

研究課題別評価書

1. 研究課題名

神経活動の *in vivo* 高速イメージングと光操作

2. 氏名

喜多村 和郎

3. 研究のねらい

脳の情報処理を理解するためには、その構成要素である神経細胞(ニューロン)の機能を生体内で直接計測することが不可欠である。動物の脳内(*in vivo*)において、単一ニューロンが如何にして数千〜数万のシナプス入力を統合して活動電位を出力するのか、言い換えれば、単一ニューロンが神経回路の情報処理にどのように関わっているのかを明らかにすることは、脳科学/神経科学における最も重要な研究テーマの1つである。この問題に答えるためには、生きた動物個体の脳内において、特定のニューロンを同定し、その入出力関係を定量的に測定することが必要不可欠である。本研究では、2光子励起顕微鏡法とパッチクランプ記録法を組み合わせることで、動物個体内で機能している単一ニューロンの入出力活動を直接「その場で」観察することにより、その情報処理を明らかにすることを目的としている。このような、従来の手法では極めて困難であった研究を実現するために、2光子励起顕微鏡法を用いた新しい単一ニューロンの記録法を開発することを最重要課題とした。

4. 研究成果

生きた動物個体の脳内において、特定のニューロンを同定し、その入出力関係を定量的に測定することを可能にする方法として、*in vivo* ホールセルパッチクランプ法が開発され、単一ニューロン機能と神経回路機能の関係について数々の重要な発見がなされてきた。しかしながら、これまでの方法ではニューロンを可視化せずに行うため(ブラインド法)、機能を調べたいニューロンから選択的に記録を行うことは原理的に不可能であり、かつ、細胞内のどの部分から記録を行ったのかを同定することも困難であるため、実験効率は極めて悪い。これらの困難を克服するために、2光子励起顕微鏡で目的のニューロンを可視化した上で、ホールセル記録を行う方法の開発を行った。

(1) 蛍光標識を必要としない単一ニューロンの可視化とシャドウパッチング法

2光子励起顕微鏡法は、レーザー走査顕微鏡法の種類であり、蛍光顕微鏡に分類される。従って、2光子励起顕微鏡を用いて脳内のニューロンを可視化するためには、観察したいニューロンの中に、あらかじめ蛍光タンパク質や蛍光物質を何らかの方法で導入するというのが一般的な常識である。ところが、我々は、脳内の細胞外領域に細胞内に取り込まれることのない蛍光色素(例えば Alexa dye など)を注入することで、2光子励起顕微鏡によりニューロンの「影」を観察することが可能であることを発見した(図1)。通常、パッチクランプ記録を行う際には、記録電極に陽圧をかけておく必要があるため、このとき電極内液に蛍光色素を含めておくだけで、特に前もって色素を注入しておかなくても十分にニューロンを可視化することができる。この方法では、ただ単に細胞外領域に蛍光色素を入れるだけであり、あらかじめニューロン内に蛍光分子を導入する必要が全くなく、「蛍光顕微鏡では、観察対象を光らせなければ観察できない」という、固定観念とは全く逆の発想により、極めて簡便な方法で脳内の単一ニューロンを可視化することを可能にしたのである。

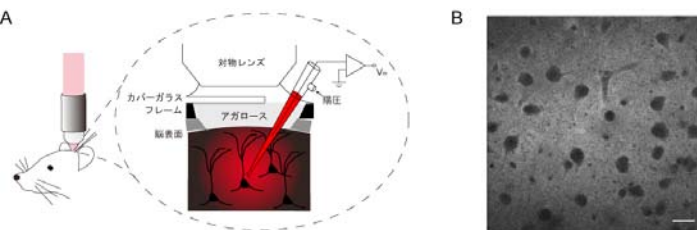


図1. 標識されていないニューロンを動物個体脳内で可視化する

ニューロンの「影」を観察することにより、ニューロンの種類を同定することができることも明らかとなった(図 2)。まず、記録をしたいニューロンが存在する脳部位の大まかな位置に電極を刺入する(大脳皮質第 2/3 層であれば脳表面から 200-300 μm 、小脳プルキンエ細胞層は 150-200 μm など)。次に、ニューロンの「影」を観察し、細胞体の大きさや形から細胞種を同定する。大脳皮質錐体細胞や小脳プルキンエ細胞などの投射ニューロンの細胞体は直径 20 μm 程度であり、抑制性の介在ニューロンは直径 10 μm の小型のものが多い。また、大型の投射ニューロンは細胞体付近では太い樹状突起を持つため、さらに正確な同定が可能である。小脳皮質における細胞種(プルキンエ細胞、介在ニューロン)の同定率は 100%であり、大脳皮質においては、錐体細胞(87%)、介在ニューロン(56%)であった。これらの値は、脳スライス標本を近赤外微分干渉顕微鏡法で観察した場合とほぼ同様の同定率である。

