

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14562

研究課題名(和文)海馬脳状態決定の神経回路機構

研究課題名(英文)Neural circuit mechanism to determine hippocampal brain state

研究代表者

林 康紀 (Hayashi, Yasunori)

国立研究開発法人理化学研究所・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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は縫線核からの海馬への入力脳状態を規定していると仮説を立てた。マウス正中縫線核からの海馬へ投射するセロトニン神経軸索にG-CaMP6を発現し、二光子顕微鏡で観察した。マウスはトラックボール上を自由に歩行し、特定の場所に来ると報酬が与えた。その結果、縫線核から海馬への投射線維は歩行開始時(つまり波期の開始)に一致するものと報酬に一致するものの2種類があることがわかった。次に、チャンネルロドプシンを縫線核セロトニン神経に発現した上で海馬局所にて刺激を行なった。報酬における歩行速度が遅くなり、報酬の情報を強化しているのではないかと想定された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the input from the raphe nucleus to the hippocampus regulates the brain status. We expressed G-CaMP6 in the serotonergic axonal projection from the medial raphe nucleus to the hippocampus and observed it with a two-photon microscope. The mouse walked freely on the trackball and rewarded when it came to a specific place. As a result, we found that there are two types of projection fibers from the raphe nucleus to the hippocampus, one consistent with the reward at the start of walking (that is, the start of the wave period). Next, channel rhodopsin was expressed in raphe nucleus serotonin nerve and stimulation was carried out locally in the hippocampus. The walking speed in reward area became slower. We postulated that it strengthen reward information.

研究分野：神経科学

キーワード：セロトニン 縫線核 記憶学習 海馬

1. 研究開始当初の背景

脳の活動は一定ではなく、さまざまな brain state (日本語訳は定まっていないがここでは「脳状態」とする)をとる。例えば海馬では動物が空間を動き回る時、空間上の特定の位置で発火する「場所細胞」が形成されることが知られている。この時海馬全体では 6-10Hz の規則的な波が観察される。一旦動物が静止すると不規則に鋭波が観察されるようになり、この時、複数の場所に対する場所細胞が動物のこれまで動いてきた道筋、あるいは動いていく道筋をなぞるように順に発火する(replay)。このように脳は動物の行動(動いているか、静止しているか)により異なった脳状態を取る。

基本的に波が観察されるに大脳皮質から海馬に対し情報が流入し、一方鋭波が見られる時には海馬から大脳皮質へ移行すると考えられている。しかし、脳状態間の遷移のメカニズムについてはよく判っていなかった。

2. 研究の目的

脳の活動は一定ではなく、さまざまな brain state (日本語訳は定まっていないがここでは「脳状態」とする)をとる。例えば海馬では動物が空間を動き回る時、空間上の特定の位置で発火する「場所細胞」が形成されることが知られている。この時海馬全体では 6-10Hz の規則的な波が観察される。一旦動物が静止すると不規則に鋭波が観察されるようになり、この時、複数の場所に対する場所細胞が動物のこれまで動いてきた道筋、あるいは動いていく道筋をなぞるように順に発火する(replay)。このように脳は動物の行動(動いているか、静止しているか)により異なった脳状態を取る。基本的に波が観察されるに大脳皮質から海馬に対し情報が流入し、一方鋭波が見られる時には海馬から大脳皮質へ移行すると考えられている。しかし、脳状態間の遷移のメカニズムについてはよく判っていなかった。

最近我々は報酬刺激に対する縫線核から海馬へのセロトニン性調節入力の活動を観察するため、カルシウム感受性蛍光タンパク質である G-CaMP を縫線核に発現し、海馬への投射線維を、仮想現実空間下、二光子顕微鏡をもちい、無麻酔の動物で観察した。その結果、正中縫線核から海馬へのセロトニン投射線維が動物の歩行時に特異的に発火することを見出した(図 1、未発表データ)。動物が静止すると、活動は急速に低下する。興味深いことにこの線維はセロトニンだけではなく、シナプス後細胞に速い脱分極を引き起こすグルタミン

酸も同時に放出し、縫線核からの入力線維は海馬抑制性ニューロンを脱分極させることが知られている (Varga, Science 2009)。そこで実際に同様に海馬抑制性ニューロン活動を観察したところ、動物の歩行時に同様に特異的に発火することを見出した(図 2、未発表データ)。我々の結果は縫線核からの海馬への入力が脳状態を波期、あるいは鋭波期に規定している可能性がある。当然のことながら、それらは間接的に記憶形成にも影響するであろう。そのため、本研究は次を specific aim とする。

SA1: 海馬脳状態の縫線核からの入力による調整

仮想現実空間下で行動する無麻酔マウスの海馬にて局所電位を測ると同時に縫線核を電気的、あるいは光遺伝学的手法を用いて刺激、あるいは抑制し、海馬脳状態へ対する影響を観察する。また、海馬への投射線維の影響を直接観察するため、海馬へ光を照射し、局所的に投射線維を刺激する。また動物の行動も観察する。

SA2: 記憶形成への縫線核からの入力の影響

縫線核からの入力が脳状態を記憶形成に如何に作用するかを観察するため、場所に対する記憶と考えられる場所細胞の安定性を長期に観察する。SA1 と同様に仮想現実空間下でマウスを行動させる。G-CaMP7 を海馬錐体細胞に発現させ、マウスの歩行に伴って形成される場所細胞を観察する。その上で縫線核からの入力を SA1 のように刺激、あるいは抑制することで脳状態を変化させ、場所細胞の安定性、対応する領域の広さなどを観察する。

SA3: 縫線核による脳状態の調節の細胞メカニズム

縫線核からの入力の神経伝達物質ならびにシナプス後細胞を同定する。セロトニンとグルタミン酸が主要な伝達物質と考えられるが、縫線核特異的に Crisper/Cas9 を用いてトリプトファン水酸化酵素あるいは VGluT3 を遺伝子破壊する。薬理的な手法を用いるほか、パルプアルブミン、ソマトスタチン、コレシストキニン性の抑制性神経細胞にそれぞれ G-CaMP7 を発現し、縫線核刺激時の発火を観察する。

3. 研究の方法

SA1: 海馬脳状態の縫線核からの入力による調整

flox-ChR2-GFP、あるいは flox-ArchT-GFP をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターにて、生後 2 週目 Sert-Cre トランスジェニックマウス縫線核に頭位固定

下注入し感染させる。これにより縫線核に ChR2 あるいは ArchT を発現させる。縫線核に光ファイバー、海馬に局所電位記録のための電極を刺入する。マウスは自由行動とするが、一部の実験では、我々が独自に開発した仮想現実空間に頭位を固定する。このためには、マウス頭蓋骨にヘッドプレートを接着し、レーザー光源から光ファイバーで光を導入し、ChR2 または ArchT を活性化して神経活動を活性化あるいは抑制する。コントロールには GFP のみ発現するウイルスを用いる。動物の行動はビデオでモニターするか、仮想現実空間を用いる場合は走行をトラックボールで検出する。海馬を直接刺激するときは、背側海馬直上に光ファイバーを埋め込む。

SA2: 記憶形成への縫線核からの入力の影響

仮想現実空間下でマウスを行動させる。G-CaMP7 を海馬錐体細胞に発現させ、マウスの歩行に伴って形成される場所細胞を二光子顕微鏡で観察する。その上で縫線核からの入力を SA1 のように ChR2 および ArchT を用い、刺激あるいは抑制することで脳状態を変化させ、場所細胞の安定性、対応する領域の広さなどを観察する。

我々は既にこのタスクを用い、マウスに報酬学習をさせることに成功し、それに対応する細胞活動の可視化にも成功している。このタスクでは、マウスは報酬領域に入ると一旦静止し、報酬（水）をえてそれを消費することを学習する。その時点では、脳状態は鋭波期にあると予想される。この時、縫線核からの入力を刺激し強制的に波期にすることで、報酬や場所に対する細胞の安定性、対応する領域の広さを検討するほか、動物の学習成績も記録する。

また縫線核からの入力自体が報酬あるいは罰シグナルになるかを検討するため、ある特定のところに来た時に水ではなく、光刺激を行う。また、より積極的に報酬あるいは罰シグナルとなるかを我々のシステムで調べるため、走行路に緑色に物体を置き、それをゆっくりマウスに近づける。マウスがそれに接触すると縫線核の光照射を行う。マウスは前に行くあるいは後ずさりすることで、緑色の物体に近づいたり離れたりすることができる。

SA3: 縫線核による脳状態の調節の細胞メカニズム

縫線核特異的に AAV ベクターと Crisper/Cas9 を用いてセロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素あるいは

小胞型グルタミン酸トランスポーター VGluT3 を遺伝子破壊する。その上で SA1、SA2 と同様な実験を行い、セロトニン、グルタミン酸のうちいずれが重要であるかを検討していく。

スライスを用いた研究から縫線核由来の線維は抑制性神経細胞とシナプスを形成していることが知られている。実際に我々はパルプアルブミン陽性神経細胞が波期に発火が向上することを確認している(図2)が、これが縫線核由来線維の入力によるのかは明らかではない。そこでパルプアルブミン、ソマトスタチン、コレシストキニン性の抑制性神経細胞のカルシウム反応を観察するため、それぞれに特異的プロモーターを用いて G-CaMP7 を発現する。カルシウム反応は仮想現実空間下、二光子顕微鏡を用いて観察する。一方で、縫線核には ChR2 を発現し、光刺激時の各種抑制性神経細胞の発火を観察、比較する。

4. 研究成果

マウス正中縫線核に G-CaMP6 をアデノ随伴ウイルスベクターを用いて発現した。正中縫線核からのセロトニン神経軸索は海馬に終止する。海馬を観察するため、大脳皮質の一部を取り去り海馬を露出した上で光学窓を設けた。軸索へのカルシウム流入を二光子顕微鏡で観察した(図1)。

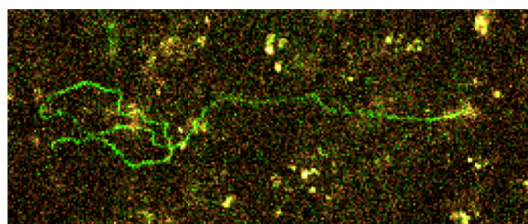
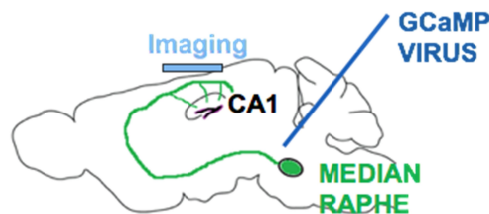


図1 G-CaMP6 を発現する縫線核からのセロトニン性の投射の記録

マウスはトラックボール上を自由に歩行し、その行程はコンピューターマウスを用いて検出し仮想現実空間を動かした。マウスが特定の場所に来ると報酬が与えられた。その結果、縫線核から海馬への投射線維は歩行開始時(つまり波期の開始)に一致するものと報酬に一致するものの2種類の集団があることがわかり(図2)、その比率は約9:1であった。

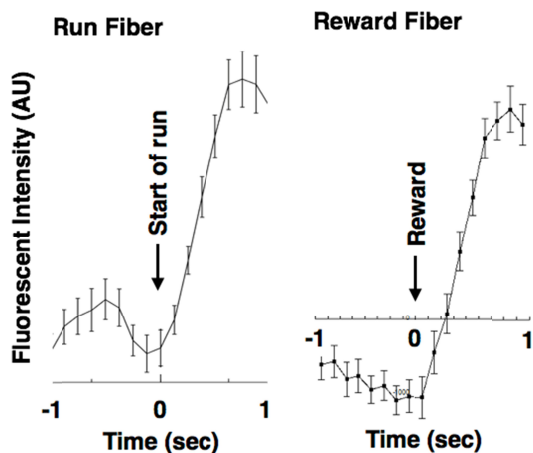


図2 2種類の縫線核からのセロトニン性の投射

この実験結果を踏まえ、次に、海馬へ投射する縫線核からセロトニン神経の機能を探るため、チャンネルロドプシンを縫線核セロトニン神経に発現した上で海馬に光ファイバーを挿入し、局所に投射する線維の刺激を行なった。その結果、報酬における歩行速度が遅くなり、報酬の情報を強化しているのではないかと想定された。一方、それ単独で効果があるかは検討中である。

一方、脳状態の把握に必要な電気生理学的な記録は急性プローベを用いて行ったところ、脳の浮腫か出血により画像の質が低下することが判明した。これについては、今後慢性プローベを用い、電極刺入後の組織が安定してから観察することを試みて行く。

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4件)

1. Bosch M, Castro J, Sur M, Hayashi Y (2017) Photomarking Relocalization Technique for Correlated Two-Photon and Electron Microscopy Imaging of Single Stimulated Synapses. **Methods Mol Biol** 1538:185-214 (査読あり).
2. Sato M, Kawano M, Mizuta K, Islam T, Lee MG, Hayashi Y (2017) Hippocampus-Dependent Goal Localization by Head-Fixed Mice in Virtual Reality. **eNeuro** 4. (査読あり).
3. Kim K, Saneyoshi T, Hosokawa T, Okamoto K, Hayashi Y (2016) Interplay of enzymatic and structural functions of CaMKII in long-term potentiation. **J Neurochem** 139:959-972 (査読あり).

4. Sato M, Kawano M, Yanagawa Y, Hayashi Y (2016) In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice. **Neurobiol Learn Mem** 135:146-151 (査読あり).

[学会発表](計1件)

A. LUCHETTI, A. BOTA, Y. HAYASHI
Minimizing ROI crosstalk in neuronal activity data from miniature microscope calcium imaging.
アメリカ神経科学学会(サンディエゴ)
Nov. 12, 2016

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 康紀 (HAYASHI, Yasunori)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・チームリーダー
研究者番号: 90466037