

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」

平成 21 年度採択研究代表者

虫明 元

東北大学大学院医学系研究科・教授

中枢神経系局所回路の状態遷移としての動的情報変換の解明

§ 1. 研究実施の概要

本研究では、認知的行動制御でみとめられる局所脳回路の情報表現変化において、その神経機構をシステムの状態遷移と捉えて、そのメカニズムを解明し、また操作する方法を開発する。今年度の研究は、全体目標としてオプトジェネティックスの実験系を開発することがあるが、光刺激用光源と電極を試作し、またチャンネルロドプシンの最適化や遺伝子組み換え動物の作成と準備を進めた。各グループでの研究は、虫明グループは前頭前野での動的状態遷移を捉える解明する目的で、二つのルールが競合する課題、両手の課題、数の操作課題を導入して、行動解析およびサルから細胞活動を記録した。およびラットでの研究の準備を八尾と連携して行っている。八尾グループはオプトジェネティックスの最適化を行いつつ、海馬での状態遷移を開発されたツールを用いて光刺激により研究を開始した。柳川グループは、GABA に注目した遺伝子組み換え動物の開発をおこないつつ扁桃体の局所回路における GABA 系の状態遷移に関わる役割を解明している。小山内グループは、カルシウムイメージングに基づいた状態遷移の解明と生理学的所見に基づいた神経モデルの作成を行うためにカルシウムを含むモデル作成を開始した。今年度の各グループの研究経過から議論して、状態遷移と振動現象や同期現象との関わりが、領域を超えて重要との認識を得た。来年度は、さらに高速共焦点顕微鏡の導入を行い、イメージングの技術と組み合わせたオプトジェネティックスの実験系の開発に挑む予定である。

§ 2. 研究実施体制

(1) 虫明グループ

①研究分担グループ長: 虫明 元 (東北大学大学院、教授)

②研究項目

前頭葉皮質の動的状態遷移の解明と多機能電極開発

(2) 八尾グループ

①研究分担グループ長: 八尾 寛 (東北大学大学院、教授)

②研究項目

オプトジェネティクスツールの最適化と海馬における状態遷移機構の解明

(3) 柳川グループ

①研究分担グループ長: 柳川 右千夫 (群馬大学大学院、教授)

②研究項目

GABA 細胞の扁桃体局所回路における機能的意義

(4) 小山内グループ

①研究分担グループ長: 小山内 実 (東北大学大学院、准教授)

②研究項目

動的イメージング計測による状態遷移機構の解明とモデル化

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

研究実施項目: 全体でのオプトジェネティクスの実験系開発

オプトジェネティクスの実験系を開発するために、光刺激用光源と電極をまず試作し、光刺激と電気記録を同時に行えるようにした。次いでチャンネルロドプシンをベクターで導入したラットまたは遺伝子改変ラットのスライスをもちいて、光刺激と効果を電気生理学的に確認した。特に遺伝子改変ラットではチャンネルロドプシンが脳に広範に発現していることを見出した(A,B-1)。光刺激システムに関しては虫明の実施項目で述べられているが、実際に光刺激システムを用いた刺激実験の研究成果に関して八尾の実施項目に詳しく述べられている。

特に、周期性光刺激に対する応答性の解析は、今後局所回路の状態把握の上で重要な所見と考えられた。また機能プローブ発現システムの開発としては、計画に従って遺伝子ツールとしてはテトラサイクリントランスアクチベーター・システムと組換えアデノ随伴ウイルスを利用して、GABAニューロン特異的にチャンネルロドプシンワイドレシーバーなどの機能プローブを発現させる方法の開発を目的としている。その第一歩として、小房型 GABA トランスポーター (VGAT) 遺伝子にテトラサイクリントランスアクチベーター2 (tTA2; 改変した tTA) をノックインした遺伝子改変マウス (VGAT-tTA2 ノックインマウス) を繁殖させた。詳しくは柳川の研究実施項目で述べている。状態遷移のニューロンモデルの研究の基盤として生理学的特徴を再現する細胞モデルのプロトタイプを作成し、基本的なシミュレーションを行った。これは小山内の研究実施項目に詳しく述べられて

