

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20800077
 研究課題名（和文）無麻酔個体動物を用いたイメージングによる視覚情報演算機構の解析
 研究課題名（英文）Analysis of information processing in visual cortex of awake rats with *in vivo* functional calcium imaging
 研究代表者
 木村 梨絵（Kimura Rie）
 独立行政法人理化学研究所・認知判断モデル連携ユニット・研究員
 研究者番号：60513455

研究成果の概要（和文）：

無麻酔・麻酔状態のラットの頭部を固定して、視覚刺激を提示したときの一次視覚野の神経活動を二光子励起機能的多ニューロンカルシウムイメージング法にて記録する実験系を確立した。抑制性神経細胞が蛍光をもつラットを用いることによって、抑制性・興奮性神経細胞を区別した。記録中は、皮質脳波や瞳孔位置、ラットの様子をモニターした。方位選択性、方向選択性、最大反応の大きさについて調べた結果、無麻酔・麻酔状態で異なる性質が確認された。

研究成果の概要（英文）：

I established a new experimental system to apply *in vivo* two-photon functional calcium imaging to adult rats in the unanesthetized/anesthetized, head-restrained condition. Using this system, I recorded responses in the visual cortex by visual stimulation. I used pigmented VGAT-Venus transgenic rats, in which GABAergic neurons express a fluorescent protein, and distinguished between inhibitory and excitatory neurons. During the recording, ECoG, the pupil of the eye, and behavior were monitored. I examined orientation selectivity, direction selectivity, and maximum responses, and revealed different properties between an unanesthetized and anesthetized condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：一次視覚野、カルシウムイメージング、二光子レーザー走査型顕微鏡、方位選択性、個体動物、無麻酔、脳の状態、入出力相関

1. 研究開始当初の背景

脳は、入力された情報を処理して出力する、情報演算システムである。多数の神経細胞が協調的にシステムとして作動することによって、幾多の特徴ある演算を実現している。こうした高次な非線形演算は、興奮性、抑制性のフィードバック・フィードフォワード型回路などの多彩な局所回路を基礎とし、これら局所回路が複雑に絡み合って多シナプスを経ることによって実現しているが、その作動原理についての知見は不十分である。これまでの多くの研究は、細胞個々の応答として個性ある要素から成る、細胞集団全体としてのマクロシステムを、要素を無視して一様化して扱ったり、あるいは、システムから切り離された要素を独立して扱ったりしていた。システムは一様でなく、その機能も要素の単純な線形和でない。したがって、一般に普及している実験手法を用いて検討を続けても、脳の情報演算システムの解明に迫るには限界があった。

そこで、研究代表者のこれまでの研究 (Kimura R et al. 2007, SfN abst. 319.14) では、脳システムとして情報処理を担う多シナプス回路をまとめて一つの巨大な演算子と捉え、その演算子への入力情報を人工的な電気刺激によって与え、機能的多ニューロンカルシウムイメージング法 (functional Multineuron Calcium Imaging, fMCI) を用いて、個性を保った状態で多数の神経細胞から出力の発火活動を一斉に捉える実験系を導入した。記憶獲得に重要な働きを担う海馬ネットワークがどのような情報演算を行うのかを、培養海馬組織切片を用いてまず検討し、次にその情報演算が、記憶・学習の素過程と考えられる可塑性を誘導することによって、どのように変化するのかを検討した。どのような演算が行われたのかという演算様式は、入力に対する出力の応答を比較することによって明らかにした。これにより、海馬ネットワークには多様な論理演算子が同時に存在していることが明らかとなり、並列分散型情報処理の様子が明示された。また、入力刺激依存的に、短期的および長期的に演算様式が変化することから、情報演算のスタイルの柔軟性が示された。個性ある要素と、複雑集合体であるシステムという異なる次元の実験データを系統立てて扱うための第一歩になったと考えられる。

しかしながら、上記の研究は、脳組織標本を用いた単純化した実験系での検討であり、様々な脳領域との相互作用がなされ、自然な稼動状態の生体脳で、どのような情報演算を行っているのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、脳組織標本を用いて単純化した実験系における情報演算機構を検討した、研究代表者のこれまでの研究を発展させ、脳が実際に生体中でどのような情報演算を行っているのかを解明することを目指すものである。生体脳から切り出した脳組織標本を用いた研究によって、情報演算の根幹となる基本原理の理解は深まったが、様々な脳領域からの入力を受け、自然な稼動状態の生体脳で、その基本原理がどのように生かされ、利用されているかが不明である。そこで、無麻酔のラット個体動物を用いて、入力-出力相関が観察しやすい一次視覚野 (V1) に焦点を当て、入力視覚刺激に対する出力発火応答を検討する。

3. 研究の方法

本研究は、まず、実験システムのセットアップを行った。麻酔状態に加えて、無麻酔状態においても、生後 6-11 週齢の adult ラットの頭部を固定した状態にて、視覚刺激を提示したときの神経活動を V1 野より二光子励起機能的多ニューロンカルシウムイメージング法にて記録する実験システムを確立した。記録中は、埋め込み電極から皮質脳波 (ECoG) を記録し、瞳孔位置、ラットの様子もモニターした。

また、GABA 作動性の抑制性神経細胞が蛍光タンパク質 Venus をもつ白色のラット (VGAT-Venus Wistar ラット) を、比較的視覚が発達した有色の Long-Evans ラットにて戻し交配することによって、有色で抑制性神経細胞が蛍光をもつラットを新たに作成した。このラットを本研究で用いることによって、抑制性神経細胞の区別を可能とした。また、カルシウム蛍光指示薬 fura-2 AM に加えて、アストロサイト特異的なマーカー Sulforhodamine101 で染色することによって、fura-2 AM 陽性細胞を、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞、アストロサイトの三種類に区別することを可能にした。

