

研究報告書

「抑制系による大脳皮質神経回路網の動作制御機構の解明 ー機能イメージングと光刺激法の併用による解析ー」

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: 惣谷 和広

1. 研究のねらい

大脳皮質神経回路網における抑制性ニューロン(GABA ニューロン)の機能は、単に神経回路網の活動レベルを抑制するだけでなく、興奮性ニューロンの特徴選択的な情報処理や生後発達初期の感受性期における神経回路網の改変に重要な役割を果たすことが想定されている。しかし、これらの想定は、少数のニューロンの活動様式から神経回路網全体の活動を類推する方法や特定の興奮性或いは抑制性シナプス機能の観察に基づいたものであり、GABA ニューロンは神経回路の 3 次元空間でどのように配置され、その作用はどの程度の広がりを持つのかなど、重要な疑問は未だ解明されていない。

そこで本研究課題では、GABA ニューロン活動の特徴や興奮性ニューロンに対する作用および各々の細胞活動による可塑的な変化などを時空間的に同時に記録・解析し、大脳皮質神経回路機能における抑制系の役割の解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

大脳皮質神経回路網は、主に末梢の感覚受容器によって受容された情報を興奮伝達する興奮性ニューロンと抑制作用によってその情報伝達を動作制御する抑制性ニューロン(GABA ニューロン)、大脳皮質内の恒常性維持を担っていると考えられているグリア細胞から成っている。

その中で、GABA ニューロンの機能は、単に神経回路網の活動レベルを抑制するだけでなく、興奮性ニューロンの特徴選択的な情報処理や生後発達初期の感受性期における神経回路網の改変に重要な役割を果たすことが想定されている。しかし、GABA ニューロンが3次元空間の神経回路網内にどのように分布し、その作用はどの程度の広がりを持つかなど、大脳皮質神経回路網動作原理における抑制系回路の構造と機能に関する重要な問題は、未だ解明されていない。そこで、本研究では、*in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を用いて、神経回路網の「構造と機能」という視点からマウス大脳皮質一次視覚野神経回路網内の GABA ニューロンの機能解析を行い、抑制系による大脳皮質神経回路網の動作制御機構に関する研究を行った。

(2) 詳細

(1) マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における興奮性ニューロン群と GABA ニューロン群間に見出された眼優位性の違い

マウス大脳皮質一次視覚野には、同側と反対側の両眼に対する視覚刺激に応答するニュー

ーロンが存在する両眼反応性領域があることが知られており(Gordon JA and Stryker MP. 1996, J Neurosci.), その応答の割合は、眼優位性と呼ばれている。しかしながら、興奮性ニュー

ーロンGABAニューロンの眼優位性の違いについては、今まで全く調べられてこなかった。その理由は、GABAニューロンは比較的数が少なく(大脳皮質全体の約20%)、従来の微小電極法ではGABAニューロンのような小型の細胞は捕捉しにくいという技術的な問題点が考えられる。

そこで、本研究では、GABAニューロンに特異的に黄色蛍光タンパク質Venusを発現する遺伝子改変マウスと*in vivo*二光子励起機能的Ca²⁺イメージング法を利用して、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の2/3層内の神経回路網内における興奮性ニューロンとGABAニューロンの眼優位性について解析を行った。その結果、従来の報告どおり、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の2/3層内の神経回路網内の興奮性ニューロンとGABAニューロンは、どちらのニューロンもさまざまな眼優位性を示した(図1a参照)。

さらに、眼優位性を定量的に解析する目的で、興奮性ニューロンとGABAニューロンの各々のニューロン群の眼優位性強度について、比較解析を行った(図1b参照)。その結果、興奮性ニューロンは、反対側の眼に強く視覚応答を示すニューロンが多く存在する分布を示すのに対して、GABAニューロンは、両眼により均等に視覚応答を示すニューロンが多く存在する分布を示した。つまり、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の2/3層内の神経回路網において、GABAニューロンは、興奮性ニューロンより強い両眼反応性を持つことがわかった。しかしながら、この眼優位性の分布の違いは、どのようなメカニズムによって形成され、なぜ違いがあるのかといった、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域内の神経回路網における眼優位性形成における新たな疑問が提起された。

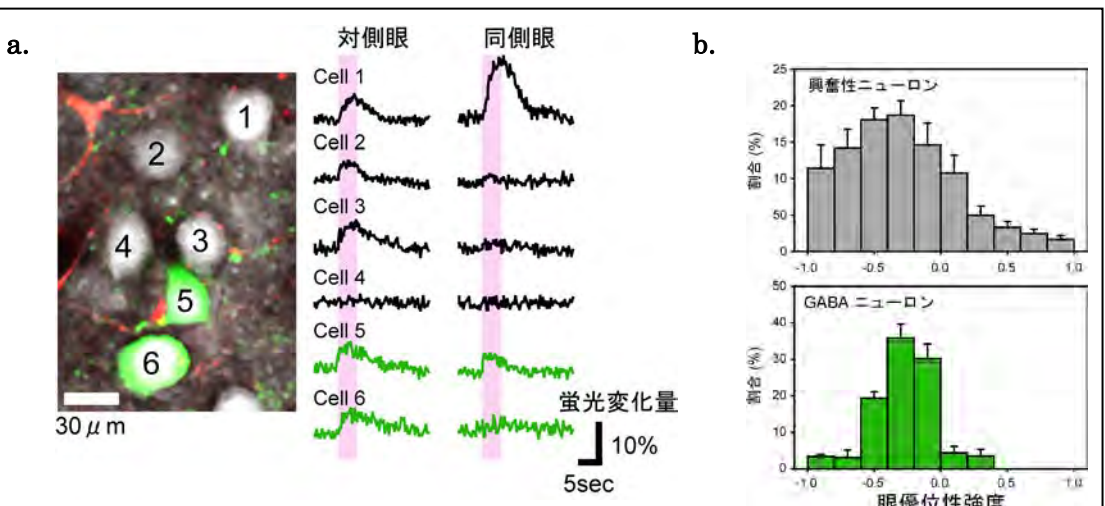


図1. マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における眼優位性

a. *in vivo*二光子機能的Ca²⁺イメージング画像と実際のニューロンの活動
(白色細胞: 興奮性ニューロン、緑色細胞: GABAニューロン)

b. マウス大脳皮質一次視覚野における興奮性およびGABAニューロンの眼優位性強度分布
グラフにおける横軸の数値は、-1に近づけば反対側の眼に優位に視覚応答を示し、1に近づけば同側の眼に優位に視覚応答することを意味する。また、0付近のニューロンは、両眼に対して均等に視覚応答することを意味する。

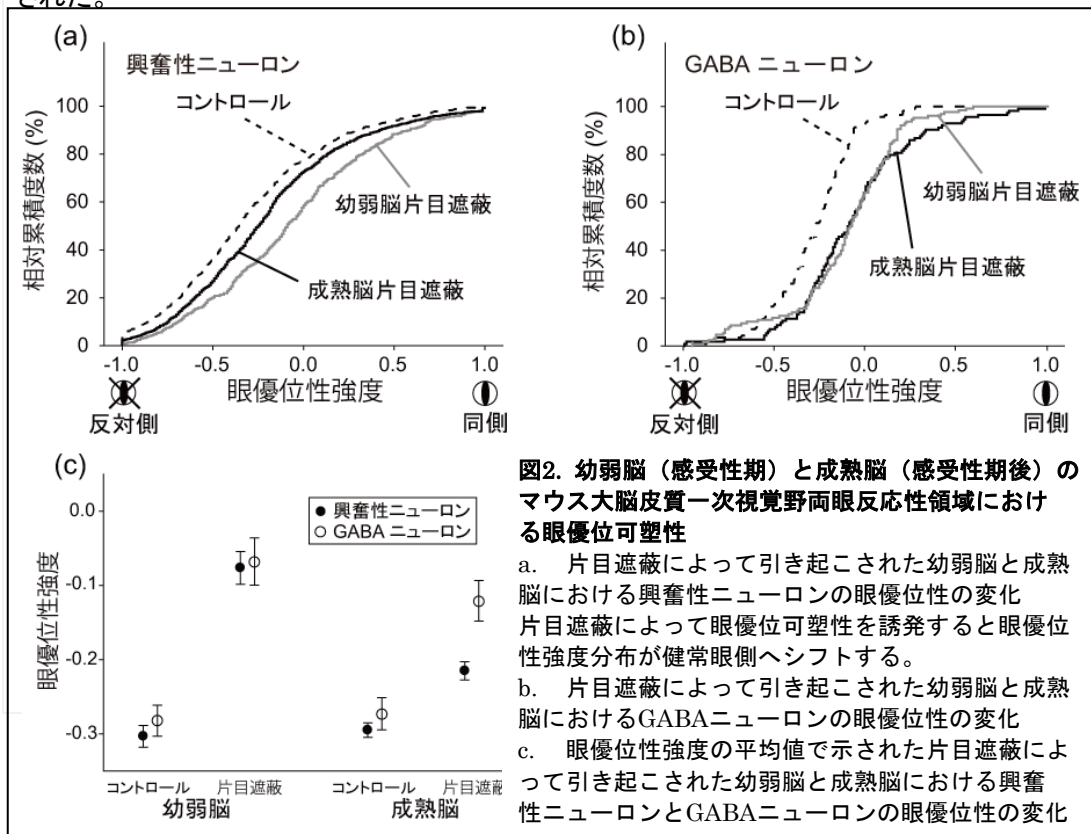
よって、GABAニューロンは、興奮性ニューロンによりも両眼により均等に視覚応答を示す。

(2) 幼弱脳(感受性期)および、成熟脳(感受性期後)マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における興奮性ニューロン群と GABA ニューロン群間に見出された眼優位可塑性の違い

幼弱脳(感受性期)の大脳皮質一次視覚野で、片目遮蔽後にみられる眼優位可塑性は、発達脳可塑性の代表的な例として古くより研究されてきた(Hubel and Wiesel, 1963, J Neurophysiol.)。また、近年、GABAニューロンの成熟度が臨界期における眼優位可塑性の開始に重要な役割を果たすことが示された(Hensch, et al. 1998, Science.)。さらに最近になって、感受性期の終了した成熟脳でも眼優位可塑性を有していることが示された(Sawtell et al. 2003, Neuron.)。しかしながら、結果(1)で述べた事と同じく技術的な理由で、興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性の違いについては、今まで全く調べられてこなかった。

そこで、本研究では、結果(1)と同じく、GABA ニューロンに特異的に黄色蛍光タンパク質 Venus を発現する遺伝子改変マウスと *in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を利用して、幼弱脳(感受性期)および、成熟脳(感受性期後)のマウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の 2/3 層内の神経回路網内における興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性について解析を行った。その結果、幼弱脳(感受性期)の興奮性ニューロンと GABA ニューロンともに、どちらも同程度の眼優位可塑性を誘発した。一方、成熟脳(感受性期後)における眼優位可塑性であるが、GABA ニューロンは、幼弱脳(感受性期)と同程度の眼優位可塑性を保持するのに対し、興奮性ニューロンの眼優位可塑性は、非常に減弱していることが示された(図 2 参照)。

これによって、興奮性ニューロンと GABA ニューロンのこの眼優位可塑性の違いは、どのようなメカニズムによるものなのか、なぜ違いがあるのかといった、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域内神経回路網における眼優位可塑性機序における新たな疑問が提起された。



3. 今後の展開

今後は、*in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法をさらに改良し、三次元同時イメージング法を実現させる。具体的には、高速レーザー操作法とピエゾモーターを装着させて対物レンズを組み合わせる。これにより、三次元空間の神経回路網内に存在するニューロン活動の同時計測が可能となり、刻一刻と脳の内部状態が変化する覚醒脳の神経回路網動作制御機構などについても GABA ニューロンの機能探求を中心に研究を展開していこうと考えている。

4. 自己評価

本研究では、GABA ニューロンと興奮性ニューロンの視覚応答特性や眼優位可塑性の違いを見出すところから研究がスタートし、最終的には、神経回路網内のニューロンの三次元配置とニューロンの視覚応答特性から GABA ニューロンの機能を神経回路網のレベルの視点で解析する新しい方法の開発へと研究を展開した。

研究期間中、光を用いた脳神経回路刺激法のための遺伝子改変マウスを作成してきたが、ようやく研究機関終了間際にこのマウスを用いた実験が可能となる状況になった。今後は、この方法と *in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を併用することで、抑制系における神経回路網動作制御機構を解析していく。また、近年、覚醒脳を制御するニューロモジュレーター回路と抑制系回路との関係性が注目され始めているから、抑制系による覚醒脳の神経回路網動作制御機構解明にも研究を展開していこうと考えている。

5. 研究総括の見解

大脳皮質神経回路において *in vivo* 二光子励起 Ca^{2+} イメージングを用い多数の抑制性 GABA ニューロンの活動を時空間的に同時記録し解析することにより、GABA ニューロンの空間分布と特徴選択的情報処理や可塑性などにおける機能の解明を目指してきた。視覚野 2/3 層のニューロンの左右眼への反応応答比(眼優位性)に着目して、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの眼優位特性を定量的に解析したところ、興奮性ニューロンに比べ抑制性ニューロンの方がより強い両眼反応性を有することを見出した。さらに眼優位性の可塑性に着目して片眼遮蔽後の眼優位性の変化を幼弱動物と成熟動物で比較し、興奮性ニューロンに比して抑制性ニューロンの方が長期に亘って可塑性を維持することを見出した。これまでの電気生理学的方法では区別できなかった興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを区別することにより明らかになったこれらの成果は高く評価できる。さらにニューロンの空間分布の解析や抑制性ニューロンの活動を光制御できるマウスの作出と解析も進めており、今後それらの成果が期待されると同時に、測定法の技術的改良と相俟って抑制性回路の実体と機能がさらに明確になる可能性が考えられる。近い将来本研究者の独創性がより明確になる単独第一著者の論文の出版が期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

| |
|---|
| <p>1. 著者. 発表論文タイトル. 掲載誌名. 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他 1. Kameyama K*, Sohya K*, Ebina T, Fukuda A, Yanagawa Y, Tsumoto T. (*:These authors equally contributed to the work.) Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons. <i>The Journal of Neuroscience</i>. 2010 Jan 27; 30(4): P1551-1559.</p> |
| <p>2. Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, Kimura F, Washburn C, Zhou R, Ninan I, Tsumoto T, Ziff EB. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. <i>PLoS One</i>. 2010 Aug 31; 5(8):e12486.</p> |
| <p>3. Jiang B, Sohya K, Sarihi A, Yanagawa Y, Tsumoto T. Laminar-specific maturation of GABAergic transmission and susceptibility to visual deprivation are related to endocannabinoid sensitivity in mouse visual cortex. <i>J Neurosci</i>. 2010 Oct 20; 30(42): P14261-14272.</p> |
| <p>4. Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, Ota M, Yasuda H, Tsumoto T, Aruga J, Craig AM. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP6 trans-synaptic interaction. <i>Nat Neurosci</i>. 2012 Jan 29; 15(3): P389-398, S1-2.</p> |
| <p>5. Sarihi A, Mirnajafi-Zadeh J, Jiang B, Sohya K, Safari MS, Arami MK, Yanagawa Y, Tsumoto T. Cell type-specific, presynaptic LTP of inhibitory synapses on fast-spiking GABAergic neurons in the mouse visual cortex. <i>J Neurosci</i>. 2012 Sep 19; 32(38): P13189-13199.</p> |

(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

1. Kazuhiro Sohya, Katsuro Kameyama, Teppei Ebina, Yuchio Yanagawa, Tadaharu Tsumoto
Differences in binocular responsiveness and ocular dominance plasticity between excitatory and GABAergic neurons in the mouse visual cortex. The 32th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009, O2-J2-1, Nagoya, Japan
2. Bin Jiang, Kazuhiro Sohya, A Sarihi, Yuchio Yanagawa, Tadaharu Tsumoto
Maturation of perisomatic inhibition is laminar-specific in visual cortex. The 32th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009, O3-I2-4, Nagoya, Japan



3. 惣谷和広、亀山克郎、蝦名鉄平、柳川右千夫、津本忠治

二光子機能的カルシウムイメージング法で明らかとなったマウス大脳視覚野興奮性ニューロンとGABAニューロンの両眼反応性および眼優位可塑性の違い。包括脳夏のワークショップ、2010年、札幌

4. Teppei Ebina, Kazuhiro Sohya, Yuchio Yanagawa, Tadaharu Tsumoto

Three-dimensional clusters of functional GABAergic neurons in the mouse visual cortex.

The 33th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2010, P1-h16, Kobe, Japan

5. Rie Kimura, Kazuhiro Sohya, Teppei Ebina, Yoshikazu Isomura, Yuchio Yanagawa, Hideyuki

Cateau, Tadaharu Tsumoto

Response properties of GABAergic and excitatory neurons in visual cortex of awake rats,

revealed by two-photon functional calcium imaging. The 33th Annual Meeting of the Japan

Neuroscience Society, 2010, P3-i01, Kobe, Japan

6. 惣谷和広

二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を用いた大脳皮質視覚野神経回路網の解析。第一回睡眠研究会、2011年、岡崎

7. Masoumeh Kourosch Arami, Abdorahman Sarihi, Bin Jiang, Kazuhiro Sohya, Tadaharu

Tsumoto

Homosynaptic LTP and heterosynaptic LTD in layer VI of the mouse visual cortex induced by white matter or layer II/III stimulation. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011, P2-a20, Yokohama, Japan

8. Teppei Ebina, Kazuhiro Sohya, Rui Kimura, Yin Shu-Ting, Hirofumi Ozeki, Yuchio Yanagawa,

Hiroshi Kameda, Takeshi Kaneko, Tadaharu Tsumoto

Three-dimensional analysis of visually responsive Parvalbumin-positive neurons in the mouse

visual cortex. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011, O3-I-4-3,

Yokohama, Japan

9. Abdolrahman Sarihi, Javad Mirnajafi-Zadeh, Bin Jiang, Kazuhiro Sohya, Yuchio Yanagawa,

Tadaharu Tsumoto

Mechanism underlying LTP of inhibitory synapses to GABAergic neurons in layer II/III of the

mouse visual cortex. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society,



2011,

P4-C14, Yokohama, Japan

10. 惣谷和広

二光子励起機能的カルシウムイメージング法を用いた大脳皮質視覚野神経回路網の解析。

第 37 回日本睡眠学会定期学術集会、2012 年、横浜

11. Rui Kimura, Kazuhiro Sohya, Hirofumi Ozeki, Teppei Ebina, Yuchio Yanagawa,
Tadaharu

Tsumoto

Comparison of neural activity in the visual cortex of rats between in awake and
anesthetized

conditions by two-photon functional imaging. The 35th Annual Meeting of the

Japan Neuroscience Society, 2012, P1-e29, Nagoya, Japan

12. Masoumeh kourosh Arami, Abdolrahman Sarihi, Bin Jiang, Kazuhiro Sohya,
Shu-Ting Yin,

Tadaharu Tsumoto

Long-term synaptic plasticity at cortico-geniculate projection neurons in layer VI of
the

mouse visual cortex. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society,
2012,

P4-b15, Nagoya, Japan

著作物

1. 惣谷和広、蝦名鉄平、津本忠治. *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法によ
って見えてきた大脳皮質視覚野抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの特徴選択性および可
塑性の違い. *生物物理*. 2012 June; 52(3): P126-131.