

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. 研究実施体制

### (1) 岡本グループ

- ① 研究代表者: 岡本 仁 (独立行政法人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 主たる共同研究者: 深井 朋樹 (独立行政法人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
  - ・手綱核機能解析システムの開発
  - ・多細胞記録システムの改良
  - ・神経回路モデルの構築

### (3) McHugh グループ

- ① 主たる共同研究者: Thomas McHugh (独立行政法人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
  - ・自由行動マウス、ラットを使った手綱核機能の解明

## § 2. 研究実施内容

### 1) ゼブラフィッシュを用いた解析

#### 1: 手綱核・脚間核結合の可塑性の解析

平成23年度の研究で、背側手綱核外側亜核のテタヌス刺激の20秒後に、同亜核の1回刺激と、個体への電気ショックを同時に与えると、同亜核の神経終末と、脚間核神経細胞との間のシナプスの間で、著明な長期増強が起きることを発見した。テタヌス刺激と電気ショックの間の時間を変化させたところ、15秒の間隔では、増強を引き起こせるが、それより短い間隔では、引き起こせないことが明らかになった。

#### 2: 光遺伝学を利用した解析

平成23年度の研究で、生きたゼブラフィッシュの成魚の頭部に、光遺伝学用光ケーブルを装着することが可能になった。今年度は、光ケーブルにレーザーを繋げて、遊泳中のゼブラフィッシュ成魚に対して、光遺伝学的実験を適用できるような実験システムを、世界で初めて確立した。さらにこの技術を使って、背側手綱核外側亜核のみで **Channelrhodopsin** を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュに光ケーブルを装着し、背側手綱核外側亜核を強制的に興奮させたところ、光線の照射中は、逃避様行動が誘発され、光線照射を中断した後は、すくみ様行動が誘発されることが観察された。

#### 3: 腹側手綱核の機能解析

平成23年度の研究で、ほ乳類の外側手綱核に相当する腹側手綱核のみで、破傷風毒素を発現するトランスジェニック系統を作成することができた。ほ乳類では、この部位は、忌避的学習に関わっていると予想されている。我々は、この系統が、能動的回避学習の著明な障害を示すが、古典的恐怖学習の習得には障害がないことを発見した。また、生きた魚の腹側手綱核から電気生理学的計測を行うことによって、腹側手綱核の神経細胞は、個体が電気ショックを受けると、興奮することを発見した。さらに、腹側手綱核のみで **Channelrhodopsin** を発現し、正中縫線核のセロトニン神経細胞で、**GFP** 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、急性スライスを作成し、腹側手綱核から正中縫線核に入力する神経繊維の終末を、光線照射によって興奮させたところ、**GFP** 陽性のセロトニン神経細胞の興奮が誘発されることを発見した。更に、この系統に、光ケーブルを装着し、能動的回避学習における非条件刺激の代わりに光線照射を行ったところ、魚は条件刺激を回避するようになった。我々は、既に正常のゼブラフィッシュでは、能動的回避学習の成立24時間後に、終脳外套中心部に、条件刺激の提示によって俊敏な興奮性応答を示す神経細胞が出現することを発見している。腹側手綱核の興奮によって誘起されるセロトニン入力、終脳のこの部分の局所神経回路の顕著な再編を引き起こしたと考えられた。

#### 4: 手綱核や終脳神経細胞の活動の可視化

H23 年度の研究で、上記で開発された手綱核亜核特異的に Gal4-VP16 を発現する系統を用い、細胞内カルシウム濃度表示蛍光蛋白をこれらの亜核で発現するトランスジェニック系統を作成した。平成24年度では、終脳外套部の興奮性神経細胞、抑制性神経細胞、線条体神経細胞等でカルシウム濃度表示蛍光蛋白を発現できるトランスジェニック系統を作成した。これらを用いて、能動的回避学習の成後に、条件刺激の提示によって興奮する神経細胞群の、2光子レーザー顕微鏡による観察を開始した。

## 5: 手綱核の社会的行動との関わりの解析

1匹飼いをへた後の2匹の同じ大きさの雄のゼブラフィッシュを、同じ水槽に入れると、両者は、闘争し、お互いの勝者と敗者の関係が固定化される。さらに、敗者は、新たな雄と対戦させても、必ず負ける。また、勝者は、新たな相手と対戦させると、ほぼ必ず勝つ。即ち、これまでの対戦の成績が、自信の蓄積や喪失を引き起こし、それが次の対戦の勝敗に大きく影響することが知られている。平成23年度の研究で、背側手綱核外側亜核を不活化した系統同士を戦わせると、勝敗は決まるが、勝者が、次の勝負で必ずしも勝てないことを発見している。平成24年度は、闘争中のゼブラフィッシュが、1分ごとに相手を何回攻撃するかを解析し、正常同士の戦いでは、始めの1分でより多く相手を攻撃した魚が、闘争中に攻撃頻度を増加させ勝利に至ること、背側手綱核外側亜核を不活化した系統は、始めの1分で、相手よりも多く攻撃しても、その後の攻撃頻度の増加がみられないことを発見した。また正常の魚では、1回目の勝負での勝利が、2回目の勝負の最初の1分での攻撃頻度の増加を引き起こし、これが勝者が、勝ち続けられる原因であることを発見した。背側手綱核外側亜核を不活化した系統では、このような勝者の特徴がみられないことを発見した。これらから、背側手綱核外側亜核を不活化した系統は、闘争における過去の優位性を、今後の闘争における自信として蓄積する能力が欠如していると考えられた。

