

平成 31 年 4 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19462

研究課題名(和文) 多点同時記録と光操作の融合による単一神経細胞の入出力解析法の開発

研究課題名(英文) Development of large-scale recording methods to allow single-cell-level computational analysis and neuronal classification according to target structures in freely behaving animals

研究代表者

水関 健司 (Kenji, Mizuseki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80344448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大規模同時記録法を用いて100個程度の神経細胞の発火活動を同時記録し、記録した神経細胞の全ての組み合わせにつき相互相関解析を行うことによって、個々の神経細胞の発火活動に加えて、細胞間のシナプス結合を網羅的に同定する技術を開発した。

さらに、大規模同時記録法で100個程度の神経細胞の発火活動を一齐に計測しながら光遺伝学的手法を援用し、チャンネルロドプシンを発現させた神経細胞の軸索を投射先脳領域にて光で刺激することでアンチドロミックにスパイクが細胞体へ伝わることを指標にして、記録している神経細胞の投射先を同定する技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大規模同時記録法と相互相関解析を融合させ、自由に行動する動物の脳において、単一細胞の入出力演算を網羅的に検出する技術を開発した。さらに、大規模同時記録により多数の神経細胞の発火活動を一齐に計測しながら光操作を援用して、記録している神経細胞の出力先の脳領域を同定する技術を開発した。これらの開発した技術は脳領域・動物種を問わず適用可能であるため、本研究の成果は脳研究の様々な局面に幅広く応用され、単一細胞レベルの入出力演算を包括的に理解し、投射先特異的な情報処理機構を明らかにするための基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：By combining large-scale electrophysiological recording and cross-correlogram analysis, we developed a novel method to measure the activity of many individual neurons, and to construct a connectivity map of the recorded neurons in freely behaving animals, thereby enabling the analysis of input-output transformation in single neurons. Further, by combining large-scale electrophysiological recording and optogenetics, we developed a novel method to classify recorded neurons based on their target structures in freely behaving animals. As we developed the technology with the goal of widespread applicability, our methods will enable neuroscience researchers to comprehensively understand single-cell-level computation and the mechanisms underlying pathway-specific information processing in freely behaving animals regardless of brain areas and animal species involved, thereby providing valuable assistance in elucidating the principles of neural circuit operation in various behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：単一神経細胞 大規模記録法 光遺伝学 入出力演算 投射先特異的 海馬 海馬台 自由行動下

## 1. 研究開始当初の背景

単一の神経細胞は、他の神経細胞からシナプス入力を受けとり、それを発火活動として出力する。この個々の神経細胞の入出力演算が積み重なって、脳の多彩な機能が実現される。しかし、行動中の動物の脳における単一神経細胞レベルの入出力演算の知見は極めて乏しい。最大の理由は、個々の神経細胞の活動と細胞間のシナプス伝達を行動中に同時に測定し、単一細胞レベルで入出力を捉える技術が存在しないためであった。

さらに、単一細胞の情報処理の結果は、その細胞が投射している下流の脳領域へ伝達される。このような脳領域をまたいだ情報伝達は、領域同士が協調して機能を発揮するために欠かせない。しかし、細胞の発火活動のみを計測する従来の神経活動計測法では、記録している神経細胞がどこへ投射しているかは不明であり、ある脳領域からどのような情報がどの脳領域へ伝達されるのかという領域間の情報伝達を自由行動下ではまったく捉えられない状況であった。

## 2. 研究の目的

上記の「研究開始当初の背景」をふまえて、本研究は、大規模同時記録法と光操作技術を融合させることで、自由行動中の動物に適用可能な下記の2つの技術を開発することを目指した。

(1) 単一神経細胞の入力と出力を同時に測定する技術

(2) 神経細胞の投射先を同定して活動計測を行う技術

上記2つの技術は神経演算の全体像を解明するための相補的な技術である。すなわち、「単一神経細胞の入力と出力を同時に測定する技術」で、局所回路における細胞間シナプス結合を同定して単一細胞の情報演算メカニズムを明らかにする。「神経細胞の投射先を同定して活動計測を行う技術」で、局所回路で処理・生成された情報が他の脳領域へ分配されるメカニズムを明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 最大256チャンネルの多点電極シリコンプローブを用いて、自由に行動する動物から100個程度の神経細胞を同時記録できる技術を確立する。この技術を基盤として、シナプス前細胞からの入力がシナプス後細胞を発火させるという神経細胞の基本的な性質を利用して、相互相関解析を行うことで細胞間のシナプス結合の有無を網羅的に判定する。

