

# 研究報告書

## 「脳内分子変化と電気生理学的・行動学的変化の統合解析」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長無/増額無)

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 山口 瞬

### 1. 研究のねらい

記憶・学習を始めとした脳機能のメカニズムを解明するには、分子レベルの変化や電気生理学的変化が脳のどの神経細胞でいつ生じるのかを明らかにする必要がある。

本研究では、研究者らが開発した *Arc-dVenus* マウス(記憶・学習や感覚情報処理に際して誘導される *Arc* 遺伝子の発現に伴い蛍光蛋白質 *dVenus* が発現するトランスジェニックマウス)を用いて、遺伝子発現の変化を *in vivo* で経時的にモニタリングし、個々の記憶・学習課題や感覚情報処理によって生じた微小な分子変化を捉えることを目指した。さらに電気生理学的変化や行動学的変化も同時に記録し解析することで、分子(遺伝子)変化・電気生理学的変化・行動学的変化の間に存在する法則性を明らかにし、脳機能の動作原理に迫ることを目指した。

また記憶・学習等に障害のある種々のミュータントマウスでも解析し、それらの機能障害の原因となる脳の責任部位の同定や病態のメカニズムについても明らかにすることを目指した。

大挑戦型としては特に、自由行動状態で遺伝子発現と電気生理学的変化と行動学的変化を同時に記録・解析できる系を確立することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

自由行動マウスで、脳の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を同時に記録し、それら三者の関係性を明らかにすることに挑んだ。

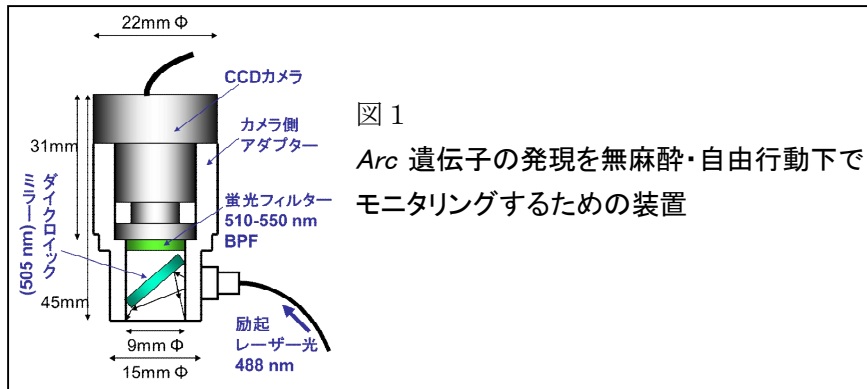
- ① *Arc-dVenus* マウスを用いて、無麻酔・自由行動下で *Arc* 遺伝子発現をモニタリングする系の開発を目指した。(i)小型 CCD カメラを用いた新規 *in vivo* イメージング装置の開発と(ii)二光子励起顕微鏡を利用した *in vivo* イメージング法の開発を行った。(ii)の方法により、正常な脳とアルツハイマー病の脳では視覚情報処理の際の神経細胞の活動パターンに差異のあることを明らかにした。
- ② 遺伝子発現の変化と電気生理学的変化と行動の関係性を調べる有効な方法として、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う実験法を開発した。この系を用いて、恐怖条件付け課題によって活性化した扁桃体神経細胞や新奇環境の探索によって活性化した海馬 CA1 神経細胞の電気生理学的特性を明らかにした。
- ③ *Arc-dVenus* マウスの脳を透明化し、視覚情報処理に関わる神経細胞を網羅的に検出することに成功した。
- ④ *Arc-dVenus* マウスと種々のミュータントマウスを交配し、蛍光イメージングすることで、種々の脳機能障害に伴う機能低下部位を明らかにした。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「脳内遺伝子発現(転写)の *in vivo* モニタリング法の開発」

#### (i) 小型 CCD カメラを用いた *in vivo* イメージング装置の開発

無麻酔かつ自由行動状態で *Arc* 遺伝子の発現をモニタリングするため、新たなイメージング装置の開発を目指した。さまざまなタイプのイメージング装置を考案し、それらを、作製の難易度や必要なコスト、使いやすさなどの面から検討した。その結果、CCD カメラを *Arc-dVenus* マウスの頭に装着する方式が良いと判断した。光学的な設計後、試作機を作製した(図 1)。



