

虫明 元

東北大学医学系研究科・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の動的変化を、神経システムの状態維持や遷移と捉え、その現象の本質とメカニズムを解明し、またその回路の状態を操作する新規な方法を開発することが目標である。今年度は、個別にはそれぞれのグループで、状態維持と遷移のメカニズム解明を行いつつ、全体としては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。また、八尾グループと大脳皮質前頭葉と海馬の状態遷移のメカニズムをラットの実験系で解明しようと新たな実験系の準備を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、大脳皮質運動野と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実施した。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)グループ全体

②研究項目(光遺伝学的神経機能評価系の構築)

・光遺伝学的神経機能評価系の構築

(2) 虫明グループ

- ① 研究分担グループ長: 虫明 元 (東北大学医学系研究科、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)
 - ・前頭前野内側部の動的表現機構の解析
 - ・両手順序動作制御における神経活動の動的情報表現
 - ・オブジェクト操作課題における神経活動の動的情報表現

(3) 八尾グループ

- ① 研究分担グループ長: 八尾寛 (東北大学生命科学研究科、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)
 - ・オプトジェネティクスツールの最適化
 - ・海馬における状態遷移機構の解明

(4) 「小山内」グループ

- ① 研究分担グループ長: 小山内実 (東北大学医学系研究科、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)
 - ・大脳皮質—基底核ループの状態遷移機構の解明
 - ・in vitro カルシウムイメージングによる、ニューロン活動のアンサンブル計測
 - ・生理学的な現象の背景になる神経機構のモデル化
 - ・オプトジェネティック実験系の作成

(5) 柳川グループ

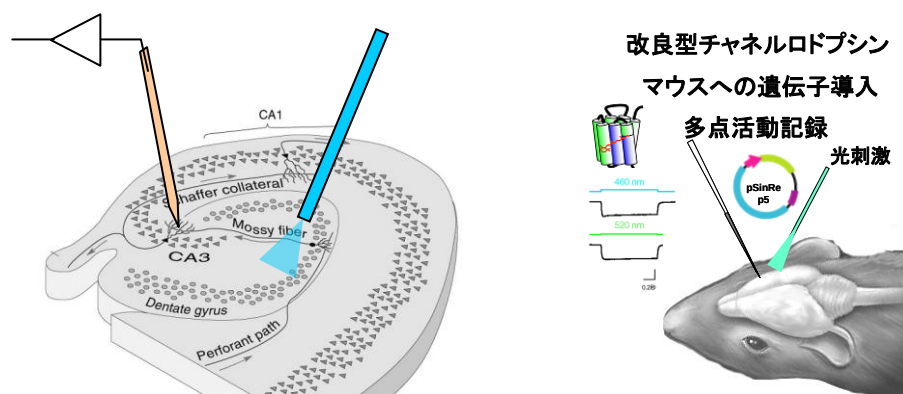
- ① 研究分担グループ長: 右千夫 (群馬大学医学研究科、教授)
- ② 研究項目 (GABA 細胞の扁桃体局所回路における機能的意義)
 - ・GABA 細胞の扁桃体局所回路における機能的意義
 - ・機能プローブ発現システムの開発

§ 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)

研究実施項目:全体でのオプトジェネティックスの実験系開発

オプトジェネティックスの実験系を開発するために、光刺激用光源と電極を試作し、光刺激と多点電気記録を同時に行える系を開発して、チャンネルロドプシンを導入した組み換え動物での実験を開始した。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(Tomita et al, 2009)のスライスをもちいて、光刺激と効果を電気生理学手法と生化学的にリアルタイムで捉えることと最初期遺伝子である c-fos の発現を調べて神経活動の履歴をしらべる生化学的手法と見合わせて確認した。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海馬で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(文献1)。光刺激方法は、持続的な刺激より、周期性光刺激に対する応答性が高くその反応性の解析は、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。海馬光刺激により広範囲にわたるマクロな状態遷移を引き起こすことに成功し、そのメカニズムを調べた。この成果は予備的な成果であるが大変興味深い現象であり虫明の実施項目で述べられている。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。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。オプトジェネティックスの実験系にイメージングファイバーの開発を企業と連携して行いプロトタイプとなる試作品を評価している。



チャンネルロドプシンを発現した神経細胞への光刺激と神経応答を記録する実験系の概略図

虫明グループ

研究実施項目:前頭葉皮質の動的状態遷移の解明と多機能電極開発

前頭葉の内側補足運動野、前補足運動野は、運動制御に関わる領域として知られる。両手の順序制御において、その順序組み合わせの数が膨大になる問題が多自由度の符号化問題として知られるが、このような両手の順序課題において、個々の運動を解剖的な効果器、機能的な動作タイプでまとめることで、見かけの自由度を減らすことができる。実際に記録してみると、前補足運動やと運動野は、個々の動きいくつかの動作タイプに分けて符号化している事が見出された。課題での指示信号は個別の運動を色で指示し、最終的な運動も個別に行われるが、神経内情報表現として、解剖学的な次元と動作などの機能的次元に分解され、限られた変数の情報表現に変換された後に順序化されて、再び情報の統合が起こることがわかった。前補足運動野の前方には、課題の要求によって複数の行動戦術の選択が必要になると動的に課題関連細胞が出現したり、逆に戦術が一つになると消えたりする新たな領域が見出され今後の研究によりその機能的意義を解明することが期待される。またオブジェクト操作課題においても、細胞活動が、数の操作と手の動作を動的に情報表現していることが見出された。

