

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2012

課題番号：23680043

研究課題名（和文） 皮質樹状突起活動による感覚・運動情報の符号化の神経基盤

研究課題名（英文） Dendritic coding of sensory and motor information

研究代表者

村山 正宜 (MURAYAMA MASANORI)

独立行政法人理化学研究所・行動神経生理学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：30578901

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、生きたマウス脳における樹状突起活動の動作原理を解明することである。この目的のため、我々は高速に3次元でスキャンできる2光子顕微鏡を構築し、これにオプトジェネティクス法、局所薬理法とを組み合わせ、感覚野における5層錐体細胞の樹状突起活動を記録した。その結果、麻酔下におけるマウスの体性感覚野-後肢領域の樹状突起は、後肢または高次運動野への電気刺激でそれぞれ応答が観察された。この樹状突起活動はマウスが覚醒したときに有意に増大し、さらに、この増強は高次運動野へのTTX投与で減弱することを見出した。これらの結果は、覚醒時における感覚野における樹状突起活動は、高次運動野からの入力により腑活化されている事を示す。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to understand how L5 neuron dendrites work in vivo. For this purpose, we developed a fast 3-dimensional scanning 2-photon microscope to achieve dendritic Ca^{2+} imaging with optogenetical manipulation, and local drug applications to a brain area. Dendritic Ca^{2+} activity could be evoked by hindlimb stimulations and electrical stimulations to a higher-order motor cortex in anesthetized mice. This dendritic Ca^{2+} activity significantly increased during awake state. We also found that enlarged dendritic activity significantly suppressed by local application of TTX, a antagonist of sodium channel, to the higher-order motor area. These results indicate that large dendritic activity in awake state can be activated by the higher-order motor area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	17,500,000	5,250,000	22,750,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	220,000,000	6,600,000	286,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：新皮質、体性感覚、知覚、樹状突起、カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は細胞体、樹状突起と軸索から構成され、細胞によっては、樹状突起は細胞膜表面の90%を占めることもある。樹状突起は多数の神経細胞からの情報を受け、統合していることから、情報統合の場であると考えられている。近年、皮質5層錐体細胞の遠位樹状突起では電位感受性チャネルの自己再生的活性化によるCa²⁺スパイクやNMDAスパイクが発生する事が知られている。これら樹状突起スパイクは細胞の発火パターンを連続発火モードへと遷移させる。この5層錐体細胞は、皮質内では主な最終出力細胞であることから、この細胞の樹状突起活動は、記憶想起や注意などといった脳の高次機能も含めた動物の行動に関連していると予測される。しかしこの仮説は未だ検証されていない。樹状突起は神経細胞の主要構成要素であるにも関わらず、行動中の動物に適用可能な樹状突起活動の記録法が存在しなかったためである。そこで申請者はこの状況を打開する為に、光ファイバを用いて自由行動中のラットの脳内における複数樹状突起の活動を光学的に記録する方法を世界に先駆けて開発した(M. Murayama et al., *J Neurophysiol.*, 2007; M. Murayama and M.E. Larkum, *Nat Protoc.*, 2009)。この方法では複数細胞における樹状突起からのアンサンブル活動を計測する事が可能であり、申請者は生体内での樹状突起の情報統合の基本メカニズムを解明することに成功している(M. Murayama et al., *Nature*, 2009)。最近申請者はこの研究を、樹状突起活動と意識・無意識とを関連付ける研究へと発展させた(M. Murayama and M.E. Larkum, *PNAS.*, 2009)。覚醒時、麻酔時における樹状突起活動の比較検討を行った結果、動物の覚醒時における樹状突起活動が、麻酔時の活動に比べ14倍以上も活性化する事、動物の運動強度と正比例に樹状突起活動が上昇する事を報告した。

上述した申請者の一連の先行研究から下記の知見を得た。1) 複数錐体細胞における樹状突起のアンサンブル活動は、感覚情報と運動情報をコードしている。2) 樹状突起活動は外部からの感覚情報の弁別や、脳の高次活動(例えば思考、記憶保持・消去や意思決定)に強く関連している。しかし、樹状突起による感覚情報と運動情報の符号化様式は a) 単一樹状突起で実現されているのか、または集合体として実現しているのか、もし単一樹状突起でコードされているのであれば、b) 感覚入力部位と運動入力部位は同一なのか異

なるのか、c) 情報コード様式は脳の高次活動でどのように修飾されるのか、などの樹状突起による情報符号化の神経基盤は不明のままである。

これを解明するためには、樹状突起の活動を単一細胞レベルで高速に記録する必要がある。また、脳内で3次元的に伸長した各側枝は、入力に対し固有の応答を示す可能性がある為、樹状突起の多点からの記録が必須である。この目的のためには超短パルス光の非線形効果を用いた2光子顕微鏡の利用が適している。しかし、ガルバノミラーを用いてレーザー光を操作していた従来の2光子顕微鏡では、多点計測に膨大な時間が必要になる為(縦512x横512ピクセル、1平面スキャンで約1秒を要す)、神経活動を数ミリ秒単位で精査する事は不可能であった。この様に測定時間に制約があった為、従来の2光子顕微鏡は、神経活動を加算平均できない様な1回性の神経現象の観察には不適切であった。これを克服するため、申請者は従来型より30倍の速度でのスキャンが可能な2光子顕微鏡を構築した。さらに、複雑に伸長した樹状突起側枝に対応する為、対物レンズを上下方向に高速で移動させる事で可能となる3次元イメージング法を開発中である。これにより、多点・高速・高精細での樹状突起活動の精査が実現する。本助成研究ではこのイメージング手法と、従来の実験心理学的手法や脳内局所薬物投与方法、脳局所電気刺激法やオプトジェネティクス法(H. Lütcke[†], M. Murayama[†], et al., [†] equal contribution, *Frontiers in Neural Circuits*, 2010)を組み合わせる事で、脳の内部情報と樹状突起活動の因果関係を探索する。本研究の遂行により、未知未踏の研究領域であった生体内樹状突起活動の探索において、ブレークスルーをもたらす事が期待できる。

樹状突起研究は毎年のゴードンカンファレンスでトピックとして採択されていることから分かるように世界的に見ても重要な分野である。1990年代からのイメージング法やパッチクランプ法の改良・開発により、樹状突起に関する研究は主に脳・脊髄スライス標本を用いて行われてきた。1999年には、2光子顕微鏡が生きた動物の脳に適用され、励起光のラインスキャン法を用いての神経活動の1次元観察や、フルフレームスキャンでの神経活動の2次元観察が行われるようになり、生体内での樹状突起に関する研究が前進した。しかし、脳内で複雑に分岐した樹状突起からの活動を高速で多点イメージングする技術は非常に難易度が高く、その開発はいまだ成しえていない。申請者は現在、これを可能とする2光子顕微鏡を平成22年度中に構築予定であり、その実現性は極めて高い。

2. 研究の目的

皮質5層錐体神経細胞の樹状突起活動が動物の心理状態に依存するという仮説は、長年検証される事がなかった。これは生体内において、樹状突起からの活動をミリ秒単位で記録する事が困難であった為である。申請者は現在、脳内で3次元的に伸長した樹状突起からの活動を多点・高速・高精細で計測が可能な2光子顕微鏡を構築中であり、その実現性は非常に高い。本研究では2光子イメージング法を用いた樹状突起活動の高速3次元法計測法と実験心理学的手法とを組み合わせる事でこの仮説を検証する。皮質回路に組み込まれた樹状突起活動の神経基盤を解明する事により、皮質に存在する全ての5層錐体細胞が必然的に有する計算原理の創出を目指す。

3. 研究の方法

高速3次元法計測法

2光子顕微鏡メーカーであるニコン、およびニコンインステックと共同で開発した。X-Y軸でのレーザースキャンと並列して対物レンズを上下運動（最速20 Hz）させた。

樹状突起カルシウムイメージング

樹状突起活動は第1体性感覚野の後肢領域に存在する5層錐体細胞から2光子顕微鏡を用いて記録した。樹状突起からのカルシウムイメージングは、5層錐体細胞に改良型GCaMP（カルシウムセンサー蛋白質）を遺伝的に発現させたトランスジェニックマウスから行った。

高次運動野の同定

新皮質膜電位イメージングにより高次運動野を同定した。高次運動野である第二運動野は後肢からの入力を受けている事が解剖学的に知られているため、マウスの後肢を電気刺激（100V, 0.1ms）した。

