

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560470

研究課題名(和文) 顕微内視鏡による自由行動中マウスでのin vivo Ca・キナーゼイメージング

研究課題名(英文) In vivo Ca/kinase imaging in freely moving mouse using micro-endoscope

研究代表者

船曳 和雄 (Funabiki, Kazuo)

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・研究員

研究者番号：00301234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はFRET測光に対応した顕微内視鏡システムを構築し、同システムと線条体直接路・間接路それぞれの投射ニューロン特異的にPKA,ERKのFRETバイオセンサーを発現させたマウスを用いて様々な行動パラダイムでの直接路・間接路投射ニューロンのPKA,ERK応答を計測した。結果、線条体では報酬入力・忌避入力それぞれで、直接路・間接路が逆報告のPKA,ERK応答を示すこと、さらにオスマウスの生殖行動などより自然な行動選択の状況などでもこれら直接路・間接路の優位性のシフトはダイナミックに起こっていること、さらに、間接路投射ニューロンの特にERK応答は非常に些細な行動変化で引き起こされることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We made a micro-endoscope system enabling FRET imaging in freely moving animals. By combining it with the mutants in which PKA or ERK FRET biosensor is expressed specifically in the striatal projection neurons of either the direct or the indirect pathway of the basal ganglia circuitry, we explored in vivo dynamics of PKA or ERK response of either pathway against several behavioral paradigms. We revealed that PKA and ERK of the direct and indirect pathways, in principal, show activation in a reciprocal manner. We further revealed that these dynamic shifts of PKA or ERK activities between direct and indirect pathways occur in a more natural situation, such as the action selection in male's mating behavior. Furthermore, we found that the behavioral threshold for the significant activation of ERK of the indirect pathway neurons is quite low, which may indicate that the indirect pathway would be more important in action selection occurring in daily life.

研究分野：システム神経科学

キーワード：in vivo imaging action selection basal ganglia system neuroscience PKA ERK

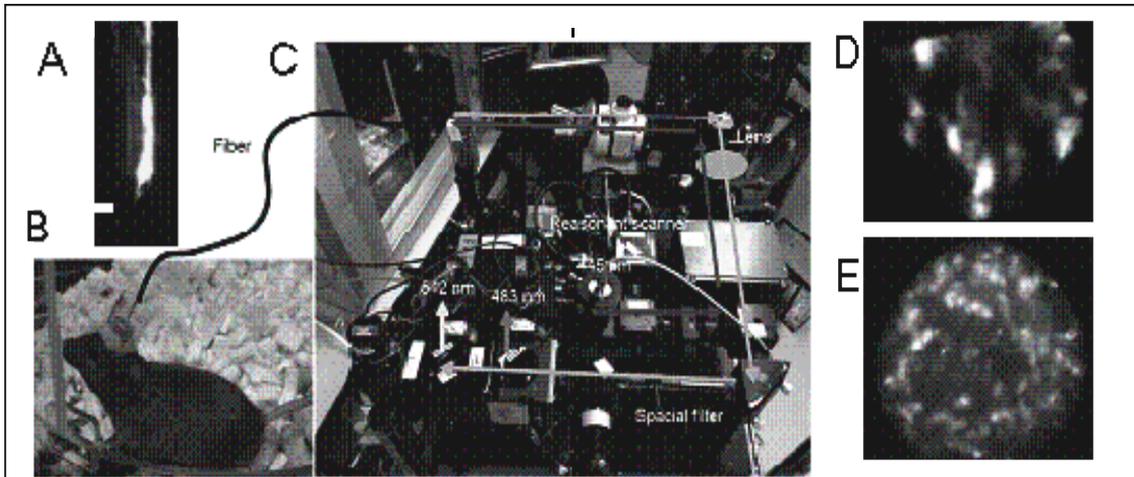


図1 申請者らが開発した頭微内視鏡システム。A、鉛筆状に研磨した内視鏡先端。低浸襲で脳深部が観察可能。B、内視鏡留置により長期間、自由行動での観察が可能。C、自作した共焦点レーザー走査光学系。安価で自由な拡張が可能。D、大脳皮質錐体細胞の内視鏡像例(D,Eとも視野300ミクロン)。E、線条体の内視鏡像例。脳深部神経回路での細胞レベルの組織観察が長期間、自由行動中マウスから可能。

### 1. 研究開始当初の背景

実際の行動中に神経活動や分子変化を細胞レベルで知ることが、脳機能の解明にとって極めて重要であることは論をまたない。しかしそれを実現することは技術的には非常に困難な状況であった。多光子励起顕微鏡による *in vivo* live imaging も世界的に行われてきたが、多光子励起顕微鏡でも脳表から 500 ミクロンより深い神経領域の観察は困難であり、さらにその観察には顕微鏡対物レンズの下に頭部を固定する必要があり、当然観察できる行動パラダイムは極めて限定的になる。一方、GRIN レンズや光ファイバー束を刺入することで、脳深部の神経回路を可視化する試みもいくつか報告され、自由行動下の Ca imaging による神経活動解析も報告されていた。

### 2. 研究の目的

我々は、共振型ガルバノミラーを用いた共焦点光学系とファイバー束を組み合わせ、*in vivo* で自由行動下に個々の細胞像を得ることの出来る頭微内視鏡システムを開発した(図1)。本研究ではそれを用いて、複数の励起光を切り替えることで、CFP/YFP の FRET imaging と、RCaMP による Ca イメージングを可能にする実験システムを構築すること。さらに同システムを用いて、大脳基底核の神経回路を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

に関しては、デジタル 10 にて励起光を切り替えるシステムを構築し、さらに、CFP/YFP と RCaMP をそれぞれ時間的に別々にサンプルしてそれを後に merge するプログラムを作成した。現在このシステムは理化学研究所 CLST にてグリア細胞での Ca, JNK 活性変化測定に使用中である。

に関しては、Cre-lox system を用いて線条体の直接路及び間接路投射ニューロン (dMSN, iMSN) それぞれにプロテインキナーゼ A (PKA) あるいは細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の活性をモニターできる FRET バイオセンサー (Kamioka et al, 2012) を発現させたマウスを作製し、これらマウスを用いて行動開始や行動選択に重要と考えられている背側線条体に上記頭微内視鏡を留置して様々な行動パラダイム(コカイン投与、電気ショック、オスマウスの mating 行動)での dMSN, iMSN の PKA, ERK 応答を観察した。

### 4. 研究成果

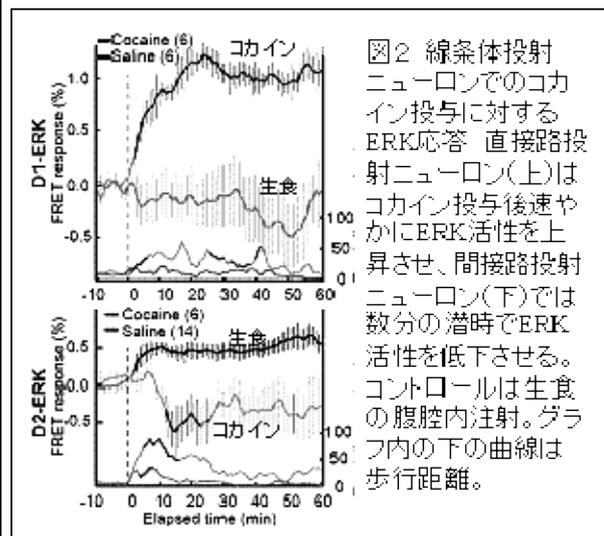


図2 線条体投射ニューロンでのコカイン投与に対する ERK 応答。直接路投射ニューロン(上)はコカイン投与後速やかに ERK 活性を上昇させ、間接路投射ニューロン(下)では数分の潜伏で ERK 活性を低下させる。コントロールは生食の腹腔内注射。グラフ内の下の曲線は歩行距離。

コカイン投与などの報酬入力、あるいは逆に電気ショックなどの忌避入力に対して、dMSN や iMSN は逆方向の PKA, ERK 応答を示すこと、さらにそれら PKA, ERK 応答の詳細な時間経過、さらに同時計測した行動変化(具体的にはコカイン投与は歩行運動、電気ショックは self-grooming)との時間関係を明らかにした。次に我々は、より自然な行動選択の状況と考えられるオスマウスの mating 行動にお

