異なる深さで記録した発火頻度の経時変化。後肢刺激(HP-stim.)によって発火頻度が二回増加する。B.後肢刺激によって誘起された短い潜時の発火活動の潜時と発火数。C.長い潜時の発火活動の潜時と発火数。

M2からS1へのシナプス入力は深い層(6層)と浅い層(L1)へ進入しているにもかかわらず、発火活動は5層が最も大きいという結果を得た。このメカニズムは遠位樹状突起

のカルシウムスパイクによるものであると仮説を立て、M2の入力によってS1の遠位樹状突起でカルシウムスパイクが生じるか検討した。実験には二光子レーザー顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを行った。その結果、後肢刺激によって樹状突起では潜時の短く振幅の小さい応答と、潜時の長く振幅の大きい応答を観察した。薬理的にM2の活動を抑制すると、潜時の長く振幅の大きい応答のみが抑制された(図4)。これまでの研究で、遠位樹状突起のカルシウム応答には1.逆行性活動電位の伝播による電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入、2.シナプス入力によって活性化されるNMDA受容体からのカルシウム流入、3.カルシウムスパイクによる電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入、の3つのメカニズムがあると考えられている。特にカルシウムスパイクによるカルシウム流入は逆行性活動電位によるものよりも大きく、NMDA受容体を介した流入はほとんど観察できないことが報告されている。ゆえに、M2の活動依存的な潜時の長い大きいカルシウム応答はカルシウムスパイクであると考えられる。

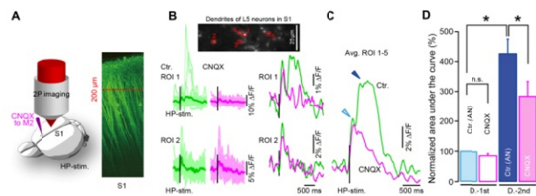


図4 .A.実験の概要図。B,C,D.後肢刺激によってS1の5層樹状突起にてカルシウム応答が観察された。大きいカルシウム応答のみがM2の活動依存的であった。

また、M2を通電による刺激を行うと、S1の5層樹状突起で大きいカルシウム応答と小さいカルシウム応答が観察された。S1の浅い層へのシナプス入力を薬理的に抑制すると、この大きいカルシウム応答だけが抑制された。これは、M2からの入力によってカルシウムスパイクが誘起されたことを示唆する。これらより、M2からのトップダウン入力によってS1の5層錐体細胞の樹状突起では、カルシウムスパイクが生じ、上記に述べた仮説の正当性を検証することができた。

そして、M2からS1への入力と知覚の因果関係を検討するために、M2の軸索にArchTを発現したマウスを用いて行動実験を行った。まず、後肢刺激によって誘起するS1の応答がArchTの活性により抑制されることを確認した(図5)。



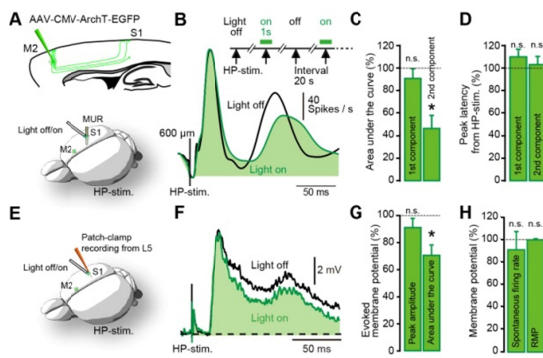


図5 M2 から S1 への入力の光照射による抑制の確認。M2 の軸索に ArchT を発現させたマウスを用いた。A-D. マルチユニット記録法による確認。E-H. ホールセル記録法による確認。後肢刺激によって生じる M2 依存的な S1 応答 ( 潜時の長い応答 ) が光照射によって抑制された。

つぎに、この ArchT マウスを用いて後肢の知覚を手がかりとする行動実験を行った。M2 から S1 への入力を光照射により抑制すると、マウスの後肢の知覚が変化すると解釈できる結果を得た ( 図 6 )。

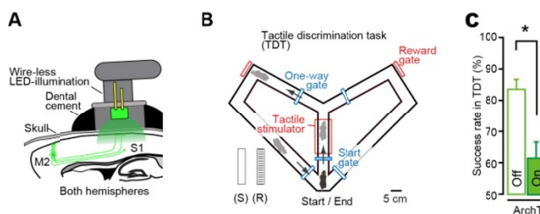


図6 . A. マウスの頭蓋骨へ取付けた無線光照射装置。これと ArchT を用いて M2 から S1 への入力を抑制し、マウスの行動の変化を観察した。B. 行動実験「Y 字迷路」を上から見た模式図。中央の通路につるつる、あるいはざらざらの床を配置し、それぞれの床に対して報酬の場所を変えた。例えば、つるつる床ならば、右側に報酬を配置、ざらざら床ならば、左側に報酬を配置した。C. マウスは床の形状と報酬の場所の関係を学習により覚えることができ、その正解率は 80% 程度になった。中央の床を通過する時に M2 から S1 への入力を光照射によって抑制すると、その正解率が 60% 程度に減少した。これは、M2 からの入力 が光照射により抑制され、床の形状を正確に知覚できなくなったことを示唆する。

本研究より、M2 からのトップダウン入力が樹状突起のカルシウムスパイクを誘起し、細胞体でバースト発火を生じさせることが正確な知覚には必要であることが明らかになった。

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

(1) 真仁田聡, 鈴木崇之, 本間千尋, 松元崇, 小田川摩耶, 山田一之, 太田桂輔, 松原智恵, 犬束歩, 佐藤正晃, 大倉正道, 山中章弘, 柳川右千夫, 中井淳一, 林康紀, Matthew E. Larkum, 村山正宜, 「マウス大脳皮質における知覚に關与するトップダウン回路」, 第 37 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜

(2) 真仁田聡, 鈴木崇之, 松元崇, 本間千尋, 山田一之, 太田桂輔, 小田川摩耶, 松原智恵, 大倉正道, 佐藤正晃, 中井淳一, 林康紀, Matthew E. Larkum, 村山正宜, 「二次運動野からのトップダウン入力による体性感覚の制御」, Neuro2013, 2013 年 6 月 21 日、国立京都国際会館

(3) 真仁田聡, 鈴木崇之, 小田川摩耶, 松原智恵, 大倉正道, 佐藤正晃, 中井淳一, 林康紀, Matthew E. Larkum, 村山正宜, 「in vivo マウス脳における皮質間の相互連絡」, 第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 28 日、タワーホール船堀

(4) S.MANITA, T.SUZUKI, M.ODAGAWA, M.INOUE, M.E.LARKUM, M.MURAYAMA, 「Corticocortical connections between the hindlimb region of the primary somatosensory cortex and the secondary motor cortex in mice」, 北米神経科学学会大会 (Annual Meeting of Society for Neuroscience 2012), 2012 年 10 月 15 日、Ernest N. Morial Convention Center in New Orleans, LA

(5) 真仁田聡, 村山正宜, 「in vivo マウス脳における単一神経細胞樹状突起からのカルシウムイメージング」, 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

真仁田 聡 (MANITA, Satoshi) 脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号 : 80584135