解剖学的回路同定

順行性神経トレーサーであるAAV-GFPをマウスの第一次体性感覚野の後肢領域、または高次運動野に注入した。その4週間後に脳スライスを作成し、投射経路を蛍光観察で同定した。また逆行性神経トレーサーであるコレラトキシンサブユニットB (Alexa 555) も同様に両領域に注入した。2-3日後に脳スライスを作成し、新皮質層構造における投射細胞を同定した。

4. 研究成果

高速3次元法計測法の確立

512 x 512 pixel size、深さ300 μm領域から10 Hzでのサンプリングでカルシウムイメージングを行う事に成功した。樹状突起からのカルシウム応答も確認できた。今後は、レーザースキャン方向を往復にすることで、同範囲におけるイメージングのスピードを倍にすることを検討している。

麻酔下のマウスから新皮質膜電位イメージングにより高次運動野を同定したのち、樹状突起カルシウムイメージングを第一次体性感覚野の後肢領域から行った。カルシウム応答は後肢への電気刺激で誘起した。この樹状突起応答をコントロールとした。次にマウスを覚醒させ、同様に後肢を電気刺激したところ、樹状突起活動が有意に上昇した。この樹状突起活動の上昇は、先に同定した高次運動野へのTTX投与により、有意に減少した。

高次運動野の不活性化が第一次体性感覚野における神経活動の抑制を引き起こすことを新皮質膜電位イメージングで確認した。

これらの結果は、高次運動野から第一次体性感覚野への神経投射を示す。つぎにこの高次運動野-感覚野への回路が存在するかどうかを調べるために、マウスの高次運動野に順行性神経トレーサーであるAAV-GFPを注入した。注入の約4週間後に脳スライスを作成し、蛍光観察すると、高次運動野からの投射領域は第一次体性感覚野であることを確認した。また、逆行性神経トレーサーであるコレラトキシンサブユニットB (Alexa555) を第一次体性感覚野に注入し、投射細胞が高次運動野のどの層に存在しているかを蛍光観察した。その結果、2/3層、5a層、6層の高次運動野の興奮性神経細胞が投射細胞であることを見出した。

現在、本研究結果に関する論文を作成中である。

研究計画作成時に記載した動物行動課題（体性感覚刺激を手掛かりとした弁別課題）はトレーニング装置の開発、動物トレーニングを開始している。トレーニングを終了したマウスを作成した段階で、神経活動の記録を開始する段階に至っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計6件）

- ① 2013年4月21日 大阪、大阪大学 蛋白質研究所「光の、光による、光のための蛋白質科学」[村山正宜](#)「高次運動野の

入力が体性感覚野と動物行動に与える影響」(口頭)

- ② 2013年3月27日 東京 日本生理学大会、真仁田聡、その他、村山正宜「in vivo マウス脳における皮質間の相互連絡」(ポスター)
- ③ 2012年11月21日 愛知 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会、本間千尋、その他、村山正宜「現実およびバーチャリアリティ空間におけるマウスの肢刺激を手掛かりとした弁別課題の確立」(口頭)
- ④ 2012年10月15日 北米神経科学大会、アメリカ ニューオリンズ、真仁田聡、村山正宜「in vivo マウス脳における単一神経細胞樹状突起からのカルシウムイメージング」(ポスター)
- ⑤ 2012年9月19日 愛知 日本神経科学大会、本間千尋、その他、村山正宜、「現実および仮想現実空間におけるマウスの肢刺激を手掛かりとした弁別課題の確立」(ポスター)
- ⑥ 2012年3月31日 長野 日本生理学大会、本間千尋、山田一之、村山正宜「マウスの肢刺激を手掛かりとした弁別課題の確立」(ポスター)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称:「小動物用実験装置、小動物用実験方法(マウス用可変触覚刺激提示機構付き回転かご実験装置)」

発明者:村山正宜(連絡発明者)、山田一之、本間千尋

権利者:独立行政法人理化学研究所(研究所整理番号24073)

種類:特許法第30条台2項の規定の適用を受けようとする特許出願

番号:特願2013-004053(整理番号:P2012-108)

出願年月日:平成25年1月11日

国内外の別:国際特許分類 A01K 67/00, A01K 15/02, A61D 3/00

6. 研究組織

(1)研究代表者

村山 正宜 (MURAYAMA MASANORI)

独立行政法人理化学研究所・行動神経生理学
研究チーム・チームリーダー

研究者番号:30578901

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし