

松崎 政紀

基礎生物学研究所光脳回路研究部門・教授

(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。本年度は、松崎グループは、頭部固定マウスの運動課題装置を完成させ、頭部固定マウスの大脳を2光子イメージングをしながら多色のレーザーを用いて連続刺激が可能な顕微鏡を構築した。チャネルロドプシン2(ChR2)変異体を第2/3層錐体細胞の一部に発現させこれを単一細胞レベルで細胞活動を上昇させることが出来ることを確認した。マウスの前肢運動野を同定するために、光刺激及び電気刺激法(ICMS)を用いて前肢運動野RFA、CFA領域を決定し、両者の方法で領域が一致することを確認した。また、光刺激によってRFAを刺激するとCFAからシナプス応答が取れることを確認し、逆行性蛍光トレーサの注入によってRFA-CFA間の結合様式をほぼ同定することができた。運動課題遂行中のマウスの運動野第2/3層において2光子カルシウムイメージングを行い、課題関連細胞を同定しつつある。磯村グループは、ラットでの運動課題をさらに改良し、従来2週間を要したレバー押し課題の訓練期間をわずか3日間に短縮することに成功した。また、外発性運動課題を学習したラットは、内発性運動課題と外発性運動課題の交代課題を追加1日で学習できることも見出した。このような課題訓練を複数個体に同時に施す多個体用訓練装置も開発し設置を終えた。現在、自発性運動と誘発性運動の交代課題を遂行中のラットの運動野からシリコンプローブをもちいたマルチユニット記録を実施しており、スパイクソーティングを含め予備的なデータ解析を推進中である。今後は、随意運動課題中の関連細胞の空間分布・細胞種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・ホールセル記録によって細胞活動や細胞結合様式を定量的に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 (基礎生物学研究所光脳回路研究部門、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

細胞光刺激のための遺伝子導入法の確立

大脳領域における運動関連細胞の同定と分布の解析

小脳における運動関連領域・細胞の観察

(2)「礒村」グループ

① 研究分担グループ長:礒村 宜和（玉川大学脳科学研究所、教授）

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

ホールセル記録による運動関連シナプス性コンダクタンスの解析

§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、磯村グループともに、昨年度から構築してきた顕微鏡・装置を実際の実験が可能になるように最適化し、実験データの取得・解析を開始した。

(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

マウス頭部固定のレバー前肢運動課題装置を顕微鏡標本ステージ上にのせ、このマウス大脳の細胞活動を2光子イメージングをしながら、2光子刺激、青色・黄色レーザーの連続刺激が可能な顕微鏡を構築した。またこの顕微鏡を用いた光刺激実験により、運動領野間結合を同定する方法、ChR2、ハロロドプシン(NpHR)発現神経細胞を系統的に光活性化する方法を確立した。NpHR 遺伝子導入マウスの大脳へ黄色レーザーを照射することにより、電気刺激(ICMS)により誘導される前肢運動を抑制できること、また第5層細胞の自発活動を側方約200 μmの空間解像度で抑制できることを確認した。

・細胞光刺激のための遺伝子導入法の確立

ChR2 変異体を第2/3層錐体細胞の一部に子宮内電気穿孔法によって発現させ、これを *In vivo* の状態で、上記顕微鏡を用いて光刺激することで、単一細胞レベルで細胞活動を上昇させることが出来ることを確認した。しかしこの遺伝子導入法では視野内すべての細胞に強く遺伝子を発現させることが難しかった。現在、より広範囲に遺伝子発現をさせるため、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入法を立ち上げている。また、小脳ニューロンの光刺激のために、プルキンエ細胞特異的な発現を可能にするレンチウイルスを作成した。現在、*in vivo* での発現効率を上げるための最適化を行っている。

・大脳領域における運動関連細胞の同定と分布の解析

前肢に関わる運動野をイメージングするためにまずマウスの前肢運動野の同定を行った。ChR2 光刺激及び ICMS を用いてふたつの前肢運動野 RFA, CFA 領域を決定し、両者の刺激方法で同定された領域が一致することを確認した。また、光刺激によって RFA を刺激すると CFA からシナプス応答が取れることを確認し、また逆行性蛍光トレーサーの注入によって CFA-RFA 間の結合様式をほぼ同定することができた。得られた解剖学的結合様式をサルのもものと比較すると、マウス RFA はサルにおける高次運動野に対応することが強く示唆された。CFA 領域に関して、運動課題遂行中のマウスの運動野第2/3層において、2光子カルシウムイメージングを行うことを可能とし、課題関連細胞を同定しつつある。そのためのデータ解析プログラムを完成させた。現在こ