(2) 大規模同時記録法に光遺伝学を組み合わせ、記録している多数の神経細胞を投射先によって分類する方法を開発する。具体的には、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてラットの海馬台の神経細胞にチャンネルロドプシン (ChR2) を発現させる。次に、最大256点の多点電極シリコンプローブを用いて、自由に行動する動物から100個程度の海馬台の神経細胞の活動を一齐に計測しながら、海馬台の主要な投射先に挿入した光ファイバーを使って脳領域特異的に青色光で刺激する。ChR2を発現している神経細胞の軸索で生じたスパイクが短い潜時と小さなジッターで逆行性に細胞体へ伝わることを指標にして、海馬台の神経細胞の投射先を同定する方法を確立する。

## 4. 研究成果

(1) 最大256チャンネルの多点電極シリコンプローブを用いて、自由に行動する動物から100個程度の神経細胞を同時記録できる技術を確立することができた。この技術を基盤として、シナプス前細胞からの入力がシナプス後細胞を発火させるという神経細胞の基本的な性質を利用して、細胞間のシナプス結合を検出した。具体的には、同時記録した神経細胞の全ての組み合わせにつき相互相関解析を行うことによって、細胞間のシナプス結合を網羅的に同定する系を立ち上げることができた。この実験系を、自由行動下で場所探索を行なっているラットの海馬CA3と海馬台に適用し、計測した活動データからオフラインでスパイクソーティングにより個々の神経細胞の発火タイミングを抽出し、データ解析を行った。まずは個々の神経細胞がどのよう

な情報（場所・頭方向・スピード・報酬・作業記憶など）を表現しているかを調べた。次に、相互相関解析を使って網羅的にシナプス結合を検出した。そして、個々の神経細胞が表現している情報と、神経細胞間のシナプス結合とを突き合わせることで、個々の細胞がどのような情報を入力として受け、それをどのような情報を表現する発火活動として出力するのかという、単一神経細胞の入出力演算を調べることが可能になった。

(2) 大規模計測と光遺伝学を組み合わせて、100 個程度の神経細胞の活動を計測しながらそれぞれの神経細胞の投射先を同定する実験系を構築した。具体的には、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてラットの海馬台の神経細胞にチャンネルロドプシン (ChR2) を発現させた。次に、最大 256 点の多点電極シリコンプローブを用いて、100 個程度の海馬台の神経細胞の活動を一斉に計測しながら、海馬台の主要な投射先に挿入した光ファイバーを使って脳領域特異的に青色光で刺激した。ChR2 を発現している神経細胞の軸索で生じたスパイクが短い潜時 (<15 ミリ秒) と小さなジター (<1 ミリ秒) で逆行性に細胞体へ伝わることを指標にして、海馬台の神経細胞の投射先を同定できた。この技術を使って、行動課題（空間探索課題や作業記憶課題など）時と睡眠中に 100 個程度の神経細胞の発火活動を一斉に計測し、神経細胞の投射先を同定した。計測した活動データから、オフラインでスパイクソーティングにより個々の神経細胞の発火タイミングを抽出し、データ解析を行った。神経細胞が持つ各種の情報（場所情報・頭方向情報・作業記憶情報など）を定量し、海馬台で観察される各種のオシレーション（シータ波・ガンマ波・リップル波など）に対する発火の相関、各種の行動状態（課題遂行時・安静時・レム睡眠時・ノンレム睡眠時）における発火パターンを精査した。その結果、海馬台の神経細胞は、投射先の脳領域によって異なる種類の情報を伝達し、異なる発火パターンで活動し、各種のオシレーションに対して異なる相関を示すことを示唆するデータを得た。この結果は、海馬台が投射先選択的に特有の情報を特有の活動様式を用いて伝達することを示唆する。

求愛、闘争、性行動、養育行動などの社会的行動や場所探索行動など、動きを伴う行動の神経基盤を明らかにするには、自由行動下で神経活動を記録する必要がある。さらに、頭位固定すると動物の睡眠パターンが正常とは異なることから、睡眠-覚醒サイクルの制御や睡眠中の情報処理の神経基盤を調べるためにも、自由行動下での神経活動記録は必須の技術である。本研究で開発した上記 2 つの技術は脳領域・動物種を問わず適用できる。そのため、脳研究の様々な局面に幅広く応用され、単一細胞レベルの入出力演算を包括的に理解し、投射先特異的な情報処理機構を明らかにするための基盤技術となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Watanabe, K., Nozaki, S., Goto, M., Kaneko, K.I., Hayashinaka, E., Irie, S., Nishiyama, A., Kasai, K., Fujii, K., Wada, Y., Mizuno, K., Mizuseki, K., Doi, H., Watanabe, Y. (2019). PET imaging of (11)C-labeled coenzyme Q10: Comparison of biodistribution between [(11)C]ubiquinol-10 and [(11)C]ubiquinone-10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 512, 611-615. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.073. 査読有り
- ② Giri, B., Miyawaki, H., Mizuseki, K., Cheng, S., Diba, K. (2019). Hippocampal reactivation extends for several hours following novel experience. *J. Neurosci.* 39, 866-875. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1950-18.2018. 査読有り
- ③ Kobayashi, R., Kurita, S., Kitano, K., Mizuseki, K., Richmond, B. J., Shinomoto, S. (2018). Reconstructing neuronal circuitry from parallel spike trains. *bioRxiv*, 334078. doi: <https://doi.org/10.1101/334078>. 査読無し

- ④ Matsumoto, N., Kitanishi, T., and Mizuseki, K. (2018). The subiculum: unique hippocampal hub and more. *Neurosci. Res.* [Epub ahead of print]. doi: 10.1016/j.neures.2018.08.002. 査読有り
- ⑤ Mizuseki, K., Miyawaki, H. (2017). Hippocampal information processing across sleep/wake cycles. *Neurosci. Res.* 118, 30-47. doi: 10.1016/j.neures.2017.04.018. 査読有り

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 岩瀬元貞、北西卓磨、水関健司、「Speed representation in the hippocampus and entorhinal cortex」、第 9 回アジア・オセアニア生理学会連合大会&第 96 回日本生理学会合同大会、神戸、2019 年 3 月 30 日
- ② 水関健司、「海馬・扁桃体・前頭前野による記憶と行動決定のメカニズム」、遺伝研研究会『遺伝要因と環境の相互作用による行動決定のメカニズム』、三島、2018 年 9 月 27 日
- ③ 北西卓磨、水関健司、「Large-scale extracellular recording to uncover the mechanism of generating spatial coding in the hippocampus」、新学術領域『生物移動情報学』国際シンポジウム、京都、2018 年 9 月 5 日
- ④ Kenji Mizuseki, 「Optogenetic identification of subicular projection targets during large-scale recording」, Joint symposium of 10<sup>th</sup> optogenetics research conference and second international symposium on brain information dynamics 2018、東京大学、2018 年 7 月 5 日
- ⑤ 岩瀬元貞、北西卓磨、水関健司、「海馬、嗅内皮質における速度表現」、第 41 回日本神経科学大会、神戸、2018 年 7 月 28 日
- ⑥ Kenji Mizuseki, 「Regulation of neuronal excitability by REM sleep」, Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, “Principles of memory dynamism elucidated from a diversity of learning systems” 2018 workshop and Meeting, Toyama, 2018 年 3 月 7 日
- ⑦ Kenji Mizuseki, 「Temporal coordination of neuronal activity in the entorhinal-hippocampal loop」, The 4th CiNet Conference - Functional and anatomical connectivity, Center for Information and Neural Networks (CiNet), Suita, 2018 年 2 月 28 日
- ⑧ 北西卓磨、馬場良子、水関健司、「Hippocampal information outflow via subiculum: in vivo recording and anatomical tracing.」、新学術領域『行動適応を担う脳神経回路の機能シフト機構』領域会議、東京、2017 年 12 月 18 日
- ⑨ 水関健司、「睡眠時における海馬の情報処理機構」、日本睡眠学会 シンポジウム『睡眠神経科学の最前線』、横浜、2017 年 6 月 29 日

〔図書〕（計 2 件）

- ① Mizuseki, K., and Miyawaki, H. (2019) Hippocampal information processing and homeostatic regulation during REM and non-REM Sleep, *Handbook of Sleep Research*, in press、総ページ 約 15 ページ
- ② 水関健司. (2018). 睡眠-覚醒のサイクルにおける海馬の情報処理機構、*ブレインサイエンス・レビュー* 2018 クバプロ ブレインサイエンス振興財団編集 pp. 327-358.

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

[その他]

ホームページ

大阪市立大学大学院医学研究科 神経生理学

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/physiology2/index.html>

アウトリーチ活動

- ① 水関健司、「記憶とナビゲーションの神経メカニズム」、高校生のための脳科学セミナー（大阪大学神経科学グループ、NPO 法人「脳の世紀推進会議」主催）、大阪大学大学院生命機能研究科、2018年8月20日
- ② 水関健司、「海馬の情報処理機構」、第3回杉本・阿倍野ライフサイエンス談話会、大阪市立大学、2017年7月5日

招待講演

- ① 水関健司、「海馬の神経回路における情報処理機構」、名古屋大学環境医学研究所セミナー、2018年4月13日
- ② 水関健司、「海馬の神経回路における情報処理機構」、大阪大学大学院生命機能研究科 生命機能研究科セミナー、2017年7月6日

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：松本 英之

ローマ字氏名：(Hideyuki Matsumoto)

研究協力者氏名：馬場 良子

ローマ字氏名：(Ryoko Umaba)

研究協力者氏名：荒巻 知子

ローマ字氏名：(Tomoko Aramaki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。