

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18372

研究課題名(和文) Neural basis of visual feature perception: investigation with optogenetically induced illusory perception

研究課題名(英文) Neural basis of visual feature perception: investigation with optogenetically induced illusory perception

研究代表者

坪田 匡史 (Tsubota, Tadashi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90739145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、マウスを用いて、特定の方位に選択性を持つ視覚野神経細胞群を人工的に活性化することにより、その機能を調べることにあった。まず、従来は長期間を要していたマウスに対する方位弁別課題の訓練を自動化することで、その訓練期間を大幅に短縮することに成功した。また、方位選択性を持つ神経細胞群を実際のマウス脳内で選択的に活性化する手法を開発したうえで、当該細胞群間の機能的結合の可塑的变化が予想外のルールに従っていることを示唆するエビデンスを見出した。以上の成果は、海外学術雑誌(Nature Communications誌)に論文掲載されるとともに、国際学会で発表(研究期間中計3回)された。

研究成果の概要(英文)：The primary purpose of this study was to examine functions of orientation-selective visual cortical neurons by activating them artificially in mice. We first established an automated method to train orientation discrimination tasks in mice. This automation dramatically shortened training period. We also developed a method to specifically activate orientation-selective neurons in vivo by combining digital micro-mirror device and optogenetic techniques. Using this method, we found that pairing of patterned optogenetic stimulation can reorganize functional connectivity among visual cortical neurons in vivo. More specifically, paired optogenetic stimulations of a single orientation-tuned neuron and surrounding neuronal populations can change orientation representation of surrounding populations in a manner dependent on functional preference of the single neuron. These results were published as an article in Nature Communications and also presented in international conferences three times.

研究分野：システム神経科学

キーワード：視覚 光遺伝学 方位弁別 神経可塑性

### 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質において主に視覚情報を司る領域である視覚野は、階層構造を形成している。先行研究から、視覚野の各領域において、視覚情報の中から特徴(方位など)を抽出するための情報処理が行われていることが知られている。これらの情報処理の担い手として、特定の特徵(特定の方位など)にのみ選択的な反応を示す神経細胞群が存在する。しかし、視覚野の各領域に存在するこれらの細胞群の活動が、どのようにして、あるいはどの程度、視覚情報中の特徴の認知に影響を与えているかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、上記の問題を解決するため、方位を弁別する課題を遂行中のマウスにおいて、特定の方位に選択性を持つ細胞群を人工的に活性化した場合の行動への影響を調べることが目的とする。

### 3. 研究の方法

まず、方位を弁別する課題の訓練を、マウスに対して行う。課題では、まず特定の方位を持つ縞模様をマウスに対して呈示する(図1)。マウスは、縞模様の傾きが時計回り(右傾)か反時計回り(左傾)かを弁別したうえで、手元のホイールを縞模様の傾きと反対方向に回転させることで応答する。正しい回答に対しては報酬が与えられるため、適切に訓練を繰り返すことで学習が成立する。

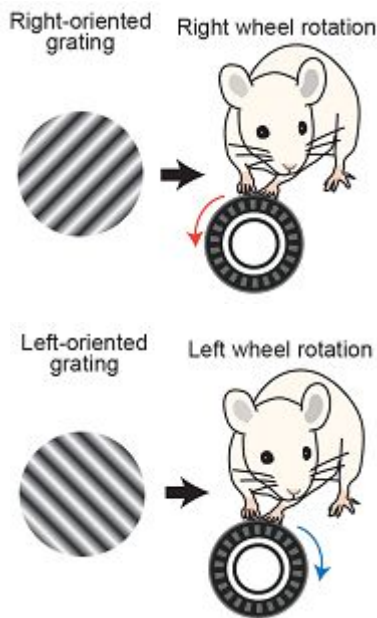


図1. 方位弁別課題。マウスは呈示された縞模様の傾きが時計回り(right-oriented)か反時計回り(left-oriented)かを弁別したうえで、ホイールを適切な方向に回す必要がある。

また、特定の方位に選択性を持つ神経細胞群を、in vivo で選択的に活性化するための手法については、以下の二つの手法を比較検討

したうえで、最適なものを用いることとする。

#### (1) チャンネルロドプシンの発現を遺伝学的に特定神経細胞に限定する手法

光活性型カチオンチャンネルであるチャンネルロドプシンを特定の神経細胞群に発現させたうえで光照射を行うことにより、発現細胞群の神経活動を人工的にコントロールすることが可能となる。特定の方位に選択性を持つ神経細胞群に発現を限定させるためには、神経細胞の活動に反応して遺伝子発現を誘導するタイプの遺伝子プロモーターを用いる必要があり、本研究では E-SARE プロモーター(Kawashima et al., 2013) を使用する。

#### (2) 光照射を特定の神経細胞群に限定する手法

この手法では、チャンネルロドプシンの発現は限定せず、視覚野神経細胞群に対して可能な限り一様に発現させたうえで、その中で特定の方位に対して選択的に反応する神経細胞を二光子イメージングにより同定したうえで、それらの神経細胞に対して選択的に光照射を行う。神経活動のイメージングには、遺伝学的に発現可能なカルシウムインディケータである GCaMP を使用する。また、チャンネルロドプシンとしては、活性化のための波長が GCaMP の励起波長とは離れている Chrimson (Klapeetke et al., 2014) を使用する。選択的光照射は、Digital micro-mirror device (DMD) を用いることで実現する。