いる。

次年度に導入予定の高速共焦点顕微鏡に装着するイメージモニタリングのファイバーシステムに関しては最適な条件を求めるためにいくつかの試作を行った。

虫明グループ

研究実施項目:コンフリクト課題に基づいた脳の動的情報表現

虫明グループの松坂は競合解決課題の遂行に関係した脳領域を検索中に前補足運動野(presupplementary motor area, 以下 pre-SMA と略す)の更に前方に従来報告されていなかった上肢運動に関連する領域(posteromedial prefrontal cortex, 以下 pmPFC と略す)を発見した。pmPFC と pre-SMA は、1). 空間的に隔たっている、2). pre-SMA は視覚刺激に対して明確な応答を示すのに対して、pmPFC は視覚刺激、体性感覚刺激に対して殆ど応答しない、3). 電気刺激によって pre-SMA では上肢の運動が生じるのに対して pmPFC では上肢、眼球運動どちらも誘発されないなどの生理学的、解剖学的な相違点がある。又、その位置関係から pmPFC, pre-SMA はそれぞれ Brodmann の 8B 野、6a β 野と見られる。さらに、認知的負荷を変化させることで pmPFC の神経回路が動的に再構築されることを発見した。すなわち、従来の研究では、pre-SMA の前方領域からは上肢の運動に関連したニューロン集団が見つかっておらず、今回用いた二つの競合するルールを含む課題で今回初めて見つかったことから、この領域が認知負荷によって動的に活性化する事が疑われた。この競合の要素が含まれていないと前方領域の課題関連細胞活動が激減してしまった。この領域の神経回路が認知負荷によって動的に再構成される事が示唆された。

研究実施項目:両手順序動作課題遂行中のサル内側運動野における興奮性細胞・抑制性細胞の活動

霊長類の前頭葉には多数の運動関連領域が存在する。これまでの研究より、高次運動野の細胞活動は、運動準備期間にこれから行う運動の抽象的な側面を符号化する傾向が高いことがわかっている。これに対し一次運動野は脊髄への投射が多く、その細胞活動は特定の筋群の活動との関係が深い。高次運動野で一旦抽象化して保持された運動関連情報は中継される間に興奮性細胞・抑制性細胞による様々な取捨選択を受け、一次運動野でみられるより具体的な運動指令に変換されると予想されるが、その過程についての知見は非常に乏しい。そこで我々は、運動の種類、効果器は、どのようなタイミングで、どのような種類の細胞集団によって表現され、具体的な運動指令に変わっていくのかを明らかにするため、サルに多数の両手順序動作を記憶に基づいて遂行させ、課題中に記録された細胞活動を波形により興奮性細胞、抑制性細胞に分類してそれぞれの細胞活動を解析した。

具体的研究方法としては、二頭のニホンザルに多種類の順序動作をトレーニングし、課題遂行中のサルの補足運動野・前補足運動野から単一神経細胞活動を記録した神経細胞活動を波形に基づいて興奮性(錐体)細胞と抑制性(介在)細胞に分類し、瞬間瞬間の細胞活動が運動の種

類、用いる効果器をどの程度反映しているかを統計的に定量した。

結果としては、補足運動野においては、運動実行期に、抑制性細胞が興奮性細胞と比べて効果器に対して高い選択性を示した。また、前補足運動野では、運動準備期間に、興奮性細胞が運動の種類を抑制性細胞よりも顕著に表現していたが、運動実行期には抑制性細胞と興奮性細胞で差はなかった。

上の結果より、少なくとも前補足運動野と補足運動野においては、運動準備期、実行期において運動の種類・効果器を主に表現する細胞のタイプが異なり、前補足運動野の興奮性細胞によって運動の種類が効果器に先んじて表現され、運動実行期に補足運動野の抑制性細胞によって用いるべき効果器が顕著に表現されることが明らかになった。抑制細胞と錐体細胞のこのような動的な情報表現が、運動準備から運動実行への変換に関わると考えられた。実際に興奮性細胞と抑制性細胞の間にどのような動的相互作用が存在するかを知ることが今後の課題である。

研究実施項目:オブジェクト操作課題における動的情報表現

前頭前野のゴール指向的な問題解決過程への役割を解明する目的で、動物に迷路課題を訓練して、与えられたゴールにどのように経路を選択するか、また経路移動にはどのような動作が必要かを自分で決定させる課題をサルに訓練し、問題解決の観点から前頭前野の神経機構の解明を行った。サル前方スクリーンに迷路が提示されその中央のスタート地点からのゴールまで、両手のマニピュレータをもちいてカーソル(オブジェクト)を移動させる。各試行では、サルが両手のマニピュレータを中立位に保持すると、前方スクリーンの格子状の迷路にスタート点の位置、次いでゴールの位置を一定時間呈示して消した後、ゴー信号が呈示された。サルは、両手のマニピュレータを操作して、カーソルをステップごとに上下左右の選択を行い移動させゴールまで到達すると報酬が与えられた。最終ゴール指示後の遅延期間においては、前頭前野細胞の多くの細胞において、最終的なゴールから最初の移動ゴールへの関連活動へ動的に変化するものが見出された。前頭前野の細胞活動によるこのような情報表現を動的な状態遷移としてとらえられないかと、細胞モデルを作成して、シミュレーションを行うことを開始した。

オブジェクト操作に関しては、迷路課題とは異なり非空間的な数の情報を用いた操作課題を考案した。動物が数のような高次の認知的対象を道具により操作する際の動的な脳活動を解明する目的で、サルに対して数的操作を行なう道具を導入し、行動解析を行い数に基づいた行動であることを確認した。結果としては、目標指向的課題におけるサルの正解率はそれぞれ77%とチャンスレベルより優位に高かった。また、数以外の視覚的特徴(面積、密度、配列等)を変えても、正解率は変化しなかった。目標指向的課題におけるサルの数の選択率は数が大きくなる程、正解率が低く曖昧となる近似的な結果を示した。これらの行動解析から数という高次に抽象的な対象操作をサルは融通性を持って操作できることが判明した。次年度はこの実験系での細胞活動記録を開始する。

動的な活動は、オブジェクト操作課題以外にも時間生成課題にも認められており、他の研究者の時間課題でも細胞活動の動的な変化が見出されている。またヒトの fMRI の課題

で行ったルール同定課題においても、ルール発見時の前頭前野—基底核の一過性の結合性増加を見出した。

研究実施項目：オプトジェネティックと組み合わせる多機能電極開発

チャンネルロドプシンの刺激用に、光刺激と細胞記録を同時に行える光電極と、その光源やバスタライブを試作した。特に周期的な刺激や、刺激強度を時間的に変化するなど動的な光刺激を行えるように、バスタライブを組み合わせることで入力の大きさや時間変化に対応した光刺激を行うことができようとした。チャンネルロドプシン用に刺激の周波数は 450nm にピークを持つ光源を作成した。新たに開発されたチャンネルロドプシン用にはより緑側へピークを持つ 490nm の光源を作成した。この光刺激システムは、簡単に出力を変調できるのでオプトカレントクランプ方法用に最適であり、神経細胞を含む局所回路の光電流応答特性を詳しく調べることができる。

またシリコン電極は多数の記録点を自在に配置できるが、一方機械的な脆弱性が問題であった。このような機械的な脆弱性を補う方法としては、金属電極にシリコン、ガラスなどの材料と複合した多機能電極を開発試作した。金属をベースにすることで、機械的な強度を持たせ、さらに光ファイバーを加えることで光—電気信号用電極として多機能電極になる。この多機能電極に関しては特許を出願した。このような電極は、特にチャンネルロドプシン等を用いた光遺伝学を用いた生理学実験系に用いることを最適である。また関連する技術として多機能電極を厚い硬膜を刺して脳に刺入のためのホルダーや技術を開発した。

