

# 研究報告書

## 「感覚情報をコードする局所神経回路の機能構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 喜多村 和郎

### 1. 研究のねらい

脳情報処理の基盤となる局所神経回路に関して、ハードウェアとしてのニューロン間の結合様式の詳細はさかんに研究されている一方で、その脳内におけるはたらきについての理解はあまり進んでいない。本研究では、最新の 2 光子カルシウムイメージング技術を駆使することで、個体脳(in vivo)の体性感覚皮質において、単一ニューロンにおけるシナプス統合と局所神経回路における感覚情報表現との関係を 1 シナプス・1 ニューロンレベルの空間解像度で明らかにする。また、神経活動依存的に蛍光タンパク質を発現するマウスを用い、協調的にはたらくニューロン集団(セルアセンブリ)を脳内で直接可視化する。このような機能的局所回路の安定性、および感覚遮断等の入力変調で誘発される神経回路の再編成を同一個体で経時的に可視化することで、感覚皮質における機能的局所神経回路の構築原理に迫る。これらの研究を通して、ブレイン・マシンインターフェース(BMI)技術に不可欠な、皮質局所回路の機能構築に関する核心的な知見を提供する。

脳情報を解読するためには、神経情報処理を担う主役である個々の神経細胞(ニューロン)のはたらきを理解すると同時に、それらが形成するネットワークが符号化する情報を明らかにすることが必須である。本研究では、マウス体性感覚皮質をモデルとして以下の項目について研究を行う。1) 単一ニューロンにおいて個々の感覚シナプス入力を可視化し、樹状突起局所における演算様式を明らかにする。2) 局所神経回路の活動をシナプス応答と同時に可視化する技術を開発し、一つ一つのニューロンが行う情報処理(シナプス統合)と局所神経回路の情報表現の因果関係を明らかにする。

次に、高い神経活動を示すニューロンのマーカーである前初期遺伝子の発現によって蛍光タンパクを発現するマウスを用いて、2 光子イメージングを行い、3) 基底状態における活動性の高いニューロン集団の安定性、4) 感覚遮断等による機能的局所神経回路の再編成について検討する。内因性の機能的局所神経回路の存在とその外攬に対する柔軟性／堅牢性を定量的に明らかにすることで、脳情報処理の基盤をなす局所神経回路の機能構築に迫る。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

脳内におけるシナプス入力の統合メカニズムを明らかにする目的で、ホールセルパッチクランプ記録と 2 光子イメージングを用いた、単一シナプス入力可視化法を開発した。開発した方法を用いて、マウス大脳皮質体性感覚野の第 2/3 層のニューロンにおいて、自発活動およびひげ刺激によるシナプス入力があるような時空間分布を示すかを解析した。自発活動およびひげ刺激による誘発活動によるシナプス入力は非常にスパースである一方、個々のシナプ

ス入力は、樹状突起上で時空間的に不均一な入力分布を示し、大多数の感覚入力はごく限られたスパインに入力していることが明らかとなった。さらに、樹状突起上で近傍に位置するスパインは、同期したシナプス入力を受ける確率が高いことを明らかにした。これらの結果は、機能的に結合しているか共通入力を受けるニューロン集団が、後シナプスニューロンの樹状突起上で近くに結合しているということを示している。このような、近傍のシナプスにおける同時入力は、効率的な感覚情報の統合に寄与していると考えられる。

さらに、自発活動によるシナプス入力パターンと感覚シナプス入力パターンの関係を詳細に調べたところ、スパイン毎に自発入力頻度と感覚入力頻度に正の相関が見出された。また、スパイン間で活動の時間パターンを比較したところ、自発入力と感覚入力で極めて類似性が高いことが明らかとなった。次に、自発入力と感覚入力の空間パターンを多次元尺度構成法により解析したところ、感覚入力パターンは自発入力パターンに含まれることがわかった。これらの結果は、自発入力と感覚入力の時空間パターンには高い類似性があり、神経回路が自発的に生み出す活動パターンの一部もしくは組合せによって、感覚情報がコードされていることを示唆している。

また、神経活動を示すニューロンのマーカーである前初期遺伝子の発現によって蛍光タンパクを発現するマウスを用いて、2光子イメージングとパッチクランプ記録を行い、前初期遺伝子の発現が高いニューロンは全ニューロンのうちのごく一部であり、前初期遺伝子の発現と感覚入力頻度の間に高い相関があることを明らかにした。

これらの本研究で得られた結果を総合すると、感覚情報は脳内においてごく一部の活性の高いニューロン集団が、極めて緻密なシナプス結合パターンを形成することでできる局所神経回路によって処理されているということを示している。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「シナプス入力可視化法の開発」

脳内において、感覚入力が一ニューロンにどのような時間的、空間的な分布で入力するのかを明らかにするために、2光子カルシウムイメージングとホールセルパッチクランプ記録を用いて、一つ一つのシナプス入力を樹状突起局所で直接可視化する方法を開発した。具体的には、シャドウパッチング法 (Kitamura et al., 2008) を用いて、マウス体性感覚野第2/3層ニューロンからホールセルパッチクランプ法により記録を行い、ニューロンを電位固定下で脱分極させ、個々のシナプス入力をカルシウムシグナルとして検出した。この方法により、感覚シナプス入力を単一スパインレベルで高感度に検出することを可能にした(図1)。また、自発シナプス入力について、樹状突起上で近傍に位置するスパインは、同時に入力を受ける確率が高いことを明らかにした (Science, 2012)。

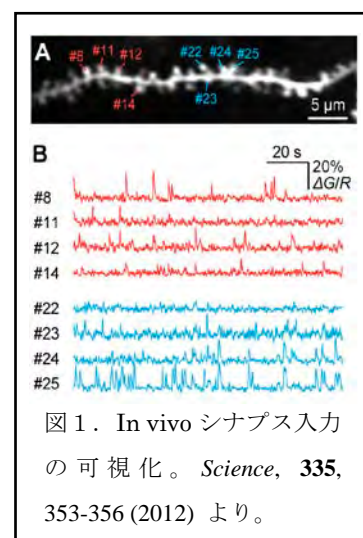


図1. In vivo シナプス入力の可視化。Science, 335, 353-356 (2012) より。

### 研究テーマB 「単一ニューロンにおける自発および感覚シナプス入力の時空間分布」

マウス体性感覚野第2/3層ニューロンにおいて、自発シナプス入力と感覚シナプス入力の時空間パターンについて詳細な解析を行った。自発入力、感覚入力ともに非常に低頻度(自発:  $0.034 \pm 0.002$  events/s、感覚:  $0.094 \pm 0.007$  events/stim.)、図2A, B)で、かつ、不均一な入力分布を示した。特に、感覚入力については、約75%の入力が25%のスパインに入力していることを明らかにした(ジニ係数=

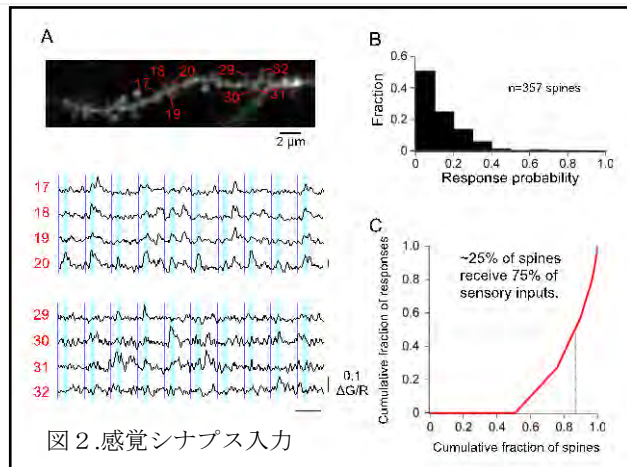


図2.感覚シナプス入力

0.66、図2C)。また、自発入力と同様、近傍に位置するスパインほど同期したシナプス入力を受ける確率が高く、機能的に結合しているか共通入力を受けている入力ニューロン集団が、

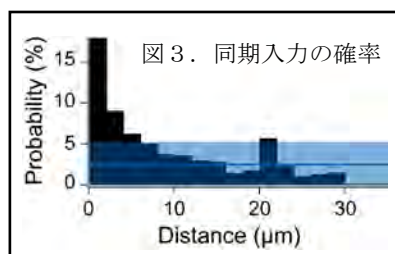


図3.同期入力の確率

樹状突起局所にシナプス結合を形成していることが示唆され、空間的に極めて緻密な回路が形成されていることが明らかとなった(図3)。次に、自発入力と感覚入力の間にはどのような関係があるかを、個々のスパインレベルで比較した。まず、スパイン毎の自発入力頻度と感覚入力頻度を比較したところ、正の相関が見られ、

より多く自発入力を受けるスパインは感覚刺激に対してもより反応しやすいことが分かった。また、同時に観察した全てのスパインペアについて反応のペア相関を計算し、自発入力と感覚入力によく似たパターンであることが示唆された。入力の空間パターンの類似性を検討するために、多次元尺度構成法を用いた比較を行った。その結果、感覚入力パターンは自発入力パターンと同じかその一部であることが明らかとなった(図4)。すなわち、感覚刺激の情報は、神経回路自体により生成される自発活動パターンの一部もしくはその組合せによって表現されていることを示唆している。

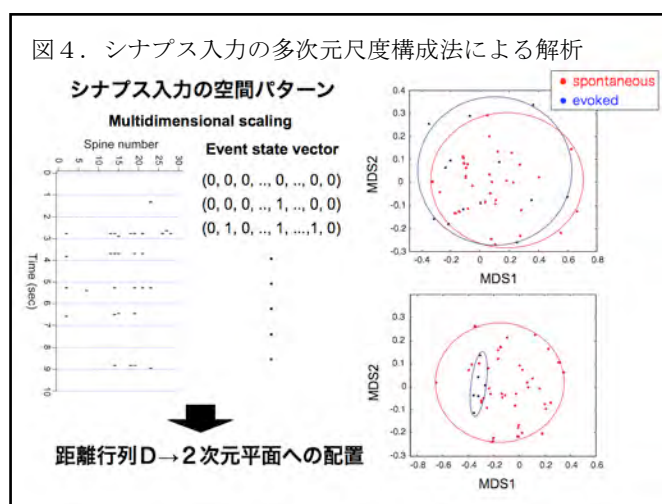


図4. シナプス入力の多次元尺度構成法による解析

#### 研究テーマC「機能的局所回路可視化」

ニューロンの活動依存的に発現する前初期遺伝子をマーカーとして、生体内で機能的局所神経回路を可視化することを可能にしたマウスを用いて、体性感覚野第2/3層において活動性が高いと考えられるニューロンのスパイク活動を計測した。自発活動については、前初期遺伝子の発現の有無によらず同程度であったのに対し、感覚刺激応答は前初期遺伝子を



発現しているニューロンのほうが有意に高い反応性を示した。すなわち、このマウスを用いることで、感覚情報処理に関与している局所神経回路の動態を追跡できることが示された。

### 3. 今後の展開

さきがけ研究として行った研究結果をふまえ、今後、以下の2つの方向へと研究を展開する。

#### (1) 個体脳における単一ニューロンのシナプス統合メカニズムの解明

本研究では、シナプス入力のみを可視化した、それらが統合された結果として出力にどのような影響を与えるかを明らかにする。特に、同期入力を受ける局所的なシナプスクラスターが、ニューロンの活動電位出力に寄与するかどうか、入力部位の細胞内における位置によって出力に与える影響が異なるかどうか等について定量的な計測とモデル計算を組み合わせることで明らかにする。また、入力線維を解剖学的に同定した上でオプトジェネティクスによってこれらの線維を賦活し、感覚シナプス入力パターンと比較することで、樹状突起局所における活動がどのような神経回路によって駆動されているのかを明らかにする。これにより、体性感覚野の単一ニューロンにおける感覚情報処理の全貌を明らかにする。

#### (2) 覚醒マウスにおけるシナプス入力の可視化

本研究はすべて麻酔下の動物において実験を行っているが、同じ実験方法を用いて覚醒マウスにおけるホールセル記録を安定に行うことが可能となっており、今後は、覚醒状態で能動的な感覚受容を行っているマウスにおけるシナプス入力の統合メカニズムについて解析を進める。

### 4. 自己評価

生体内におけるシナプス統合メカニズムと局所神経回路機能の関係を明らかにすることを最終目標として、2光子イメージングとホールセル記録を組み合わせた、新しい記録法の開発を行った。その結果、*in vivo* において一つ一つのシナプス入力を可視化することを可能にし、感覚情報の入力様式や自発入力と感覚入力の時空間パターンの相違を明らかにすることができたことは、一定の成果を達成することができたと思う。

本研究課題の最終目標である、動物個体脳内におけるシナプス統合メカニズムと局所神経回路機能の解明については、ようやくその研究の端緒を開いたところであるが、さらなる研究の継続によって、脳内における感覚情報処理の全体像をそう遠くない将来に明らかにすることができると期待される。

### 5. 研究総括の見解

課題目標は達成された。高解像度の2光子カルシウムイメージング技術を駆使して、自発活動／感覚活動時の神経回路の特性を解明し、機能構築を明らかとしたが、この成果はマクロなレベルでの脳イメージング知見の基盤的メカニズムを示し、BMIの今後の展開のため、不可欠な基礎を与えるものとして高く評価される。

脳活動はニューロン上に存在するシナプスを通じた相互情報交換に基づく。本研究では、シナプスレベルでの活動を判別できる高い空間解像度を持つ最新の2光子カルシウムイメージング技術を駆使、シナプスレベルでの神経活動を可視化し、局所神経回路における感覚情報表現を明らかにした。さらに、神経活動依存的に蛍光タンパク質を発現するマウスを用い、協調的に働くニューロン集団を脳内で直接、可視化した。究極的には、機能的局所回路の安定性、および感

覚遮断等の入力変調で誘発される神経回路の再編成を同一個体で経時的に可視化することで、感覚皮質における機能的局所神経回路の構築原理に迫ることが可能である。

本研究では、大多数の感覚入力は、ニューロン上で、各々ごく限られた部位に固まって入力し、また、互いに近傍に位置するシナプスは、同期した入力を受ける確率が高いことを明らかにした。ニューロンの電気的性質を考慮すると、この配置は、効率的な感覚情報の統合に寄与する。一方、自発活動／感覚刺激時でニューロンへの入力パターンを詳細に調べると、各々のシナプスで自発活動／感覚刺激時の活動頻度に正の相関がみられ、また、時間パターンについても類似性が高いことが明らかとなった。この空間パターンを多次元尺度構成法により解析したところ、感覚入力パターンは自発入力パターンに含まれた。一方、前初期遺伝子発現によって蛍光タンパクを発現するマウスを用い、2光子イメージングとパッチクランプ記録を行った結果、前初期遺伝子の発現と感覚入力頻度の間に高い相関が示された。これらをまとめると、感覚情報は脳内においてごく一部の活性の高いニューロン集団が形作る極めて緻密なシナプス結合パターンを形成する局所神経回路によって処理される。

脳イメージング研究で近年、自発脳活動が基底的な脳活動パターンを形成し、脳機能に重要な寄与をなすこと、これらの基底脳活動パターンは個体発生の過程で形成されることが提案されているが、この結果は、その基盤的なメカニズムを明らかにする可能性を持つ点で特に興味深い。脳の自発活動を考慮に入れた BMI 技術は近年、成果を上げつつあり、このような BMI の基盤の解明により、更なる技術的革新が齎されることが期待される。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Kitamura, K. & Kano, M.: Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. Neural Networks, published online (2012). doi: 10.1016/j.neunet.2012.08.001                                       |
| 2. Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N. & Ikegaya, Y.: Locally synchronized synaptic inputs. Science 335, 353–356 (2012).                                       |
| 3. Kitamura, K. & Häusser, M.: Dendritic calcium signaling triggered by spontaneous and sensory-evoked climbing fiber input to cerebellar Purkinje cells in vivo. J. Neurosci. 31, 10847–10858 (2011). |

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表

1. 喜多村和郎: 生体内2光子イメージングによる単一ニューロン・単一シナプスの活動計測. 第2回睡眠研究会, 2012.7.5. 名古屋.
2. 喜多村和郎: 大脳皮質における感覚シナプス入力の可視化. 生理研研究会「シナプス可塑性の動作原理～分子から行動まで～」2012.6.14. 岡崎.
3. 喜多村和郎: 生体内における神経活動の2光子イメージング. 日本顕微鏡学会第68

回学術講演会, 2012.5.16. つくば.

4. 喜多村和郎: Two-photon imaging of neuronal population activities in cerebellar cortex. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13. 横浜.
5. Kitamura, K.: Heterogeneous organization of sensory synaptic inputs in the mouse barrel cortex. 生理研国際研究集会, 2011.12.9. 岡崎.
6. Kitamura, K.: Two-photon imaging of Purkinje cell dendritic activity in vivo. 8th IBRO World Congress of Neuroscience. (Florence, Italy) 2011.7.16.
7. 喜多村和郎: 生体内における神経活動の2光子イメージング. 第5回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 2010.5.22. 大津.
8. 喜多村和郎: 小脳シナプス回路の in vivo 解析. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010.3.30. 盛岡.
9. 河村吉信、中山寿子、喜多村和郎、狩野方伸: 発達期小脳における神経回路形成の in vivo 解析. 生理学研究所研究会「大脳皮質局所回路の機能原理」, 2009.11.19. 岡崎.
10. 喜多村和郎: 覚醒個体脳におけるホールセル記録と2光子イメージング. 第 47 回日本生物物理学会年会シンポジウム, 2009.11.1. 徳島.

#### 受賞

平成 22 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞 平成 22 年 4 月 13 日

#### 著作物

1. 喜多村和郎: in vivo イメージング. 脳神経科学イラストレイテッド(改訂第3版), 第8章, in press (2013).
2. Kitamura, K.: Two-photon targeted patch-clamp recordings in vivo. Patch Clamp Techniques, Springer Protocols Handbooks, 183–193 (2012).
3. 喜多村和郎, 橋本浩一, 狩野方伸: 小脳プルキンエ細胞樹状突起活動の in vivo イメージング. 生体の科学, 63(1), 26–33 (2012).
4. 喜多村和郎: In vivo イメージングパッチクランプ法. 最新パッチクランプ実験技術法 (岡田泰伸 編, 吉岡書店) 第 12 章 (2011).