

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640020

研究課題名(和文)海馬神経幹細胞娘細胞クローンの神経回路における機能

研究課題名(英文)Role of clonally-related neurons in hippocampal neuronal circuit

研究代表者

林 康紀(Hayashi, Yasunori)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90466037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、単一の神経前駆細胞から分化した複数の神経細胞の活動を、蛍光カルシウムセンサータンパク質とレトロウイルスベクターを用いて解析した。受精後12日目の胎児に、レトロウイルスベクターを注入し、発生後2ヶ月齢以降で二光子顕微鏡で観察したところ、海馬CA1領域内に娘細胞集成体が観察された。海馬CA1領域の神経細胞に蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現させ、仮想現実空間での活動をイメージングしたところ、娘細胞集成体の活動は他の細胞に比べて低いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cluster of neurons which differentiated from progenitor cells are called clonally-related neurons. In this study, we analyzed neuronal activity of clonally-related neurons using Ca²⁺ sensor protein and retrovirus vector for labeling clonally-related neurons. At 12 days after fertilization, retrovirus was injected into subventricular zone through uterine wall. Infected neurons in hippocampal CA1 region were imaged using two photon microscope at 2 month later after birth and we can see the clonally-related neurons in hippocampal CA1 region. When we analyse the neuronal activity in clonally-related neurons, it is indicated that firing rate of clonally-related neurons were lower than other neurons.

研究分野：総合生物

キーワード：神経科学 脳・神経

1. 研究開始当初の背景:

中枢神経回路の形成には2つの機構が関与している。一つは、発生期に働く遺伝子によりプログラムされた生得的な機構であり、これにより自律的におおまかな神経回路が形成される。これを元に生後、外界との相互作用によりさらに細部が最適化されていく。生得的な回路形成は視覚野で多数の知見が得られており、最近、生得的機構の一つとして娘細胞集合体が注目を集めている。一方、海馬では、以下の二つのことが明らかとなっている。1)神経細胞は、発生期の脳室壁に存在する神経前駆細胞が分裂し、放射状グリアは存在するが、娘細胞は途中で放射状グリアから離脱し、水平方向に移動し、最終的には錐体細胞層に水平方向の錐体細胞集団を形成する。2)相互にシナプス結合は形成しないが、共通の fast spiking 抑制性神経細胞からの入力を受け、これは娘細胞でない細胞と比較して有為に高頻度であった。この事実は海馬で自律的におおまかな神経回路が形成され、それらを構成する娘細胞集合体が海馬の微小回路に何らかの機能を持つ可能性を示唆する。

一方で、電気生理学的解析からは海馬神経細胞間の発火はランダムではなく、学習とは無関係に特定のパターンをとる事が知られるようになった。このパターンは、経験によって変化するのではなく、既に存在していることが preplay という現象から示唆された。このような機能的結合が、娘細胞集合体から作られると考えられるが、従来の電気生理学的手法では娘細胞集合体の解析は非常に難しく、機能的結合を解明することは出来ない。特に、電気生理学的解析では娘細胞集合体とそれ以外の細胞を区別することが難しい。

近年、二光子顕微鏡を用いて、GCaMP などの Ca^{2+} センサーと組み合わせ、神経細胞の活動を可視化する手法が開発されてきている。この方法を用いれば、特定の細胞種に着

目して神経細胞の活動を解析することが可能である。そこで、本研究では、二光子顕微鏡による神経細胞の可視化とレトロウイルスベクターを用い、海馬 CA1 領域内での娘細胞集合体の活動を解析する。

2. 研究の目的:

これまで述べたように、従来の電気生理学的手法では海馬娘細胞集合体の解析は極めて困難である。

私達はこれまで、仮想現実空間内を行動するマウス海馬で二光子顕微鏡 Ca^{2+} イメージングを行い、空間行動学習によって、複数の神経細胞が同期して発火し、時空間に対する神経細胞集合体が形成されることを観察してきた。そこで、本研究ではこの娘細胞集合体で構成される生得的回路が神経細胞集合体形成にどのような影響をあたえるか調べるために、 Ca^{2+} イメージング法と仮想現実空間による空間行動学習を組み合わせ、海馬娘細胞集合体の機能を解析する。