八尾グループ

研究実施項目：オプトジェネティクスツールの最適化

膜貫通ヘリックスの特性にもとづいて、脱感作、作用スペクトルにおいて優れたチャンネルロドプシンをデザインした。たとえば、ChR1 の第6膜貫通ドメインを相同の ChR2の相同配列に置き換えたキメラタンパク質 ChR(ABCDEFg)は、作用スペクトル特性において、ChR1 と同じだが、コンダクタンスにおいて改善されていた。さらに、第7膜貫通ドメインの C 末サブドメインを ChR2 の相同配列に置き換えたキメラタンパク質 ChR(ABCDEFg_{1g2}) (チャンネルロドプシン・グリーンレシーバー; ChRGR)は、さらに大きなコンダクタンスを示し、神経細胞の光駆動に最適化されていた。光電流キネティクスにおいて、ChRGR は、ON 時定数、脱感作、OFF 時定数において、ChR1 に近い特性を示したが、脱感作がさらに小さい特徴があった。

研究実施項目：海馬における状態遷移機構の解明

マウスをケタミン—キシラジンにより麻酔し、脳定位固定下に野生型マウス大脳皮質に、ChRGR のコンストラクトを組み込んだシンドビスウィルスベクターを接種した。約 12 時間後に皮質スライスを作製し、ChRGR を発現している運動野 L5 錐体細胞を同定した。L5 錐体細胞にパッチクランプ法を適用し、ホールセルカレントクランプ下に、緑色 LED 光(505 ± 15 nm)を矩形波状に照射

し、脱分極させた(オプト・カレントクランプ)。これにより、細胞体における電流注入と同様の膜電位応答が得られ、L5 錐体細胞は、3-10Hz でほぼ等間隔に活動電位を発生した。同様のオプト・カレントクランプ法を海馬 CA3 錐体細胞に適用した。

チャンネルロドプシン2をThy1.2プロモーター制御下に発現するトランスジェニックラット(解析し、脳に広く分布していること、および、網膜神経節細胞特異的に発現していることを見出した。海馬においては、歯状回顆粒細胞、CA3 錐体細胞、CA1 錐体細胞に発現していた。海馬スライスを作製し、CA3 錐体細胞ホールセルカレントクランプ下にレーザー光パルス(490 nm)を照射した。パルス長 1s の場合、最初の活動電位のあとに持続する過分極が認められた。興奮性シナプス伝達をCNQXとAP5で抑制し、抑制性シナプス伝達をPTXで抑制したところ、照射光強さ依存的に反復活動電位が認められたが、100ms 以後には過分極性の応答に移行した。また、短いレーザーパルスの繰り返し刺激に反応しなかった。抑制性のシナプス入力とカリウムチャンネルの活性化がCA3 錐体細胞特異的な活動パターンを形成していることが考えられる。これに対し、歯状回顆粒細胞は、1s レーザーパルスに反復活動電位応答した。また、短いレーザーパルスの繰り返し刺激に追従して活動電位を発火する傾向が認められた。

柳川グループ

研究実施項目:扁桃体局所回路の解明

扁桃体局所回路における GABA ニューロンの機能的意義を明らかにする目的で、扁桃体の基底外側核と介在核における GABA ニューロンサブタイプの分類を行った。小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) 遺伝子プロモーターの制御下に Venus 蛍光タンパク質が発現する VGAT-Venus トランスジェニックマウスを用いて、カルシウム結合タンパク質のバルブアルブミン (PV) の発現分布について Venus の蛍光観察と抗バルブアルブミン抗体を用いた免疫染色法で検討した。基底外側核の Venus 陽性細胞の一部にバルブアルブミンの発現が認められたが、介在核の Venus 陽性細胞ではバルブアルブミンの発現が検出されなかった。扁桃体では、その中の領域によってバルブアルブミン陽性細胞の分布が異なることが示唆された。

GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD; GAD65 と GAD67 の 2 型存在) により生合成される。恐怖などの情動行動機能における GABA 神経伝達の役割を明らかにするために、GAD67 条件付きノックアウトマウス (GAD67-flox マウス) を繁殖させた。今後は、Cre recombinase を組み込んだ組換えアデノ随伴ウイルスを準備して、扁桃体特異的 GAD67 ノックアウトマウスを作製する。

研究実施項目:オプトジェネティックスのための機能プローブ発現システムの解析

テトラサイクリントランスアクチベーター・システムと組換えアデノ随伴ウイルスを利用して、GABA ニューロン特異的にチャンネルロドプシンワイドレシーバーなどの機能プローブを発現させる方法の開発を目的としている。その第一歩として、小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) 遺伝子にテトラサイクリントランスアクチベーター2 (tTA2; 改変した tTA) をノックインした遺伝子改変マウス (VGAT-tTA2 ノックインマウス) を繁殖させた。VGAT-tTA2 ノックインマウスには、両端に frt

配列を配置した PGK-Neo 遺伝子が挿入されており、tTA2 の発現に影響を与える可能性がある。そこで、VGAT-tTA2 ノックインマウスと Flp recombinase トランスジェニックマウスと交配することにより、PGK-Neo 遺伝子を削除した。今後は、PGK-Neo 遺伝子を削除した VGAT-tTA2 ノックインマウスにおける tTA2 の発現を解析するとともに、tetO プロモーターの下流に機能プローブや蛍光タンパク質の遺伝子を配置した組換えアデノ随伴ウイルスの作製を行う。

小山内グループ

研究項目： 大脳皮質—基底核ループの状態遷移機構の解明

細胞内カルシウムは、カルシウム依存性カリウムチャネルの活性調節などを介して、ニューロンの入出力特性を遷移させ、大脳皮質—基底核ループの状態遷移を引き起こす鍵になっているであろうとの観点から、大脳基底核線条体における自発カルシウムリズムの解析を行った。その結果、それぞれの細胞から得られるカルシウムリズムは不規則であるが、大脳皮質との神経結合の有無により、その周期性が変化することが分かった。さらにこのカルシウムリズムには有意な相関がある細胞ペアが多数存在するが、活動電位阻害によりその相関ペア数は減少する傾向にあった。これらの結果から、線条体における自発カルシウムリズムは、大脳皮質からの入力により制御を受けていることが示唆された。

研究項目： 生理学的な現象の背景になる神経機構のモデル化

ニューロンの生理学的特徴を再現する細胞モデルのプロトタイプを作成し、自発カルシウムリズムが GABA ニューロンの状態遷移にどのように関わりうるのかを確かめるために、“Ca²⁺-clamp”シミュレーション実験を行った。その結果、カルシウム依存性カリウムチャネルの存在により、細胞内 Ca²⁺ 濃度が自発カルシウムリズムで観測されている濃度範囲で変化することにより、ニューロンの入出力特性が変化することが確認された。また、この際作成したチャネルモデルなどは、どのような細胞種にも適用可能であるよう、チャネルの分子種ごとに作成した。今後、虫明グループ、八尾グループ、と協力して、生理学的に尤もらしい細胞・ネットワークモデルを構築し、神経回路の状態遷移モデルをコンピュータシミュレーションにより考察するために活用する。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

A-1、B-1) Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, Ishizuka T, Mushiake H, Kato M, Hirabayashi M, Shigemoto R, Yawo H, Tamai M: Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter. PLoS One 4: e7679, 2009.
DOI:10.1371/journal.pone.0007679

- C-1) Mulder J, Zilberter M, Spence L, Tortoriello G, Uhlén M, Yanagawa Y, Aujard F, Hökfelt T, Harkany T: Secretagoin is a Ca²⁺-binding protein specifying subpopulations of telencephalic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 22492-22497, 2009.
DOI:10.1073/pnas.0912484106
- C-2) Chen L, McKenna JT, Leonard MZ, Yanagawa Y, McCarley RW, Brown RE: GAD67-GFP knock-in mice have normal sleep-wake patterns and sleep homeostasis. *Neuroreport* 21: 216-220, 2010.
DOI:10.1097/WNR.0b013e32833655c4
- C-3) Kameyama K, Sohya K, Ebina T, Fukuda A, Yanagawa Y, Tsumoto T: Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons. *J Neurosci* 30: 1551-1559, 2010.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5025-09.2010