

大木 研一

九州大学大学院医学研究院・教授

大脳皮質の機能的神経回路の構築原理の解明

§1. 研究実施の概要

大脳皮質は、外界から情報を受け取り、それを処理することによって、複雑な反応選択性を獲得しているが、実際にどのような神経回路によって、この情報処理がなされているかについては、依然として不明である。近年、イメージング技術の進歩(二光子励起法)により、生体から数千個の神経細胞の活動を同時に計測することが可能になった。他にも、神経回路を調べる技術が続々と開発されており、神経科学の研究は変革期を迎えつつある。本研究では、これら最新の手法を用いて、視覚野の神経回路が情報処理を行う上での基本構造とその発生のメカニズムを解明したい。大脳皮質には数百億の神経細胞が存在するが、その機能によって何十もの領野に分かれている。各領野も神経細胞の機能によって、さらに細かいモジュールに分割されている。それでは何が機能的な神経回路の最小単位なのだろうか？そのような最小単位の存在が解明できれば、大脳皮質は単位回路が並列に組み合わさったものとして理解されるだろう。また、単位回路の動作原理の解明を通して、神経回路の情報処理の原理を知ることができると期待される。

本年度は、研究実施体制の整備、必要な技術開発に重点を置いた。大木グループは、二光子顕微鏡による3次元機能イメージングの開発、CreER マウスの導入と、GFP/OGB 同時イメージングの系の開発、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法の導入を行った。田川グループは、皮質 2/3 層の興奮性神経細胞にスパースに遺伝子を発現する方法の開発、ChR2 発現細胞に光照射で発火を誘導できることの確認、発達期のマウスの頭部に青色 LED を埋め込んで光刺激する方法の開発を行った。

§ 2. 研究実施体制

(1)大木グループ

- ①. 研究分担グループ長:大木 研一(九州大学大学院医学研究院、教授)
- ②. 研究項目

二光子イメージングによる大脳皮質の機能的神経回路の解析

(2)田川グループ

- ① 研究分担グループ長:田川 義晃(京都大学大学院理学研究科、助教)

② 研究項目

光遺伝学による神経活動操作技術の確立

§3. 研究実施内容

研究目的

本研究では、単一細胞レベルの解像度をもつ独自の *in vivo* 二光子イメージング技術を用いて、機能的な大脳局所回路の解明を目指す。テーマ1では、深さ方向の機能画像を取得することによって、ミニコラムに対応する局所回路の機能的な基本単位を示すことを目指す。テーマ2では、単一の神経幹細胞の子孫が、お互いに特異的に結合して **subnetwork** を構成し、**subnetwork** に属する細胞は、同じ方位選択性を持つのではないかという仮説を、二光子カルシウムイメージングに分子遺伝学的な手法を組み合わせることで検証する。テーマ3では、方位選択性が生後発達段階での活動に依存して決定されるかどうか、特に、同期活動をした細胞間の結合がヘップ則に則って強化され、**subnetworks** を形成し、類似した反応選択性を持つに至るかどうか検証する。

方法・成果・達成状況

[大木グループ]

0. 二光子顕微鏡と2光子カルシウムイメージングのセットアップ

大木グループは今年度から研究室を始動させたので、まず二光子顕微鏡をセットアップし、マウスの視野から単一細胞レベルの方位選択性マップを取得する方法(Ohki et al., 2005)を再現し、質の高いデータが取得できることを確認した。また、学術研究員 3 人、大学院生 3 人、学部学生 2 人をグループに加え、すでに数名は 2 光子イメージングの技術を習得し、質の高いデータを取得することが可能になっている。

①3次元機能イメージングの開発

ミニコラムに対応する機能的構造を解明するためには、深さ方向の機能画像を取得する必要がある。そこで、2光子顕微鏡の対物レンズにピエゾ・ドライブを装着し、数 Hz で XZ 方向の画像を取得する深さ方向(XZ 方向)の2次元イメージングの系を立ち上げた。X 方向に 200 ミクロン、Z 方向に 100 ミクロン(ピクセルサイズは、0.8 ミクロン x 1 ミクロン)の画像を5Hz で取得し、視覚刺激を同期して提示することにより、この範囲にある細胞の視覚反応を調べることに成功した。各細胞の方位選択性を調べたところ、縦方向に類似した方位選択性をもった細胞のペアがいくつか見られたが、XZ 方向の1枚の画像に入ってくる細胞の数が少なく、結論を得るに至らなかった。

そのため、次に3次元の機能イメージングの系の開発に着手した。まず従来型のガルバノミラーのスキャナーを限界まで速く動かすことにより、XYZ 方向に 280 x 140 x 100 ミクロンの範囲を、ボクセルサイズ 2.2 x 2.2 x 5 ミクロンで、1 volume あたり 1.15 秒の速さで機能画像を取得し、視覚刺激を同期して提示することにより、視覚反応を取得することができた。

さらに、15.6 kHz で1ラインを取得するレゾナントスキャナーを X 軸のスキャンに用いるシステムを新たに構築し、XYZ 方向に 300 x 300 x 160 ミクロンの範囲を、ボクセルサイズ 0.59 x 0.59 x 5 ミクロンで、1 volume あたり 1.2 秒の速さで機能画像を取得できるようになった。

来年度は、この3次元機能イメージングを用いて、視覚野の3次元的な機能構築がどうなっているかを調べる予定である。また、現在のところの問題点としては、AOM (Acoustic Optic Modulator) を piezo に同期させてレーザーパワーを変化させるところが未解決であり、160 ミクロンよりも広い範囲を Z 方向に取得しようとする、深い所での明るさの減少が顕著で、十分なシグナルを得ることができない。AOM と piezo の同期を来年度には実現させ、さらに、piezo の稼働範囲は、現在 200 もしくは 250 ミクロンのものを使用しているが、これを 450 ミクロン稼働可能なものに付け変え、より Z 方向に広い範囲からデータを取得する予定である。

②CreER マウスの導入と、GFP/OGB 同時イメージング

少数の神経幹細胞の子孫だけを GFP でラベルするために、理研の細谷俊彦の研究室から CreER マウス (BLBP-CreER) を導入して、現在繁殖中である。レポーターラインとして、Z/EG マウス (loxP- β geo-stop-loxP-eGFP) を導入して、こちらも繁殖中である。これらをかけ合わせて、E11.5 の胎児の母体に、ごく少量の tamoxifen を注入すると、1個体あたり平均数個の神経幹細胞がラベルされると期待される。

このように eGFP でラベルされた細胞群からカルシウムイメージングを行うためには、eGFP と OGB (Oregon Green BAPTA-1 AM、カルシウム指示薬) のシグナルを分離する必要があるが、eGFP (480-570 nm) と OGB (495-610 nm) の蛍光のスペクトルは大部分重なっていて分離が困難である。これを励起波長と蛍光波長を使い分けることで、シグナルが区別できることを確認した。まず、800 nm で励起すると、OGB は非常に強く励起されるが、eGFP は弱くしか励起されない。次に 960 nm で励起すると、eGFP は強く励起されるが、OGB は弱くしか励起されない。これをさらに、454-496 nm のフィルターと 517-567 nm のフィルターで分離することにより、eGFP と OGB のシグナルを区別することができた。

来年度は、一つの神経幹細胞の子孫同士が、どのような結合様式を持つかを、スライスの電気生理で検証する。また、同じマウスに対して、カルシウム指示薬を GFP 陽性細胞および GFP 陰性細胞に導入し、それらの細胞の方位選択性を二光子カルシウムイメージングで調べ、GFP 陽性細胞が類似した方位選択性を持つかどうか検証する。

③子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法と LED 埋め込みによる光刺激のセットアップ

田川グループで開発された子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法と LED 埋め込みによる ChR2 光刺激手法を大木グループへ導入した。子宮内電気穿孔法により、視覚野に遺伝子導入が出来ることを確認し、さらに、Cre-loxP システムにより RFP を一部の細胞にスパースに発現できることを確認した。現在 ChR2-mCherry を遺伝子導入し、LED 埋め込みが安全にできることを確認し、ChR2 の光刺激の実験を始めたところである。

今年度は、ChR2 の埋め込み LED による光刺激が、視覚野の神経細胞を有効に発火させていることを細胞外記録により確認する。さらに、大脳皮質 2/3 層錐体細胞にスパースに ChR2 を発現させて、LED 光刺激によって ChR2 発現細胞に生後2週の時期に同期活動を誘導したマウスを用

いて、同期活動した細胞同士が、どのような結合様式を持つかを、スライスの電気生理で検証する。次に、二光子カルシウムイメージングを用いて、同期活動した細胞が、類似した方位選択性を持つかどうか検証する。

[田川グループ]

今年度は、光遺伝学の手法を用いて、発達期のマウス大脳皮質の神経活動を操作する技術の確立をめざした。光照射によって神経発火を誘導する分子ツール channelrhodopsin (ChR2) を遺伝子発現ベクターに組み込み、子宮内電気穿孔法によってマウス大脳皮質の 2/3 層興奮性神経細胞に発現させた。蛍光タンパク GFP を共発現させて ChR2 発現細胞の形態を可視化し、ChR2 発現が神経細胞の形態に影響を与えないことを確認した。

本研究では、皮質 2/3 層の興奮性神経細胞にスパースに遺伝子を発現させる必要がある。通常の子宮内電気穿孔法では多数の細胞に発現させることは可能であるが、少数の細胞に高発現させることが困難であった。そこで、Cre-loxP システムを利用することにより、発現細胞の数をまばらにする手技を確立した。この方法で Cre と loxP-stop-loxP-RFP を含むベクターを混ぜて遺伝子導入することにより、皮質 2/3 層興奮性細胞に RFP をまばらに高発現させることができた。

次に、ChR2 発現細胞に光照射で発火を誘導できることを確認する実験を行った。上記手法で皮質 2/3 層神経細胞に ChR2 を発現させたマウスを作製し、麻酔下で大脳皮質に細胞外記録電極を刺入して、脳表からの光照射(473nm レーザ光)に同期した発火が記録できることを確認した。さらに、より長期間安定して光刺激する技術の確立をめざして、マウスの脳に青色 LED を取り付ける手技を確立した。この手法により、哺乳期のマウスに少なくとも2日間、任意のパターンで光照射を行う実験系を確立した。今年度は大木グループと共同で、LED 光照射によっても皮質 2/3 層 ChR2 発現細胞に発火を誘導できることを確認する実験を進める。