3. 研究の方法:

(1)娘細胞集合体の標識

娘細胞集合体を標識するために、分裂細胞にのみ感染する Molony murine leukemia virus を改変した CAG プロモーターで tdTomato を発現するレトロウイルスベクターを用いる。E12 の野生型妊娠マウスの子宮を露出し、子宮壁越しに胎児脳室内にレトロウイルスベクターと fast green を微小ガラス管を用いて同時に注入する。この時、うまく脳室に溶液が入るとその形状が子宮壁を介して観察する事が出来る。子宮を母体にも戻し、腹壁を外科用ホチキスで閉じ、さらに生育させる。E19-20 で帝王切開にて胎児を取り出し、ICR 系のマウスに里親に出す。

(2)仮想現実空間行動学習中での海馬娘細胞集合体の解析

生後2ヶ月以上経過したレトロウイルスベクターを注入したマウスの海馬 CA1 領域に、シナプシンプロモーターで GCaMP6f を発現させるアデノ随伴ウイルス(GCaMP6f AAV)を注入する。その後、金属製のヘッドプレートを取り付ける。ヘッドプレート中の穴にある頭蓋骨片に半径 2.8 mm の穴を開け、大脳皮質の一部を露出させる。吸引によって、穴の下にある大脳皮質を最低限吸引し、海馬 CA1 領域を露出させる。皮質除去後の穴に、底部にカバースリップと人工硬膜を接着したステンレス製リングのイメージング窓を埋め込む。

二週間の回復期間を置き、麻酔下で二光子顕微鏡を用いてイメージングを行う。まず、イメージング窓直下にレトロウイルスベクターによってラベリングした赤色蛍光タンパク質を発現する神経細胞が存在するかどうかを確認するために 1100 nm のレーザーで励起させ、赤チャンネルで tdTomato 陽性細胞を探す。その後、910 nm のレーザーで励起し、GCaMP の蛍光を確認する。tdTomato 陽性細胞と GCaMP 陽性細胞の両方が同時に確認できる領域で、以降の観察を行う。

tdTomato 陽性細胞と GCaMP 陽性細胞の両方が同時に確認できたマウスに対し、行動実験二日前から絶水を行う。絶水後、I 字迷路を用いた行動実験を行う。

データ解析に用いる ROI は、tdTomato 陽性細胞の ROI は赤チャンネルの画像から細胞体を決定し、tdTomato 陰性細胞は、GCaMP の画像から細胞体を決定した。それぞれの ROI から蛍光強度の変化を計測し、 $\Delta F/F$ を計算した。蛍光強度測定は ImageJ を用いて計測し、 $\Delta F/F$ の計算および発火頻度の計算、相互相関解析は Matlab を用いて計算した。

4. 研究成果：

(1) 娘細胞集合体の標識

娘細胞集合体を標識するために、E12 の野

生型胎児マウスの側脳室にレトロウイルスベクターを注入した。出生後、1ヶ月経過したと

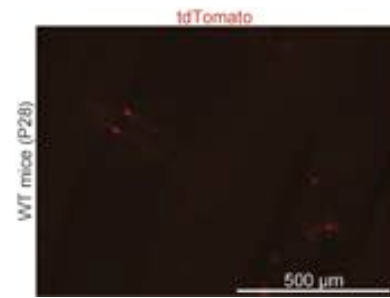


Fig.1 娘細胞集合体の蛍光顕微鏡像

ここで、固定し、tdTomato の蛍光を確認した (Fig.1)。その結果、娘細胞集合体を tdTomato によって標識することができた。

(2) 娘細胞集合体の活動解析(麻酔下)

レトロウイルスベクターで標識したマウスに対し、GCaMP6fAAV をインジェクションした後、ヘッドプレート及び観察窓を取り付け、1100 nm および 910 nm の励起光を用いて二光子顕微鏡で観察した。同じ視野内に、

tdTomato 陽性細胞と GCaMP6f 発現細胞の両方が観察できた

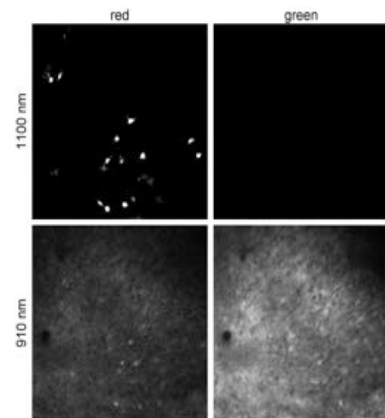


Fig.2 娘細胞集合体の二光子顕微鏡像

感染の確認できたマウスを用いて、麻酔下での娘細胞集合体の活動を解析した。1%イソフルランで麻酔した状態で 10 分間レコーディングを行ったところ、娘細胞集合体の発火頻度は娘細胞集合体以外の細胞より低い発火頻度を示すことがわかった (Fig.3A)。さらに、これらの娘細胞集合体の発火は同期していないことがわかった (Fig.3B)。

(3) 覚醒下での娘細胞集合体の活動解析

続いて、覚醒下での娘細胞集合体の活動を解析した。仮想現実空間の I 字迷路を走らせたところ、マウスは I 字迷路を走り、報酬を

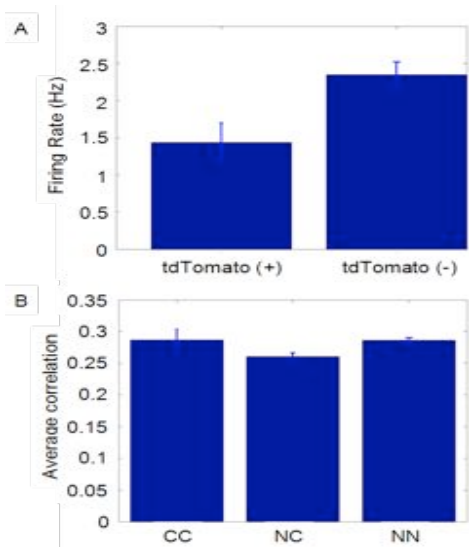


Fig.3 (A)発火頻度。tdTomato(+)は標識した娘細胞、tdTomato(-)はそれ以外の細胞を示す。(B)相互相関解析。CC は標識された細胞同士、NC は標識された細胞とされていない細胞同士、NN は標識されていない細胞同士の組み合わせ。

獲得することが出来た。その時の娘細胞集合体を解析したところ、麻酔下と同様に娘細胞集合体の発火頻度は他の細胞に比べて低いことがわかった(Fig.4A)。さらに、覚醒下でも麻酔下と同様に、娘細胞集合体の発火は同期していないことが分かった(Fig.4B)。

以上のことから、娘細胞集合体の発火頻度が低いことおよび両者は同期発火していないことがわかった。娘細胞集合体の細胞群はレトロウイルスと AAV が同時感染している

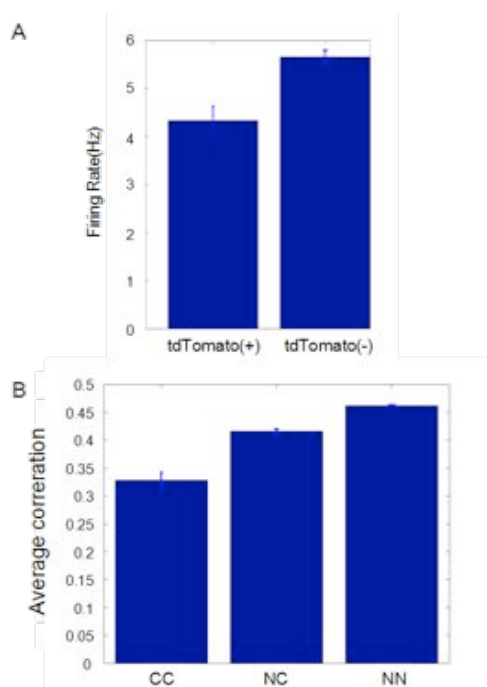


Fig.4 (A)発火頻度。(B)相互相関解析。

ことから、両者の同時感染もしくは tdTomato と GCaMP6f の強制発現によって神経細胞の活動そのものに影響を与えている可能性が考えられる。今後は、その点を克服するために、タモキシフェン存在下で Cre リコンビナーゼが活性化される Emx1-CreERT2 マウスと Cre 依存的に tdTomato を発現する Ai9 マウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスで、E9-E12 の間でタモキシフェンを注入し、GCaMP6f AAV を注入したマウスを製作し、解析を行う予定である。

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 6 件)

① Matsuno H, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Yano-Umeda S, Saneyoshi T, Takeda M, Hayashi Y. A Naturally occurring null variant of the NMDA type glutamate receptor NR3B subunit is a risk factor of schizophrenia. *PLoS One*. 査読有、2015 10(3):e0116319.

doi: 10.1371/journal.pone.0116319.

② Hosokawa T, Mitsushima D, Kaneko R, Hayashi Y. Stoichiometry and phosphoisoforms of hippocampal AMPA-type glutamate receptor phosphorylation. *Neuron*. 査読有、2015 85(1):60-7.

doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.026.

③ Kim K, Hayashi Y. CaMKII: the Swiss army knife of synaptic plasticity. *J Physiol*. 査読有、2014 592(Pt 22):4807-8.

doi: 10.1113/jphysiol.2014.284414.

④ Martinez-Lozada Z, Waggener CT, Kim K, Zou S, Knapp PE, Hayashi Y, Ortega A, Fuss B. Activation of sodium-dependent glutamate transporters regulates the morphological aspects of oligodendrocyte maturation via signaling through calcium/calmodulin-dependent kinase II β 's actin-binding/-stabilizing domain. *Glia*. 査読有、2014 Sep;62(9):1543-58.

doi: 10.1002/glia.22699.

⑤ Saneyoshi T, Hayashi Y. Synapse reorganization-a new partnership revealed. *EMBO J*. 査読有、2014 Jun 17;33(12):1292-4. doi: 10.1002/emboj.201488619.

⑥ Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. 査読有、2014 Apr 16;82(2):444-59. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.021.

〔学会発表〕（計 6 件）

① Hayashi Y. Conversion mechanism of temporal Ca²⁺ code into persistent biochemical code during LTP. 第 92 回日本生理学会, 2015.03.22, Kobe, Japan

② Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine during LTP. 第 18 回 アイセムス国際シンポジウム・第 15 回 国際細胞膜研究フォーラム, 2015.03.04, Kyoto Japan

③ Hayashi Y. Roles of cytoskeleton in hippocampal synaptic plasticity. RIKEN BSI-WIS Brain Sciences Meeting, 2015.01.21, Tel Aviv, Israel

④ Hayashi Y. Molecular mechanisms of hippocampal synaptic plasticity. 2014 Inter-Academy Seoul Science Forum, 2014.11.12, Seoul, Korea

⑤ Hayashi Y. Quantitative view of AMPA receptor phosphorylation. 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014.07.07, Miln, Italy

⑥ Hayashi Y. Role of cytoskeleton in hippocampal synaptic plasticity. Cold Spring Harbor Laboratory Neuronal Circuits 2014, 2014.04.03, NY, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 康紀 (HAYASHI, Yasunori) 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー 研究者番号：90466037

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし