

[課程-1]

論文の内容の要旨

論文題目 アデノウイルスベクターを用いた神経細胞種および層特異的な活動測定法の開発研究

指導教員 齊藤延人教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年度 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 山田義之

知覚、記憶、情動、行動等の脳機能と神経細胞の活動との関係を理解することは、神経科学研究における最重要課題の一つである。この課題に取り組むためには、生きている動物個体内で神経細胞群の活動を記録 (*in vivo* 記録) し、解析することが必要不可欠である。

従来の細胞外記録法は、電気的な応答を高い時間分解能で記録できるという利点を持っているが、1) 記録している細胞の同定が困難である、2) サンプリングに偏りが生じる可能性がある、3) 同時記録できる細胞数が限られている、という問題を抱えている。

近年、脳内に刺入したガラス管から細胞膜透過性の Ca^{2+} 感受性色素を投与し、多数の神経細胞の活動を光学的に同時記録する *in vivo* Ca^{2+} イメージング法が確立された。この手法は、神経細胞の活動の結果生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を記録する方法であり、細胞外記録法に比べ時間分解能は劣るものの、観察している視野内にあるほぼ全ての細胞を可視化した上で、それらから同時に活動電位に対応したシグナルを記録することができるため、上述した細胞外記録法の問題点を解決することができる。

In vivo Ca^{2+} イメージング法は大脳皮質視覚野、体性感覚野、小脳皮質をはじめとする様々な脳部位に適用され、従来の手法では得られなかった新たな知見を生み出しているが、1) Ca^{2+} 感受性色素を特定の細胞種のみを導入することができない、2) 細胞内から Ca^{2+} 指示薬が徐々に排出されるため長期間の記録が困難である、といった課題が存在している。

一方で、蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーを使用することにより、上記の課題の克服が試みられている。

蛍光タンパク質センサーは遺伝子によってコードされているため、細胞種特異的なプロモーターを用いることで特定の細胞種における長期間の安定な発現が期待できる。実際に、蛍光タンパク質センサーは複数のモデル生物（線虫、ハエ、ゼブラフィッシュ）に適用され、神経活動の記録に有用であることが示された。しかし、哺乳類モデル生物であるマウスの神経細胞内では、センサーが機能しない、あるいはシグナル変化率が著しく低下するという問題が報告されている。近年、蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーの開発・改良が進み、哺乳類神経細胞の活動を光学的に観察できることが報告され始めているが、これらの研究の多くで用いられている遺伝子導入法はトランスジェニック動物の作成に限られており、多大な労力が必要な上に、導入された遺伝子の発現はプロモーター以外の要因にも影響されるため、望む発現パターンを示す個体を得るのは必ずしも容易ではない。より簡便で柔軟な遺伝子導入法を活用することができれば、より速やかに研究が進展することが期待される。

本研究では、アデノウイルスベクターを用いてマウス胎仔脳室内の神経幹細胞に遺伝子を導入することで、細胞種特異的および層特異的に蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーを発現させ、成体マウス脳において神経活動を光学的に測定する実験系の構築を試みた。

本研究で使用した蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーである Yellow Cameleon (YC) は、シアン蛍光タンパク質 (ECFP)、カルモデュリン (CaM)、ミオシン軽鎖キナーゼの CaM 結合部位ペプチド (M13)、改変型黄色蛍光タンパク質 (Venus) からなる融合タンパク質であり、 Ca^{2+} 濃度の変化により生じる CaM-M13 複合体の構造変化が ECFP と Venus の間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化を引き起こす。本研究では、野生型の CaM を用いた YC2.60 (*in vitro* 解離定数 40 nM)、CaM の Ca^{2+} 結合部位 4 つのうち 1 つに点変異 (E104Q) を導入した YC3.60 (*in vitro* 解離定数 250 nM) の 2 種類の YC を使用した。また、CaM の Ca^{2+} 結合部位 4 つ全てに点変異を導入した YCnull を作成し、精製タンパク質が Ca^{2+} 感受性を持たないことを確認した上で、陰性対照として使用した。

まず成体マウス (P21~) の脳を組織学的に解析した結果、センサーの発現パターンは、胎生 12 日目にウイルス注入した場合には小脳プルキンエ細胞および第 5/6 層錐体細胞特異的、胎生 14 日目にウイルス注入した場合には大脳皮質第 2/3 層錐体細胞特異的であることが明らかになった。また、YC2.60、

YC3.60、YCnull の発現パターンがいずれも類似していたことから、Ca²⁺結合能を持つタンパク質を導入したことにより、発達過程における脳の層構築が障害される訳ではないことが示された。

