

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22110006

研究課題名（和文）行動動物脳深部神経回路の可視化技術の開発と神経回路の生理・病理下での安定性の研究

研究課題名（英文）Development of deep brain imaging technology in behaving animals: stability and instability of neuronal circuit under physiological and pathophysiological conditions

研究代表者

林 康紀（Hayashi, Yasunori）

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90466037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 117,400,000円

研究成果の概要（和文）：海馬は陳述記憶形成に重要である。しかし記憶がどのように表現され、いつまで海馬で保持されているか、想起時に再現されているのか不明である。これは海馬の神経細胞を長期に観察する事ができないためである。我々は海馬の約1000個の細胞の活動を仮想現実空間内で二光子顕微鏡Ca<sup>2+</sup>イメージングを用い長期観察した。行動学習の後に約2%の細胞が一連の行動の特定の時点で発火することが明らかになり、それは観察後2週間以上安定していた。更に全体の約20%の細胞がその日毎に表現に加わった。この表現は行動パターンに非常に特有で、行動パターンを変化させると再構成された。また記憶想起が起こっている時に必ずしも発火していなかった。

研究成果の概要（英文）：Hippocampus is involved in the encoding an episodic experience into a physical trace in brain. However, how an episode is represented at cellular resolution, how long it lasts, and whether the same representation is reinstated upon recall are still not fully elucidated due to the lack of method to longitudinally observe representation. We performed two-photon microscopic Ca<sup>2+</sup>-imaging of ~1000 CA1 pyramidal neurons from mouse dorsal hippocampus during a familiar episodic event under virtual reality over two weeks. The hippocampal representation consists of a group of neurons firing sequentially during the event; ~2% of the cells fire at specific time point consistently while ~20% join the representation on each day and turn over in a few days. A change in the episode sequence largely eliminates both components, even the animal is behaviorally recalling the episode indicating the retrieval of a familiar episodic sequence can take place without a reinstatement of the same representation.

研究分野：総合領域

キーワード：海馬 記憶 神経細胞集合体 シナプス可塑性

研究成果の概要 (和文) : 海馬は陳述記憶形成に重要である。しかし記憶がどのように表現されているか、いつまで海馬で保持されているのか、想起時に再現されているのか不明である。これは海馬の神経細胞を長期に観察する事ができないためである。我々は海馬の約 1000 個の細胞の活動を仮想現実空間内で二光子顕微鏡  $Ca^{2+}$  イメージングを用いて長期観察した。行動学習ののちに、約 2% の細胞が一連の行動の特定の時点で発火することが明らかになり、それは観察後 2 週間以上安定していた。さらに全体の約 20% の細胞がその日毎に表現に加わった。この表現は行動パターンに非常に特異で、行動パターンを変化させると再構成された。また記憶想起が起こっている時に必ずしも発火していなかった。

研究成果の概要 (英文) : Hippocampus is involved in the encoding an episodic experience into a physical trace in brain. However, how an episode is represented at cellular resolution, how long it lasts, and whether the same representation is reinstated upon recall are still not fully elucidated due to the lack of method to longitudinally observe a representation. We performed two-photon microscopic  $Ca^{2+}$ -imaging of ~1000 CA1 pyramidal neurons from mouse dorsal hippocampus during a familiar episodic event under virtual reality over two weeks. The hippocampal representation consists of a group of neurons firing sequentially during the event; ~2% of the cells fire at a specific time point consistently while ~20% join the representation on each day and turn over in a few days. A change in the episode sequence largely eliminates both components, even the animal is behaviorally recalling the episode indicating the retrieval of a familiar episodic sequence can take place without a reinstatement of the same representation.

研究分野 : 神経科学一般

キーワード : 海馬、記憶、神経細胞集集体、シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景 : 海馬は陳述記憶の座として知られ、近時記憶を一旦蓄えた上で大脳皮質を含む各領域に長期記憶として振り分ける。一方で大脳皮質は記憶を長期的に保持すると考えられている。両者は解剖学的差異も明らかで、共に興奮性錐体細胞を基本とする皮質でありながら、大脳皮質は 6 層構造を持ち、明確な機能円柱をもって水平、垂直方向に結合する一方、海馬は 1 層のみで基本的に領域間の結合しかなく、垂直方向の結合はない。

