

岡本 仁

(独)理化学研究所脳科学総合研究センター・副センター長

手綱核による行動・学習の選択機能の解明

§1. 研究実施の概要

手綱核は、間脳の最背側部に両側性に存在し、いわゆる終脳辺縁系と、脳幹部のモノアミン神経細胞群や脚間核との間を中継し、情動や認知機能に重要な役割を果たすのではないかと考えられる。本研究では、手綱核を含む神経回路は、魚から哺乳類まで、高度に保存されていることを利用し、ゼブラフィッシュ、ラット、マウスを用いて、行動選択のスイッチボードとしての手綱核の役割を明らかにすることを目指している。本年は、ゼブラフィッシュの背側手綱核外側亜核での破傷風毒素の特異的発現によって、ゼブラフィッシュが恐怖条件刺激に対して選択的にすくみ行動を示すようになるとの発見を、Nitroreductase/Metronidazole 系を使って、成魚に達してから同神経核を破壊する実験によって確認し、論文を発表した。また、ゼブラフィッシュの全ての手綱核亜核それぞれを、特異的に操作できることを目指して、トランスジェニック系統の作成を行った。また、安静時のラットの手綱核の活動が海馬シータ波と同期しているという発見に基づき、自由行動で不安や恐怖を感じる状況で見られるシータ波と手綱核の関わりを調べられる実験系を確立した。また、このような神経活動の計測結果の解析のためのプログラムを開発した。また、マウスで、手綱核の細分化領域ごとに活動を操作するためのトランスジェニック系統を作成した。

§2. 研究実施体制

(1) 岡本グループ

- ① 研究分担グループ長: 岡本 仁 (独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター、副センター長)
- ② 研究項目
 - ・手綱核による行動・学習の選択機構の解明

(2) 深井グループ

- ① 研究分担グループ長: 深井 朋樹 (独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 脳回路機能理論研究チーム、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - ・手綱核機能解析システムの開発
 - ・多細胞記録システムの改良
 - ・神経回路モデルの構築

(3) McHugh グループ

- ① 研究分担グループ長: Thomas McHugh (独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経回路・行動生理学研究チーム、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - ・自由行動マウス、ラットを使った手綱核機能の解明

§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)

1: H21年度までに背側手綱核外側亜核のみで GAL4-VP16 を発現するトランスジェニック系統と、Gal4-VP16 の標的配列 UAS の下流に破傷風毒素の遺伝子を組み込んだトランスジェニック・ゼブラフィッシュをかけ合わせ、これらの遺伝子を、背側手綱核外側亜核のみで発現するゼブラフィッシュを作成した。この魚は、恐怖学習実験後に、恐怖条件刺激を提示すると、野生型の魚と較べて、異常に亢進したすくみ行動を示した。この系統では、破傷風毒素が生後間もなくから背側手綱核外側亜核で発現するため、手綱核の神経投射そのものに、影響を与えるのではないかと懸念が見られた。これを克服するため、破傷風毒素の代わりに、Nitroreductase を背側手綱核外側亜核で発現する系統を作成し、恐怖条件付け実験の直前に、metronidazole で個体を処理することによって、背側手綱核外側亜核の神経細胞に細胞死を誘発することに成功した。このような魚を使っても、恐怖条件刺激に対して、亢進したすくみ行動が見られることを確認でき、これまでの結果をまとめて雑誌発表を行うことができた³⁾。また、この魚と正常魚との、恐怖条件刺激の提示後に、興奮する被蓋野の神経細胞を、c-fos の発現によって同定する試みを行っている。

2: ゼブラフィッシュで、他の亜核ごとに特異的に、神経活動を操作できる系統の確立に向けた、トランスジェニック系統の作成を行った。

3: ゼブラフィッシュで手綱核・脚間核間のシナプス伝達機構を調べるため、手綱核を電気刺激した際に脚間核から *in vivo* 細胞外記録を行い、集合電位を記録した。

4: これまでの深井チームとの共同研究によって、ラット外側手綱核神経細胞の約34%がREM睡眠中に海馬シータ波に位相同期して活動していることを明らかにしてきた。平成22年度は、この結果を発展させ、外側手綱核の破壊により海馬シータ波の性質がどのように変化するかを検討した。外側手綱核を破壊したラットの海馬シータ波をウレタン麻酔下で測定したところ、対象群に比べて単位時間あたりのシータ波発生時間が有意に短縮しており、外側手綱核神経活動が海馬シータ波の持続に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

近年の研究から海馬シータ波は、移動、不安、恐怖、REM睡眠など様々な行動と関連して脳領域間の協調活動に関与することが示されている。外側手綱核破壊がこれらの特定の行動に伴う海馬シータ波に与える影響を調べるため、McHughチームと共同で自由行動下におけるラット海馬シータ波測定システムを構築した。この実験系の確立によりREM睡眠時や直線路移動時、高架式十字迷路により不安が増強したラットにおける海馬シータ波を測定する事が可能になった。同解析により外側手綱核破壊ラットでは、対照群と比較して単位時間あたりの海馬シータ波を伴うREM睡眠時間が有意に短縮している事が明らかとなった。現在、外側手綱核破壊の直線路移動時や不安増強時のシータ波への影響について解析中である。

また、外側手綱核神経細胞は海馬CA1錐体細胞と同様のシータ波への位相同期活動を示しているため、特定の脳領域が外側手綱核・海馬両方の同期神経活動を修飾している可能性について調べた。2種類の異なる逆行性標識物質を同一個体の海馬CA1及び外側手綱核へとそれぞれ注入し、これらの領域へ神経線維を投射する領域を調べたところ、海馬シータ波のペースメーカー領域として知られる対角帯の2種類の神経細胞群がそれぞれ海馬、外側手綱核へと軸索を投射していた。この細胞群の神経化学的特徴についてさらに検討したところ80%以上の細胞がGABA作動性の神経細胞であった。以上の結果は、対角帯が外側手綱核及び海馬CA1領域におけるシータ波位相同期現象の源泉となっている可能性を示唆している。

5: マウスの手綱核亜核の神経活動を操作するための、トランスジェニック・マウス系統を作成している。

6:深井グループは、変分ベイズ推定法にスパイク分離の開発を行ってきたが、アルゴリズムの解析解を見つけたことにより実装が容易になり、多細胞記録のスパイクの精度と効率を著しく向上させることに成功した。この方法と従来法を人工的なスパイクデータに適用し、最善のアルゴリズムを決定した(論文投稿中)。またベイズ推定法を神経細胞の同期ダイナミクスを解析する手法の改善に用いた¹⁾。非線形ダイナミクスの時系列データの解析法である、多時間スケール解析法をラットから記録された多細胞スパイクに適用し、神経集団の活動があらゆる時間尺度で繰り返される、普遍構造をもつ場合があることを証明した²⁾。このことは、行動学習に関与するさまざまな時間尺度を、神経活動の時間構造に反映させるような非線形動力的メカニズムが、神経回路で働いていることを示唆している。海馬などの学習の基本となるシナプス可塑性規則を理論的に導出した(論文投稿中)。この結果は生理学実験の知見とよく合致する。多細胞のスパイク列の時間空間的特徴を検出するために、高次元の特徴空間に射影することで検出を行う、カーネル PCA 法の開発を進めた。検出には成功したが、元の空間に戻せないなどの欠点があるため、更なる改良を要する。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Nakae K, Iba Y, Tsubo Y, Fukai T, Aoyagi T: Bayesian estimation of phase response curves. *Neural Networks* 23(6):752-763 (2010). doi:10.1016/j.neunet.2010.04.002
- 2) Safonov LA., Isomura Y, Kang S, Struzik ZR, Fukai T, Câteau H: Near scale-free dynamics in neural population activity of waking/sleeping rats revealed by multiscale analysis. *PLoS ONE* 5(9): e12869 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0012869
- 3) Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, Nakayama R, Takahoko M, Goto M, Sassa T, Amo R, Shiraki T, Kawakami K, Hosoya T, Higashijima S, Okamoto H : The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nature Neuroscience* 13(11): 1354-1356 (2010). DOI: 10.1038/nn.2654