

「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

松崎 政紀

東京大学大学院医学系研究科・准教授

最先鋭技術で探る運動皮質回路の時空間表現と光制御

§ 1. 研究実施の概要

随意運動が脳皮質内の神経回路にどのように情報表現されているのかを解明することを目的とする。そのために、階層横断的方法論を結集・融合させ、運動に関わる皮質細胞の活動・分布を単一細胞レベルで明らかにし、それらの活動を光制御することで情報の流れと情報量を明らかにする。本年度においては要素技術開発に重点を置いた。松崎グループは、光刺激・イメージング可能な顕微鏡の構築、遺伝子導入した光活性化分子の光刺激法の確立、を行った。磯村グループは、脳定位固定覚醒マウスにおける運動課題の訓練装置の構築と新たな装置の開発を行った。これに加え、松崎グループは、小脳における運動関連微小帯域の同定とシナプスコンダクタンス解析のための実験を、磯村グループは、大脳運動野全層細胞電気計測の実験を開始した。今後は、随意運動課題中の関連細胞の空間分布を多細胞カルシウムイメージングとマルチユニット記録によって明らかにするとともに、光刺激によって細胞活動や個体運動がどのように変化するかを計測する予定である。

§ 2. 研究実施体制

(1) 松崎グループ

① 研究分担グループ長: 松崎 政紀 (東京大学大学院、准教授)

② 研究項目

同時光刺激・イメージング・電気記録の可能な顕微鏡の構築

遺伝子導入した光活性化分子の光刺激法の確立

小脳における運動関連微小帯域の同定とシナプスコンダクタンス解析

(2) 礒村グループ

①研究分担グループ長:礒村 宜和(玉川大学、特別研究員)

②研究項目

頭部固定 Go/No-go 等前肢・舌運動課題装置の開発・効率化・汎用化
運動野全層からの電気記録による運動関連活動の解析

§ 3. 研究実施内容

研究目的

随意運動が脳皮質内の神経回路にどのように情報表現されているのかを解明することを目的とする。そのために、階層横断的方法論を結集・融合させ、運動に関わる皮質細胞の活動・分布を単一細胞レベルで明らかにし、それらの活動を光制御することで情報の流れと情報量を明らかにする。本年度は、松崎グループ、礒村グループともに、22年度からの研究遂行に備えた装置の開発・最適化という要素技術開発に重点を置いた。松崎グループは、研究項目、「光刺激・イメージング可能な顕微鏡の構築」、「遺伝子導入した光活性化分子の光刺激法の確立」、を目標とし、ほぼ達成した。礒村グループは、研究項目「頭部固定 Go/No-go 等前肢・舌運動課題装置の開発・効率化・汎用化」、を行い、訓練機の基本形と新しい装置の試作品を完成した。これに加え、全体計画書では22年度開始予定であった、「小脳における運動関連微小帯域の同定とシナプスコンダクタンス解析」、に関して松崎グループが、「運動野全層からの電気記録による運動関連活動の解析」、に関しては礒村グループが、前倒して実験を開始した。

方法・成果・達成状況

(1) 松崎グループ

・同時光刺激・イメージング・電気記録の可能な顕微鏡の構築

2光子イメージングしながら、ケイジド試薬、光活性化タンパク質(チャンネルロドプシン 2、ChR2; ハロロドプシン)を様々な時間・空間解像度で刺激できるようにするため、新たに顕微鏡を構築した。このために、2光子レーザー2台、可視光レーザー3台を搭載し、2光子イメージングと2光子局所刺激、青・黄・橙色の連続照射を可能とした。また空間光変調器を使った光学系を新たに構築し、任意の光刺激パターンを標本上に投射することを可能とした。この光をファイバーに導入することで、ファイバー下においても任意の光刺激パターンを投射することも可能とした。

礒村グループと協力しながら、上記顕微鏡下での覚醒マウスの頭部固定オペラント装置の基本型の開発をほぼ終了した。1-2週間の訓練によってマウスは、頭部固定された状態でレバーを引くと水の報酬が得られる課題を学習し、安定してレバー引きをするようになった。この時のレバーの位置記録、水報酬タイミングなどをすべて、PCから制御できるようにした。また課題遂行中にユニ

ット記録が出来るようにし、運動関連細胞の発火を検出できるようになった。

上記オペラント課題遂行中のマウス脳活動を計測するため、個体脳における多細胞2光子カルシウムイメージングの実験系を立ち上げた。麻酔した個体脳にカルシウム指示薬を負荷した後、これを2光子イメージングによって計測することで、細胞活動をカルシウム蛍光上昇として捉えることが出来るようになった。次に、課題遂行中のマウスにおいて2光子イメージング画像を取得することに成功した。現在、計測したカルシウム上昇を検出、レバー引きタイミングに合わせてソーティングし平均化できるように解析ソフトを作成している。

・細胞光刺激のための遺伝子導入法の確立

ChR2遺伝子が神経細胞に導入されたトランスジェニックマウスを用いて、このマウスが麻酔した状態で運動皮質第5層でユニット記録を行いながら、皮質表面に対して2次元光刺激マッピングを行うことで100-200 μm の空間範囲で刺激できることを確認した。さらに光刺激中に多細胞カルシウムイメージングを行うことによって、光活性化された細胞をカルシウム蛍光上昇の計測によって同定することを可能とし、ほぼ半数の第5層細胞が反応していることが判明した。また子宮内電気穿孔法によって皮質第2/3層の細胞に遺伝子導入したChR2が光照射によって発現細胞で活動電位を誘発できるかどうかを調べた。その結果、個体動物脳において光刺激マッピングを行い、その時の細胞活動をユニット記録によって計測し、これに関しても100-200 μm の空間解像度で活動電位を誘発できることがわかった。カルシウムイメージングによって、光活性化された細胞を同定したところ、全細胞の数パーセントしか反応しなかったため、より効率的な導入法を検討している。

・小脳における運動関連微小帯域の同定とシナプスコンダクタンス解析

覚醒マウス小脳でホールセル記録を行い、プルキンエ細胞活動と舌舐めの同時測定を行い、舌舐めに同期したシナプス入力及び、活動電位を検出することに成功した。

(2) 磯村グループ

・頭部固定 Go/No-go 等前肢・舌運動課題装置の開発・効率化・汎用化

今年度はまず、前肢で自発的にレバーを操作すれば報酬を獲得できるオペラント運動課題を脳定位固定条件下のラットに効率よく訓練する行動実験系を確立し、ラットの運動中に運動野の錐体細胞と介在細胞の電気的活動を傍細胞記録法とマルチユニット記録法により測定することに成功した(参考: Isomura Y et al., *Nat. Neurosci.* 12:1586-1593, 2009. DOI:10.1038/nn.2431)。しかし、現法では皮質深層の光学的観察や遺伝子改変操作に有利なマウスを使用することができず、2光子顕微鏡を空間配置することも困難なため、松崎グループと協力して前肢レバー引き運動課題の行動実験装置の抜本的な改良に取り組んだ。現在、マウスでもレバー引き課題を遂行することが可能であることを実際に顕微鏡台上でも確認しており、次年度以降の本格的な測定実験の開始に向けて最終調整をおこなっているところである。この最終調整が済み次第、多個体のマウスに効率よく運動課題を訓練する訓練装置も同様の調整を施して

完成させる段取りでいる。

また、磯村グループ自体は次年度以降に電気生理学的実験を開始するために、より効率よく学習すると期待される新しいタイプの運動課題を考案しつつある。運動課題の訓練の効率化は、多数の訓練済み動物を傍細胞記録実験やパッチクランプ記録実験などの電気生理学的実験に使用する今後の研究計画に不可欠である。この新課題では、ラットを対象動物として、操作レバーを前肢でより自然につかめるように、また「押す」と「引く」両方の動作を観察できるように、いくつかの改良を加えた。さらに、レバー操作と報酬獲得の関係を被検動物がより直感的に理解できるような工夫をレバー機構本体に施した。現在、試作品が完成した段階であり、次年度は実際に脳定位固定状態の被検動物を使って最適化を試み、電気生理学的実験への適用に向けて完成させたい。

・運動野全層からの電気記録による運動関連活動の解析

また、本研究項目については、一部計画を前倒しにして本実験をすでに実施し、運動発現中の運動野細胞の発火活動を16chシリコンプローブにより深さ400ミクロン間隔でマルチユニット活動を記録する実験系をほぼ確立した(参考:Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. *Eur. J. Neurosci.* 31:263-272, 2010. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.07068.x)。次年度はこれまでに収集した実験データの基礎的な解析に取り掛かる予定である。

このように全体計画での21年度のマイルストーンである、

- ・同時光刺激・イメージング可能な顕微鏡の構築、覚醒マウス脳内イメージングの実現
- ・遺伝子導入した光活性化型分子の個体動物脳における光刺激の確証
- ・覚醒マウスの脳定位固定オペラント訓練装置の開発

をほぼ達成することが出来た。