

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750382

研究課題名(和文) 視覚-運動変換をつかさどる上丘の細胞集団活動の解明

研究課題名(英文) Neuronal population activity of visuo-motor transformation in the superior colliculus

研究代表者

笠井 昌俊 (KASAI, Masatoshi)

生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力研究員

研究者番号：70625269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：中脳上丘の重要な生理機能と考えられている感覚(視覚)-運動(眼球運動)変換の神経機構をあきらかにするために、マウス上丘において2光子顕微鏡による *in vivo* Ca<sup>2+</sup> イメージングをおこない神経細胞集団の活動を計測した。上丘における側方抑制・周辺抑制による、興奮・抑制の効果が、上丘の層内でどのような広がりをもって作用するかについて明らかにした。また、覚醒下マウスを頭部固定をした状態で視覚刺激を提示し、従来よりも高頻度にサッカード様の眼球運動を誘発できる、動きを含んだ視覚刺激特性についても検討をした。

研究成果の概要(英文)：The superior colliculus (SC) is a brainstem center which plays essential roles in mediating the signal for sensory-motor translation. It has been hypothesized that horizontal excitatory and inhibitory interaction in the sSC is important for target selection, however; the way of neuronal implementation remained elusive, especially at the neuronal population level. In this study we applied *in vivo* two-photon Ca<sup>2+</sup> imaging and simultaneously recorded neuronal population activities evoked by visual stimuli. I examined excitatory and inhibitory interaction by presenting spatially separated visual stimuli and stimulus with different sizes. I found that Mexican hat-like lateral interaction is implemented as a neuronal population activity. I also recorded eye movements from head-fixed awake mice. To induce saccade-like eye movement frequently, I tested several kinds of visual stimuli which contains motional information.

研究分野：神経生物学

キーワード：上丘 マウス 2光子顕微鏡 *in vivo* イメージング 側方抑制 視覚 サッカード 眼球運動

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の上丘は、は虫類や鳥類など大脳皮質の未発達な動物では、視蓋と呼ばれる情報統合をになう重要な神経核に相当し、大脳皮質にかわる脳の中核として機能していると考えられている。上丘には顕著な層構造があり、層を介した感覚情報の統合から運動出力情報への変換がおこなわれる。

上丘では主として、視野空間の中のより目立った物体に素早く視線をむける眼球運動（サッカード）情報が生成される。サッカード情報に関わる上丘の局所神経回路については、*in vivo*での単一神経細胞活動の解析や、脳スライス標本でパッチクランプ法を用いた*in vitro*の実験により調べられてきた。

一方で実際の脳の回路は多数ニューロンからなり、回路を構成する多数が実際にどのように振る舞うかに関しては未知な部分が多い。

(2) 上丘の浅層は視神経を介して網膜から直接入力を受け、浅層内に視野空間マップが形成される。さらにこの視覚情報から抽出された視野内のオブジェクトの情報が、中間層・深層へと伝わり、そこでは実際に引き起こされるサッカードの方向と強さの情報をもったベクトルマップが細胞集団として表現される。このような細胞集団によって形成される空間情報やその機能を知るためには、それを表現する多数のニューロンの位置と神経活動を*in vivo*で同時に記録することが重要になってくる。これにより、回路機能と細胞構築の関係をより詳細に知ることができると考えられた。

## 2. 研究の目的

上丘の各層における神経情報変換の流れに着目して、各層を形成する細胞の集団としての振る舞いを網羅的に観察し、*in vivo*での局所回路（層内、層間）の情報処理機構を明らかにすることを目的とする。上丘では、視覚を中心とした様々な感覚情報が統合され、外界の目立つオブジェクトにたいしてサッカードや、首振り運動などの運動制御情報が作り出されていると考えられている。このような上丘における、層を介した神経情報変換を、細胞集団のレベルの活動パターンとしてとらえることで、脳の基本的な機能である「感覚-運動の情報変換」機構の基本原則の理解を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vivo* 2光子イメージング

2光子レーザー顕微鏡による*in vivo*  $Ca^{2+}$ イメージングをもちいて、マウスの上丘から、多数ニューロンの神経活動を同時に記録した。マウスの上丘表面を露出させるため、大脳皮質の尾内側部を吸引、切除する方法をもちいた。

$Ca^{2+}$ イメージング用の蛍光色素として、複数の $Ca^{2+}$ 感受性色素（Fura2-AM, Oregon Green BAPTA1-AM, CaTM2, Ca1520 など）を比較し、上丘でのイメージングに最適なものを検討した。ガラスピペットにより、これらの色素を上丘に空気圧で注入し細胞に負荷した後、イメージング用の観察窓を作成した。従来の手法では、アガロースゲルを注入してカバーガラスで押さえることで、イメージング用の観察窓を作成していたが、今回は、観察窓として光学用の小硝子片とカバーガラスをはりあわせたものを使用することで、対物レンズから観察部位表面までの透明度をあげる工夫を試みた。また、慢性実験のため、AAVベクターを用いた、GCaMP6を使った $Ca^{2+}$ イメージングについても検討をおこなった。

### (2) 視覚応答

サッカードの対象となる物体を選び出すため、視野空間の中でどのように情報処理がおこなわれているかを明らかにするため、側方抑制・周辺抑制という、空間情報における興奮と抑制の相互作用に着目した。視野角 $1^\circ$ の小さな丸い光刺激を空間的に離れた2点の場所に提示し、2点の間隔を変えることで（3, 6, 9, 12,  $15^\circ$ ）、細胞集団の活動がどのように変化するかを解析し、興奮抑制の影響が上丘内でどの程度の広がりをもって処理されるかを評価した。

サイズの異なる丸い光刺激（0.5, 1, 3, 5,  $10^\circ$ ）を提示し、周辺抑制が細胞集団の活動パターンとして実際の上丘内でどのように表現されているかを調べた。

### (3) 興奮・抑制性細胞における応答の違い

GABA作動性神経細胞特異的にGFPを発現する遺伝子改変マウスを使ってイメージングをおこなうことで、GFP陰性の細胞を興奮性細胞、GFP陽性の細胞を抑制性細胞と同定し、それぞれのタイプの神経細胞で周辺抑制の応答パターンに違いがあるのかどうかを検討した。実装されている神経回路を評価した。

上丘の抑制性細胞は、形態的な特徴によりさらに数種に分離されそれぞれ働きが違ふと考えられてきた。そこで、上丘浅層における側方抑制・周辺抑制にどのタイプの抑制性細胞が関与するかを、2光子顕微鏡下でターゲットドパッチクランプをおこない、細胞内染色することで、樹状突起の形状などの形態学的特徴を調べた。

#### (4) 覚醒下マウスにおけるサッカード様眼球運動の計測

上丘における眼球運動情報を解析するために、眼球運動中の上丘の神経活動を記録することを試みた。マウスの眼球運動は、USB3.0接続の小型カメラを利用した。眼球運動は、瞳孔の中心位置を計測するシステム (iRecHS2, 産総研松田博士により開発) を利用した。このシステムでは 500 Hz で瞳孔中心の XY 座標出力できるため、サッカードのような速い眼球運動でも計測することができた。

マウスは頭部固定下のまま、回転可能なディスクの上にのせることで、歩行・走行できる状態で、眼球運動を計測できるようにした。同時に、ディスクの回転角度から、マウスがどのくらい (距離、速度) 歩行運動をおこなったかについても記録した。

記録システムは、MATLAB によって、National Instruments 社製の DAQ を制御し、視覚刺激と2光子顕微鏡によるイメージングの同期、眼球運動と、マウスの歩行距離 (速度) 等が同時に記録できるシステムを作成し、GitHub に公開した。〔その他〕参照。