さて、近年の二光子顕微鏡の発達に伴い個々のニューロンの活動、さらにはシナプスの安定性が覚醒動物で可視化できるようになった。大脳皮質シナプスは脳表に有るため

観察しやすく、構造が数ヶ月単位にわたり保たれる事が明らかにされ、記憶の長期保存に合致した構造安定性を持つ事が示されてきた。一方、海馬の構造がどの程度安定かまた可塑的かは全く判っていない。これは、海馬のニューロンを覚醒動物で直接観察する事が不可能であった為である。

## 2. 研究の目的 :

以上を鑑み、本研究では未開拓の領域である、覚醒動物での海馬神経細胞とシナプスの活動を可視化できる実験系を確立し、記憶学習における神経回路の変化を直接観察する事を試みる。

このために、我々がこれまで培ってきた二光子顕微鏡によるイメージング、ニューロンへの遺伝子導入技術に加え、近年開発が進みつつある microlens を用いる。まず細胞体におけるカルシウム反応を指標にする事で、大脳皮質で見られる様な安定な機能単位が存在するかを検出する。さらに、シナプス形態と活動を検出し、その安定性と可塑性を大脳皮質と比較する。その上で他研究グループと共同で、種々疾患モデルに於ける神経活動の安定性と可塑性を検出していく事で、動的な側面からニューラルサーキットパソロジーの概念を確立する事を試みる。

## 3. 研究の方法 :

### 空間記憶課題を行うマウスの海馬神経回路活動のイメージング

二光子レーザー顕微鏡でイメージングした海馬神経回路活動の画像データを解析するための手法の開発と、バーチャルリアリティ環境下で空間上の特定の場所を記憶する際の海馬場所細胞活動を観察するための新規仮想空間記憶課題を開発し、空間課題を遂行するマウスの海馬神経回路活動イメージングと、得られたデータの解析を行ってきた。

現在用いている空間記憶課題では、マウスは 1 次元の直線路を 1 方向にのみ走行するタスクを行う。走行路の周囲には、distal cue を、また特定の場所を reward area として設定し、目印として近傍の壁と床の模様を変えておく。Reward area は 3 ヶ所異なったものを設定した。



図1 走行路の様子。当初は Reward 1 で報酬を与え、学習が進んだのち、Reward 2 で与える。

マウスは走行路の一端から歩き出し、reward area で報酬をもらう。トレーニング時には 1 カ所のみで報酬を与え、残りでは与えない。走行路の反対端に到着すると、自動的に開始端に teleport される。これを繰り返す事で学習を促す。最初は reward area を通過したときに直ちに報酬が与えられるが、この非遅

延課題で10回程度の訓練した後、reward areaで一定時間（通常1-2秒）停止したときのみ3回の報酬が得られる遅延課題に切り替える。遅延課題である程度学習が成立した後は、reward areaの場所を変更し新たなreward areaの学習を促す。

我々がこれまでに作製した蛍光カルシウムセンサータンパク質G-CaMP7を海馬CA1錐体細胞に発現するトランスジェニックマウスをこのタスクの訓練に用い、二光子顕微鏡下空間記憶を形成する過程の海馬神経回路活動のイメージングを行った。得られた画像データから、開発した自動解析ソフトウェアで個々の細胞の活動を抽出し、それらのパターンの解析を行った。

#### 4. 研究成果：

トレーニング開始後、数週間で動物は課題を学習し、reward areaで静止し、報酬をもらうようになる。その段階からの海馬CA1錐体細胞の活動画像を解析した。その結果、次のような3種類の細胞活動が観察された。

1. 場所細胞 これまで報告されている場所細胞と性質がほぼ一致し、走行路上の特定の場所で発火した。
2. 報酬細胞 マウスがreward areaに入り、報酬を待ち、それから走り出すまでの間、発火する細胞。
3. 終点細胞 マウスが走行路の終点に着き、新しい試行を待つまでに発火している細胞。

特に、報酬細胞に関する解析を行った。報酬細胞はすべての細胞のうち、約10-20%（観察される領域に約1000個の細胞があるうちの約100-200個）を占め、reward areaに滞在している時間（約10秒）の初めに反応する細胞から最後に反応する細胞まで様々な発火パターンを示した。

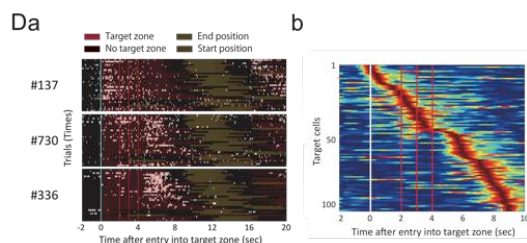


図2 報酬細胞の例。遅延課題型の空間記憶課題でreward areaに滞在するマウスの海馬からイメージングされた時間依存的な細胞活動。(Da) 時間依存的活動を示した細胞の活動。マウスがreward areaに入ってからすぐに活動する細胞137、5秒ほど経ってから発火する細胞730、336を例として示す。(b) 観察された約100個の報酬細胞を、発火タイミングの順に並べたもの。

特に報酬細胞が同期発火を示すかを検討するため、発火パターンの相互相関関係を検討した。図3A、Bに示す3つの細胞は、それぞれ

別の細胞であるが、非常によく似た発火パターンを示す。このような細胞集団の関係を俯瞰するため発火パターンの類似性を元に樹形図を作成した。その結果、発火場所と頻度から報酬細胞と分類された細胞同士がクラスターを形成していることが観察された（図3C）。

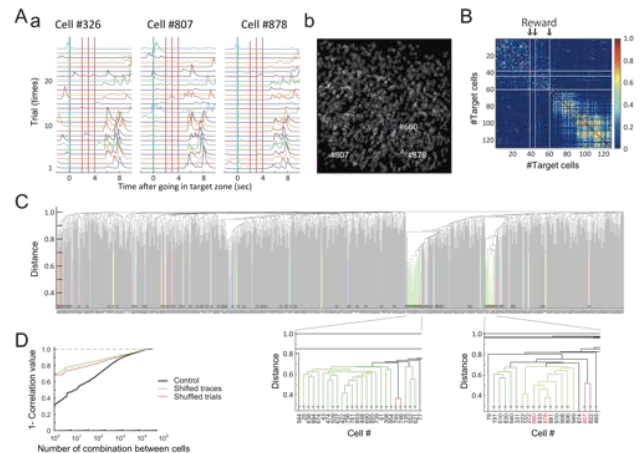


図3 同期発火する細胞の検出

次に異なった日で、これらの細胞がどのような活動を示すか観察した。その結果、それぞれの細胞はかなり異なった反応をすることが分かった。ある日報酬細胞として分類されても、次の日は必ずしも報酬細胞としては分類されず、場所細胞、終点細胞としての性質を持つものもあった。また、報酬細胞として分類されても、必ずしも同じ時点で発火するとは限らなかった。

しかしながら、より詳細に解析したところ、およそ2%の細胞が、安定して同じ場所で発火することを見出した。これらの細胞は、reward areaが他に移動しても発火していたため、報酬を記憶していると考えられた。つまり、海馬内で報酬は、2つの細胞、安定して常に報酬を認識する細胞と、その日にオンラインで表現されていると考えられた。

