

## 蛍光分光を応用した神経細胞の個体脳における同定と 聴覚神経回路機構の研究

Neuronal identification by fluorescence spectrogram,  
and the application to auditory neural circuits in vivo

大森 治紀 (OHMORI HARUNORI)

京都大学・大学院医学研究科・教授



### 研究の概要

本研究は第1にパッチ電極を用いた新しい蛍光分光電気計測法を開発する。石英ガラス管で作成したパッチ電極を光導体として用いる事で電気活動と同時に神経細胞のFRET応答など蛍光分光を行う装置である。ガラス電極先端での光計測であり、始めに切片標本で検証実験を行い、その後脳深部で細胞機能の解析を目指す。第2はin vivo脳機能解析に上記装置を応用する事である。特に動物個体を用いた聴覚機能解析実験系での応用を目標に進めている。

研究分野：複合領域

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：パッチ電極、神経細胞、蛍光蛋白、神経回路、聴覚、蛍光トレーサー

### 1. 研究開始当初の背景

電気生理学を基本的な実験手技とする脳神経生理学研究は、分子生物学の黎明期以前から脳神経機能の詳細を明らかにしてきた。一方、分子生物学研究では、様々な機能蛋白を蛍光標識して神経細胞に発現させた新しい実験動物を多数作製し、多光子顕微鏡などを用いて分子標識された脳表面の神経細胞の解析が進められている。しかし、脳実質の深部にわたり展開する多くの神経細胞機能の解析は、脳の高次機能の解明に欠かせない。

### 2. 研究の目的

本研究は、第1に蛍光分子標識された神経細胞を脳の深部で同定し電気活動を計測できる新しい蛍光パッチ電極計測法を開発する。第2に研究代表者が豊富な経験を持ち、かつ明確な神経回路構成をとる聴覚神経核の機能を個体脳で解明する為に、本蛍光パッチ電極計測法を応用する事である。脳の高次システム解析に有効な実験手技として多くの研究室で簡単に使える装置を5年間の研究期間内に実用化する事を最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

第1の研究では、研究代表者が、機器およびソフトウェアの仕様を定め、主たる機器製作業

者との間で試作を進めた。パッチ電極を用いて蛍光分光と電気活動記録を同時に行うことを目的とする機器を試作した。第2の研究では、ヒヨコの聴覚系を対象として、in vivo実験法を確立してきた。さらに蛍光トレーサーのin vivo局所注入、および蛍光色素を充填した神経細胞の免疫染色など、神経細胞の同定と形態観察の手法も安定した実験手技として確立した。これらの実験への応用を通して新しい実験手法である蛍光パッチ電極計測法の問題点を整理・解決する予定である。

### 4. これまでの成果

第1の研究による、蛍光パッチ電極を用いた分光電気計測装置の開発は、装置の概要と脳切片標本の神経細胞を当面の対象としたFRET計測を中心に述べる。

分光電気計測装置はレーザー光を2分岐光ファイバー束の1束に投射する。光ファイバーの他端は電極ホルダーにつながる。検出系は2分岐光ファイバーの1束の蛍光信号を集め蛍光検出用光ファイバー束を介して分光計で解析する。将来の蛍光寿命計測の為に光および電気遅延回路を組み込んでいる。レーザーは蛍光寿命計測の為に532nm固体パルスレーザー(15kHz, 1.3ns, 4μJ), 488nm固体連

続レーザー (20mW), 445nm 固体連続レーザー神経細胞に接する石英ガラス電極先端は1-2 $\mu$ m 径であり光強度の厳密な計測は不可能であるが、パッチ電極からのレーザー光による細胞 (直径 10 $\mu$ m) の蛍光イメージは顕微鏡下に肉眼および高感度 CCD カメラを用いて可能である。パッチ電極は石英ガラス管から作製する。細胞の発する蛍光が極めて微弱であり、分光には背景蛍光をできる限り抑える必要がある。無電解メッキによりガラス管表面をコーティングする事で汚れを防ぎ FRET 応答の記録が可能になった。まだ背景蛍光レベルが不安定であり、電極の特性を安定させる一層の工夫は必要である。