れを用いて課題関連細胞の分布を解析している。

- ・小脳における運動関連領域・細胞の観察

小脳の実験では、水報酬時の舌運動に関わる細胞活動を同定することを最初の目的とした。大脳イメージング領域とは異なっているため、脳固定具の位置を変えるなど装置の改良が必要であることがわかり、現在それを最適化している。予備的な段階ではあるが、小脳の舌運動に関わるプルキンエ細胞の活動をホールセル記録で捉えることができるようになった。

(2) 礒村グループ

- ・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

近年、礒村らは、レバーの配置を工夫することにより、脳定位固定条件下のラットにレバー操作課題を約2週間で学習させる行動実験装置を開発することに成功した(報告済)。しかし、最も理想的な行動課題は熟練を要せずに1日から数日間で学習が観察できるものであり、この実験装置でもまだまだ抜本的な効率化と汎用化が必要であると考えていた。そこで今年度は、独特の操作部機構を備える行動実験装置を開発し、脳定位固定したラットを対象にオペラント学習課題を課す実験をおこなった。その結果、わずか数日で「内発性/外発性運動課題」や「Go/No-go 運動課題」の学習が完了する行動実験装置の開発に成功した。

- ・運動野全層からの電気記録による運動関連活動の解析

すでに、前肢の内発性運動を発現中の一次運動野より、1シャンク 16ch シリコンプローブをもちいて深さ 400 ミクロン間隔(400,800,1200,1600 μ m)で多数の神経細胞の発火活動をマルチニューロン記録した実験データを蓄積し終えており、現在、基礎的な解析を進めているところである。また、上記項目の行動実験系を活かして、「内発性/外発性運動」と「Go/No-go 運動」の発現機構を調べるために、これらの運動課題を遂行するラットの一次運動野の第5層を中心にマルチニューロン記録実験を順調に実施している。また、このうち一部の実験データはすでにスパイクソーティング解析に入っている。

- ・ホールセル記録による運動関連シナプス性コンダクタンスの解析

今年度は、これまで礒村研究室で活用してきたインビトロ(スライス)パッチ記録用の実験装置をインビボ・パッチ記録専用として円滑に換装することを目指した。その過程で、大脳スライス中のネットワークにおけるグルタミン酸作動性の錐体細胞とGABA作動性の介在細胞のサブタイプが相互に作用することにより同期的活動が生じることを見出し論文報告をおこなった(論文2: F.Tsukamoto et al., 2010)。この成果は、インビボ・パッチ記録により大脳皮質における「バランス抑制」の仕組みを解明する際の手がかりになるものと期待している。現在は、麻酔または覚醒中のラットをもちいたインビボ・パッチ記録実験系の完成に力を注いでおり、予備的検討を重ねたうえでブラインド・パッチ法に適する記録装置や行動実験装置を導入・改変しているところである。

結語

21年度に立ち上げた顕微鏡および装置の開発・最適化はほぼ完了することが出来た。これらを

用いた2光子イメージングと電気記録による運動関連細胞の同定・解析は順調に進んでいる。新たな実験系である、細胞光刺激のための遺伝子導入法、運動課題中での小脳イメージング法、運動遂行中でのホールセル記録法についてはまだ確立はしていないが、実現可能性についてめどが立ってきた。また運動課題装置についてはさらに改良を進めている。今後は現在実験を行っているデータの収集・解析・意義付けを進めるとともに、新たな実験系を完成させて次の段階の実験データの収集を始められるように研究を進めていく予定である。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Safonov LA, Isomura Y, Kang S, Struzik ZR, Fukai T, Câteau H: Near scale-free dynamics in neural population of waking/sleeping rats revealed by multiscale analysis. PLoS ONE 5(9): e12869 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0012869
2. F-Tsukamoto Y, Isomura Y, Imanishi M, Ninomiya T, Tsukada M, Yanagawa Y, Fukai T, Takada M: Prototypic seizure activity driven by mature hippocampal fast-spiking interneurons. J Neurosci 30(41): 13679-13689 (2010). doi: 10.1523/JNEUROSCI.1523-10.2010