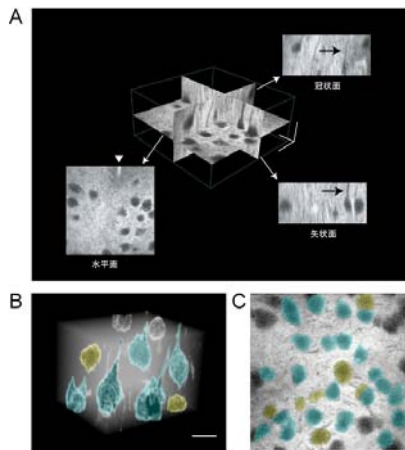


図2. 個体脳内におけるニューロンの可視化と同定。(A)マウス大脳皮質における「影」観察の三次元再構成像。矢じりは記録電極。ニューロンおよび電極先端を同時に可視化することができる。矢状面や冠状面において、錐体細胞の樹状突起が可視化できる(矢印)。(B)細胞種の同定。細胞体の大きさや形、脳表面方向に伸びる太い樹状突起の有無によって、興奮性の錐体細胞(青)か、抑制性の介在ニューロン(黄)かを区別する。(C)一視野の中で同定された細胞の種類。スケールバーは全て 20 μm 。

以上のように、脳の細胞外領域に蛍光分子を入れることで、ニューロンの「影」を観察し、そのニューロンを同定することが可能であることがわかった。一方、記録電極は内液の蛍光色素で可視化できるので、目的のニューロンの「影」に記録電極を近づけてパッチクランプ記録を行うことが可能になる(図 3)。ギガオームシールの形成過程を可視化することが安定で良い記録を行うために重要であることが、脳スライス標本におけるホールセルパッチクランプ記録において分かっている。すなわち、ニューロンに対する記録電極の位置や、ギガオームシールを形成するための陰圧をかけるタイミングを最適化することが安定な記録を得るために必要なのである。我々が開発した方法(シャドウパッチング法)では、脳スライス標本で行われている方法を、動物個体の脳内で行うことを可能にしたと言う点で画期的な方法である。

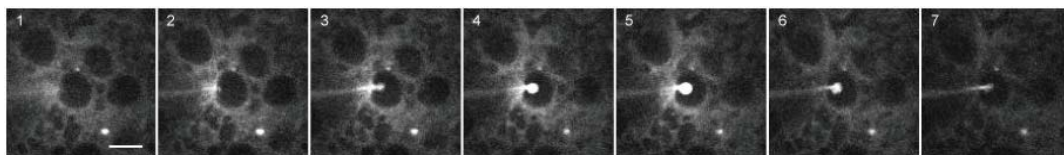
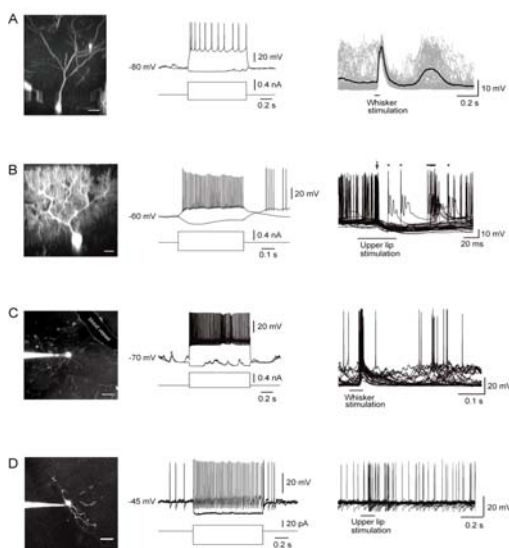


図3. シャドウパッチング法 ギガオームシール形成過程の連続写真(2.5 秒間隔、スケールバー:20 μm)。Alexa 594 を含む記録電極をラット小脳プルキンエ細胞の細胞体に近づけ(1)、細胞膜に対して押し付ける(2, 3)。電極にかけた陽圧による「えくぼ」が観察されたら(4, 5)、陽圧を開放し、陰圧をかける(6)。これにより、ギガオームシールが形成され、同時に細胞外領域の蛍光色素は急速に拡散する(7)。

