

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03540

研究課題名(和文) マウス一次視覚野ニューロンに方位選択性が生じる神経回路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neural circuits that generate orientation selectivity in the mouse primary visual cortex

研究代表者

根東 覚 (Kondo, Satoru)

東京大学・ニューロインテリジェンス国際研究機構・特任准教授

研究者番号：20301757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳の基本単位はニューロンで、その役割はシナプス入力を選択的に統合し出力を伝達することです。しかしながら、何千もの入力から出力を決めるメカニズムは未解明でした。本研究では、このメカニズムを明らかにするために、まずスパイン活動の正確な記録を行う新規方法を開発し、次に視覚刺激によって起こるスパイン活動をカルシウムセンサーにより記録しました。1個のニューロンから多数のスパイン反応を計測し、スパインの機能マップを作成することに成功しました。このマップを用いた解析から、細胞体活動と一致した反応を示すスパインが最も多く存在すること、またこれらが特定の樹状突起セグメントに集中していることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外界の視覚情報は眼の網膜で受容されたのち、大脳視覚野へ送られます。この時網膜では、視覚情報は一旦視覚特徴に分解され、大脳で抽出・再構築されることで外界が認識されます。視覚特徴の一つに線の傾きを表す方位選択性がありますが、物体の形状認識に重要な視覚機能と考えられています。本研究では、この方位選択性という視覚特徴抽出の仕組みを明らかにしたことで、私たちがどのようにして物体の形を認識しているかというプロセスの理解に近づくことが出来ました。

研究成果の概要(英文)：Understanding how neurons integrate thousands of synaptic inputs is critical to discern cortical information processing. Substantial evidences suggest the importance of spatial arrangement of synaptic inputs onto dendrites for neuronal computation. However, the principle of spatial arrangement and integration mechanisms of inputs remain largely unsolved. To this end, we firstly developed a new method to record individual spine responses in more accurate manner by using optogenetic method. Then, we recorded visually evoked ~1,000 spine responses from individual orientation or direction selective neurons and investigated the input-output relationship. We could successfully re-construct functional inputs map of all the recorded spines. From this map, we found the dominance in the number of orientation or direction-selective spines that matched with the somatic selectivity. Furthermore, these spines were distributed all over the dendrites but showed some clustering on a part of dendrites.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 大脳視覚野 2光子カルシウムイメージング シナプス統合 視覚情報処理 神経回路 マウス 生体イメージング

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳の基本単位はニューロンで、その役割はシナプス入力を選択的に統合し出力を伝達することにある。筋細胞の神経筋接合部のシナプスとは異なり、中神経細胞では1個のニューロンは数千ものシナプス入力を受け、また個別のシナプスが引き起こす脱分極は比較的弱い。つまり、1個のニューロンは複数のシナプス入力を統合することで活動電位を発生すると考えられている。しかしながら、1個のニューロンが多数の入力から出力を決めるメカニズムには未解明な点が多く残されている。

この疑問に対して、これまで樹状突起の形態と膜の電気的性質に着目した研究がなされてきた。例えばコンピューターシミュレーションや樹状突起に直接電極を刺入することで、シナプス電位が樹状突起を伝播する性質が検討されてきた。また細胞体と樹状突起の同時電気生理記録を行い、樹状突起の電極から注入した電流によって誘起される細胞体の電位変化を記録することで、樹状突起におけるシナプス電位の伝播が明らかになってきている。これらの研究から、樹状突起が能動的な特性を持ち、この性質が樹状突起の情報統合に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。また、細胞体がシナプス入力によって必ず活動電位を発生するのではなく、閾値下の膜電位変動を示すことも示されている。しかしながら、これらの電気生理学的方法では、個別のシナプス電位変化を記録することは不可能で、シナプス統合の解明にまで至っていない。

### 2. 研究の目的

シナプス統合のメカニズムを解く方法として、電気生理学的な記録に対し光学的に神経活動を観察する技術が進歩してきた。光学イメージング技術の進歩により、生きた動物の脳活動を時間的・空間的に高分解能で記録することが可能となってきている。特に2光子励起顕微鏡を用いたイメージングでは、生体脳から単一細胞(Kondo, Yoshida and Ohki, 2016)はもとより、より微細な構造である単一スパイン(Kondo, Kohsaka and Okabe, 2011)あるいは単一軸索終末(Kondo and Ohki, 2016)などの単一シナプスレベルのイメージングも可能である。このイメージング技術を用いることで、1個のニューロンから細胞体の反応と樹状突起に分布する多数のシナプス入力信号をそれぞれ記録し、シナプス入力から細胞体の出力がどのようにして形成されるのかを検討することが可能になりそのような試みが始まっている(Chen et al., 2013)。皮質ニューロンの樹状突起スパインは、興奮性シナプス入力の大部分が作られる場所である。1個のニューロンは何千ものシナプス入力を受けているが、入力がランダムに分布しているのかそれとも規則に従って分布しているのか詳しくはまだ分かっていない。これまでに報告されている実験的証拠から、ニューロンが行う計算には機能を共有する入力の空間的配置や時間的タイミングの重要性が指摘されている。それゆえ、樹状突起におけるシナプス入力の分布原理と統合原理を明らかにすることは、皮質ニューロンの情報処理を理解するために必須と考えられる。本研究では、2光子イメージング技術を用いて単一ニューロンから多数のシナプス入力を計測することで情報処理メカニズムを明らかにし、シナプス統合の解明を目指す。神経回路の個別の素子の演算様式を理解することは、神経回路全体の演算の理解に極めて重要な意義を持つと考えられる。

### 3. 研究の方法

シナプス統合のメカニズムを明らかにするために、ニューロンがもつ反応選択性という性質を利用する。この性質は、感覚野のニューロンに多く見られ、特定の感覚入力に対して選択的に反応する性質である。大脳一次視覚野のニューロンは、さまざまな視覚特徴に対してこのような反応選択性を示すが、方位選択性はそのうちの1つで、特定の線の傾きに反応する性質である。方位選択性は、物体の形の認識に重要な機能と考えられている。本研究では、ニューロンが方位選択的に反応するメカニズムをモデルとすることで、シナプス統合のメカニズムを明らかにする。実験はマウスを用いスパインを *in vivo* 2光子カルシウムイメージングで行う。スパインは興奮性ニューロンにおいて、主に興奮性シナプス入力が行われる場所である。スパインの2光子カルシウムイメージングは、本研究の問いを解くための現在最も有効な手段の1つと考えられるが、細胞体活動電位の逆伝播シグナルがスパインシグナルに干渉し解析を行う上で大きな問題となる(図1)。スパインイメージングを開始する前に、まずこの問題を解決する。この問題に対して光遺伝学を用いることで、記録するニューロンにおいて活動電位の逆伝播が起こらない実験系を構築することで解決する。次にこの実験条件下に、1個の細胞から多数のスパイン活動を計測し、方位選択性形成の神経回路を単一細胞レベルで明らかにすることで、シナプス統合のメカニズムの解明を目指す。

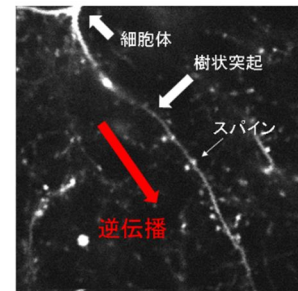


図1 スパインの2光子イメージングと細胞体活動電位の逆伝播

#### (1) 細胞体活動を抑制し、活動電位の逆伝播が起こらない実験系の構築

大脳細胞の活動を抑制する方法として、大脳を冷却するあるいは薬剤を還流する方法が従来から行われてきた。しかしながら、これらの方法には、脳への侵襲性や抑制の時間的・空間的制御が困難であるという問題があった。一方光遺伝学あるいは化学遺伝学により細胞活動を制御する方法を導入することで、これらの問題は解決されることが考えられる。本研究では、ステップファンクション型の光抑制性分子である SwiChR++ を利用した光遺伝学による方法を検討する(図2)。この光抑制性分子は 480nm 付近の可視光照射により光活性化され抑制性効果が駆動され、560nm 付近の可視光照射により光抑制効果が消失し復元する性質がある。この光抑制性分子の遺伝子を持つアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を作成し、大脳一次視覚野興奮性ニューロンに遺伝子導入し発現させる。細胞体活動鎮静化の確認のために、カルシウム感受性タンパク(GCaMP6s)を、同様に AAV を用いて発現させる。光抑制前後で、細胞体活動を2光子カルシウムイメージングし、鎮静化を確かめる。

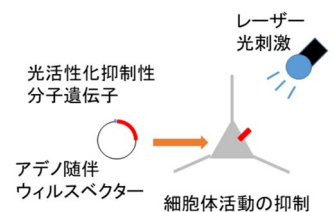


図2 光遺伝学により細胞体活動電位の発生を抑制し逆伝播をなくす

#### (2) スパイン活動を記録し、単一ニューロンのシナプス入力空間機能マップの作製

(1) で構築した細胞体活動電位を抑制する実験系を用いて、1個のニューロンに所属する多数の樹状突起からスパイン活動の網羅的なイメージングを行う。スパイン活動の計測には、カルシウム感受性タンパクである GCaMP6s を用いる。ニューロンへの GCaMP6s の発現には AAV を用いる。異なるニューロン由来の樹状突起の重なりを防ぐために、GCaMP6s を低密度に発現させる。低密度の発現には、cre-loxP システムを用いる。cre タンパクを発現させるための AAV を限界希釈し低力価とし、GCaMP6s を発現させるための AAV は高力価に感染さ

せる。この方法により、異なるニューロンの樹状突起が重なることなく、スパインを解像良く撮像できるようにする。マウス一次視覚野ニューロンに AAV 感染から約 2 週間後に、一次視覚野直上に観察窓を作成する。マウスは低濃度のイソフルレン麻酔下に 2 光子励起顕微鏡下に設置する。計測する脳とは対側の眼の前に視覚刺激提示用のモニターを設置する。

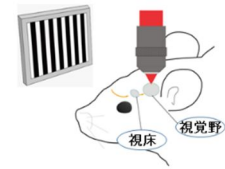


図3 スパイン活動の2光子カルシウムイメージング

方位選択性は、PsychoPy2 を用いて角度を変えながら一定方向に動く白黒縞模様の視覚刺激を提示し計測する。最初に細胞体の方位選択性を計測し、次に細胞体活動を光抑制しスパイン活動を計測する(図3)。スパイン活動の計測は、可能な限り多数の樹状突起から行う。2光子イメージングした細胞体及びスパイン活動は、MATLAB を用いて独自に作成した解析プログラムにより解析する。記録したニューロン樹状突起を再構築し、樹状突起上に計測したスパインを位置と反応選択性の情報を載せた単一ニューロンのシナプス入力空間機能マップを作成する(図4)。

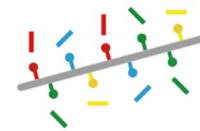


図4 スパイン活動の2光子カルシウムイメージング

### (3) 作成したシナプス入力空間機能マップを用いたシナプス統合メカニズムの解明

スパイン活動情報と細胞上での位置情報をパラメータとした、スパインの空間機能について解析を行う。細胞体の位置を(0,0,0)とした3次元空間座標を設定し、各スパインの座標を3次元座標で表す。また各スパインがどの樹状突起セグメントに帰属するかもパラメータとして決める。方位選択性毎のスパインの数、同一樹状突起セグメント内での機能集積程度、細胞体から各スパインの距離と機能の関係、スパイン活動から細胞体活動を説明できる数理モデルの検討など定量的な解析を行う(図4)。

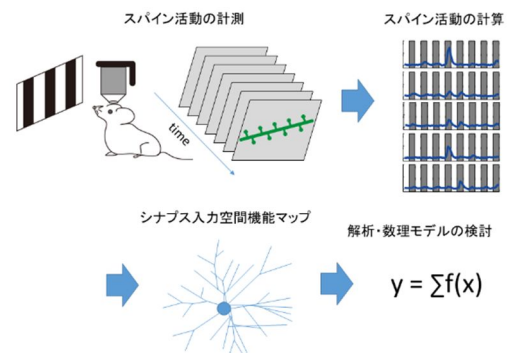
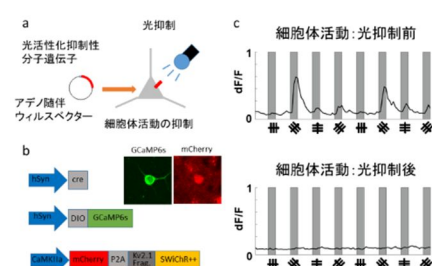


図4 シナプス統合解析の流れ

## 4. 研究成果

### (1) 細胞体活動を抑制し、活動電位の逆伝播が起こらない実験系の構築

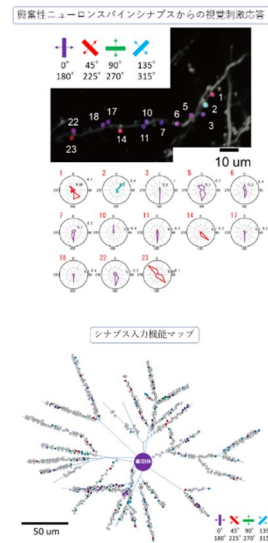
細胞体活動電位の発生を光遺伝学的に抑制し、活動電位の逆行性伝播が生じない条件下に、スパイン活動を記録する実験系を確立した。これにより、個別のスパイン活動を、樹状突起からのシグナルの混入なく、正確に測定することが出来るようになった(右図)。