電極ホルダーは光ファイバー束から石英ガラス電極管端面に光を通しかつ戻ってくる蛍光を光ファイバーに伝え、更に電気現象を検出する銀線を増幅器に通し、電極内の空気圧を保つ複雑な構造であるが、電極ホルダーを黒色デルリン素材で作製し、軸方向に光ファイバー束を連結している。

以上の装置を試作し、FRET などの光計測と電気記録をパッチ電極を用いて行う事ができた。Ca 応答性 FRET 蛋白 F2C をニワトリ脳に *in vivo* 局所注入し聴覚神経細胞に発現させた。その後作製した脳切片標本では 445nm 励起により、KCl 投与で 500nm 近傍の CFP スペクトル強度が増加し、530nm 近傍の YFP スペクトル強度が低下する FRET 応答をパッチ電極先端で記録できた。KCl 洗浄により回復した。蛍光色素を逆行性に充填した神経細胞で動電位が記録できた。

第2の研究では、個体脳への分光電気計測装置の応用の為の準備を進めた。動物個体脳からの聴覚応答、特に抑制性神経回路による機能修飾、特定の神経細胞への蛍光トレーサーの逆行性充填、形態観察およびチャンネルタンパク質の免疫染色は論文発表した。そして FRET 蛋白の個体脳局所での発現効率を上げる試みも進めている。これらの実験は現時点ではニワトリヒナで行っているが、マウスを用いた実験系も既に整備している。マウスはニワトリに比べて可聴周波数領域が高く特殊なスピーカー・マイクロフォンを用いるので、実験装置に多少の工夫が必要であった。

## 5. 今後の計画

第1に FRET 計測の成功確率を高める事など、蛍光パッチ電極計測の基本的な特性を改善し幾つかのステップで改良を図る。特に神経

(40mW)を取り替えて使用する。

細胞電気活動と FRET 応答、および顕微測光による FRET 応答と蛍光パッチ電極法による FRET 応答の厳密な比較をしたい。第2は、個体脳の神経細胞への応用を進める。

## 6. これまでの発表論文等

Sato T, Fukui I and Ohmori H. Interaural phase difference modulates the neural activity in the nucleus angularis and improves the processing of level difference cue in the lateral lemniscal nucleus in the chicken. *Neuroscience Research* 66:198-212. (2010)

Iwao Fukui, R. Michael Burger, Harunori Ohmori, and Edwin Rubel. GABAergic inhibition sharpens the frequency tuning and enhances phase locking in chicken nucleus magnocellularis neurons. *J Neuroscience* 30(36) 12075-12083 (2010)

Kuba H, Oichi Y & Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na<sup>+</sup> channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465: 1075-1078. (2010)

Kuba, H. and Ohmori, H. Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick. *Journal of Physiology* 2009: 587(Pt1): 87-100. (2009)

Eri Nishino and H Ohmori. The modulation by intensity of the processing of interaural timing cues for localizing sounds. *Molecular Neurobiology* 40(2):157-65. (2009)

Tomohiko Irie and Harunori Ohmori. Presynaptic GABAB receptors modulate synaptic facilitation and depression at distinct synapses in fusiform cells of mouse dorsal cochlear nucleus. *BBRC* 367:503-508 (2008).

Eri Nishino, R. Yamada, H. Kuba, H. Hioki, T. Furuta, T. Kaneko, and H. Ohmori. Sound-Intensity-Dependent Compensation for the Small Interaural Time Difference Cue for Sound Source Localization. *Journal of Neuroscience* 28(28): 7153-7164. (2008)

ホームページ等

<http://www.nbiol.med.kyoto-u.ac.jp>