ける dMSN, iMSN の PKA, ERK 応答を計測した。結果、予想通りメスマウスに対して積極的な mating 行動をとっている場合には、dMSN の PKA, ERK は有意な活性化を示し、iMSN は有意な変化を示さなかった。一方、忌避入力としては非常にマイルドと思われる、メスマウスに対しての mating 行動に非積極的な状況では、逆に iMSN の PKA と特に ERK が有意な活性化を示した。これは、オスの mating 行動といったより自然な行動選択の場面において、背側線条体での直接路、間接路の神経回路の活性変化が日常的にダイナミックに起こっていることを示すと同時に、より低濃度のドーパミン変化に対して応答することが知られる D2 受容体をもつ間接路が日常的な僅かな状況変化に応じて行動選択する場面などではより重要な役割を担うことを示唆する所見と考えられる (Goto et al, PNAS, 2015)。次に我々は、DREADD 法を用いて強制的に dMSN、あるいは iMSN 特異的に cAMP を変化させ、それによる PKA 変化とオスマウスの生殖行動変化を観察した。結果、DREADD 法による cAMP 変化に応じて、自由行動中の顕微内視鏡からの記録でも cAMP を上昇させると PKA は活性化し、逆に減少させると不活性化を示すことを確かめた。そして、これら PKA 変化と呼応するようにオスマウスは mating 行動の積極性を変化させた。以上より、行動選択と線条体直接路・間接路投射ニューロンの PKA 応答との causal linkage を確認した (Goto et al, PNAS, 2015)。さらに我々は、上記と同様の手法を用いて側坐核での忌避記憶形成における dMSN, iMSN の PKA 応答の役割を調べた。結果、忌避記憶形成に必須と思われた iMSN の PKA 応答は、忌避刺激 (電気ショック) を受けた直後ではなく、10 分程度経てから徐々に現れることを明らかにした (Yamaguchi et al, PNAS, 2015)。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1 , Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear. Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, Funabiki K, Nakanishi S, Kobayakawa R, Kobayakawa K. **Cell**. 2015 Nov 19;163(5):1153-64.

2 , Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. Yamaguchi T, Goto A, Nakahara I, Yawata S, Hikida T, Matsuda M, Funabiki K, Nakanishi S. **Proc Natl Acad Sci U S A**. in press

3 , Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice.

Goto A, Nakahara I, Yamaguchi T, Kamioka Y, Sumiyama K, Matsuda M, Nakanishi S, Funabiki K.

**Proc Natl Acad Sci U S A**. 2015 May 26;112(21):6718-23.

4 , Bedside evaluation of smooth pursuit eye movements in acute sensory stroke patients.

Johkura K, Kawabata Y, Amano Y, Kudo Y, Murata H, Kirimura S, Funabiki K. **J Neurol Sci**. 2015 Jan 15;348(1-2):269-71.

5 , One-third of vertiginous episodes during the follow-up period are caused by benign paroxysmal positional vertigo in patients with Meniere's disease. Taura A, Funabiki K, Ohgita H, Ogino E, Torii H, Matsunaga M, Ito J. **Acta Otolaryngol**. 2014 Nov;134(11):1140-5.

6 , Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. Hayashi Y, Nabeshima Y, Kobayashi K, Miyakawa T, Tanda K, Takao K, Suzuki H, Esumi E, Noguchi S, Matsuda Y, Sasaoka T, Noda T, Miyazaki J, Mishina M, Funabiki K, Nabeshima Y. **Mol Brain**. 2014 Jun 4;7:44.

7 , Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. Danjo T, Yoshimi K, Funabiki K, Yawata S, Nakanishi S. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014 Apr 29;111(17):6455-60.

8 , Role of granule-cell transmission in memory trace of cerebellum-dependent optokinetic motor learning. Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014 Apr 8;111(14):5373-8.

〔学会発表〕(計 1 件)

1 , In vivo Ca imaging of mouse's inferior colliculus using micro-endoscope. Kazuo Funabiki, 日本解剖生理学会 神戸、2015/3/15

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

船曳和雄（FUNABIKI Kazuo ）

先端医療振興財団・先端医療センター研究

所・上席研究員

研究者番号：00301234

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし