

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18341

研究課題名(和文) 光学的アプローチによる視覚情報を介した認知機能の解明

研究課題名(英文) Optical approach to investigate brain mechanisms underlying cognition and visual system

研究代表者

揚妻 正和 (Agetsuma, Masakazu)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特任准教授

研究者番号：30425607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに、実験の基礎となる光学技術(二光子神経活動イメージングと同時に、光遺伝学的にPV陽性細胞の活動を抑制するシステム)の改善を進めた。これらを用いて、まずは麻酔下における反応を観察し、視覚情報処理とその時のPV陽性細胞の役割について検証を進めた。これらの成果は論文として発表した(Agetsuma et al., 2017)。また、課題遂行中のマウスにおいて実験を進めるために、擬似的な自由行動下のマウスでの観察装置を作成し、データ取得を進めた。今後は学習前後のマウスから得られた行動・神経活動データを解析し、学習・認知機能に関わる情報処理様式の解明を進め、論文に発表していく。

研究成果の概要(英文)：We have modified the optical system that enables neural activity imaging and simultaneous optogenetics so that we can perform more stable long-term observation and manipulation of neural activity than the previous method. Using this system, we first investigated the computational mechanism underlying visual information processing and the role of PV neurons under the anesthesia. These results were published (Agetsuma et al., 2017). We also developed a new system by which we can perform training and behavioral tests of mice under the objective lens, which enables imaging and optogenetics before, during, and after the learning/training. We performed actual experiments using this system. We will proceed the analysis of the data to understand the computational mechanism underlying cognition, learning and memory, and publish the results.

研究分野：システム神経生理学

キーワード：二光子イメージング population coding 光遺伝学 パルプアルブミン陽性細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、脳での情報処理により、外界の情報を収集し、認知機能を通じて行動として表現する。脳の最小構成単位「神経細胞」は、複雑に結合することで「神経回路」を形成し、多数の神経細胞が協調的に働くことで情報処理を遂行している。局所ごとの神経回路はさらに複雑に組み合わせたり、解剖学的・機能的に分類される領野や神経核（大脳皮質各領野、海馬、基底核、視床など）が形成され、これらが統合的に機能することで、初めて知覚、随意運動、思考、記憶などの「脳機能」が成立する。

脳が処理する情報の中でも「視覚情報」は、我々ヒトを含む多くの動物がそれに依存した生活を行っており、その情報処理機能は重要である。視覚情報は、目の網膜によって受容され、視床を通して大脳皮質の視覚野へと運ばれる。一次視覚野に受容された情報は、さらに様々な部位へと振り分けられたり、再統合されたりしながら処理され、最終的に認知・行動へとつながる。

これまでに大脳皮質視覚野の機能や解剖に関しては、様々なモデル動物を通じて広く調べられている。特に電気生理学的な技術の発展に伴って理解が深まり、多くの興味深い提案がなされてきた。

視覚野の入り口である一次視覚野も、認知機能に重要であることが示唆されている。例えば、同じ視覚情報の入力に対しても、「注意」を払う必要のあるような課題遂行時には、一次視覚野の神経反応性が上昇することが知られている（Chen et al., *Nature Neuro.*, 2008）。加えて「spike count correlation / noise correlation」と呼ばれる神経ネットワーク全体としてのゆらぎや同期性を示す指標も、注意と関連して複雑に変動することが示されており、情報処理の観点から新たな提案がなされてきている（Herrero et al., *Neuron.*, 2013; Ruff and Cohen, *Nature Neuro.*, 2014）。さらには、最新のOptogenetics（光遺伝学）技術によって抑制性神経の活動を一過的に活性化する実験が行われ、一次視覚野内におけるパルブアルブミン（PV）陽性の抑制性介在神経が、認知依存型課題において重要であることが示されており（Lee et al., *Nature.*, 2012）認知機能を担う情報処理メカニズムという観点では最も進んだ研究分野の一つであると考えられる。

これら背景を受け、我々はこれまで一次視覚野での神経細胞集団としての情報処理メカニズムに着目し、抑制性神経の役割、特にPV陽性細胞の役割について研究を進めてきた。光遺伝学によってサブタイプ特異的に抑制性神経の活動を操作しながら、神経ネットワークの活動を観察することで、その役割を調べることが可能となる。ただし、従来の電

気生理学的な技術では、一度に観察できる細胞数に限界がある。一方で、大脳皮質における神経ネットワークでは、神経細胞が集団として非常に精密に制御される必要があり、その仕組みを調べる上で重要な神経「群」としての挙動を観察する上で、それらの技術のみでは困難である。

そこで申請者たちは、遺伝子コード型のセンサーによる二光子神経活動イメージングを導入し、光遺伝学と同時に進行手法を確立した。この技術により、「多数の細胞からの活動記録」と「ミリ秒単位の分解能による特異的な神経活動制御」を同時に行うことが可能となり、神経回路での情報処理、そして認知や行動などとの因果関係をより直接的に検証することが可能となった。

先述の通り、PV陽性細胞は、視覚情報を利用した意思決定のメカニズムなどに深く関わっており（Lee et al., *Nature.*, 2012）、注意や意思決定などによるネットワーク制御にも関連することが示唆される。さらに興味深いことに、この同期性の制御は、神経細胞の空間的な配置や、神経細胞ごとの方位選択性の合致度などに応じて異なる役割を持つことが示唆され、神経回路でのバランスをとるような役割を持つことが示唆された（Agetsuma et al., 研究開始当初は投稿準備中であった）。過去に報告されたような課題遂行中での様々なネットワーク同期性の変化にも、このPV陽性細胞が大きな役割を担っている可能性が十分考えられ、注意や意思決定のメカニズムとの深い関わりが示唆される。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、このような注意や意思決定、記憶などの認知機能において、大脳皮質神経回路でどのように情報処理が行われているのかについて着目し、PV陽性細胞の役割の検証なども介しながら、そのメカニズムについて解析を進めていく。課題遂行中のマウスを用いて、上述のような新たな光学的アプローチにより、ネットワーク情報処理、特に注意や記憶に伴った処理形態とその変化、そしてそこでのPV陽性細胞の役割を調べることを目的とする。

## 3. 研究の方法

二光子神経活動イメージングは、単一細胞レベルの解像度を保ちながら、同時に非常に多くの神経細胞からの活動を計測することを可能とする技術である。したがって、神経回路における細胞集団としての情報処理メカニズムを理解する上で非常に有用な技術である。一方、PV陽性細胞はネットワークにおける情報処理に関与することが示唆されるため、その活動を光遺伝学的に操作し、その変化が行動・意思決定に対して持つ意義を詳細に調べていくことで、結果としてどの

ような情報処理形態が重要なのかを知ることができると考えられる。特にこれまでの研究では、すべて同時に行われることがほとんどなく、それぞれの因果関係に関しては推測の域をでないことが多かった。申請者らが開発した技術を組み合わせることで、より直接的に情報処理から行動に至るまでのメカニズムを明らかにしていく。

神経活動イメージングにおいて用いる2光子レーザー顕微鏡には、すでに導入されているオリンパス社の多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FVMPE-RS を利用する。レゾナントスキャナにより 60Hz の速度で広視野観察が可能であり、特に情報処理に関する研究においては大きな利点がある。一細胞レベルの空間分解能を確保しながらも出来るだけ多くの細胞から観察を可能とするために、低倍率・高 NA のレンズ (XLPLN25XWMP など) を用い、広い視野を確保する。また、神経活動を同定するためのセンサーとしては、現在広く用いられる遺伝子コード型のカルシウムセンサーを利用し、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて発現を行う。

これらに PV 陽性細胞の操作を加え、注意や意思決定のメカニズムに関する役割を調べる。神経活動操作のためには、AAV を利用して ArchT を発現させ、光依存的な活動抑制を行う。PV 陽性細胞特異的な発現のために、Cre-lox システムを利用する。

さらに、申請者が視覚情報をもとにした恐怖記憶に関する研究をこれまで進めてきた経験を生かし (Agetsuma et al. Nature Neuro., 2010 ; Aoki et al., Neuron, 2013; Amo et al., Neuron, 2014 )、様々な課題を合わせて進めていく。

嫌悪刺激を用いた学習課題に関しては、パプロフ型の恐怖条件付けを用いる。ある特定の視覚刺激を提示し、その数秒後に、感覚刺激と同時、あるいは少し遅らせて嫌悪刺激である微弱な電気ショックを体の一部 (後肢など) に与えることで、マウスは特定の感覚刺激から嫌悪刺激が与えられるかどうかを予測できるようになる。なお、一般にこれらの条件付けの進度を測る際には、すくみ行動 (その場に凍りつくように動かなくなる) を指標とするが、二光子イメージング状況下での計測という点では工夫が必要である。これまでの覚醒状態のマウスにおける二光子イメージングでは、トラックボールが用いられてきたが、比較的不安定な足場となるため、その上ではすくみ行動の評価が困難な可能性が考えられる。そのため、トラックボールの代わりとなるような安定性の高い足場を準備し、実験を進める (代案として、条件付けは顕微鏡下ではなく通常の装置の中で行い成立後に神経活動観察のみを行う方法、あるいは瞬目反射条件付けによる実験系も検討したが、こちらの手法がうまくいったため

採用することにした)。

これらを通じて大脳視覚野における情報処理のメカニズム理解に向けて研究を進めていく。

#### 4. 研究成果

本申請課題では、視覚情報を用いた課題遂行中のマウスを用いて実験を進める計画で開始した。それに先立ち、実験の基礎となる光学技術 (二光子神経活動イメージングと同時に、光遺伝学的に PV 陽性細胞の活動を抑制するシステム) の改善を後述の通り進めた。またこれらの技術を用いて、まずは麻酔下において視覚刺激を受動的に提示した場合における反応を観察し、視覚情報処理とその時の PV 陽性細胞の役割について検証を進めた。

その結果、PV 陽性細胞が時空間的に神経ネットワークの同期性を制御していることがわかった。さらに、神経細胞集団による情報処理についても関与していることがわかった。興味深いことに、この情報処理の制御は、上記の同期性制御を介して行われていることが示された。したがってこれらの観察により、大脳皮質視覚野の神経細胞が集団としてどのようなメカニズムを介して視覚情報を処理するかについて示すことができた。

これらの成果は、論文として発表することができた (Agetsuma et al., Cerebral Cortex, 2017)。

その上で、課題遂行中のマウスにおいて実験を進めるために、擬似的な自由行動下のマウスでの観察装置を作成した。そして、イメージング、光遺伝学の技術を課題遂行中のマウスで利用可能となるように調整・最適化した。2光子顕微鏡は、もともとは光イメージング (観察) のためにのみ作られていた。そこで、光遺伝学 (広範囲同時操作) を行うための新たな光学系をデザインし、顕微鏡内部の光学系および対物レンズを経由した光刺激システムを導入した。光刺激において、申請者はこれまで、光ファイバーを経由して光を観察部位に直接投射してきたが、今回の改善によりイメージング部位に対するの相対位置が常に一定となり、さらなる再現性・操作性の向上が見込まれる。このことは、長期的な観察でも常に一定の操作を加えることを可能とし、特に同一神経回路における学習前後での定量的比較には有利な系が確立できた。

また、神経活動観察に適した学習の系の確立とそれにとりまなう顕微鏡下・頭部固定状況での観察装置の開発が完了した。行動実験の予備実験も進め、実際の脳活動観察における実験パラダイムを構築した。さらには、これらすべてを Labview によって統合的に制御するシステムを構築した。特に顕微鏡下では通常のマウスとはことなるストレスがかかる

ため、それを改善するための様々な環境改善を行い、恐怖学習の指標である「すくみ行動」が評価しやすい状況を確立した。

また、低倍・高NAの対物レンズの導入により、高い時間分解能とより広い視野を獲得する事が出来たが、その一方で大量の神経活動データが取得されるようになった。そのため、このデータ解析の為に適したプログラムを作成した。また、一つ一つの神経活動を同定するためのアルゴリズムを導入することで、より効率的にデータ解析を行うことが可能となった。

なお、大脳皮質視覚野における研究は近年非常に競争が激しく、独創性という観点から考えると、認知機能に必要なことが知られる他の脳領域へと標的を広げていくことが重要と考えられる。例えば、海馬や同じ大脳皮質でも前頭前皮質など、より高次の認知機能・記憶との関連の深い領域の情報処理機構は非常に興味深い。そこで今後は、これらの標的での観察を通じて、神経回路による情報処理メカニズムの多様性、及び共通性を明らかにし、脳内情報処理機構をより深く理解していく。

これらの実験データ取得と平衡して、先行研究によって得られた視覚刺激情報のデータを用いて、様々な解析手法を導入した。例えば、機械学習アルゴリズムによる神経群活動からの decoding 技術を導入し、情報処理という観点からの評価を多角的に行うことが出来るようになった。これらの解析方法も、今後は学習前後のマウスから得られたデータについて応用していくことで、新しい発見へとつなげていく。

そして実際に、学習したマウスを用いてPV陽性細胞の活動を光遺伝学的に変化させながら神経活動イメージングを行う実験も実施した。これら一連の行動・神経活動データを今後詳細に解析し、学習・認知機能に伴う神経ネットワークの情報処理様式の解明と、そこでのPV陽性細胞の役割について検証を進め、最終的に論文に発表していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Agetsuma M., Hamm JP, Tao K., Fujisawa S., Yuste R.: Parvalbumin-Positive Interneurons Regulate Neuronal Ensembles in Visual Cortex. **Cerebral Cortex** (2017) in press 査読有 doi: 10.1093/cercor/bhx169.

Inagaki S, Tsutsui H, Suzuki K, Agetsuma M., Arai Y, Jinno Y, Bai G, Daniels MJ, Okamura Y, Matsuda T, Nagai T.: Genetically encoded bioluminescent voltage indicator for multi-purpose use in wide range of bioimaging. **Sci Rep** (2017) 7, 42398 査読有

doi: 10.1038/srep42398.

Agetsuma M., Matsuda T, Nagai T.: Methods for monitoring signaling molecules in cellular compartments. **Cell Calcium**. (2016) S0143-4160, 30194-30194 査読有 doi: 10.1016/j.ceca.2016.12.002.

Chou MY., Amo R., Kinoshita M., Cherng BW., Shimazaki H., Agetsuma M., Shiraki T., Aoki T., Takahoko M., Yamazaki M., Higashijima S., Okamoto H.: Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. **Science** (2016) 352, 87-90 査読有 doi: 10.1126/science.aac9508.

Tiwari DK, Arai Y., Yamanaka M., Matsuda T., Agetsuma M., Nakano M., Fujita K., Nagai T.: A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy. **Nat Methods** (2015) 12, 515-518 査読有 doi: 10.1038/nmeth.3362.

〔学会発表〕(計5件)

Agetsuma M., Hamm JP, Tao K., Fujisawa S., Yuste R.: Parvalbumin-Positive Interneurons Regulate Population Coding in Cortex. 第95回日本生理学会大会. March 2018. (Takamatsu, Japan)

Agetsuma M., Hamm JP, Sato I, Tao K., Fujisawa S., Yuste R.: 光学的アプローチによる大脳皮質局所神経回路における情報処理機構の解明. 薬学会 137 年会シンポジウム. March 2017. (Sendai, Japan)

Agetsuma M., Hamm JP, Sato I, Yuste R.: Parvalbumin-positive interneurons regulate spatio-temporal network dynamics for population coding in mouse primary visual cortex. Neuroscience 2016. Nov 2016 (Chicago, USA)

Agetsuma M., Hamm JP, Sato I, Yuste R.: Co-regulation of spatial and temporal network dynamics by parvalbumin-positive interneurons for population coding in visual cortex. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. July 2016. (Yokohama, Japan)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

揚妻 正和 (AGETSUMA, Masakazu)  
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特任准教授

研究者番号: 30425607