八尾グループと共同で、前頭葉と海馬の振動刺激選択的な相転移機構を調べる目的で、マウス大脳皮質運動野 L5 錐体細胞に ChRGR を強制発現し、麻酔脳定位固定下に、緑色 LED 光(505 ± 15 nm)を用いて 0.1-100Hz にわたり連続的に周波数の変化する光振動(RSSL)を与えた。RSSL によるオプト・カレントクランプに応答して、5-10Hz の帯域に同期した活動電位が引き起こされた。また、運動野の局所フィールド電位(LFP)の 3-10 Hz の周波数成分が増大した。照射実験後に、ChRGR を発現していないニューロンにおいても、c-Fos の高発現が認められた。すなわち、緑色 LED 光で駆動された少数のニューロンの活動が再帰性ネットワークの創発的な活動レベルを亢進させたことが示唆された。ネットワークの観点からは、麻酔下の活動の少ない状態から活動の高い状態へ、状態遷移した(文献1)。

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

21 年度に引き続き、ChR1 の第6膜貫通ドメインと第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、チャネルロドプシン・グリーンレシーバー (ChRGR, ChR1- tg_2) の特性を HEK293 細胞発現系を用いて解析した。460 nm, 520nm それぞれの波長について、ChRGR は、ChR2 よりも大きな光電流を示した。520nm では、緑色光に対する感受性が高いとされる VChR1 よりも大きな光電流が得られた。また、脱感作から回復する時定数は、1.3 s となり、ChR2 の約 10 分の 1 だった。以上の性質から、ChRGR は、緑色光を用いて、神経細胞を高頻度で繰り返し刺激する目的に最適化されていることが裏付けられた。

研究実施項目: 海馬における状態遷移機構の解明

虫明グループと共同で、前頭葉と海馬の振動刺激選択的な相転移機構を調べる目的で、海馬およびマウス大脳皮質運動野でオプトカレントクランプに基づいた局所回路の相転移の現象を検討している。マウス運動野 L5 錐体細胞の結果は虫明グループの項目で述べた。さらに ChR を神経

系に発現した遺伝子組み換えラットで、麻酔下でオプトカレントクランプ法に基づいた周期的な刺激に伴う活動性の変化をしらべた。特定の周期刺激に感受性があることは海馬においても確認されたが、さらに海馬では大脳皮質と違い、刺激中に seizure 様の活動に変化し、さらに大脳皮質を巻き込む律動性の変化に発展することを見出した。現在刺激前後のこの転移現象の時期の海馬から、多点記録を行った。この相転移の機構を多細胞の協同的な現象としてとらえ、記録点の LFP のコヒーレンス、コーズリティーを解析している。さらに海馬回路内の周期応答性を解明すべく、海馬 CA3 錐体細胞のオプトカレントクランプ RSSL 周波数応答特性を解析した。放線層樹状突起において、2-20 Hz の高周波に対する応答性が顕著に高かった。このことから、フィードバック回路の周期的・同期的な入力伝播に適合した膜特性が示唆される。2011 年度以降の研究において、これを詳細に研究する目的で、多点並列光照射システムを開発した(出願番号 2010-265375)。

入小山内グループ

研究実施項目：大脳皮質－基底核ループの状態遷移機構の解明

GAD67-GFP マウス及び、GFAP-GFP マウスを用い、線条体 GABA ニューロンにおける自発 Ca^{2+} リズムの計測・解析、発生機構の同定のための薬理学実験、GABA ニューロン－グリア間相互作用の解析を行った。その結果、ニューロン、アストロサイトにおいて、持続時間が最大数百秒の自発 Ca^{2+} リズムが観測された。この自発 Ca^{2+} リズムは、細胞内カルシウムストアからの IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 放出であることが分かった。また、代謝型グルタミン酸受容体の 5 型 (mGluR5) を阻害することにより消失することから、mGluR5-PLC- IP_3 の経路が線条体における自発 Ca^{2+} リズムに関与していることが考えられる。また、ニューロン－ニューロン間、ニューロン－アストロサイト間で、自発 Ca^{2+} リズムに有意な相関ペアが検出された(文献4)。

研究実施項目：in vitro カルシウムイメージングによる、ニューロン活動のアンサンブル計測

大脳皮質スライス標本を用いて、カルシウムイメージング法による神経活動のアンサンブル計測を行った。その結果、皮質内信号伝播を可視化すると共に、カラム様信号伝播が物理的な神経回路構造によるものではなく、抑制性シナプス伝達により達成されていることを明らかにした(文献2)。また、基底核の一部である視床下核での信号伝播特性をカルシウムイメージング法により明らかにした(文献3)。

研究実施項目：生理学的な現象の背景になる神経機構のモデル化

大脳基底核線条体投射ニューロンの生理学的特徴を再現可能な膜モデルを作成し、モデル細胞を作成した。このモデル細胞を用いて、自発 Ca^{2+} リズムが GABA ニューロンの状態遷移にどのように関わっているのかの解明の手がかりとして、“ Ca^{2+} -clamp” シミュレーション実験を行ったところ、SK チャネルを介して、自発 Ca^{2+} リズムがニューロンの出力特性を変化させ得ることが分かった。

柳川グループ

研究実施項目：扁桃体局所回路の解明

扁桃体の GABA ニューロンのサブタイプの分類を行った。GABA ニューロンに Venus 蛍光タンパク質が発現している 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 パルブアルブミン (PV)、カルビンディン-D28K (CB)、カルレチニン (CR) が発現する細胞について検討した。その結果、(1) 扁桃体外側核と基底外側核では多数の GABA ニューロンでカルシウム結合タンパク質が発現があること、(2) CR 陽性細胞は、PV 陽性細胞、CB 陽性細胞とは異なるサブタイプに属することを明らかにした。次に、新たなカルシウム結合タンパク質、セクレタゴジンのマウス扁桃体での分布を調べた結果、中心核の GABA ニューロンの一部に発現していることを明らかにした(文献 7)。

扁桃体が関与する情動機能における GABA 神経伝達の役割を明らかにするために、パルブアルブミン特異的 GAD67 ノックアウトマウス(GAD67 flox/+; PV-Cre)を作出し、コントロールマウス(GAD67 flox/+)とともに行動実験を行なった。感覚運動フィルター機能を評価する音驚愕プレパルス抑制(PPI)では、ノックアウトマウスで PPI が有意に低下していた。一方、GAD67-GFP マウスを利用してストレス感受性と恐怖記憶の研究に貢献した(文献 8, 9)。

研究項目:機能プローブ発現システムの開発

テトラサイクリントランスアクチベーター (tTA)・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ネルロドプシン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、VGAT-tTA2(+Neo)マウスを繁殖させている。これから tetO プロモーターの下流にレポーター遺伝子が導入されているトランスジェニックマウスと交配することで、tTA システムが働くかどうか、検討する。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Wen L, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Matsuzaka Y, Mushiake H, Yawo H.: Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. PLoS ONE 5(9): e12893(2010). doi:10.1371/journal.pone.0012893
- 2) Yokose J, Ishizuka T, Yoshida T, Aoki J, Koyanagi Y, Yawo H: Lineage analysis of newly generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus. Neurosci Res 69(3): 223-233 (2011). doi:10.1016/j.neures.2010.11.010
- 3) Osanai M, Tanaka S, Takeno Y, Takimoto S, Yagi T: Spatiotemporal properties of the action potential propagation in the mouse visual cortical slice analyzed by calcium imaging. PLoS ONE 5(10): e13738 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0013738

- 4) 田村 篤史, 八木 哲也, 小山内 実: 視床下核電気刺激に対する神経応答のカルシウムイメージングによる計測. 電気学会論文誌 C 131: 42-49 (2011).
- 5) 田村 篤史, 山田 尚宏, 矢口 雄一, 森 一生, 小山内 実: 線条体における持続時間の長い自発カルシウム変動の細胞間相関. BPES 2010 第 25 回生体・生理工学シンポジウム論文集: 53-56 (2010).
- 6) H. Lütcke†, M. Murayama†, T. Hahn, D.J. Margolis, S. Astori, S.M.A. Borgloh, W. Göbel, Y. Yang, W. Tang, S. Kügler, R. Sprengel, T. Nagai, A. Miyawaki, M.E. Larkum, F. Helmchen and M.T. Hasan († equal contribution to this work): Optical recording of neuronal activity with a genetically encoded calcium indicator in anesthetized and freely moving mice. *Frontiers in Neural Circuits* 4: 9 (2010).
- 7) Mulder J, Spence L, Tortoriello G, DiNieri JA, Uhlén M, Shui B, Kotlikoff MI, Yanagawa Y, Aujard F, Hökfelt T, Hurd YL, Harkany T: Secretagoin is a Ca^{2+} -binding protein identifying prospective extended amygdala neurons in the developing mammalian telencephalon. *Eur J Neurosci.* 31: 2166-77 (2010).
- 8) Uchida T, Oki Y, Yanagawa Y, Fukuda A: A Heterozygous Deletion in the Glutamate Decarboxylase 67 Gene Enhances Maternal and Fetal Stress Vulnerability. *Neurosci Res.* 69: 276-282 (2011). doi:10.1016/j.neures.2010.12.010
- 9) Nagata-Kuroiwa R, Furutani N, Hara J, Hondo M, Ishii M, Abe T, Mieda M, Tsujino N, Motoike T, Yanagawa Y, Kuwaki T, Yamamoto M, Yanagisawa M, Sakurai T: Critical role of neuropeptides b/w receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. *PLoS One.* 6:e16972 (2011) . doi:10.1371/journal.pone.0016972

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)