この試作機では、光ファイバーの先端から出た励起光が、ダイクロイックミラーに反射したあと円錐状に広がって対象面(脳表面)に照射され、中心部が辺縁部に比べて明るくなるという問題点があった。そこでそれを補正するためのプログラムを開発した。

またこの試作機では、装置の重量がマウスにとってかなりの負担になる問題点があった。そのため、現在、*Arc-dVenus* マウスの代わりに *Arc-dVenus-3'* ラット(*Arc-dVenus* マウスと同様のコンストラクトで作製したトランスジェニックラット)を用いてイメージングを試みている。

#### (ii) 二光子励起顕微鏡を利用した *in vivo* イメージング

上記の小型 CCD カメラを用いた *in vivo* イメージング装置の開発と並行して、二光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングを行った。この実験系では、イメージングの際にマウス頭部を顕微鏡下に固定する。そのため、完全な自由行動下での連続イメージングではないが、それに近い条件でのデータ採取と考えられる。

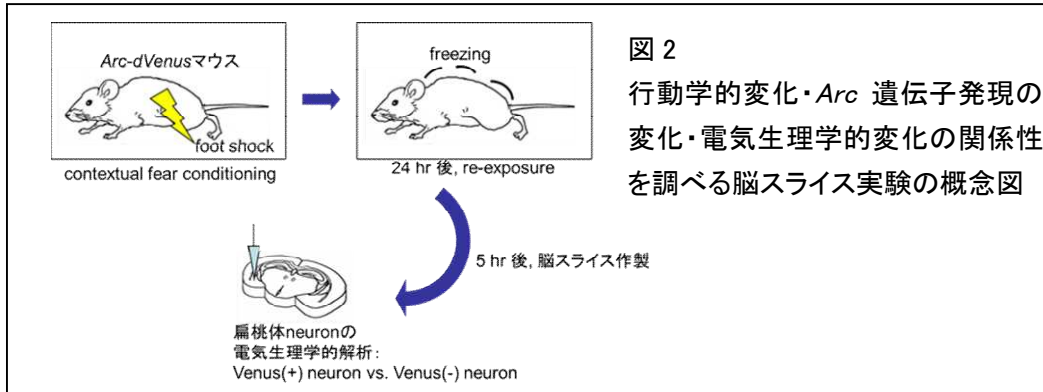
*Arc-dVenus* マウスに視覚刺激(縦縞模様による刺激)を与えたあと二光子励起顕微鏡を用いて大脳皮質視覚野(内側二次視覚野)を観察すると、第 II/III 層で蛍光シグナル(+)の神経細胞を多数観察することができた。*Arc-dVenus* マウスに対して二光子励起顕微鏡を用いてイメージングする方法が極めて有用であることを示した(論文 6)。

この系を用いてアルツハイマー病モデルマウスの脳を解析し、アルツハイマー病に特有の異常な反応パターンを明らかにした(論文 6, 研究テーマ F 参照)。

### 研究テーマ B「電気生理学的変化・行動学的変化のモニタリング法の開発」

#### (i) 電気生理学的変化のモニタリング法の開発

*in vivo* のモニタリングではないが、電気生理学的変化と *Arc* 遺伝子発現の変化、行動学的変化の関係性を調べる有効な方法として、脳スライスを用いる実験法を開発した。この実験系では、*Arc-dVenus* マウスに行動実験課題を行わせ、その5時間後(蛍光シグナルが十分誘導された後)に脳スライスを作製し、蛍光シグナル(+)<sup>+</sup>の神経細胞と蛍光シグナル(-)<sup>-</sup>の神経細胞で電気生理学的特性を比較する(図 2)。



この実験系を用いて、恐怖条件付け課題によって活性化した扁桃体神経細胞(蛍光シグナル(+)<sup>+</sup>の扁桃体神経細胞)では、mEPSC (miniature excitatory postsynaptic currents) の頻度の増加や paired pulse ratio の低下が見られることを明らかにした(論文 1)。

また、新奇環境の探索によって活性化した海馬 CA1 神経細胞は、その後の sharp waves/ripples (記憶の自動再生の際に生じると考えられている電位変化)で再活性化することを明らかにした(論文 3)。

## (ii) 行動学的変化のモニタリング法の確立

行動学的変化を記録するため、ビデオモニタリングシステムを導入した。

## 研究テーマ C「脳内遺伝子発現・電気生理学的変化・行動学的変化の同時モニタリング法の開発」

上で述べたように、無麻酔・自由行動下での遺伝子発現のモニタリングは、二光子励起顕微鏡を用いてかなりの程度まで達成された。脳波の変化と行動学的変化は、導入したテレメリーシステムとビデオシステムを用いて記録することが可能である。これらを併用することで同時モニタリングが可能である。

## 研究テーマ D「転写以外の遺伝子発現変化のモニタリング法の開発」

*Arc* mRNA には活性化シナプス近傍へ運ばれる特性がある。*Arc* 遺伝子の 3'-非翻訳領域を用いてトランスジェニックマウス・ラットを作製し、レポーター mRNA が活性化シナプス近傍に運ばれる様子を観察することに成功した(未発表データ)。

## 研究テーマ E「正常な記憶・学習、感覚情報処理のメカニズムの解析」

### (i) 視覚刺激を反復して与えた場合の大脳皮質視覚野神経細胞の反応の解析

視覚刺激(縦縞模様による刺激)を反復して与えた場合の大脳皮質視覚野神経細胞の反応を、二光子励起顕微鏡による *in vivo* イメージングで調べた。1 回目の刺激でも 2 回目

の刺激でも、同程度の数の神経細胞に蛍光が誘導された。しかしそのポピュレーションは異なり、両方の回に蛍光が誘導された神経細胞は、それぞれの回に蛍光が誘導された神経細胞の約半数であった。そして 1 回目の刺激で蛍光が強く誘導された神経細胞ほど、2 回目の刺激でも蛍光が誘導されやすいことがわかった。このことから *Arc* が誘導された神経細胞は再活性化されやすくなっていることを示した(論文 6)。

#### (ii) 脳の透明化による視覚情報処理神経回路の可視化

アミノアルコールを用いて *Arc-dVenus* マウスの脳を透明化した。透明化した脳を ultramicroscope を使って撮影し、個々の細胞の蛍光シグナルを脳全体にわたって検出した。視覚刺激(光刺激)が(+)と(-)それぞれの条件の脳を比較し、視覚情報処理に関わる神経細胞を網羅的に検出することに成功した(論文 2)。

### 研究テーマ F「脳機能障害のメカニズムの解析」

*Arc-dVenus* マウスと種々のミュータントマウスを交配した。得られたマウスの脳サンプルを蛍光イメージングすることで、種々の脳機能障害に伴う機能低下部位を明らかにした(*GaMKII-alpha* ヘテロマウス[論文 8], *Schnurri-2* ノックアウトマウス[論文 5], *SNAP-25* ドミナントネガティブマウス[論文 4])。また *Arc-dVenus* マウスとアルツハイマー病モデルマウスを交配して得られたマウスを二光子励起顕微鏡でイメージングし、神経細胞の異常活動を *in vivo* で定量的に捉えることに成功した(論文 6)。

### 大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展

大挑戦型として、自由行動マウスで、脳の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を同時に記録し解析することに挑んだ。

完全な自由行動状態で解析するシステムの完成には至らなかったが、遺伝子発現をモニタリングするための小型 CCD カメラ *in vivo* イメージング装置の開発を行った。

また、二光子励起顕微鏡を用いることで、完全な自由行動状態ではないがそれに近い状態での遺伝子発現のモニタリングに成功した。これは脳波を記録するためのテレメリーシステムや行動を記録するためのビデオシステムと併用可能である。

さらに、遺伝子発現変化と電気生理学的変化と行動の関係性を調べる有効な方法として、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う方法を開発した。

### 3. 今後の展開

*Arc-dVenus* マウスを用いたイメージングは、脳内の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を結び付ける要の技術として神経科学の分野で普及するかもしれない。しかし *Arc-dVenus* マウスと現存する最も高性能な顕微鏡(二光子励起顕微鏡など)の組み合わせでも、海馬など脳深部領域を *in vivo* で観察することは困難である。*in vivo* で脳を透明化する手法を開発し、脳深部を観察するための技術的ブレイクスルーをもたらしたい。

### 3\*. 非公開の今後の展開(参考情報)

*Arc-dVenus* マウスに対して二光子励起顕微鏡などを用いて *in vivo* イメージングを行う技術



や、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う方法は汎用性があり、今後もさまざまな脳機能のメカニズムや脳機能障害の病態の解明に貢献すると思われる。

特に、*in vivo* イメージングで個々の神経細胞の反応パターンを解析する方法（論文6の方法）は、アルツハイマー病を始めとした種々の脳疾患において、病態や新たな治療法（新薬など）の効果を解析する重要なパラダイムとなる可能性がある。論文6の成果はその端緒を開くものであり、5年以内に脳疾患に対する新薬の開発に結び付く可能性があると考えられる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

（研究者）

大挑戦型として、自由行動マウスで、脳の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を同時に記録し解析することに挑んだ。研究期間内に、完全な自由行動状態で解析するシステムの完成には至らなかったが、遺伝子発現をモニタリングするための小型 CCD カメラ *in vivo* イメージング装置の開発を行い、また、二光子励起顕微鏡を用いることで、自由行動に近い状態での遺伝子発現のモニタリングに成功した。さらに、遺伝子発現変化と電気生理学的変化と行動の関係性を調べる方法として、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う方法を開発した。

これらの方法は、今後もさまざまな脳機能のメカニズムや脳機能障害の病態の解明、脳疾患に対する新たな治療法の開発に貢献すると予想される。研究期間内にこれらの方向性を示せたことは大きな成果だと考えている。

(2) 研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

神経回路特性の長期的変化は一般的には遺伝子発現制御が関わると考えられるが、それを生きた標本において経時的に観測する技術は未発達である。本研究は記憶・学習や感覚情報処理に際して神経細胞に誘導される *Arc* 遺伝子発現に着目し、これを蛍光蛋白質 *dVenus* により可視化できるトランスジェニックマウスの脳内の蛍光シグナルを記録できるカメラの作出をねらったものである。自由行動下の動物頭部に装着するカメラを試作し改良を進めてきたが、励起光密度や重量などについて課題が発生し完成には至っていない。一方平行して進めてきた二光子励起顕微鏡にマウス頭部を固定して課題に伴う変化を経時観察する方法、および課題後に脳スライスとして解析する方法については、視覚刺激や恐怖刺激による、あるいは病態モデル動物における、脳内の *Arc* 遺伝子発現様式の解析は共同研究者も得て発展しており、論文にもなっている。山口研究者はもともと遺伝子発現・電気生理学的変化・行動学的変化の同時モニタリングへの強い興味から、脳波および行動計測のシステムも立ち上げており、今後この独自の観点からの研究展開が期待できる。非常に有用なマウスの作成により広範な共同研究者に恵まれたことは、当該分野にとっても貴重な貢献である。今後責任著者として主要成果の論文発表も期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Nonaka A, Toyoda T, Miura Y, Hitora-Imamura N, Naka M, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H. Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. <b>J Neurosci</b> . 2014, 34(28), 9305-9309
2. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. <b>Cell</b> . 2014, 157, 726-739
3. Mizunuma M, Norimoto H, Tao K, Egawa T, Hanaoka K, Sakaguchi T, Hioki H, Kaneko T, <u>Yamaguchi S</u> , Nagano T, Matsuki N, Ikegaya Y. Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. <b>Nat Neurosci</b> . 2014, 17(4), 503-505
4. Ohira K, Kobayashi K, Toyama K, Nakamura HK, Shoji H, Takao K, Takeuchi R, <u>Yamaguchi S</u> , Kataoka M, Otsuka S, Takahashi M, Miyakawa T. Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. <b>Mol Brain</b> . 2013, 6(12), 1-17
5. Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, <u>Yamaguchi S</u> , Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T. Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. <b>Neuropsychopharmacology</b> . 2013, 38(8), 1409-1425
6. Rudinskiy N, Hawkes JM, Betensky RA, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Spires-Jones TL, Hyman BT. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. <b>Nat Neurosci</b> . 2012, 15(10), 1422-1429
7. Shinohara Y, Hosoya A, Ahmed H, Yamasaki N, Hattori S, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Miyakawa T, Hirase H, Shigemoto R. Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. <b>Hippocampus</b> . 2012, 22(2), 117-121
8. Matsuo N, Yamasaki N, Ohira K, Takao K, Toyama K, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Miyakawa T. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. <b>Front Behav Neurosci</b> . 2009, 3(20), 1-10

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yamaguchi S, Eguchi M. A transgenic mouse line that allows fluorescence imaging of brain function. Biotech 2012, 27 April 2012, Tokyo
2. 「マウス脳細胞 動き“見える化”」アルツハイマー解明に一步

中日新聞 2012年9月12日朝刊

3. 「『アルツハイマー』脳神経細胞」異常な活動 視覚化

読売新聞 2012年9月26日朝刊

4. 「アルツハイマー病の脳神経細胞異常活動状態を視覚化」

TBS テレビ みのもんたの朝ズバッ！ 2012年9月28日