シャドウパッチング法を用いて、大脳皮質第 2/3 層の錐体細胞(図 4A)や小脳プルキンエ細胞(図 4B)などの投射ニューロンだけでなく、小型の介在ニューロン(図 4C, D)からも選択的にホールセルパッチクランプ記録を行うことが可能であることが示された。「影」観察による細胞種の同定は、記録したニューロンの電気生理学的性質や形態の 2 光子励起観察によって確認された。「影」観察時に必要な細胞外の蛍光分子は、記録中に拡散してなくなるため、記録後は記録電極から細胞内に入った蛍光分子により、ニューロンの形態を高いコントラストで観察することが可能である。「影」観察の条件(2 光子励起レーザーや電極にかかる圧力など)を最適化することで、ホールセルパッチクランプ記録を 70%以上の成功率で行うことが可能となった。また、記録の良し悪しの指標である、アクセス抵抗(低いほど電極による電圧降下が少ない)は 20 M Ω 未満であり、脳スライス標本での記録と同程度の良い記録をとることができる。記録は多くの場合 30 分以上行うことが可能で、2 時間以上に渡って記録を維持することも難しくはない。これらの改善された記録



条件は、シャドウパッチ法によるギガオームシール形成の最適化および記録電極位置の精密なコントロールによってもたらされたものである。

図4. マウス個体脳における大脳皮質、小脳皮質ニューロンのシャドウパッチング

(左)細胞形態の2光子励起顕微鏡による観察。スケールバー:20 μm。(中央)電流注入による活動電位の発生。(右)感覚刺激(髭への空気吹き付け刺激)によるニューロンの応答。(A)大脳皮質第2/3層錐体細胞。(B)小脳プルキンエ細胞。(C)大脳皮質第2/3層介在ニューロン。(D)小脳介在ニューロン。

(2) 覚醒個体脳内における単一ニューロンからの選択的ホールセル記録

従来、動物個体におけるホールセル記録や2光子励起イメージングによる単一ニューロンの機能解析は主に麻酔下の動物において研究が行われてきたが、麻酔薬が中枢神経系に与える影響を無視することはできず、それゆえ用いる麻酔薬の種類によって得られる結果に矛盾が生じることもしばしば見受けられる。しかしながら、無麻酔覚醒時の動物において、これらの解析を行うことは従来の方法(ブラインド法)では非常に困難で、成功例は世界的に見てもごくまれである。本研究で開発した、シャドウパッチング法により麻酔下の動物においては、飛躍的に実験効率が向上したことから、この方法を覚醒動物に用いることによって、無麻酔の状態でもホールセル記録を安定して行うことができると期待された。実際に、無麻酔の動物においてホールセル記録を行った例を図5に示す。麻酔下と比較すると若干実験効率は劣るものの、約50%の成功率で無麻酔のマウスにおいてホールセル記録を行うことが可能となった。今後は、この方法を用いることで本研究の最終目標である、個体脳における単一ニューロンの入出力の定量関係を明らかにして行きたいと考えている。

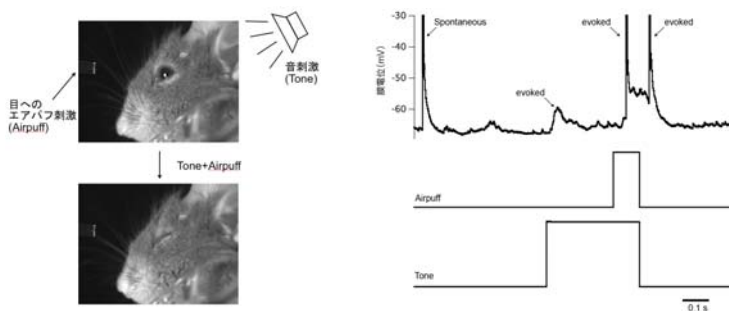


図5. 覚醒マウスにおける音刺激および瞼への刺激に対する、マウスの反応(左)と小脳プルキンエ細胞の応答(右)。刺激に対応した動物の反応(瞬き)をビデオカメラでモニターし、プルキンエ細胞の応答をホールセル記録(右)により測定する。

5. 自己評価

生体内におけるシナプス統合メカニズムを明らかにすることを最終目標として、2光子励起イメージングとホールセル記録を組合せた、新しい記録法の開発を行った。動物個体内で標識しない神経細胞を可視化・同定して、そのニューロンから選択的に記録を行うというこれまでにない発想に基づく手法である。その結果、従来法では到達不可能であった実験効率と実験精度を達成することができた。さらに、この新規記録法の発展として、研究提案時には予期していなかった、覚醒動物への適用ということにも成功した。これまで動物個体を用いる研究で、必ずといってよいほど問題となっていた麻酔薬の影響を受けることなく、よりインタクトに近い状態での単一ニューロン活動を解析できるという点で、極めて重要な技術的進歩であると考えられる。また、感覚刺激による単一

シナプス入力の可視化について、技術的に困難な問題はほぼクリアされ、予備的な実験結果も得ることができた。

本研究課題の最終目標である、動物個体脳内におけるシナプス統合メカニズムの解明については、ようやくその研究の端緒を開いたところであるが、研究目的を達成する上で必要な技術開発は、当初の目標をほぼ達成することができたと考える。

6. 研究総括の見解

本研究は生きた動物個体の脳内の特定のニューロンを同定し活動電位の入出力関係を定量的に測定する新しい手法として、蛍光標識を用いない単一ニューロンの可視化すると同時に従来法のパッチクランプ法を結びつけたシャドウパッチング法を開発した。すなわち、2光子励起イメージングとホールセル記録とを組み合わせた新しい手法である。これを用いて覚醒行動中のマウスの脳において、単一ニューロンからのホールセル活動記録が出来るようになったことは、今後の脳機能解析に大きく寄与するであろう。極めて優れた成果を挙げていると評価される。今後の展開が楽しみである。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Kitamura, K., Judkewitz, B., Kano, M., Denk, W. & Häusser, M.: Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nature Methods*, 5, 61-67 (2008).

(2) 特許出願

なし

(3) 受賞

・平成20年度 武田科学振興財団一般研究奨励(2008年11月)

(4) 著書

・喜多村和郎: In vivoにおける神経活動の2光子励起観察法. *実験医学増刊*, Vol.26, No.12, 157-164 (2008).

・喜多村和郎: 2光子励起顕微鏡法を使った単一ニューロンの機能計測. *バイオインダストリー*, 2009年2月号.

(5) 学会発表

学会発表(国際)

・Kitamura, K., Denk, W. & Häusser, M. Targeted patch-clamp recordings from unlabeled neurons in the mammalian brain, *Neuroscience 2006*.

学会発表(国内)

・喜多村和郎 Targeted patch-clamp recordings from unlabelled neurons in vivo. 第29回日本神経科学大会, 2006.

(6) 招待講演

招待講演(国際)

・Kitamura, K.: Targeted whole-cell recordings from unlabeled neurons in vivo. NIPS-JST国際研究集会「神経科学における非線形イメージングと蛍光バイオセンサーの最前線」、2008.4.18.

招待講演(国内)

・喜多村和郎: 単一ニューロンにおけるシナプス統合のin vivoパッチクランプと2光子イメージングによる解析. 「統合脳」ワークショップ「樹状突起・スパイン」、2007.8.22.

・喜多村和郎: 2光子イメージングを用いた個体脳単一ニューロンからの選択的記録法とその可能性. 第31回日本神経科学大会シンポジウム、2008.7.11.

・喜多村和郎、橋爪幹、狩野方伸: 小脳皮質における登上線維微小帯域のin vivo2光子イメージングによる解析. 生理学研究所研究会「細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性」、2008.10.2

・喜多村和郎: 動物個体脳における神経活動の多光子励起顕微鏡による観察. 光・量子デバイス研究会、2009.2.13

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文) 発表

論文(国際)

・Judkewitz, B., Rizzi, M., Kitamura, K. & Häusser, M.: Targeted in vivo single-cell electroporation. Nature Protocols, in press.

・Schultz, S. R., Kitamura, K., Post-Uiterweer, Krupic, J. & Häusser, M.: Spatial pattern coding of sensory information by climbing-fiber evoked calcium signals in cerebellar Purkinje cell dendrites. Journal of Neuroscience, in press.

(2) 学会発表

学会発表(国際)

・Y. Kawamura, H. Nakayama, K. Kitamura, M. Kano: Developmental changes in climbing fiber responses of cerebellar Purkinje cells revealed by whole-cell patch-clamp recordings in vivo. Neuroscience 2008.

学会発表(国内)

・河村吉信、中山寿子、喜多村和郎、狩野方伸: 発達期小脳プルキンエ細胞のin vivoパッチクランプ法による解析. 第31回日本神経科学大会、2008.7.9.