### 4. 研究成果

従来はマウスに対する方位弁別課題の訓練に長期間(数か月)を要しており、また、訓練は実験者によりマニュアルで行われていたため、訓練のためには実験者が多大なエフォートを払う必要があった。そこで本研究ではまずマウスの行動訓練自動化のための実験装置の開発を進め、これにより訓練の自動化および訓練方法の最適化を行った。当該装置による訓練には実験者がその場にいる必要がないため、毎回の訓練条件を均一化できるとともに、訓練の大規模な並行化も可能となる。実際、当該装置を用いることで、訓練開始から  $26 \pm 7$  日(平均 $\pm$ 標準誤差、マウス 8 匹に基づくデータ)という短期間で課題の学習を成立させることに成功した。当該結果を含んだ研究成果については、海外学術雑誌(Nature Communications 誌)に論文として掲載された。

また、特定の方位に選択性を持つ神経細胞群を選択的に活性化するための手法に関しては、上記の二つを比較検討した結果、光照射を限定する手法を用いることとした(図2)。

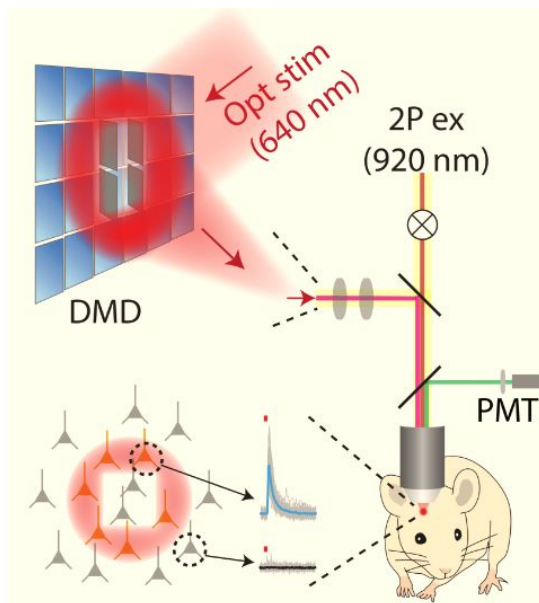


図2. 二光子イメージングと神経細胞の光活性化を同時に行う実験の概念図。二光子顕微鏡のシステムにDMDを組み込んで使用する。

チャンネルロドプシンを発現している神経細胞群に対して、DMDを用いて一定のパターンで光照射を行うことにより、実際にin vivoの視覚野において神経細胞群の活動をイメージングしながら、その中の特定の細胞群の選択的な活性化を行うことに成功した。

一方、この手法の開発過程において、特定方位に選択性を持つ単一神経細胞とその他の細胞群とを一定の時間間隔で繰り返し刺激する実験を行ったところ、それらの神経細胞群の間の機能的結合に予想外の可塑的变化が起こることを発見した。具体的には、単一神経細胞が選択性を示す方位とは直行する方位に選択性を持つ神経細胞群との間の機能的結合が選択的に強化されることを示す以下の実験的エビデンスを見出した。

- (1) 繰り返し刺激の後、直行する方位に選択性を持つ神経細胞群の割合の増加が認められた。
- (2) また、直行する方位を持つ視覚刺激に対する応答が、繰り返し刺激を受けた神経細胞群全体として上昇する傾向が認められた。

この結果は当初予想していなかったものであるが、本研究で新規手法を確立したことで得られた発展的な結果であって学術的に重要な意義を持つと考えられたため、現在学術雑誌に論文として投稿準備中であるとともに、北米神経科学学会等、複数の国際学会で発表を行った。今回見出された現象の背後には、視覚野神経回路におけるネットワークレベルでの可塑的变化のルールが存在すると考えられ、将来的にはそうしたルールの探求がニューラルネットワークモデルなどをを用いて発展していく可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Ryo Aoki, Tadashi Tsubota, Yuki Goya, Andrea Benucci. An automated platform for high-throughput mouse behavior and physiology with voluntary head-fixation. **Nature Communications** 8: 1196 (2017). DOI: 10.1038/s41467-017-01371-0. 査読有。

〔学会発表〕(計 3件)

1. Tadashi Tsubota, Emanuele Frandi, Andrea Benucci: “Plasticity for stimulus selectivity in the visual cortex of adult mice induced by patterned optogenetic stimulation”, Soc.for Neurosci. 47th annual meeting, Washington DC, USA, November (2017)
2. Tadashi Tsubota, Emanuele Frandi, Andrea Benucci: “Plasticity of functional representation in visual cortical neurons of adult mice induced by patterned optogenetic stimulation”, The Japan Neurosci. Soc. 40th meeting, Chiba, Japan, July (2017)
3. Tadashi Tsubota, Emanuele Frandi, Andrea Benucci: “Sculpting the dynamics of neuronal networks in the mouse cortex with optogenetic tools”, Soc.for Neurosci. 46th annual meeting, San Diego, CA, USA, (2016)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪田 匡史 (Tadashi Tsubota)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学  
総合研究センター・基礎科学特別研究員  
研究者番号：90739145

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし