

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03336

研究課題名(和文) 視覚皮質興奮性・抑制性ニューロンのシナプス入力機能構築と情報統合機構の解明

研究課題名(英文) Synaptic inputs and integration on the excitatory and inhibitory neurons in the 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) 13,900,000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ました。次にこの方法を使って、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活動を計測し、スパイン機能マップの作成に成功しました。このマップの解析から、細胞体活動と一致した反応を示すスパインの数が最も多く、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

私たちは外界の情報の約9割を視覚から得ています。視覚情報は目の網膜で受容されたのち、視床という中経路を通り大脳視覚野へ送られます。この時網膜で視覚情報は一旦様々な要素(視野の中の位置、形を構成する線、物体の色、物体の動きなど)に分解され、大脳へ送られ再抽出されることで外界が認識されます。本研究では、視床から大脳視覚野へ送られる情報の性質や大脳視覚野で要素の情報が抽出される仕組みを、最新の2光子カルシウムイメージングという方法を用いて、生体イメージングすることで明らかにしました。これらの研究成果により、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 シナプス入力マップ 視覚情報処理 情報統合 神経演算 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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

私は、視覚神経科学を専門とし、視覚情報処理を行う神経回路の配線図と動作原理を明らかにする研究に取り組んでいる。脳で処理される様々な情報、私の専門では視覚情報は、ローカルな単一細胞での情報処理と、神経細胞が集まったグローバルな神経回路での情報処理に一旦分けて考える必要がある。そして最終的に、ローカルな情報処理とグローバルな情報処理の知見の融合により、神経情報処理の統合的な理解が得られると考えている。

神経回路は、ニューロンという個別の演算素子がシナプス結合により多数集合することで機能的演算回路を構築している。脳の情報処理の理解には、神経回路レベルでの演算様式の理解に加え、個別の素子の演算様式を理解することも重要と考えられる。大脳一次視覚野は様々な種類の視覚情報入力を受けている。その中でも特に重要と考えられるのが、視覚視床を経由して入力する網膜からの視覚情報と、同じ大脳視覚野に分布する他のニューロンからの入力である。1個のニューロンはこれら多数のシナプス入力を受け、この中から入力を選択的に統合して情報を読み出し、次のニューロンへ伝達していると考えられる。しかしながら、1個のニューロン上に視覚情報入力があるのかがどのように空間的に分布し、また入力情報が統合され出力が決まるのかは未知な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

大脳視覚野の視覚情報処理は、網膜からの視覚情報と大脳視覚野で処理された視覚情報の反回性入力などが主な原動力となり演算が行われ外界の情報が脳内に表現される。本研究では、次の3つの点に焦点を当てて大脳視覚野における視覚情報処理を理解するための礎を築くことを目的とした。すなわち、(1) 視覚視床 (今回は LPN) から大脳視覚野へ投射する入力の視覚応答特性の解析、(2) シナプス入力の位置と機能の情報を正確に計測するための技術開発、(3) 大脳視覚野興奮性ニューロンが受けるシナプス入力の位置と機能の同時解析、(4) 大脳視覚野抑制性ニューロンが受けるシナプス入力の位置と機能の同時解析、(5) シナプスを光刺激するための実験系の構築、である。

## 3. 研究の方法

(1) 視覚視床 (今回は LPN) から大脳視覚野へ投射する入力の視覚応答特性の解析  
マウスの LPN にカルシウムセンサーである GCaMP6s を AAV により発現させる。AAV は脳定位固定したマウスに微量圧注入法を用いて注入する。AAV 注入から2週間後に、大脳一次視覚野の直上に観察窓を作製する。2光子励起顕微鏡下において観察窓を通して、LPN から投射する軸索のイメージングを行う。方位選択性を調べるための視覚刺激を提示し、軸索の視覚応答を計測する。

(2) 大脳視覚野ニューロンが受けるシナプス入力を計測するための方法の新規開発とシナプス入力の位置と機能の同時計測と解析

シナプス入力を計測する際の大きな妨げとなるのが、細胞体で発生する活動電位の樹状突起への逆伝播である。これを抑制するために抑制性光遺伝学タンパク分子である SwiChR++ を細胞体に発現させ、光抑制可能な実験系を新規に構築する。マウスの大脳一

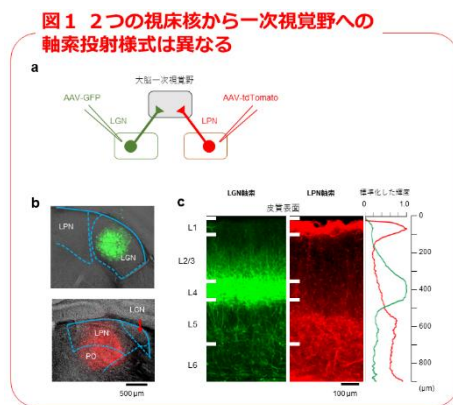
次視覚野 (V1) に GCaMP6s と抑制性光遺伝学タンパク (SwiChR++) を AAV により低密度に発現させる。AAV の注入と観察窓の作製は上記 (1) に準ずる。2 光子励起顕微鏡下において観察窓を通して、V1 ニューロンから興奮性シナプスの入力場所であるスパインのイメージングを行う。この時、SwiChR++を活性化させるために、458nm の光刺激を細胞体に限局させて行う。細胞体活動電位の発生が抑制されている間に、方位選択性を調べるための視覚刺激を提示し、スパインあるいは樹状突起シャフトの視覚応答を計測する。計測したシナプス入力の樹状突起上の位置と反応情報を解析し、単一ニューロン上でのシナプス入力の機能マップを作成する。

### (3) シナプスを光刺激するための実験系の構築

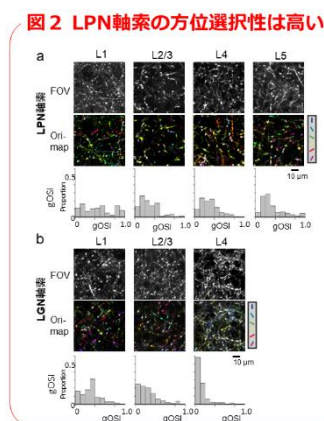
シナプスの視覚刺激応答を計測するだけでなく、その結果に基づいてシナプス入力を人為的に操作し模倣できれば、単一ニューロンレベルでの情報統合の仕組みの理解に極めて有用であると考えられる。さらに多数のシナプス入力を同時に操作できれば、実際に生体内で生じているシナプス入力パターンに似た活動操作を行うことも可能になる。そのために本研究では、空間光位相変調器 (SLM) を用いて、刺激レーザービームを多数の光に分配し、樹状突起に 3 次元的に分布するスパインの多数同時光刺激可能な実験系を構築する。そして既存の 2 光子励起顕微鏡の光路内に光刺激装置を接続し、イメージングと光刺激を同時に行うことができる実験系を構築する。光刺激装置は、レーザービームを SLM に導くための反射ミラー、SLM、そしてビーム径を調整するためのビームエキスパンダーから成る。

## 4. 研究成果

(1) 大脳一次視覚野 (V1) は網膜からの情報を 2 つの視覚視床 (LGN と LPN) から並列入力として受ける。私は過去に LGN から V1 への投射を調べ報告している (Kondo and Ohki, 2016)。今回は、まず LPN から V1 への投射様式と LGN から V1 への投射様式との比較を行った。その結果、LGN から V1 への投射は第 4 層が最も強く、次いで 1 層へ投射するのに対し、LPN から V1 への投射は第 1 層が最も強く、次いで 5 層へ投射する違いがあることが分かった (図 1)。



次に LPN から V1 へ投射する軸索の視覚応答を LGN から V1 へ投射する軸索と比較した。その結果、LGN から V1 の 4 層へ投射する軸索は方位選択性が低く、1 層への投射は高いのに対して、LPN から V1 の 1 層へ投射する軸索も 5 層へ投射する軸索も方位選択性が高いことが分かった。LGN から V1 への投射では、主要な投射に方位選択性が低い一方で、LPN から V1 への投射では、主要な投射の方位選択性が高いという結果を得た (図 2)。網膜から V1 への視覚情報伝達については LGN からの入力メイン経路で、LPN からの入力はサブ経路であることから、方位選択性が低い LGN の入力から方位選択性が高い V1 神経細胞の応答への変換は従来から唱えられている Hubel & Wiesel の仮説を支持し、一方で方



位選択性を持つ LPN からの入力に V1 神経細胞の方位選択性形成に補助的な役割を果たしていることが考えられた。

今後は、LPN から V1 へ入力する方位選択性情報の役割を、LPN、LGN あるいは上丘（網膜から LPN への投射は上丘を経由する）の抑制を行い、V1 神経細胞の方位選択性への作用を調べることで解明を継続する予定である。

(2) 細胞体に抑制性光遺伝学タンパク分子を限局発現させ、スパイン活動を正確かつ大規模に計測する方法を新規に開発することができた (図 3)。

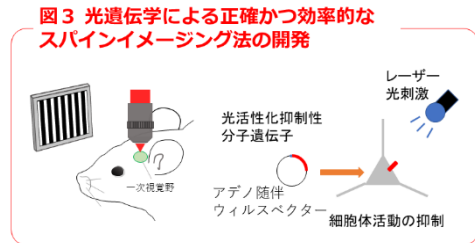


図3 光遺伝学による正確かつ効率的なスパインイメージング法の開発

(3) (2) で開発した技術を用い多数のスパイン活動について、どのスパインが、いつ・どこで・どんな入力を受けたのかというシナプス入力の時空間的パターンを視覚刺激と組み合わせ計測した。そして1個のニューロンから約 1,000 個のスパイン視覚応答を計測することで詳細なシナプス入力機能マップの作成に成功した (図 4)。

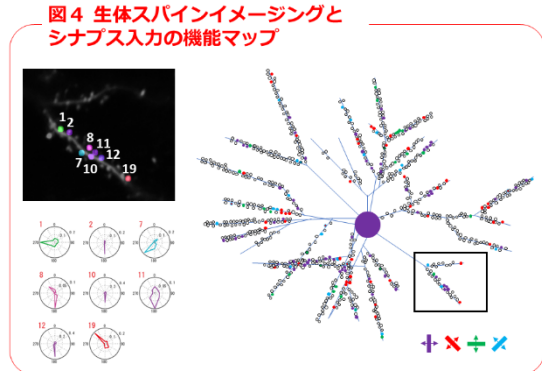


図4 生体スパインイメージングとシナプス入力の機能マップ

作成したシナプス入力マップから、全体の約 20% のスパインが視覚応答を示し、そのうちの約 80% (全体の約 16%) が方位選択性を有していた。さらに方位選択性を持つスパインの 50% 以上が細胞体の示す (つまり細胞体の出力) 方位選択性と一致することが分かった。また、スパインの位置と機能の多重情報を解析した結果、細胞体の活動はスパイン入力の数と入力の局在化により決まり、多数の樹状突起の枝の中でも特定の枝が細胞体出力に寄与している可能性を見出した。本研究成果は論文投稿を行い現在リバイス中である。

今後は、大脳視覚野興奮性ニューロンにおける単一細胞レベルでの視覚情報の入出力関係について、本研究で作成に成功した機能マップと数理モデル計算を組み合わせた解析を行いさらに推進させ、明らかにしたいと計画している。

(4) (2) で開発した技術を用いて、抑制性ニューロンからシナプス入力を計測する方法を開発した。抑制性ニューロンは興奮性ニューロンとは異なり、スパインを持たずシナプス入力を直接樹状突起シャフトに受け取っている。したがって、興奮性ニューロンの場合のように、bAP 由来の成分を樹状突起シグナルから類推計算で除去するという手法を用いることが難しく、そのため抑制性ニューロンのシナプスの機能イメージングはほとんど世界的に進んでいなかった。(2) で開発した新技術を抑制性ニューロンのシナプスイメージングに用い、抑制性ニューロンの樹状突起シャフトから興奮性シナプス入力の計測を行った。その結果、bAP の影響を受けることなくシナプス応答を計測することに成功した (図 5)。このような計測は世界で初めてで、今後上記 (3) で示した興奮性ニューロンと同様にシナプス入力の大規模解析を行うことで、抑制性ニューロンのシナプス入力機能構築の解明と情報統合の仕組みの解明に向けた研究に着手するための実験基盤を構築することができた。

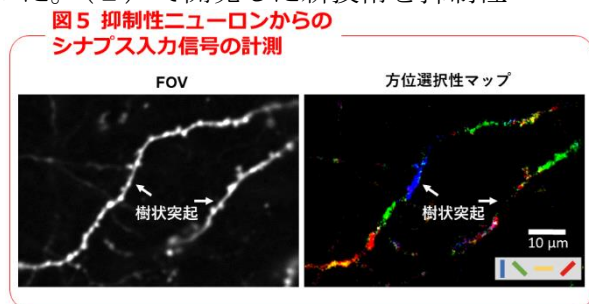


図5 抑制性ニューロンからのシナプス入力信号の計測



(5) 本研究で新しく見出した単一細胞レベルでのシナプス入力局在化の意義を実験により明らかにするための、実験系の構築を開始した。スパインを光刺激するためのレーザービームを空間光位相変調器に導入し、多数の光に分配することに成功した(図6)。

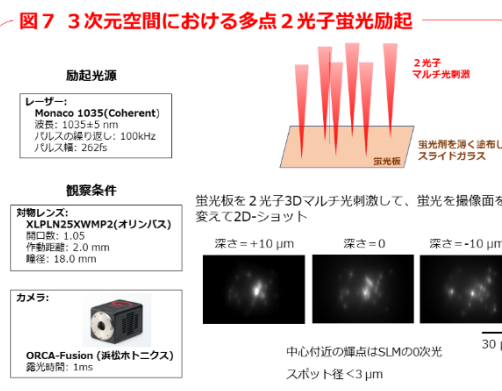
次に2光子刺激に用いるパルスレーザーを同様に3次元的に分配し、蛍光板に照射したところ3次元的に光照射し2光子励起できていることを確認した(図7)。

本研究成果は、装置開発の短報として雑誌投稿すべく現在準備中である。

今後は、本研究で製作した多点光刺激装置を2光子励起顕微鏡に組み込み、2光子イメージングにより同定したスパインを2光子刺激が可能なイメージング装置として完成させる予定である。

## (6) 今後の展望

(1) では視覚視床 (LPN) から V1 へ投射する軸索の機能解析を行った。私は以前の研究でもう一方の視覚視床で網膜から V1 へ至る視覚伝導路の主要経路である LGN 軸索の機能解析を行っている。次の問題として、2つの視覚視床から V1 ニューロンへの情報入力の特徴と情報処理がどのように行われているかを解明する必要がある。そのためには(2) および(3)で行った、1個のニューロン上でのシナプス入力の機能解析が有用である。すなわち、2つの異なる視覚視床から V1 へ送られる情報が1個のニューロン上にどのように配置されているのかを明らかにするために、各シナプス入力の空間配置と機能を示すマップを作成する。このマップを基に、2つの入力 V1 ニューロンの情報処理に果たすそれぞれの役割を解明することで、網膜からの大脳へ至る2つの平行経路の意義の解明に繋がると考えている。また視覚視床からの入力は、興奮性ニューロンだけでなく抑制性ニューロンにもシナプス結合している可能性もある。(4)の方法を用いることで、この問題にも取り組むことが可能である。さらに(5)で開発した方法により、単一ニューロン上にマップしたシナプス入力の活動を、様々なパターンで人為的に起こすことで、視床入力の神経演算様式の特徴を解明することも将来展望として見据えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kondo S, Kiyohara Y and Ohki K  | 4. 巻<br>16           |
| 2. 論文標題<br>Response Selectivity of the Lateral Posterior Nucleus Axons Projecting to the Mouse Primary Visual Cortex. | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Front. Neural Circuits  | 6. 最初と最後の頁<br>825735 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fncir.2022.825735  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>根東 覚、瀧口 優                      |
| 2. 発表標題<br>シナプス解像度を持つ高速スキャンレス3次元2光子顕微鏡の開発 |
| 3. 学会等名<br>第45回日本神経科学大会                   |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>根東 覚、瀧口 優                       |
| 2. 発表標題<br>シナプス信号入力の大規模計測に向けた新規イメージング装置の開発 |
| 3. 学会等名<br>第100回日本生理学会大会                   |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>福田裕太、根東 覚、大木研一                    |
| 2. 発表標題<br>マウス一次視覚野における単純型細胞・複雑型細胞のシナプス入力の解析 |
| 3. 学会等名<br>第100回日本生理学会大会                     |
| 4. 発表年<br>2023年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岩田卓、星野鉄哉、根東覚、佐々木哲也、武井陽介、伊藤雅英    |
| 2. 発表標題<br>光波散乱計測を用いた分散培養ニューロンの3次元形態解析システム |
| 3. 学会等名<br>第128回日本解剖学会総会・全国学術集会            |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>根東 覚、菊田浩平、大木研一                                    |
| 2. 発表標題<br>マウス一次視覚野錐体細胞の出力チューニングは樹状突起と細胞体における入力の非線形統合によって決まる |
| 3. 学会等名<br>第44回日本神経科学大会                                      |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kondo S, Kikuta K and Ohki K   |
| 2. 発表標題<br>Nonlinear integration of synaptic inputs revealed by large-scale synapse imaging without backpropagating action potentials |
| 3. 学会等名<br>The 10th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>根東 覚、菊田浩平、大木研一                     |
| 2. 発表標題<br>マウス一次視覚野錐体ニューロンに分布する興奮性シナプス入力の機能構築 |
| 3. 学会等名<br>第43回日本神経科学大会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|