## 2)マウス、ラットを用いた解析

### 1: 外側手綱核の機能解析

深井チームは、岡本チームとの共同研究で、非空間的課題を学習したラット海馬の神経発火における時系列構造の存在を 23 年度に引き続き行った。手綱核神経細胞の発火によってトリガーされる海馬細胞の時系列発火パターンの解析と、集団発火データの主成分分析を中心に行ったところ、記録を行った 6 匹のラット中、1 匹でそのような時系列発火の例を多数検出した。しかし他のラットにおいては、統計的に有意な時系列の存在を検出することがなかった。この個体差が生じた理由は明らかではないが、記録時のノイズの影響で一匹のラットから平均して得られるニューロン数が少ないことが、時系列の検出を困難にしている可能性がある。そこで、スパイク分離の数学的方法をさらに改善し、テトロード電極による測定データからスパイクを分離し、多数のニューロンの活動を同時に検出できるようになった。更にこれまで、多細胞のスパイク列から、特徴的な発火パターンを検出するためのカーネル PCA 法を定式化したが、ラットの行動と多細胞神経活動の相関の検出には成功したものの、情報量の多い発火パターンを検出する時間スケールの切り出しには難点

が残っていたが、深井チームは、この問題を徹底的に分析し、ほぼ満足できる解を見出すことができた。これらの新しい方法によって、多細胞データからのスパイク分離を終えることができたので、今後、時系列の検出に再度取り組む予定である。それにより、手綱核によって、海馬神経回路に特定の記憶痕跡が活性化されるという仮説の検証を試みる。またそのような活動パターンとラットの行動や  $\Theta$  波の位相との関係、あるいは睡眠中のリプレイについても明らかにする。

McHugh チームは、自由行動状態でのマウスの外側手綱核の神経細胞の活動を、安定して計測できる手法を確立し、fast spiking と burst spiking の2種類の神経細胞を同定した。これら2種類の細胞いずれもが、罰に関連する場所に特異的に発火頻度を上昇させることを発見した。また、これらの細胞の一部が、海馬の  $\Theta$  振動と連動した興奮修飾を受けることを発見した。現在、これらの神経細胞の興奮と、海馬の場所細胞の興奮との関係、これらの神経細胞と  $\Theta$  振動との関係を更に解析中である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Aoki T, Kinoshita M, Aoki R., Agetsuma M, Aizawa H, Yamazaki M, Takahoko M, Amo R, Arata A, Higashijima S, Tsuboi T, Okamoto H (accepted) Imaging of Neural Ensemble for Retrieval of a Learned Behavioral Program, Neuron.
2. Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R, McHugh TJ, Fukai T, Isomura Y, Okamoto H (accepted) The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. J. Neurosci.
3. Aizawa H, Kobayashi M, Tanaka S, Fukai T, Okamoto H (2012) Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. J Comp Neurol 520(18) :4051-4066. (DOI:10.1002/cne.23167)
4. Okamoto H, Agetsuma M, Aizawa H. (2012) Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. Dev Neurobiol. 72(3):386-394. (DOI: 10.1002/dneu.20913)
5. Teramae J, Tsubo Y, Fukai T (2012) Optimal spike-based communication in excitable networks with strong-sparse and weak-dense links. Scientific Reports 2: 1-6. (DOI:10.1038/srep00485)
6. Kai T, Burkitt AN (2012) Spectral Analysis of Input Spike Trains by Spike-Timing-Dependent Plasticity. PLoS Comput Biol 8: e1002584 1-22. (DOI:10.1371/journal.pcbi.1002584)

7. Hiratani N, Teramae J, Fukai T (2013) Associative memory model with long-tail-distributed Hebbian synaptic connections. *Frontiers in Computational Neuroscience* 6: 1-15 (DOI:10.3389/fncom.2012.00102)
8. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T (2013) Passage-time coding with timing kernel inferred from irregular cortical spike sequences. *J. Statistical Mechanics: Theory and Experiment (JSTAT)*. P03004: 1-21 (DOI:10.1088/1742-5468/2013/03/P03004)