

「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

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、ゼブラフィッシュとマウスの手綱核細分化領域の対応関係を明らかにし、背側手綱核外側亜核の特異的操作によって、ゼブラフィッシュが恐怖条件刺激に対する応答が、選択的にすくみ行動を示すようになることを発見に基づき、不安レベルや安静時の行動量の測定等の計測を行うことによって、この操作が、恐怖応答における行動選択に特異的な影響を及ぼすことを確認した。また、安静時のラットの手綱核活動を多重電極で計測、分析できるシステムを確立し、その活動が海馬シータ波と同期していることを発見した。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に必要なベクターの構築を行った。また、自由行動マウスから、手綱核神経活動を計測するためのシステムを確立した。

## § 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)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)理化学研究所脳科学総合研究センター、チームリーダー)

②研究項目

多細胞スパイクデータの数学的解析方法の開発  
手綱核-海馬神経回路の相互作用のモデル化  
手綱核神経回路のモデル

(3)McHugh グループ

①研究分担グループ長:Thomas McHugh((独)理化学研究所脳科学総合研究センター、チームリーダー)

②研究項目

非拘束条件での手綱核と海馬の神経活動同時計測、及び手綱核光刺激装置の共同開発

### § 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)

[岡本グループ]

#### 1:ゼブラフィッシュ手綱核の活動の遺伝子操作

我々は、ゼブラフィッシュでは背側手綱核と腹側手綱核が、マウスの内側手綱核と外側手綱核に相当することを発見した。更に我々は、ゼブラフィッシュの背側手綱核が、更に外側と内側の亜核に分かれており、外側亜核は脚間核の背側半分に、内側亜核は脚間核の腹側半分に選択的に投射すること、左側の手綱核では外側亜核が内側亜核よりも有意に大きく、右側の手綱核ではその反対であることを発見した(H. Aizawa et al. *Nucleus*, *Current Biology* 15,3(2005) 238-243, H. Aizawa et al. *Developmental Cell* 12,1(2007), 87-98)。更に、背側手綱核の外側亜核が投射する背側脚間核は、脅威や性的衝動に基づく本能的行動の中枢である中心灰白質付近に投射し、内側亜核が投射する腹側脚間核は、セロトニン神経細胞を含み戦略的行動プログラムの成立に関わる縫線核に投射することも証明している<sup>1)</sup>。このような神経回路を特異的に操作するために、これまでに、背側手綱核の全体や、外側亜核だけに特異的に Gal4-VP16 を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作成している。これらの系統を使って、背側手綱核や、外側亜核だけを選択的に破壊したり、神経活動を抑制できるようになった。背側手綱核の外側亜核の神経細胞で、特異的に破傷風毒素を産生し、背側脚間核への神経伝達が特異的に遮断されたトランスジェニック・ゼブラフィッシュでは、恐怖学習の成立後の、恐怖反応が、異常に亢進していることが明らかになった。即ち、野生型のゼブラフィッシュでは、恐怖学習の後に条件刺激を提示すると、一時的な遊泳活動の亢進が見られるだけだが、このようなトランスジェニック系統は、条件刺激と提示後、完全に行動を停止した(フリージング)。この状態は、条件刺激の提示終了後も数分間持続した。このことから我々は、背側手綱核(哺乳類の内側手綱核)の外側亜核が、恐怖

学習後の恐怖行動の選択と深く関わっているのではないかと考えている。本研究期間では、このような実験の詰めを行い、結果をまとめて雑誌に投稿した。現在、再投稿のため、追加実験を行った。更に、ゼブラフィッシュ手綱核の他の細分化領域の神経活動の操作を行うためのトランスジェニックシステムの作成を進めた。

## **2: ラットを用いた外側手綱核の神経細胞と海馬シータ波との協調的活動**

海馬シータ波は神経情報の符号化や空間的および恐怖学習過程において重要な役割を果たし、シータ波の有無は覚醒・レム睡眠・ノンレム睡眠などの脳状態を規定している。外側手綱核はセロトニンやドーパミン神経活動を抑制的に制御する神経核として注目されており、これらモノアミン神経系の制御を介して、記憶形成や行動プログラム選択などを担う他の神経回路活動を修飾している可能性がある。我々は、外側手綱核が他の神経回路活動に与える影響を調べるため、外側手綱核を電氣的に障害したラットの海馬からウレタン麻酔下で細胞外フィールド記録を行ったところ、シータ波に相当するパワースペクトルの減少を見いだした。この結果から、外側手綱核神経細胞が海馬シータ波と何らかの相関関係を保ちながら活動する可能性があるため、シータ波を発生するレム睡眠中ラットの外側手綱核から細胞外ユニット記録を行い、海馬シータ波との関係を検討した。その結果、外側手綱核神経細胞の半分以上が海馬シータ波の特定の位相と同期して活動しており、その神経細胞活動はシータ波の微小変動と強調して活性化していることが明らかとなった。さらに外側手綱核をシータ波に位相同調させる脳領域を調べるため、傍細胞標識および逆行性標識実験を行ったところ、海馬シータ波と位相同期する外側手綱核神経細胞は、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入力を受ける外側手綱核内側区画に局在していた。これらの結果は、外側手綱核が対角帯のようなペースメーカー領域の影響下に、レム睡眠におけるドーパミンおよびセロトニン神経系の調整を介して、記憶形成の制御を担っている可能性を示唆している。

## **3: マウス手綱核の遺伝子操作**

マウス手綱核の細分化領域ごとに、人為的に活動を制御するためのベクターの作成を行った。

### **[深井グループ]**

本研究では、手綱核や海馬からの多細胞記録が重要になる。多細胞記録では、テトラポッドで得られる4つの電気信号から、各ニューロンのスパイク時系列を何らかの数学的方法で高精度に分離する必要がある。分離の精度が低い場合、最終的にオペレータが手作業で分離する作業の負担が増大し、実験データの解析に膨大な時間がかかるばかりか、オペレータの主観によるバイアスの影響が避けられないため、スパイク分離の正確さ自体に問題が出ることになる。さらに分離精度が低い方法論の場合には、最終的にクラスタリングを行う以前に、スパイク検出の段階でノイズの影響を軽減しておく必要があるため、きれいな波形を示さないスパイクはデータセットから除外する必要がある。これはせっかく記録したスパイクの大多数を解析に利用せずに捨てることを意味し、実験データから得られる情報量は大幅に減少してしまうことになる。

従来のスパイク分離法は十分な性能を有しているとは言えないため、深井らは新しくロバスト変分ベイズ法によるスパイク分離アルゴリズムを開発した<sup>2)</sup>。この方法はスパイクを波形の特徴に従ってニューロンごとのクラスターに分ける方法に新規性があるが、分離性能を人口データや公開されているテスト用実験データで試したところ、従来のどの方法に比較しても、著しく誤差が少ない結果を得ることができた。このアルゴリズムは現在 EToS ver.1 として、誰でも無料でダウンロードできるようにしているが、現在までに約100件のダウンロードがあった。論文発表後に数値計算の速度や精度を向上させるために、大幅なアルゴリズムの改善を行い、EToS ver.2 ではさらに

正確なスパイク分離が安定して行えるようになった。このバージョンはまだ公開されていないが、現在岡本や相澤らにより、手綱核の多細胞データの解析に利用されている。

また、上の方法で得られた多細胞のスパイク列から情報を読み取るためには、スパイク列の時間空間特徴を検出して行動時系列との相関を解析する必要がある。そのための数学的手法を検討した。現在はカーネル PCA などさまざまなマシン学習の方法論を取り上げて、実際の多細胞データで性能を試している段階である。

## [McHugh チーム]

64 チャンネルデジタル記録装置を購入し、多重電極を自由行動中のマウスの外側手綱核に、確実に装着できるための実験系の確立を試みた。電極の到達箇所は、電気的細胞傷害法と色素注入によって確かめた。マウスが、歩行中に期待される報酬を得られなかった時に、外側手綱核の神経細胞の活動を記録できる、新しい行動実験系を確立した。

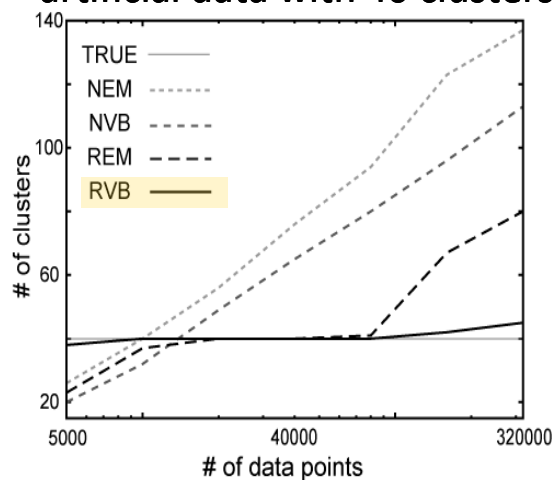
## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

- 1) Amo R, Aizawa H, Takahoko M, Kobayashi M, Takahashi R, Aoki T, Okamoto H: Identical Identification of the Zebrafish Ventral Habenula As a Homolog of the Mammalian Lateral Habenula. J Neurosci 30: 1566-1574, 2010.

artificial data with 40 clusters



ロバスト変分ベイズ法 (RVB) の優位性。人口データには40個のクラスターが埋め込んである。他の方法の性能がデータ数に大きく依存するのに対し、RVBでは安定して、正しいクラスター数を推定できる。

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3690-09.2010

- 2) Takekawa T, Isomura Y, Fukai T: Accurate spike sorting for multi-unit recordings. *Eur J Neurosci* 31:263-272, 2010.

DOI:10.1111/j.1460-9568.2009.07068.x