次に、成体マウスから作成した急性脳スライス標本において、パッチクランプ法と二光子励起イメージングを同時に適用し、生理学的な解析を行なった。大脳皮質第 2/3 層錐体細胞に対し、記録電極から電流注入して活動電位を発生させ、細胞体近傍の先端樹状突起においてラインスキャン (~5 ms/line) により蛍光タンパク質 Ca²⁺センサーの応答を観察した。その結果、活動電位の発生に伴い、YC2.60、YC3.60 では ECFP の蛍光強度が減少、Venus の蛍光強度が増加するという変化が見られ、両者の相対蛍光強度比 (Venus/ECFP) は増加した。YCnull ではこのような変化は見られなかったことから、YC2.60 および YC3.60 のシグナル変化は自家蛍光の混入などのアーチファクトによるものではなく、神経活動の結果生じた Ca²⁺濃度変化に起因するものであることが示された。YC2.60 は全細胞 (8/8) で、YC3.60 もほとんどの細胞 (11/13) で活動電位 1 回に対して閾値を超える応答が見られた。1 回の活動電位に対して、YC2.60 は YC3.60 よりも有意に大きな変化を示したが、減衰の時間経過は遅かった。また、刺激周波数 (20 または 80 Hz) によらず、YC2.60 は YC3.60 よりも少ない刺激数で飽和する傾向が見られた。大脳皮質第 5/6 層錐体細胞においても同様の解析を行なったところ、YC2.60 は全細胞 (8/8) で、YC3.60 もほとんどの細胞 (9/10) で活動電位 1 回に対して閾値を超える応答が見られた。小脳プルキンエ細胞では、1) 電流注入刺激、2) 平行線維 (PF) 刺激、3) 登上線維 (CF) 刺激を与えた時の応答を、それぞれ 1) 細胞体近傍の近位樹状突起、2) 3) 細胞体から 50 μm 以上離れた遠位樹状突起において観察した。電流注入刺激を与えた場合、YC2.60、YC3.60 どちらも、Na⁺スパイクの発生に対してはほとんど応答を示さなかったが、Ca²⁺スパイクの発生に対して応答が見られた。PF 刺激 (50 Hz) の場合、YC2.60 では多くの細胞 (3/5) で 2 回、YC3.60 ではほとんどの細胞 (6/7) で 5 回の刺激を与えた時に閾値を超える応答が見られた。CF 刺激の場合、YC2.60、YC3.60 いずれにおいても 1 回の刺激で閾値を超える応答が見られた。PF 刺激、CF 刺激に対する応答は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の阻害剤投与により有意に減少したことから、記録している細胞を直接刺激した結果生じた応答ではなく、入力線維を刺激した結果生じたシナプス入力を反映した応答であることが示された。なお、YC2.60、YC3.60 を発現している細胞と発現

していない細胞の間で電気的特性に有意な違いが見られることはなかったことから、蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーの発現により、神経細胞の基本的な機能に異常が生じた訳ではないことが示された。

YC2.60 および YC3.60 は、低分子蛍光 Ca^{2+} 指示薬である Fluo-4 に比べ変化率が小さく時間経過が遅く、精製タンパク質をキュベット内で測定した結果に比べ、神経細胞内での変化率は減少していた。主な原因としては、1) 神経細胞内に多く含まれる内在性の CaM がセンサーと干渉すること、2) Ca^{2+} 濃度の変化に比べセンサーの応答速度が遅いこと、が考えられる。従って、蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーを用いた研究の今後の進展には、1) 神経細胞に内在する Ca^{2+} 結合タンパク質と相互作用しにくいセンサー、2) より応答速度の速いセンサー、3) より大きな変化率を示すセンサー、を開発することが欠かせない。

従来哺乳類神経細胞に蛍光タンパク質センサーを発現させるための手段であったトランスジェニックマウスの作成に比べ、本研究で用いた手法は格段に簡便で柔軟性が高い。従って、改良された蛍光タンパク質 Ca^{2+} センサーだけでなく、蛍光タンパク質膜電位センサーをはじめとする新規センサーを哺乳類神経細胞に発現させて性能を測定し、よりよいものを選別するための実験系として非常に有用である。

本研究で使用した YC2.60、YC3.60 は、大脳皮質第 2/3 層錐体細胞、第 5/6 層錐体細胞、小脳プルキンエ細胞いずれにおいても、*in vivo* で生じうる刺激に対して閾値を超える応答を示したことから、実際に神経活動の *in vivo* 記録に応用することが可能であると期待される。大脳皮質では異なる層の神経細胞は異なる入出力先を持ち、異なる情報処理を行なっていると考えられているため、各層の活動を区別して *in vivo* 記録することには大きな意義がある。また、小脳皮質における唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は、運動学習において重要な役割を担っていると考えられているため、マウスに学習課題を与える前後での応答を記録して比較することにより、記憶・学習が成立する際の神経活動の変化に関する重要な手がかりが得られるかもしれない。