## 4. 研究成果

### (1) 上丘浅層における側方抑制

① カルシウム指示薬を上丘神経細胞に負荷し、約  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$  四方の視野内に存在する数 100 個の神経細胞から同時に視覚応答を記録した。Ca<sup>2+</sup> イメージングでは活動電位発生に伴う細胞内の Ca<sup>2+</sup> の濃度の上昇を記録するため、抑制性の応答を直接記録することができない。そこで、特定の場所に提示した視野角 1° の丸い光刺激に対する応答を基準として、異なる場所に同時に提示した同サイズの視覚刺激による影響を調べた (2点刺激)。2点の間隔をランダムに変化させて、視野上での距離 (視野角) と、イメージング部位内での上丘細胞集団位置を対応させ解析した。その結果、視覚刺激の間隔が

3° の場合では、基準となる1点刺激の場合よりも、2点刺激を提示した場合の方がより大きな活動が得られるのに対して、刺激間隔が 6° の場合は、1点刺激と2点刺激で、応答の差がなくなる。さらに、9-12° まで間隔を広げた場合は、2点刺激を提示した場合の方が、1点刺激の場合よりも神経活動が低下することが示された。

2光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングでは、低倍率の対物レンズを使用することで広範囲から多数の神経細胞を同時に記録できることから、上丘における応答する神経細胞の応答の中心を解析的に求めることができた。これにより、応答中心から各神経細胞の距離を基準として、上丘における2点応答の興奮・抑制の影響を調べた。応答中心から約 100  $\mu\text{m}$  に存在する場合は、応答が増強することを明らかにした。一方、応答中心から 200  $\mu\text{m}$  ほど離れた場所に位置する神経細胞では、抑制性の応答の影響を最も強く受けることが明らかになった。

② 視覚刺激のサイズを変えた場合、視覚刺激のサイズが 5° よりも大きい場合に明らかな周辺抑制効果が確認された。視覚刺激のサイズが 0.5° の場合と 10° の場合の応答を比較したところ、10° の場合には、上丘での応答中心から半径 70  $\mu\text{m}$  程度のニューロンの活動が減弱していることが明らかになった。

これまでの単一神経細胞記録による、マウスの上丘神経細胞の記録では、周辺抑制を起こすためには、もっと大きな視覚刺激を提示する必要があるとされてきた。本研究の結果ではより小さい刺激ですでに周辺抑制がおこることを示した。本研究で用いた手法では多数の神経細胞の応答を網羅的に見ることから、上丘における視野の場所の情報を従来の方法より正確な位置情報の解析ができることが、従来の結果との差の原因であると推察される。

③ 抑制性神経細胞特異的に GFP を発現する GAD67-GFP ノックインマウスを用いて、周辺抑制がおこる場合に、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞がそれぞれどのような視覚応答パターンを示すのかについて、②と同様の解析をおこなった。結果として、上丘浅層においては、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞

はどちらもよく似た周辺抑制効果が見られることが明らかになった。マウス大脳皮質視覚野においては一部タイプの抑制性ニューロンが周辺抑制の現れる領域で強く活動し、応答中心にある興奮性神経細胞の活動を押さえていることが示されてきたが、本研究から得られた結果によると、上丘浅層においては、数種の抑制性細胞においても同一の応答パターンを示すことから、周辺抑制をになう抑制性神経細胞は、応答中心から離れた場所に位置する抑制性細胞である可能性が高いことが示唆された。

#### (2) サッカード様眼球運動の計測

覚醒下マウスをもちいて、サッカードに関連した神経活動を上丘から記録するためのシステムを構築することができた。

麻酔下マウスでは当然自発的な眼球運動は見られない。また覚醒下においても頭部固定された状態で安静にしている場合は、サッカードの頻度が低いと考えられる。そこで視覚刺激を与えることと、頭部固定下においても歩行・走行ができるようにディスク状のトレッドミルを作成した。単に視覚刺激として光の点をポップアップさせても、ネコやサル、ヒトのように、マウスではその点に向かってサッカードする頻度は低い。より目立つ刺激として、様々な方向に様々な時間・空間周波数で動く格子状の刺激を試した。また刺激のサイズがだんだんと大きくなる（ルーミング）ような動きのある視覚刺激を提示した。このような刺激を提示すると、単なるポップアップよりもサッカード様の眼球運動を高頻度で観察できそうであることがわかってきた。また、歩行・走行運動と同時にサッカード様の眼球運動が記録されることもわかってきた。

本研究期間中では、運動可能な状態にした場合、イメージング中の観察面の動きがまだ大きく、神経活動を同時に記録を達成することはできなかった。今後、マウスを胴体部を保持する機構を追加することで、揺れを軽減できると考えている。これにより視覚刺激からサッカード発現にいたるあいだのマウス上丘の神経活動の詳細をさら詳細に調べることが可能であると考えられる。

#### 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 Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Sasaki T, Kasai M, Isa T, Kato G, Nabekura J, Mizukami H, Ozawa K, Kawasaki H, Yamamori Y.

In Vivo Two-Photon Imaging of Dendritic Spines in Marmoset Neocortex.

eNeuro, 査読あり, 2015 Sep 17;2(4)

doi: 10.1523/ENEURO.0019-15.2015

[学会発表] (計 11 件)

① 笠井昌俊, 伊佐正, 上丘浅層における側方抑制の空間ダイナミクス, 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22-24日, 「札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)」

② 笠井昌俊, 伊佐正, Spatial population dynamics of lateral interaction in superficial superior colliculus, 5th NIPS-CIN Joint Symposium, 2015年11月5-6日, 「生理学研究所 (愛知県・岡崎市)」

③ 笠井昌俊, 伊佐正, マウス上丘浅層における側方抑制機構の細胞集団の活動に基づいた空間的解析, 視覚科学フォーラム第19回研究会, 2015年8月19-20日, 「ホテル福島グリーンパレス (福島県・福島市)」

④ 笠井昌俊, 伊佐正, 上丘浅層細胞集団活動イメージングによる側方抑制のメカニズムの解明, 第38回日本神経科学大会, 2015年7月28-31日, 「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

⑤ 笠井昌俊, *in vivo* 2光子カルシウムイメージングによる上丘浅層の側方抑制機構の解析, 第1回「適応回路シフト」領域会議, 2015年6月28-29日, 「ホテルグランデンコ (福島県・耶麻郡)」

⑥ 笠井昌俊, 伊佐正, マウス上丘浅層における側方抑制の空間パターンの解析, 第5回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム, 2015年6月19日, 「生理学研究所 (愛知県・岡崎市)」

⑦ 笠井昌俊, 伊佐正, Two-photon imaging of lateral interaction in the superficial layer of the superior colliculus, NBNI 2014, 2014年12月

18-20 日, 「岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)」

なし

- ⑧ Masatoshi KASAI, Tadashi Isa, Two-photon imaging of lateral interaction in the superficial layer of the superior colliculus, Neuroscience 2014, 2014 年 11 月 15-19 日, 「Washington D.C. (USA)」
- ⑨ 笠井昌俊, 伊佐正, 2 光子カルシウムイメージングによる上丘浅層における側方抑制機構の解明, 第 61 回中部日本生理学会, 2014 年 11 月 7-8 日, 「名古屋市立大学 (愛知県・名古屋市)」
- ⑩ 笠井昌俊, 伊佐正, 2 光子顕微鏡による上丘浅層の側方抑制システムの解明, 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ⑪ 笠井昌俊, 伊佐正, 2 光子イメージングをもちいたマウス上丘の側方抑制を示す細胞集団の記録, バイオイメージング・インフォマティクスワークショップ 2014, 2014 年 6 月 9-10 日, 「岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)」

(3) 連携研究者  
なし

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

[https://github.com/kassailattice628/Rec\\_Ver11](https://github.com/kassailattice628/Rec_Ver11)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠井 昌俊 (KASAI, Masatoshi)  
生理学研究所・発達生理学研究系・  
特別協力研究員  
研究者番号: 70625269

### (2) 研究分担者