

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290003

研究課題名(和文) 単一シナプス活動の可視化によるpopulation codingの解析

研究課題名(英文) Population coding of individual synaptic inputs

研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA, Kazuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：60423159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：大脳におけるシナプス入力のパopulation codingを明らかにするために、2光子イメージングによる単一シナプス入力の可視化法を確立した。自発活動および感覚刺激により誘発されるシナプス入力を解析したところ、近傍に位置するシナプスに高い確率で同期した入力が入ることを明らかにした。また、自発入力と感覚シナプス入力は時空間的に類似したパターンを示し、これらの入力パターンが経験依存的に形成されることを示した。さらに、覚醒状態においては、麻酔下と比較してより高い確率で同期入力が観察され、生理的条件下では感覚シナプス入力の時空間パターンが樹状突起における非線形な情報処理に貢献していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the population coding by individual synaptic inputs, we have developed a method for visualizing the activity of single synapse in vivo by using two-photon imaging. We have shown that both spontaneous and sensory-evoked synaptic inputs are synchronized at neighboring synapses, and that spatiotemporal pattern of sensory-evoked synaptic inputs are similar to that of spontaneous inputs. Furthermore, we showed that these pattern of synaptic inputs are shaped by sensory experience during critical period. We also showed that the probability of coincident inputs in awake condition is much higher than that under anesthesia, indicating that the spatiotemporal pattern of synaptic inputs contributes to nonlinear dendritic integration under physiological conditions.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経情報処理 シナプス結合 体性感覚 2光子イメージング

1. 研究開始当初の背景

単一ニューロンにおける情報統合メカニズムについて、シナプス入力強度が樹状突起内の位置によって異なること、樹状突起局所での同期したシナプス入力非線形加重により樹状突起スパイクを発生しうること、これらの現象には樹状突起に存在する受容体やチャネルが積極的に関与していることなどが、脳スライス標本を用いた研究により明らかにされ、個々のニューロンが、単純な線形加算器としてではなく、より複雑な非線形演算を行う高度な演算素子としての性質を持つことが明らかとなっている。しかしながら、このような性質が生理的にどのような意義があるかについては、極めて限定的な知見しかない。これは、生理的に意味のあるシグナル(例えば、感覚情報)が、脳内でどのような時空間分布をもってニューロンに入力しているかを調べる方法がなかったためである。我々が開発した Shadowpatching 法によって、この解析が可能となり、既に他グループにおいても、感覚シナプス入力の可視化に成功している (Jia et al., Nature, 2010; Chen et al., Nature, 2011; Varga et al., PNAS, 2011)。このように、動物個体脳内において、シナプス統合の生理的意義を明らかにするための技術的課題は解決されつつあるが、現時点においては、シナプス入力を可視化できたというだけで、その統合メカニズムと生理的意義については、ほとんど何もわかっていない。そこで本研究では、マウス大脳体性感覚野において、洞毛刺激に対するシナプス入力の時空間パターンを詳細に解析し、入力パターンが洞毛刺激のどのような情報を持っているかを、定量的に明らかにする。

2. 研究の目的

マウス大脳バレル皮質錐体細胞において、2光子イメージングを用いた in vivo ホールセル記録とカルシウムイメージングを行い、個々の感覚シナプス入力、すなわち洞毛からの感覚入力、細胞内および樹状突起内においてどのように分布しているのかを直接可視化する。シナプス入力集団として感覚刺激のどのような情報をコードしているのかを情報理論などを用いて定量的に明らかにする。また、これらの感覚シナプス入力からの脳領域から入力しているかを同定することで、単一ニューロンにおけるシナプス入力を解析して複数の脳領域による感覚情報処理のメカニズムが明らかにできると期待される。

一方、単一ニューロンにおける情報統合メカニズムについて、シナプス入力強度が樹状突起内の位置によって異なること、樹状突起局所での同期したシナプス入力非線形加重により樹状突起スパイクを発生しうること、これらの現象には樹状突起に存在する受容体やチャネルが積極的に関与していることなどが、脳スライス標本を用いた研究に

より明らかにされ、個々のニューロンが、単純な線形加算器としてではなく、より複雑な非線形演算を行う高度な演算素子としての性質を持つことが明らかとなっている。しかしながら、このような性質が生理的にどのような意義があるかについては、極めて限定的な知見しかない。本研究では、洞毛刺激に対するシナプス入力の時空間パターンと活動電位出力の関係を明らかにし、生体内における単一ニューロンの情報統合メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

麻酔下マウス大脳皮質バレル野において、shadowpatching 法(図1)を用いて、ホールセル記録とカルシウムイメージングを同時に行う。脳内の細胞外領域に蛍光色素を導入し、個々のニューロンの「影」を可視化することで、錐体細胞から選択的にホールセル記録を行う。単一スパインの解像度を持つ2光子励起顕微鏡を用い、カルシウム感受性色素および形態観察用色素を同時に電極内液から細胞内に導入することで、個々のスパインの活動と形態を同時に可視化する。

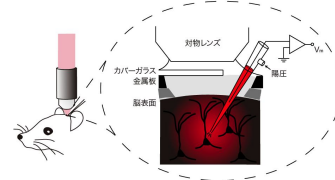


図1. Shadowpatching 法

ホールセル記録された L2/3 錐体細胞を電位固定下で脱分極することにより、個々のシナプス入力を NMDA 受容体を介したカルシウム流入として捉える。スライス標本での研究から、単一シナプス刺激による NMDA 受容体を介したカルシウム流入はスパイン内に限局し、隣接するスパイン間でのクロストークがないことが示されており、観察されたカルシウムシグナルは、単一のシナプス入力由来のものであると考えられる。これまでに、この方法を用いることで、洞毛刺激による感覚シナプス入力および自発ネットワーク活動によるシナプス入力を単一スパインで可視化できることを確認している(図2)。

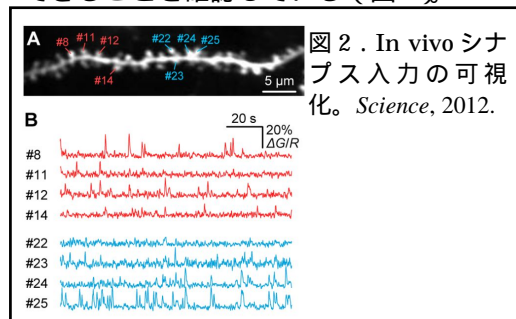


図2. In vivo シナプス入力の可視化。Science, 2012.

このように、単一の感覚シナプス入力を可視化した上で、個々のシナプス入力の性質および、スパイン集団による population coding について解析を行う。

これまでに、自発シナプス入力について、

それぞれ入力頻度が極めて低いこと、近傍に位置するスパインは同期した入力を受ける確率が高いことを明らかにしており (Takahashi et al., 2012)、本研究では、感覚シナプス入力と自発シナプス入力の時空間分布、経験依存的なシナプス入力パターンの形成、および覚醒状態におけるシナプス入力パターンの解析を行なう。

4. 研究成果

in vivo 可視化パッチクランプ法 (shadowpatching 法) を用い、麻酔下マウス大脳パレル皮質 L2/3 錐体細胞において、ホールセル記録とカルシウムイメージングを同時に行った。様々な洞毛刺激 (主洞毛と隣接洞毛、刺激方向、刺激頻度、刺激強度) を与えた時に、錐体細胞の樹状突起において、感覚シナプス入力がかかるような時空間分布で入力するかをカルシウムシグナルとして単一スパインレベルで可視化した。自発シナプス入力については、樹状突起局所の近傍に位置するスパインに同期した入力がある確率が高いことをすでに示していたが (Science, 335, 353-356, 2012)、感覚シナプス入力についても近傍のスパインで同期入力の確率が高いことが明らかになった。また、自発シナプス入力、感覚シナプス入力ともに、ごく一部のスパインに大部分の入力が集中していることが明らかとなり、各スパインにおいて、自発シナプス入力頻度と感覚シナプス入力頻度に正の相関が見られた。さらに、多次元尺度構成法を用いてシナプス入力の空間パターンを詳細に解析したところ、自発シナプス入力パターンと感覚シナプス入力パターンの間に高い類似性を見出した。これらの結果は、感覚情報は神経回路が内在的に持つ活動パターンを用いて表現されていることを示唆している。これらの実験をさらに効率的に、再現よく行うために、高感度カルシウムプロベタンパク質を用いた実験系の導入を行った。高感度カルシウムプロベタンパク質をコードするウイルスベクターを大脳皮質に注入することで、少数のニューロンにプロベを発現させ、自発シナプス入力および感覚シナプス入力を再現よく観察できることを確認した。

また、感覚情報がこのような精緻な回路によって処理されていることから、感覚経験に依存した過程、すなわち経験依存的可塑性によってシナプス入力のクラスター化が形成されると考えられる。そこで次に、感覚遮断によってこのシナプス入力様式がどのように変化するかを解析したところ、感覚遮断した動物では、正常な感覚経験をした動物と比べて、離れたスパインでも同期した入力を受けることが明らかとなった。感覚遮断により、皮質の機能マップが障害されることが知られていることから、入力のクラスター化が正常な感覚マップの形成に重要であることが示唆される。

これまでの実験は、技術上の制約から全て麻酔下の動物で行ってきたが、脳の活動状態は覚醒時と麻酔下では大きく異なるため、察結果が麻酔下特有の現象である可能性も否定できない。そこで、次に、覚醒状態のマウスにおいてもシナプス入力を可視化できる実験系の確立を目指した。これまで、ホールセル記録下でイメージングを行っていたが、覚醒状態では体動などで長時間の記録を保持することが困難なため、最近開発された新しい高感度のカルシウムセンサータンパク質を用いて、ホールセル記録すること無くシナプス入力を可視化する実験系を確立した。高感度カルシウムセンサー-G-CaMP をアデノ随伴ウイルスまたは DNA の子宮内エレクトロポレーションにより大脳皮質第 2 / 3 層錐体細胞に導入し、樹状突起のカルシウムイメージングによりシナプス入力を可視化できることを確認した。このカルシウムセンサーを導入したマウスを用いて、覚醒状態で 2 光子顕微鏡下に頭部固定し、自発活動および感覚刺激によるシナプス入力を可視化した。その結果、覚醒状態においても感覚刺激に応答して近傍のスパインに同期した入力があることが明らかとなった。その後、同じ樹状突起を麻酔下で観察したところ、覚醒状態で高頻度に感覚入力を受けていたスパインにおいても入力頻度が減少し、その結果、同期入力確率も減少することが明らかとなった。したがって、これまで麻酔下で観察されていた以上に覚醒状態では入力頻度、同期入力確率も高くなっており、生理的な条件下では、感覚シナプス入力の時空間パターンが樹状突起における非線形情報処理に貢献していることが予想される。

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 11 件)

- (1) Tsutsumi S, Yamazaki M, Miyazaki T, Watanabe M, Sakimura K, *Kano M, *Kitamura K: Structure-function relationships between aldolase C/zebrin II expression and complex spike synchrony in the cerebellum. *J Neurosci* 35, 843-852 (2015). 査読有
- (2) Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, *Nakai J, *Kitamura K, *Bito H: Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat Methods* 12, 64-70 (2015). 査読有
- (3) Tada M, Takeuchi A, Hashizume M, *Kitamura K, *Kano M: A highly

- sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Neurosci* 39, 1720-1728 (2014). 査読有
- (4) Kawamura Y, Nakayama H, Hashimoto K, Sakimura K, *Kitamura K, *Kano M: Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fibre inputs to Purkinje cells during cerebellar development. *Nat Commun* 4, 2732 (2013). 査読有
- (5) Hashizume M, Miyazaki T, Sakimura K, Watanabe M, *Kitamura K, *Kano M: Disruption of cerebellar microzonal organization in GluD2 (GluR 2) knockout mouse. *Front Neural Circuits* 7, 130 (2013). 査読有
- (6) Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Okuno H, Ohki K, *Bito H: Functional labeling of neuronal ensemble and axonal projections in vivo using a synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nat Methods* 10, 889-895 (2013). 査読有
- (7) *Kitamura K, Kano M: Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. *Neural Networks*, 47, 11-17 (2013). 査読有
- (8) Ikezoe K, Mori Y, Kitamura K, Tamura H, *Fujita I: Relationship between the local structure of orientation map and the strength of orientation tuning of neurons in monkey V1: a 2-photon calcium imaging study. *J Neurosci* 33, 16818-16827 (2013). 査読有
- (9) Masamizu Y, Tanaka YR, Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, *Matsuzaki M: Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci* 17, 987-994 (2014). 査読有
- (10) *Kano M, Nakayama H, Hashimoto K, Kitamura K, Sakimura K, Watanabe M: Calcium-dependent regulation of climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J Physiol* 591, 3151-3158 (2013). 査読有
- (11) Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, *Bito H: Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII and calcineurin. *Cell Rep* 3, 978-987 (2013). 査読有
- [学会発表](計 19 件)
- (1) Tsutsumi S, Hidaka N, Isomura Y, Matsuzaki M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K: Differential learning related changes in climbing fiber inputs to cerebellar stripes. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日～24 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- (2) Choo MJ, Hira R, Matsuzaki M, Kano M, Kitamura K: Optogenetic mapping of cerebro-cerebellar communication loop in mice. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日～24 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- (3) Kitamura K: Functional organization of cerebellar modules during skilled behavior. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日～24 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- (4) Inoue M, Takeuchi A, Horigane SI, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H: Rational design of ultrafast, high-affinity red calcium indicator for monitoring neuronal activity. Neuroscience 2015, 2015 年 10 月 17 日～21 日. Chicago (USA).
- (5) Inoue M, Takeuchi A, Horigane SI, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H: Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 28 日～31 日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- (6) Hoang HT, Tsutsumi S, Hashizume M, Yamashita O, Tokuda IT, Sato M, Kawato M, Kano M, Kitamura K, Toyama K: Identification of complex spikes in two-photon recording of Purkinje cell calcium responses by machine learning and ROC analysis of the performance. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 28 日～31 日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- (7) 喜多村和郎: In vivo 光学イメージングと電気生理学の融合. 第 38 回日本神経科学大会 (教育講演) 2015 年 7 月 28 日～31 日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- (8) Kitamura K, Kano M: Experience-

- Dependent Clustering of Sensory Synaptic Inputs in the somatosensory cortex. 第 92 回日本生理学会大会 2015 年 3 月 23 日 . 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- (9) Kitamura K: Two-photon imaging of neural activity at single neurons and single synapses: Optical physiology in vivo. 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 12 日 . パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (10) Takeuchi A, Tada M, Hashizume M, Kitamura K, Kano M: Highly sensitive calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo with a new fluorescent calcium indicator, Cal-520. 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11 日 . パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (11) Kitamura K, Kano M: Sparse and heterogeneous organization of sensory inputs in layer 2/3 of mouse barrel cortex. Neuro 2013. 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日 . 京都国際会館 (京都府・京都市)
- (12) Tsutsumi S, Tada M, Sakimura K, Kitamura K, Kano M: Synchronous climbing fiber responses correlated with the aldolase C compartments in mouse cerebellar cortex. Neuro 2013. 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日 . 京都国際会館 (京都府・京都市)
- (13) Good JM, Miyazaki T, Kitamura K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Postnatal desynchronization of climbing fiber responses in Purkinje cell populations of the developing cerebellum. Neuro 2013. 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日 . 京都国際会館 (京都府・京都市)
- (14) Kawamura Y, Nakayama H, Hashimoto K, Sakimura K, Kitamura K, Kano M: Selective strengthening of single climbing fiber inputs to Purkinje cells during postnatal cerebellar development in vivo. Neuro 2013. 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日 . 京都国際会館 (京都府・京都市)
- (15) Tsutsumi S, Yamazaki M, Miyazaki T, Watanabe M, Sakimura K, Kitamura K, Kano M: Fine scale correspondence between the cerebellar microzones and the aldolase C compartments in mice. Neuroscience2013 2013 年 11 月 9 日 ~ 13 日 . San Diego (USA).
- (16) Hashizume M, Miyazaki M, Sakimura K, Watanabe M, Kitamura K, Kano M: Impairment of cerebellar microzonal organization by aberrant climbing fiber to Purkinje cell wiring in

GluR 2 (GluD2) knockout mouse. Neuroscience2013 2013 年 11 月 9 日 ~ 13 日 . San Diego (USA).

- (17) 喜多村和郎: 光で探る脳のはたらき ~ シナプスから回路へ ~. 量子エレクトロニクス研究会 2013 年 12 月 20 日 . 上智大学軽井沢セミナーハウス (長野県・北佐久郡)
- (18) 喜多村和郎: 小脳皮質回路の機能構築と運動制御・運動記憶 . 第 2 回記憶回路研究会 . 2013 年 12 月 11 日 . 生理学研究所 (愛知県・岡崎市)
- (19) 喜多村和郎: 光で探る脳の活動 ~ シナプスからニューロンまで ~ 第 22 回日本バイオイメーキング学会学術集会公開講座 (招待講演). 2013 年 9 月 14 日 . 東京大学 (東京都・文京区)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA, Kazuo)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号 : 60423159

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし