

神経回路ダイナミクス研究チーム

Laboratory for Neuronal Circuit Dynamics

チームリーダー KNÖPFEL, Thomas

脳の情報処理活動は小さな脳細胞から生ずる千分の一秒という速さの電気的および化学的シグナルによって行われている。この複雑なシグナル伝達に関して、個々の脳細胞における膜電位の変化や細胞内伝達物質の濃度変化などはすでによく研究されているが、細胞の集合体である「脳」が組織全体としてどのように情報処理を行っているかはまだ明らかではない。この脳全体のネットワーク機能を解明するためには、多くの異なった部位で起こる電気的および化学的シグナルの変化を同時にかつ千分の一秒という速さに対応できる実験システムで観察する必要がある。そこで我々は細胞の膜電位やイオン濃度、情報伝達物質などの変化によって蛍光を発するタンパク質を利用し、これらのシグナル変化を視覚的に観察可能にする画像技術の開発と応用を行っている。またこれら環境感受性蛍光タンパクは遺伝子組換えおよび導入技術によって動物の脳の一部にのみ発現させることもできるため、脳の特定部位の詳細な情報を得ることができる。我々のこれらの技術を用いることによって、小脳および大脳皮質における時空間的な情報伝達のメカニズムが解明されている。

1. 新しいイメージング技術の開発

(1) 我々の重要課題の1つとして電位感受性蛍光タンパク(VSFP)の開発があげられる。すでに蛍光エネルギー移動(FRET)を用いたVSFPの基本型の開発は終了し、現在はその改良型の開発を行っている。また組換え型GFPを用いてpHやクロールイオン濃度変化を感受することができるプローブの開発も行っている。今までの研究では下記のような成果が得られている。

(i) 膜電位感受性蛍光タンパク(VSFP)の開発(坂井, Repunte-Canonigo, Raj, Knöpfel)

電位依存性カリウムチャンネル(Kv2.1)に色の異なる変異型GFP(シアン, 黄色)の組み合わせを組み込んだFRET構成物を開発した。このタンパクは、細胞膜の脱分極に伴い、一対の蛍光タンパクの位置関係が変化することによって起こるFRETによって細胞膜の電位変化を蛍光の変化として観察することができる。

(ii) pHおよびクロールイオン感受性黄色蛍光タンパクを発現した遺伝子導入マウスの作成(Repunte-Canonigo, Raj, Knöpfel)

ニューロン特異的プロモーター(pKv3.1)の制御によって黄色蛍光タンパク(EYFP)を発現する遺伝子導入マウスを作成した。このマウスにおいてEYFPは小脳顆粒細胞および大脳皮質介在ニューロンで発現が認められた。このEYFPは細胞内pHやクロールイオン濃度変化によって蛍光強度が変化する。これにより、生きている動物において外来性の蛍光プローブなどを使用せずにこれら環境因子の変化をモニターリングすることが可能となった。(米国 UT

Southwestern の Ho 氏, Joho 氏との共同研究)

(iii) GFP の改良(Akemann, Raj, Knöpfel)

部位特異的あるいは無作為にアミノ酸配列を置換することによって変化するGFPの明るさ(発色団の形成効率, モル吸光係数, 量子収率), 色などの特性を検討した。これら改良されたGFPの物理学的特性を利用し, 新たな微小環境プローブの開発が可能である。

(2) 高速2光子励起顕微鏡の開発

(i) Multiphoton Multifocal Microscopy(MMM)を用いた研究(Akemann, Wolf, Knöpfel)

マックスプランク研究所(ドイツ)にて開発された二次元2光子励起顕微鏡(MMM)とCCDイメージングシステムを用い, 蛍光発色イメージングの至適光学的条件を検討した。(ドイツMPI GöttingenのStraub氏, Hell氏との共同研究)

(ii) 超高速2光子励起顕微鏡を用いた研究(Wolf, Knöpfel)

電位感受性色素を用い, 2光子励起顕微鏡による超高速イメージングのための機器を試作し, 至適光学的条件を検討した。

2. 神経回路ダイナミクス

(1) 小脳回路ダイナミクス

(i) マウス小脳プルキニエ細胞mGluR₁における遅延型興奮性シナプス後電流(slow mGluR₁-EPSC)の機序に関する研究(Alojado, Knöpfel)

小脳平行繊維のテタヌス刺激によってslow mGluR₁-EPSCが誘発されることが知られているが, その機序は明らかでない。今回の我々の研究により, これには細胞内ナトリウム濃度の上昇が重要であり, さらにこのナトリウム濃度の上昇に先立ってmGluR₁を介した細胞外よりのカルシウムイオンの流入が必要であることが分かった。この細胞内ナトリウム濃度の上昇はプルキニエ細胞樹状突起の特定部位において観察されることから, この現象がmGluR₁依存性のシナプス可塑性に関与している可能性が示唆された。(イタリア Univ. of Turin の Tempia 氏, Anchisi 氏, Strata 氏との共同研究)

(ii) 小脳プルキニエ細胞におけるGタンパク制御型受容体キナーゼ4(GRK4)に関する研究(Knöpfel)

GRKが様々なGタンパク制御型受容体を制御していることが知られている。今回我々は小脳プルキニエ細胞でのGRK4の存在を確認し, このキナーゼがmGluR₁の脱感作など生理的制御に重要な関連があることを報告した。(イタリア I. N. M. Neuromed の Salles 氏, Nicoletti 氏, Blasi 氏との共同研究)

(iii) ラット小脳皮質におけるmGluR_{1b}とmGluR₁の分布に関する研究(Knöpfel)

小脳皮質において数種の変異型 mGluR₁ が存在し、それぞれ異なった分布を示していることが知られている。我々の免疫標識法を用いた研究によると、mGluR_{1b} の分布は平行繊維とプルキニエ細胞で形成されるシナプス端から 60 nm 以内と 60 ~ 120 nm にそれぞれ 25% , 10 ~ 18% であった。一方 mGluR_{1a} は同部にそれぞれ 37% , 15% の分布を認めた。この分布の差によって小脳に特有の神経伝達が可能になっていると考えられた。(スペイン Basque Country Univ. の Mateos 氏, Grandes 氏との共同研究)

(iv) 成長過程における小脳登上線維の退行に関する研究 (Knöpfel)

マウスの成体では 1 つの小脳プルキニエ細胞と下オリブ核由来の 1 本の登上線維とが興奮性シナプスを形成している。しかし出生直後のマウスでは複数の登上線維が 1 つのプルキニエ細胞とシナプスを形成し、その後約 20 日間で成体のように一対一対応に変化していくことが知られているが、その機序は明らかでない。そこで我々は細胞内ナトリウムとカルシウム濃度の変化に注目し、生後 6 ~ 14 日のマウスについて検討した。イメージングシステムにより登上線維のプルキニエ細胞体部から樹状突起部への転位はカルシウムおよびナトリウム濃度の上昇として観察され、このような変化は生後 6 ~ 9 日の間に急速に起こることが確認された。また複数の登上線維がプルキニエ細胞を支配している場合、登上線維刺激にてカルシウム濃度が上昇する部位にオーバーラップが認められた。このことより登上線維の退行および維持に関して、カルシウムイオンが直接は関与していないことが示唆された。(イタリア Univ. of Turin の Scelfo 氏, Strata 氏との共同研究)

(2) 大脳皮質回路ダイナミクス

(i) NMDAR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた体性感覚野地図の形成機構に関する研究 (Wolf, 岩里, 西山, 利根川, 糸原, Knöpfel)

行動遺伝学技術開発チームにおいて作成された NMDAR1 遺伝子ノックアウトマウスを用い、大脳皮質体性感覚野にみられる経験依存的髭バレル形成機構における NMDA 受容体の働きを、イメージングシステムを用いて検証した。このノックアウトマウスでは、予測されたように視床皮質線維刺激による NMDA 受容体を介した皮質の興奮は認められなかった。しかし一方 NMDA 受容体を介した抑制機構網には変化を認めず、NMDA 受容体の欠損は局所の皮質回路に形成異常を引き起こすものの、視床皮質における感覚の投射には関与しないことが電気生理学的にも形態学的にも明らかとなった。

(ii) 大脳皮質体性感覚野における体性感覚野の形成機構に関する研究 (Wolf, Knöpfel)

体性感覚野の興奮および抑制機構の機能を正常マウスと NMDAR1 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、薬理学的手法を併用した高速イメージングシステムにて比較検討した。

(iii) アストロサイト特異的変異マウス (S100B 変異マウス) を利用したアストロサイトの脳機能における役割の解析 (西山, 糸原, Knöpfel)

S100B は神経栄養因子およびグリア細胞増殖因子として働くことが知られている。行動遺伝学技術開発チームにおいて作成された S100B 変異マウスを電気生理学的解析したところ、これらのマウスでは海馬での長期増強のエンハン

ス現象が認められた。また行動学的解析においても、これらのマウスでは学習能力の向上が認められた。これらの結果は、記憶と学習の過程におけるグリア細胞とニューロンの相互作用を示唆している。(参照 行動遺伝学技術開発チーム)

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Sallese M., Salvatore L., D'Urbano E., Sala G., Storto M., Launey T., Nicoletti F., Knöpfel T., and De Biasi A.: "The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1", *FASEB J.* **14**, 2569-2580 (2000). *

Iwasato T., Datwani A., Wolf A. M., Nishiyama H., Taguchi Y., Tonegawa S., Knöpfel T., Erzurumlu R. S., and Itohara S.: "Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex", *Nature* **406**, 726-731 (2000). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Behnisch T. and Knöpfel T.: "Optical analysis of hippocampal LTD of synaptic transmission induced by a group I mGluR agonist in mice using a frequency doubled pulse laser system and voltage sensitive dye", 2000 2nd FENS Forum Meet., (Federation of European Neuroscience Societies (FENS)), Brighton, UK, June (2000).
Alojado M. E. and Knöpfel T.: "Characterization of the mGluR₁-mediated inward current in Purkinje cells in acute cerebellar slices", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Iwasato T., Datwani A., Wolf A. M., Nishiyama H., Taguchi Y., Tonegawa S., Knöpfel T., Erzurumlu R. S., and Itohara S.: "Cre-mediated disruption of NMDAR1 in cortical excitatory neurons impairs barrel formation", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Repunte-Canonigo V. P., Raj C. D., Iwasato T., Itohara S., Ho C. S., Joho R. H., and Knöpfel T.: "Generation of transgenic mice expressing a green fluorescent protein under control of the Kv 3.1 K⁺ channel promoter", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Iwasato T., Datwani A., Wolf A. M., Nishiyama H., Taguchi Y., Tonegawa S., Knöpfel T., Erzurumlu R. S., and Itohara S.: "Cre-mediated disruption of NMDAR1 in cortical excitatory neurons impairs barrel formation", Barrels 13th Symp., (Neuroscience), New Orleans, USA, Nov. (2000).

Scelfo B., Strata P., and Knöpfel T.: "Climbing fiber Ca²⁺ and Na⁺ responses in developing mouse Purkinje cells", 28th Spring Meet. of the Physiological Soc. of Italy, Florence, Italy, Feb. (2001).

(国内会議)

筒井秀和, Wolf A., Knöpfel T., 岡良隆: "Electrophysio-

logical characterization of afferent encoding and voltage-imaging in the corpus glomerulosum of a teleost brain”, 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会，横浜，9 月 (2000).

岩里琢治, Datwani A., Wolf A., 西山洋, 田口祐介, 利根川進, Knöpfel T., Erzurumlu R. S., 糸原重美: “大脳皮質特異的 NMDAR1 ノックアウトマウスにおけるパレル形成”, 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会，横浜，9 月 (2000).

Knöpfel T.: “Optical imaging of neuronal information processing”, CREST Research Seminar, (東京大学), 東京, 12 月 (2000).

岩里琢治, Datwani A., Wolf A., 西山洋, 田口祐介, 利根川進, Knöpfel T., Erzurumlu R. S., 糸原重美: “大脳皮質特異的ノックアウトによるパレル形成における NMDA 受容体の機能の解析”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

坂井理映子, Knöpfel T., 楠元雅子: “Direct effect of an antiarrhythmic drug on gap junction current”, 第 65 回日本循環器学会学術集会, 京都, 3 月 (2001).

坂井理映子, Knöpfel T., 楠元雅子: “Direct effect of an antiarrhythmic drug on gap junction current”, 第 78 回日本生理学会大会, 京都, 3 月 (2001).

Research Subjects and Members of Laboratory for Neuronal Circuit Dynamics

1. Novel Voltage Imaging Technology
2. Neuronal Circuit Dynamics

Laboratory Head

Dr. Thomas KNÖPFEL

Research Scientists

Dr. Walther AKEMANN
Dr. Rieko SAKAI
Dr. Vez P. Repunte-CANONIGO
Dr. Maria Elena ALOJADO

Technical Staffs

Mr. C. Dinesh RAJ
Ms. Satoko ISHII
Mr. Alexander WOLF
Mr. Shinichi MATSUSHITA

Assistants

Ms. Ayako TAKADA

Outside Collaborators and Visiting Scientists

Dr. Rolf JOHO (Cen. Basic Neurosci., UT Southwestern, Dallas, USA)
Dr. Filippo TEMPIA (Dept. Neurosci., Univ. Turin, Italy)
Dr. Thomas BEHNISCH (Dept. Neurophys., Inst. Neurobio., Germany)
Dr. Jaroslav BLAHOS (CNRS-UPR9023, CCIPE, Montpellier, France)
Ms. Bibiana SCELFO (Dept. Neurosci., Univ. Turin, Italy)
Mr. Javier DIEZ (Dept. Neurosci., Basque Country Univ., Bilbao, Spain)
Dr. Martin STRAUB (MPI Biophys. Chem., Göttingen, Germany)
Dr. Gabriele NASE (Dept. Neurophys., MPI Brain Res., Germany)