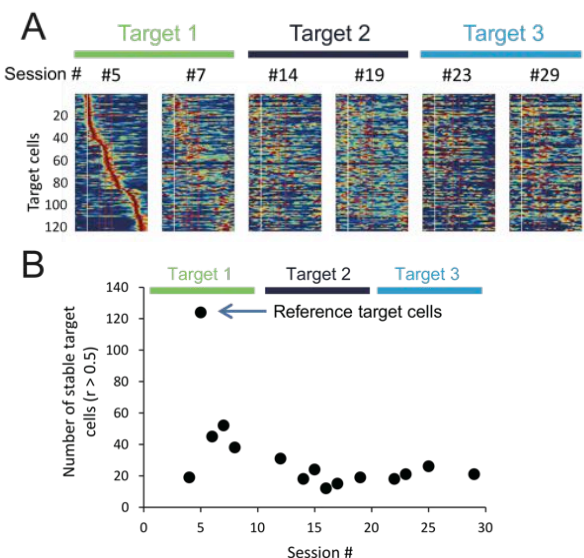


図4 報酬細胞の安定性。A 上段は第5セッションで報酬細胞とされた細胞が、次の日以降reward areaで発火し



ているかを検討した。B A の定量結果。

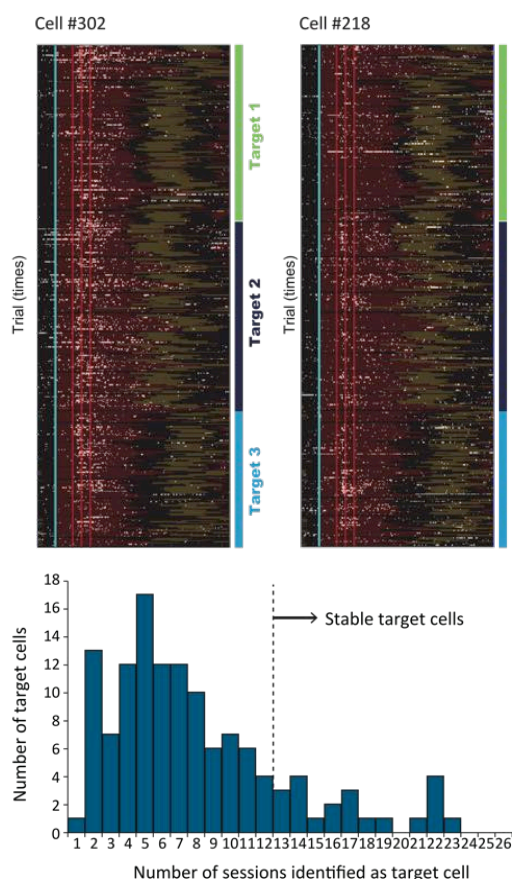


図5 安定して発火する報酬細胞。多くの報酬細胞は数セッションで変化していくが、一部の報酬細胞は非常に安定である。

#### 4、結論と考察

改良した空間記憶課題の結果からは、マウスは3か所の手がかりの中から、報酬の得られる1か所のみを認識して学習することができるが示された。マウスはバーチャルリアリティ環境下でも、異なる手がかりと報酬の結びつきを学習できることが明らかになった。場所細胞地図のイメージングでは、異なる場所に対して反応する細胞が、海馬神経回路内ではランダムに存在していることが示された。時間に依存した海馬神経活動では、海馬は空間情報だけではなく、動物の行動に関わる時間の経過もコードしている可能性が考えられた。海馬の時間情報表現は、海馬研究者の間で最近注目を集めているトピックであり、今後はより体系的な解析で、その生理的な意義を明らかにするような研究へと発展させたい。

#### 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 14 件)

① Matsuno H, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M,

Yano-Umeda S, Saneyoshi T, Takeda M, Hayashi Y. A Naturally occurring null variant of the NMDA type glutamate receptor NR3B subunit is a risk factor of schizophrenia. *PLoS One*. 査読有、2015 10(3):e0116319.

doi: 10.1371/journal.pone.0116319.

② Hosokawa T, Mitsushima D, Kaneko R, Hayashi Y. Stoichiometry and phosphoisoforms of hippocampal AMPA-type glutamate receptor phosphorylation. *Neuron*. 査読有、2015 85(1):60-7.

doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.026.

③ Kim K, Hayashi Y. CaMKII: the Swiss army knife of synaptic plasticity. *J Physiol*. 査読有、2014 592(Pt 22):4807-8.

doi: 10.1113/jphysiol.2014.284414.

④ Martinez-Lozada Z, Waggener CT, Kim K, Zou S, Knapp PE, Hayashi Y, Ortega A, Fuss B. Activation of sodium-dependent glutamate transporters regulates the morphological aspects of oligodendrocyte maturation via signaling through calcium/calmodulin-dependent kinase II $\beta$ 's actin-binding/-stabilizing domain. *Glia*. 査読有、2014 Sep;62(9):1543-58.

doi: 10.1002/glia.22699.

⑤ Saneyoshi T, Hayashi Y. Synapse reorganization-a new partnership revealed. *EMBO J*. 査読有、2014 Jun 17;33(12):1292-4. doi: 10.1002/embj.201488619.

⑥ Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. 査読有、2014 Apr 16;82(2):444-59. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.021.

⑦ Ueda Y, Kwok S, Hayashi Y. Application of FRET probes in the analysis of neuronal plasticity. *Front Neural Circuits*. 査読有、2013 7:163.

doi: 10.3389/fncir.2013.00163.

⑧ Ueda Y, Hayashi Y. PIP<sub>3</sub> regulates spine formation in dendritic spines during structural long-term potentiation. *J Neurosci*. 査読有、2013 Jul 3;33(27):11040-7

doi: 10.1523/JNEUROSCI.3122-12.2013.

⑨ Sakaguchi M, Hayashi Y. Catching the engram: strategies to examine the memory trace. *Mol Brain*. 査読有、2012 Sep 21;5:32. doi: 10.1186/1756-6606-5-32.

⑩ Saneyoshi T, Hayashi Y. The Ca<sup>2+</sup> and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 査読有、2012 Aug;69(8):545-54.

doi: 10.1002/cm.21037.

⑪ Hayashi Y, Okamoto K, Bosch M, Futai K. Roles of neuronal activity-induced gene products in Hebbian and homeostatic synaptic plasticity, tagging, and capture. *Adv Exp Med Biol*. 査読有、2012;970:335-54.

doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8\_15.

⑫ Bosch M, Hayashi Y. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*. 査読有、2012 Jun;22(3):383-8.

doi: 10.1016/j.conb.2011.09.002.

⑬ Wang DO, Matsuno H, Ikeda S, Nakamura A, Yanagisawa H, Hayashi Y, Okamoto A. A quick and simple FISH protocol with hybridization-sensitive fluorescent linear oligodeoxynucleotide probes. *RNA*. 査読有、2012

Jan;18(1):166-75.

doi: 10.1261/rna.028431.111.

⑭ Mower AF, Kwok S, Yu H, Majewska AK, Okamoto K, Hayashi Y, Sur M. Experience-dependent regulation of CaMKII activity within single visual cortex synapses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、2011 Dec 27;108(52):21241-6.

doi: 10.1073/pnas.1108261109.

[学会発表] (計 18 件)

① Hayashi Y. Conversion mechanism of temporal Ca<sup>2+</sup> code into persistent biochemical code during LTP. 第 92 回日本生理学会, 2015.03.22, Kobe, Japan

② Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine during LTP. 第 18 回 アイセムス国際シンポジウム・第 15 回 国際細胞膜研究フォーラム, 2015.03.04, Kyoto Japan

③ Hayashi Y. Roles of cytoskeleton in hippocampal synaptic plasticity. RIKEN BSI-WIS Brain Sciences Meeting, 2015.01.21, Tel Aviv, Israel

④ Hayashi Y. Molecular mechanisms of hippocampal synaptic plasticity. 2014 Inter-Academy Seoul Science Forum, 2014.11.12, Seoul, Korea

⑤ Hayashi Y. Visualization of neuronal assembly in hippocampal CA1 during spatial memory task. 記憶回路研究会「個体内の記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解」講演, 2014.10.09, Okazaki, Japan

⑥ Hayashi Y. Role of cytoskeleton in hippocampal synaptic plasticity. Cold Spring Harbor Laboratory Neuronal Circuits 2014, 2014.04.03, NY, USA

⑦ Hayashi Y. Visualization of hippocampal neuronal assembly during locomotion in virtual environment. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014" 2014.03.16, Tokyo, Japan

⑧ Hayashi Y. Visualization of hippocampal neuronal assembly during memory task on a virtual reality platform. 2nd DYCE-ASIA Workshop/ISSP International Workshop on "Life Science and Photonics", 2013.12.17, Chiba, Japan

⑨ Hayashi Y. Quantitative view of AMPA receptor phosphorylation. The 8th International Conference of Neurons and Brain Diseases, 2013 July, Singapore

⑩ Hayashi Y. 記憶の分子メカニズム、第 4 回札幌神経科学研究会、2013.05.22, Sapporo, Japan

⑪ Hayashi Y. CaMKII $\beta$  is a gating mechanism of activity-induced structural modification of hippocampal dendritic spines. 24th Biennial Meeting of the International and the American Society for Neurochemistry, 2013 April, Cancun, Mexico

⑫ Hayashi Y. CaMKII serve as a gate of activity-induced structural and functional modification of hippocampal dendritic spines. 第 90 回日本生理学会大会, 2013. April Tokyo, Japan

⑬ Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of single dendritic spines during long-term potentiation. Cold Spring Harbor Asia Conferences Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders, 2012.11.06, Suzhou, China

⑭ Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal synaptic plasticity. 3rd LIN Symposium, Translating synaptic activity into neuronal plasticity, 2012.08.27, Tangermünde, Germany

⑮ Hayashi Y. CaMKII serve as a gate of structural splansticity of dendritic spines. The 7th International Conference for Neurons and Brain Disease (Association for the Study of Neurons and Diseases), 2012.06.27, Montreal, Canada

⑯ Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal learning and memory. 2012 International Brain Research Symposium, 2012.05.03, Daegu, Korea

⑰ Hayashi Y. Phosphoisotype analysis of AMPA receptor GluR1. Gordon Research Conference Excitatory Synapses & Brain Function, 2011.06.29, Aston, USA

⑱ Hayashi Y. Temporal progression of the

structural and molecular remodeling of dendritic spines after LTP induction. Neuronal Communication Beyond the Synaptic Cleft - International conference and workshop, 2011.02.08, Niigata, Japan

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

林 康紀 (HAYASHI, Yasunori) 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー 研究者番号：90466037

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者

佐藤 正晃 (SATO, Masaaki) 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員 研究者番号：90518325

上田 善文 (UEDA, Yoshibumi) 独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・協力研究員 研究者番号：60391877