

研究報告書

「高次脳機能情報処理の再構成に向けた恐怖記憶の読み取りと操作」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 揚妻正和

1. 研究のねらい

大脳皮質は、知覚、随意運動、思考、記憶など、様々な脳の高次機能を担っており、これまでに広く研究の対象とされてきた。脳機能とそれに伴う情報処理機構を理解する上で、そこで働く遺伝子を理解しただけでは不十分であり、個々の細胞レベルでの理解に加え、神経「群」としてのレベルで理解することが必要である。本研究では、光学的アプローチによる神経群活動の「観察」・「制御」を行い、大脳皮質に保存された恐怖記憶を、強制的に読み出す、すなわち人工的に恐怖反応を「再構築」する。そこから大脳皮質による高次脳機能達成における「最小構成単位」を導き出し、集積回路としての大脳皮質神経回路網の仕組みについて、新たな理解と提案を行う。これにより、大脳皮質情報処理機構に関する研究分野全体の加速を促し、脳機能の再構成と理解をすすめる。また、恐怖やストレスに関する研究という点で医療への応用にもつなげていく。

2. 研究成果

(1) 概要

本課題遂行に際し、さまざまな光学系の開発・改良を進め、より高精度な観察・操作が可能となった。新たな顕微鏡、センサーの導入により、従来よりも高時間分解能なイメージングが可能となった。加えて、対物レンズを介した光遺伝学的制御システムの構築により、安定的・定量的な神経活動操作が可能となった。

また恐怖記憶を評価するために、頭部固定による2光子顕微鏡下での擬似自由行動を可能とし、さらには行動観察のシステムも進めた。遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能である。これにより、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定が可能となった。

得られたデータの解釈に関しても様々な技術の導入を進め、局所回路内における多数の神経細胞がどのように集団として活動するかについて新たな知見を得ることが出来た。新たな共同研究を介して、情報論的な解析手法、さらには機械学習による神経活動の読み取り技術の導入も可能となった。

(2) 詳細

本研究では、以下の目標を設定し、研究を進めてきた。モデル動物であるマウスを用いて、

(A) 光イメージング技術による複数の神経からの同時活動記録と、(B) 光遺伝学的な活動制御法による抑制性神経の役割の検証を通じ、恐怖記憶制御における「最小構成単位」を導き出す。そして、(C) それに基づいた神経活動パターンの再現を行い、動物行動を再構築する。

研究テーマ A 「*in vivo* 光神経活動イメージングによる複数の神経細胞からの活動記録」

＜A-1＞ 二光子レーザー顕微鏡による神経活動イメージング

本研究では、最新の深部イメージング技術を利用することで、二光子レーザー顕微鏡による内側前頭前皮質からの *in vivo* 神経活動イメージングを行った。レゾナントスキャナー搭載型の顕微鏡の導入により、高速な計測を実現した。さらに、低倍率・高 NA の対物レンズの導入により、広視野からの観察とそれによるより多くの神経細胞からの同時観察を可能とした。神経活動の観察には、それに伴ってカルシウム濃度が上昇することを利用し、カルシウム濃度依存的に蛍光強度の変化を示すタンパク質プローブを用いた。その発現には、アデノ随伴ウイルスを利用した手法により、観察部位にのみ特異的な発現を可能とした。

＜A-2＞ マウス恐怖条件付けと、それに伴った神経活動の記録

内側前頭前皮質において、学習依存的な恐怖反応に伴った神経活動の観察を行った。実際の観察においては、頭部を顕微鏡対物レンズの下に固定し、非麻酔下のマウスにおける、学習に伴った神経活動パターンの変化を観察した。遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能である。これにより、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定が可能となった。その結果、条件刺激により誘発される神経群の活動性・情報処理様式について様々な興味深い変化が観察された。現在はそれらの結果をまとめるべく、サンプル数を揃えたと共に、より詳細な解析を進めている。

研究テーマ B 「光遺伝学的手法による抑制性神経の役割の評価」

上記神経活動の観察と過去の知見より、学習における抑制性神経の役割を推察し、光遺伝学的操作によってその役割を検証することを目指す。抑制性神経は、パルブアルブミン (PV) 陽性神経やソマトスタチン (SOM) 陽性神経など、異なる分子マーカーによってサブタイプごとに分類され、それぞれ異なる生理学的性質や、投射先を持つ。そこで、すでに広く用いられている PV-Cre 系統とよばれるトランスジェニックマウスと、lox 配列によってはさまれた逆向きの ArchT 配列を持つアデノ随伴ウイルスを入手し、部位とサブタイプの両方に特異的な ArchT の発現を可能とした。二光子励起によって神経活動イメージングを行いながら、同時に LED による抑制性神経の活動抑制をすることで、サブタイプごとの役割を調べる系を確立した。光刺激に際しては、2 光子顕微鏡の対物レンズを介した光刺激の光学系の開発を行うことで、より安定的・定量的な神経活動操作が可能となった。その結果に関するデータは、現在解析中である。

研究テーマ C 「SLM による神経群活動パターンの再構築と、それによる恐怖記憶の読み出し」

上述の実験で得られた情報を元に、光学的技術による単一神経レベルの解像度での複数の神経同時活性化(活動パターンの再現)を実現し、脳からの記憶の「読み出し」、すなわちマウス個体で人工的に恐怖反応を生み出させることを目標とし準備を進めてきた。一方、研究テーマ A において、神経活動は非常に多彩な変化を遂げることが観察され、記憶の読み出し

を進める前に、どのような神経活動の再現が行動の再構成に必要であるかを十分に絞ることが重要であることが示された。そこで現在は、情報論的な方法を導入することで、その多彩な変化の中から記憶をコードするために重要な要素の選別を進めている。そして今後それを明らかにした後、光遺伝学と SLM (spatial light modulator) と呼ばれるシステムによる任意に選択した神経のみの活性化、あるいは光を全体に照射しながらの非特異的な活性化を行い、神経活動パターンの再現を進めていく。

3. 今後の展開

前述の結果に関しては早急に論文にまとめて行く計画である。一方で、イメージングによって予想していた以上に非常に多くの仮設が提示される結果となり、多くの重要な知見が得られつつある半面、再構成系によってこれらの仮説を検証する前に、さらに洗練した情報論的な解析を推進して行くことが必須であることが明らかとなった。あらたな解析手法の確立とそこから導き出される結果をもとに、今後は光遺伝学的神経活動操作による仮説の検証へとつなげて行く。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

実験に関しては概ね計画通りに進んだと考えている。本研究課題の実施に当たり、システムの購入・構築から細かい実験器具の準備にいたるまですべて新規に開始したため、なかなか思い通りに行かないこともあった。三年という限られた期間の中でのプレッシャーはしかしながら、結果として研究全体としては促進の方向につながったと捉えている。例えば、新たなプログラミング言語を比較的短期間で習得せざるを得なかったこと、必要かつ未開発のものは自力で創作するしかない状況、一人という限られた労働力の中で必要なものに焦点を絞った研究計画を立てる必要があったなど、これからの研究生活を考えた上で考えさせられることも多く、非常に貴重な経験となった。今後、既存の技術や概念にとらわれることなく、必要であれば精力的に新規システムを構築して行くことにもつながると考えている。そしてまた、その成果を示すためにも、できるだけ早く論文化することが必須だと考えている。

また、イメージングによって、予想していた以上に非常に多くの仮設が提示される結果となった。多くの重要な知見が得られつつある半面、生命現象の理解という観点で考えると、再構成系によってこれら仮説をやみくもに検証するのではなく、さらに洗練した情報論的な解析を推進し、そこから論理的に絞られた仮説を検証することが必須である。今後はこの「情報論的な解析からの仮説絞込みと、そこからの仮説依存的構成的アプローチ」の流れを確立することで、他の脳研究を含む広い研究分野へのまさに「さきがけ」となるような潮流を生み出していきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

レゾナンスキャナー搭載型の顕微鏡の導入により、高速な計測を実現し、低倍率・高NAの対物レンズの導入により、広視野からの観察とそれによるより多くの神経細胞からの同時観察に

成功した。また、遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能となり、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定を可能にした。このような成果から、条件刺激により誘発される神経群の活動性・情報処理様式について様々な興味深い変化の観察ができるようにしたことは、高く評価できる。恐怖だけではなく様々な高次脳機能へとアプローチするチャンスが拡大したことは大きな成果である。なお、さががけ個人研究を文字通り一人で取り組み、着実に進めたことを特記しておきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Karnani M., Agetsuma M., Yuste R.: A Blanket of Inhibition: Functional Inferences from Dense Inhibitory Connectivity. *Current Opinion in Neurobiology* (2014) 26, 96-102 (表紙に選出)

(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)

著作物

1. 揚妻正和: オプトジェネティクスー高次脳機能情報処理機構の理解へ向けて 「生体の科学(特集「生命動態システム科学」)」, Vol.65 No.5 p518-519(2014)

学会発表

1. Society for Neuroscience annual meeting 2016(2016)
2. 生理学研究所 研究会「生体多元シグナルダイナミクスの計測と操作」(2016)
3. 第 39 回日本神経科学大会(2016)
4. Cold Spring Harbor Laboratory meeting “Neural Circuit 2016”(2016)
5. バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2015(2015)
6. 第 37 回日本神経科学学会(2014)
7. 79th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology –Cognition (2014)
8. Society for Neuroscience annual meeting 2013(2013)