### (2) スパイン活動を記録し、単一ニューロンでシナプス入力の空間機能マップの作製

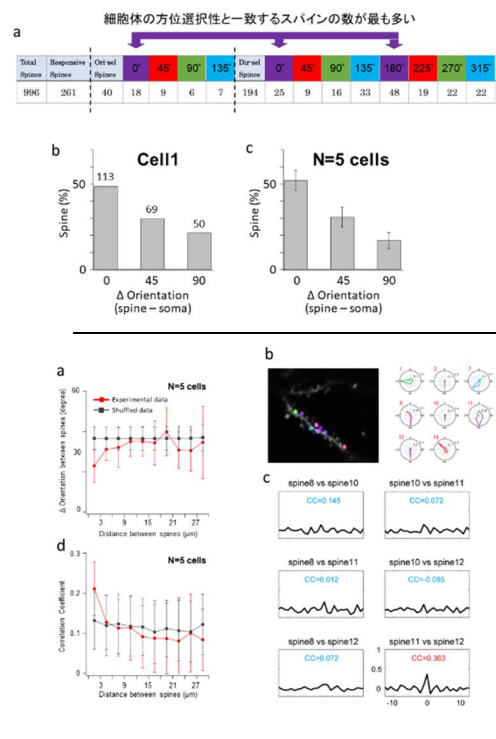


(1) で確立した実験系を用い、個別の大脳視覚野興奮性ニューロンから、スパイン活動の大規模イメージングを行った。まず大脳視覚野興奮性ニューロンに、カルシウムセンサータンパクと抑制性光遺伝学タンパクを低密度に発現させた。次に視覚刺激を提示し、細胞体の活動を記録したのち、細胞体活動を光抑制しスパインの活動を記録した。記録は2光子カルシウムイメージングにより行った。大脳視覚野1個の興奮性ニューロンは約2000個のスパインを持つが、大規模イメージングを行った結果、1個のニューロン当たり約1000個のスパインの活動を記録することに成功した(右上図)。また個別のスパイン反応をカルシウムシグナル変化から計算し、ニューロンの樹状突起上に各スパインの位置と反応を特定したシナプス入力機能マップを作製することにも成功した(右下図)。

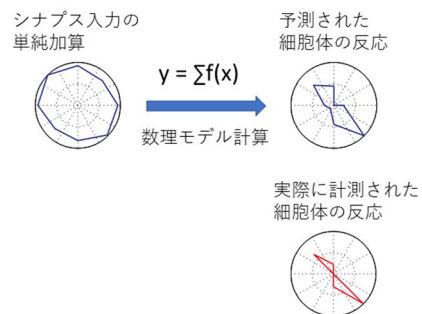


### (3) シナプス入力空間機能マップから、シナプス統合のメカニズムの解明

(2) で作成したシナプス入力空間機能マップをもとに、シナプス入力の機能分布を解析した。その結果、2つのことが明らかとなった。1つ目は、細胞体の反応と同じ反応を示すスパインが、最も多数存在した(右上段図)。2つ目は、同じ反応をするこれらのスパインが、特定の枝にクラスターを形成していることが分かった(右中図)。またこれらのクラスターを形成するスパインの活動のノイズ相関を計算すると時間同期していると考えられるスパインが見られた(右中段図)。また、数理モデルを立て、各スパインのカルシウムシグナル変化からシミュレーションを行った結果、ある一定以上の大きさのシグナル変化したスパインだけを選び、反応を加算すると、細胞体の活動のある程度予測できることが分かった(右下段図)。以上の結果から、細胞体の活動はスパイン入力の数とクラスターにより決まり、多数の樹状突起の枝の中でも特定の枝が細胞体活動の決定に強く関係している可能性が示唆された。また、カルシウムシグナル変化の比較的大きなスパインが、細胞体の活動に寄与している可能性も考えられた。



#### 数理モデル予測



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 根東 覚
2. 発表標題 マウス一次視覚野の方位選択性に関する神経回路の機能構築
3. 学会等名 生理学研究所研究会「大脳皮質回路の機能原理を探る」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根東 覚
2. 発表標題 マウス外側膝状体から一次視覚野へ方位選択性入力
3. 学会等名 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根東 覚、大木研一
2. 発表標題 マウス視覚野における光遺伝学による細胞体興奮の抑制
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根東 覚、大木研一
2. 発表標題 New method to prevent the visually-evoked somatic depolarization for spine imaging
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根東 覚、大木研一
2. 発表標題 光遺伝学により細胞体活動を抑制した条件下でのスパインの視覚応答記録
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清原 悠嵩、根東 覚、大木研一
2. 発表標題 マウス一次および高次視覚野に分布するLPN投射軸索の反応特性
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根東 覚、菊田浩平、大木研一
2. 発表標題 Functional organization of response-selective inputs on dendrites of mouse primary visual cortex neurons.
3. 学会等名 第8回神経局所回路国際会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根東 覚、菊田浩平、大木研一
2. 発表標題 マウス一次視覚野ニューロン樹状突起における反応選択性入力分布
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根東 覚、清原 悠嵩、大木研一
2. 発表標題 マウス一次視覚野に分布するLPN投射軸索の反応特性
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考