機能的多ニューロンカルシウムイメージング法によって、蛍光強度の変化として、多数の神経細胞から同時に発火活動を捉えることができる。また、単一細胞の空間解像度を持ち、発火している細胞、発火していない細胞の空間位置を直接的に捉えることができる。さらに、無麻酔状態の個体動物にこのイメージング法を適用することによって、注意などの意識が働く自然な状態での神経活動を記録でき、様々な脳領域から相互作用がなされる状態での神経活動を記録できる。

このように、より自然に近い状態で、生きた脳から、細胞個々の要素と、それらを包含する複雑集合体であるシステムという異なる次元の実験データを系統立てて扱うことが可能となった。

4. 研究成果

本研究では、まず、[3. 研究の方法]に記載したように、実験システムの立ち上げを行った。麻酔状態のみならず、無麻酔状態のラットの頭部を固定した状態で、ある方向に動く視覚刺激を提示したときの神経活動を、V1野のII/III層より二光子励起機能的多ニューロンカルシウムイメージングをすると同時に、埋め込み電極から皮質脳波 (ECoG)、瞳孔位置、ラットの様子をモニターした。これによって、様々な脳領域からの神経入力を受け、自然な稼働状態の生体脳において、外部から与えた視覚入力情報がどのように演算され、出力されるのかということを検討した。

まず、無麻酔状態のラットのV1野の神経細胞は、同じ視覚刺激を提示しても試行ごとに異なる応答を示すことが明らかとなった。そこで、この試行ごとの応答のばらつきが、脳波から想定され、主に覚醒度に基づく、“脳の状態”によって変化するかどうかを検討した。また、与える視覚刺激のコントラストを変えたときに、脳の状態依存的な試行間ばらつきが変化するかを検討した。この結果、試行ごとの興奮性神経細胞の応答のばらつきは、脳の状態によって変化し、さらに、コントラストを変えることによって影響を受ける傾向が観察された。以上から、生体脳においては、脳の状態依存的に入力情報の演算様式の多様性を変化させ、また、入力情報が多少変わるだけで、演算様式の多様性が変化するが、多様性の変化の方向性は、脳の状態依存的に異なるということが示唆された。

次に、視覚刺激を提示したときの、無麻酔状態、および麻酔状態のV1野の神経細胞の応答を、それぞれ平均化することによって、光反応性の各性質、方位選択性(orientation selectivity; OSI)、方向選択性(direction selectivity; DI)、最大応答の大きさについての検討を行った。この結果、無麻酔状態と麻酔状態で異なる性質が確認された。

まず、方位選択性については、麻酔状態では、既報と同様に、抑制性神経細胞に比べて、興奮性神経細胞は大きな値を示し、視覚刺激のコントラストによって影響を受けなかった。一方、無麻酔状態では、方位選択性のチューニングが、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞ともに、コントラストに依存して変化した。一般的傾向として、視覚刺激のコントラストが下がるにつれて、方位選択性のチューニングはシャープになった。次に、方向選択性については、無麻酔状態の興奮性神経細胞は、麻酔状態に比べて強い方向選択性を示した。最大応答の大きさについては、麻酔状態では、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞で違いがないが、一方、無麻酔状態では、抑制性神経細胞の応答の大きさが、興奮性神経細胞

に比べて、大きな値を示した。以上から、無麻酔状態と麻酔状態で、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞の光反応性は異なることがわかった。

本研究から、脳の状態と入力刺激に応じて、V1野の情報演算様式の多様性が変化し、さらに、試行間の平均応答も影響を受け、集団として異なる光反応性を示すことがわかった。また、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の光反応性も異なる性質があり、このような興奮性・抑制性神経細胞が協調して働くことによって、全体として視覚刺激に対する情報演算を、脳の状態と入力刺激に依存して行っていることが示唆された。

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 3件)

木村梨絵、池谷裕二
神経ネットワーク活動の可視化 (特集「生命システムの階層間をまたぐイメージング技術」)
雑誌『蛋白質 核酸 酵素』[共立出版] 54(15), 1952-1957, 2009 査読無

木村梨絵、池谷裕二
多ニューロン活動の可視化 (特集「学習と記憶-基礎と臨床」)
BRAIN and NERVE [医学書院] 60(7), 747-754, 2008 査読無

Kimura, R., Matsuki, N.
Protein Kinase CK2 Modulates Synaptic Plasticity by Modification of Synaptic NMDA Receptors in the Hippocampus.
Journal of Physiology (London) 586(13), 3195-3206, 2008 査読有

[学会発表] (計 3件)

木村梨絵、惣谷和広、蝦名鉄平、磯村宜和、柳川右千夫、加藤英之、津本忠治
二光子カルシウムイメージングによって明らかになった、覚醒ラット視覚野の抑制性と興奮性神経細胞の光反応性
第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学会大会 第20回日本神経回路学会大会 合同大会
2010年9月

木村梨絵、松木則夫、池谷裕二
海馬多シナプス回路における情報演算の短期的および長期的可塑性
第31回日本神経科学大会 P1-o13 東京 2008年7月

Kimura R, Matsuki N, and Ikegaya Y
Visualization of hippocampal polysynaptic
computation
NIPS-JST 国際ワークショップ P-5 岡崎
(愛知県) 2008年4月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 梨絵 (Kimura Rie)
独立行政法人理化学研究所・認知判断モデル
連携ユニット・研究員
研究者番号：60513455