

「新規遺伝子導入法による神経細胞樹状突起の光操作と測光」

研究期間：2018年12月～2022年3月

研究者：佐藤 達雄

1. 研究のねらい

大脳皮質はマクロスケールからミクロスケールまで複雑かつ精巧にデザインされている。大脳皮質は多くの領野をもち、階層的かつ並列的に情報を処理することで、感覚情報処理などの高次脳機能を実現している。その一方で、大脳皮質の情報処理演算単位(ユニット)である神経細胞は、細胞体、樹状突起、神経軸索などの細胞内コンパートメント構造から構成され、特に樹状突起は微細な形態かつ複雑な細胞生理学的特性をもつ。皮質のマクロスケールの理解、特に各皮質領野がどのような情報処理をするのかという理解は、動物そのものを扱うシステム神経科学の分野で過去数十年にわたり深まった。一方で、単一の皮質神経細胞の樹状突起に対する理解も、単離皮質標本を用いることで劇的に進んだ。すなわち、樹状突起は単なる細胞膜ではなく様々なイオンチャネルを発現した興奮性膜であることが分かった。この興奮性膜は、細胞体から遠く離れた場所に入る微弱なシナプス入力を電氣的に増幅して細胞体に伝えることができる。つまり、樹状突起は細胞内コンパートメント演算サブユニットとしてシナプス入力を増大することで、ニューロンの演算ユニットとしての能力を拡充しうる。

しかしながら、単離皮質標本において示された樹状突起のミクロ演算が、生体脳のマクロ情報処理に関わっているのか不明な点が多い。人工的な単離標本の現象が果たして生体脳の情報処理で起こっているか因果的に検証する技術もなく、理解が深まっていなかった。また、生体脳では隣り合う神経細胞は異なる情報処理に関わるので、全ての細胞に共通する特徴を導くのが困難であった。

本研究の狙いは、生体脳で樹状突起シグナルをもつ単一細胞を選び出し、樹状突起シグナルを操作すれば細胞体の情報処理がどのように変わるかを検証することにある。そのためには、活動操作および活動測光のため、狙った単一細胞にのみタンパクを発現させる方法が必要であり、また樹状突起活動を操作しながら同時に樹状突起・細胞体から活動を測光する技術も必要である。これらの技術をもとに、樹状突起の細胞膜特性から生体脳の情報処理に至る過程をシームレスに解明することを目指している。結果として、生体脳における単一細胞の細胞生理学的探究の基盤を確立する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、生体脳における単一細胞生理学を行うため、新規の技術開発を複数行った。生体脳の大脳皮質では、隣り合う神経細胞は異なる情報処理に関わるので、ランダムに細

胞を選んで細胞生理学的実験を行うと、ばらつきの多いデータになり解釈に困難を伴うことが多い。そこで、生体脳の機能(応答)を同定した単一細胞を選び出し、その細胞にのみ遺伝子導入する手法を開発した(研究テーマ I、図1)。まず、覚醒動物で単一細胞を機能で選び出す。その後、麻酔下に切り替えて、単一細胞に狙い撃ちでプラスミド導入を行う。翌日以降、プラスミドからタンパクが発現される。続けて測光実験をする際には蛍光カルシウム感受性タンパクを発言するプラスミドを、光遺伝学的操作実験をする際には光応答タンパクを発現するプラスミドを選ぶ。複雑な実験手順ではあるが、条件・手順を最適化・簡素化し、技術の難易度を下げることに成功した。

本研究では、カルシウムセンサーと光応答タンパクを発現した単一細胞において、樹状突起の活動を測光し、かつ光遺伝学的に操作する。すなわち測光と光操作を同時並行する技術も開発する必要がある。測光には二光子レーザーを用いるが、光操作には安価で選択幅の多い一光子レーザーを用いる。そのため、二光子測光と一光子光遺伝学を高速で切り替える顕微鏡デザインの開発に取り組んだ。実際に二光子測光の最中に光遺伝学的抑制が行えることを確認した(研究テーマ II、図 4)。

上記の技術を使って、樹状突起の活動を操作した際に、細胞体の情報処理がどう変わるか、さらにはネットワーク情報処理がどう変わるかを調べるのが最終目標である(研究テーマ III)。そのためには、樹状突起と細胞体の活動を同時に記録する必要がある。そこで、樹状突起と細胞体を同時測光できるようにした(図 5)。

これらの技術を組合せて、今まで多細胞ネットワーク計算と見なされていた非線形計算を単一細胞の樹状突起サブユニット演算として説明し直す。このことは、大脳皮質の情報処理演算単位に対する見方を変え、脳の捉え方を変える。

(2) 詳細

研究テーマ I 「生体脳での応答を同定した後に、単一ニューロンに外来タンパクを遺伝子導入する方法の開発」

テーマ I では、新しい手法である「狙い撃ち DNA 電気穿孔法」を完成させた(図1)。この手法は三つのステップからなる。第一ステップでは細胞体発火が強い細胞を探す(多細胞カルシウム測光による機能的スクリーニング)。第二ステップでは、その細胞にプラスミドを導入する(狙い撃ち DNA 電気穿孔法)。第三ステップでは、プラスミドの発現をもとに、樹状突起からカルシウム測光を行う。

この技術の原型は、報告者がドイツの研究室に所属していた際に検討していたものだが、問題が二つあった。一つ目は、繊細な技術の組合せのため、電気生理と二光子測光の未経験者には難しいことである。二つ目は、機能的スクリーニングと狙い撃ち DNA 電気穿孔の

ステップを麻酔下で連続して行う必要があり、覚醒マウスで機能的スクリーニングができなかったことである。特に、麻酔下と覚醒下では皮質活動が大きく変わるので、二つ目の問題は深刻であった。

本テーマでは、本技術の洗練化・簡素化に取り組み、二年目の大学院生でも安定してこの技術を使えるようにした。特に、ガラス電極の先がよく見えることが重要だったので、電極内色素・レーザー波長・光学センサーの組合せを最適化した。また、穴を開けた二重ガラスを自作してガラス窓とすることで、機能的スクリーニングを覚醒下で行えるようにした。特に、ガラス窓の穴を通して、同じ動物を何度も使えるようになるので実験効率が格段に上昇した。

研究テーマ II「subcellular 測光・光操作を並行して行う顕微鏡デザインの開発と最適化」

研究テーマ I の手法を使えば、樹状突起増幅を行っている単一細胞に任意のプラスミドを発現させることができる。すなわち、カルシウム感受性センサーや光応答タンパク(チャンネル/ポンプ)のプラスミドを共発現でき、単一細胞における細胞コンパートメント光操作と細胞コンパートメント活動測光を組み合わせられる。しかし、実際に光操作と測光を同時並行するには、クロストーク(図2)が問題となる。すなわち、光遺伝学の光源が脳内で散乱し光学検出センサーにシグナルとして誤認識されたり(a)、カルシウム感受性タンパクを励起したり(b)、二光子測光の光源が光感受性タンパクを活性化したり(c)しうる。

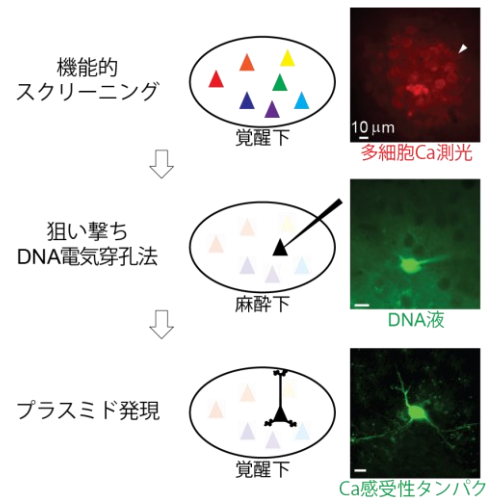


図1:狙い撃ち DNA 電気穿孔法
Sato 2021 より改変

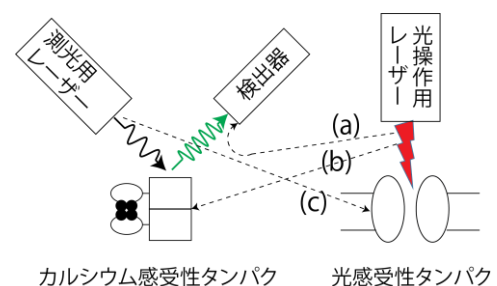


図2:二光子測光・一光子光遺伝学を同時並行する際に問題となるクロストーク

クロストーク a と b を解決するには、測光と光操作の時間を重ならないようにすればよい。クロストーク c に関しては、4つの因子（カルシウムセンサー・光応答チャンネル/ポンプ・二光子励起の波長・一光子光遺伝学の波長）を最適化するしかない。現在、クロストーク c がほぼない条件を確立し、その条件で同時並行が問題なくできることを確認した（図3B）。

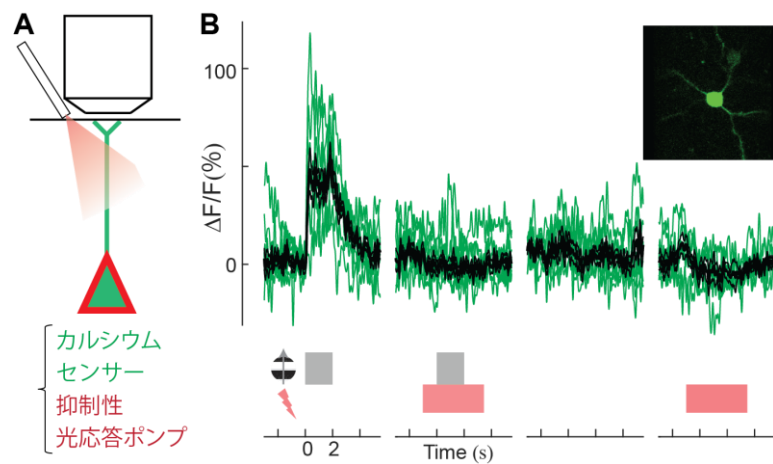


図3：二光子測光・一光子光遺伝学を同時並行。A: 実験デザイン。B: DNA 電気穿孔法で発現した細胞の細胞体から、二光子カルシウム測光を行いながら、光操作による抑圧（抑制性ポンプ Jaws）を行った。光操作により、視覚応答が完全に抑えられている。

研究テーマ III「単一ニューロンの房状樹状突起の活動を光操作し、そのニューロンの非線形応答、およびネットワーク活動に与える影響を検証」

単一神経細胞の樹状突起を光操作した際に、細胞体の計算がどう変わるか評価するのが本研究の最終目標である。着目する計算は、教科書的な非線形計算である。そのメカニズムとして多細胞ネットワーク作用が提案されてきた。その説明を単一細胞の細胞内コンパートメント演算サブユニットで書き換えることを目標としている。

テーマ III では、樹状突起の活動と細胞体の活動を同時に記録する手法と、一光子光遺伝学の照射を細胞体/樹状突起のみに行う手法が必要となる。まずは、樹状突起と細胞体の活動を同時記録するように顕微鏡をカスタマイズした。カルシウム応答は樹状突起と細胞体

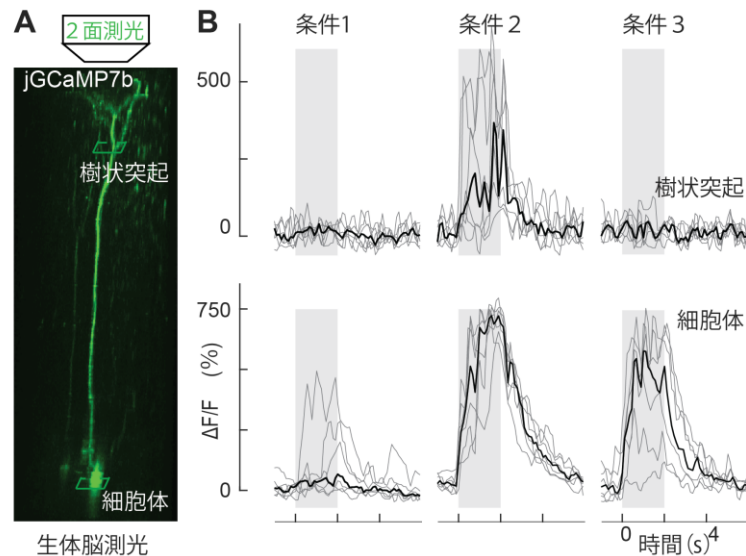


図4：樹状突起と細胞体から二面カルシウム測光 A: 生体脳でのカルシウムセンサー発現。B: 異なる情報処理条件での樹状突起・細胞体のカルシウム応答。

で異なるのが分かる(図4B)。この樹状突起シグナルを抑えると、細胞体の応答がどうなるかを明らかにすることを目指している。今まで開発してきた技術を組み合わせることで、樹状突起活動が細胞体の非線形計算にどう寄与しているかを因果的に証明する

3. 今後の展開

まずは短期的な展開として、一年遅れで進んでいる本研究課題を完成させ投稿する予定である。

5年程度の中期的な展開としては、本研究で開発した技術(狙い撃ち DNA 電気穿孔法と二光子測光・一光子光遺伝学同時並行)を用いて、さらに生体脳での単一細胞生理学を展開したい。より複雑な皮質計算に着目して(例えば内側前頭前野の報酬・罰学習)、樹状突起演算の演算サブユニットとしての重要性を示していきたい。そして本研究の技術をシンプルに応用して、樹状突起よりさらに微細構造であるスパイン(樹状突起棘)の活動(グルタミン酸センサー iGluSnFr)を測光することも視野に入れて準備し始めている。

また、中期的な展開として共同研究も積極的に行っていきたい。本研究の技術、機能的狙い撃ち DNA 電気穿孔法は、機能的に多様な神経細胞を詳細に調べることができる。細胞の機能的多様性は、がん研究・免疫研究では遺伝子学的多様性と結びついており、大きなパラダイムシフトを起こした。神経系でも、本技術をもとに遺伝子学的多様性・形態学的多様性を明らかにしたい。分子生物学者・解剖学者との共同研究が重要となる。

長期的な社会に対するインパクトに関しては、樹状突起が大脳皮質の演算単位たり得ることを本研究で示せたら、人工知能回路研究に影響を与える。深層学習を生物学的に実装するためには、細胞体から独立した樹状突起演算ユニットにエラー信号を与えればよいという仮説がある。樹状突起の研究をもとに、深層学習を生物学的にとらえる研究が今後 5-10 年で進み、生物学的な深層学習の洗練化・実装が進んでいくと考える。

4. 自己評価

モナシュ大学の工事の遅れでプロジェクトを開始できたのは一年遅れであったが、研究開始後からはおおよそスケジュール通りに進んでいる。研究体制としては、コロナ禍が豪州の大学経営を直撃してポスドクが採用できなくなったが、大学院生でも実験できるように実験手法の簡素化を行い対応できた。

二光子測光と一光子光遺伝学を同時並行するという顕微鏡デザインは、all optical アプローチを手軽に生体脳で実現できる手法であり、今後広まっていくと考える。また、本技術の実験手法には生体脳二光子顕微鏡下でパッチクランプ法を組み合わせる技術の洗練化が多くあるので、生体脳パッチクランプ法の技術的難易度を下げ、導入・波及に役立つと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. **Sato, TK**. "Long-range connections enrich cortical computations"
Neuroscience Research, 75(2):218-29, 2021

日本神経科学学会奨励賞受賞(2020 年)に伴う招待総説である。大脳皮質長距離結合に関わる報告者の研究を、過去の文献とともに議論した。また、新規技術、「機能的狙い撃ち単一

細胞 DNA 電気穿孔法」の革新性についても説明した。掲載号の表紙にもなっている。単著者であり、責任著者である。

2. Sato TR, Itokazu T, Osaki H, Ohtake M, Yamamoto T, Sohya K, Maki T, **Sato TK***:
“Interhemispherically dynamic representation of an eye movement-related activity in mouse frontal cortex”
eLife Nov 5;8. pii: e50855. doi: 10.7554/eLife.50855, 2019

本研究では生体脳二光子カルシウム測光と光遺伝学抑圧を用いて、大脳皮質運動野に有する運動障害代償機構を調べた。運動障害からの回復は、生理的に皮質回路に備わる可塑的变化で起こり得ることを示した。運動障害を引き起こすために、今までの研究のような脳損傷は起こさず、光遺伝学的抑圧を用いた。モナシュ大学で独立後に取り組み、最終・共責任著者として発表した論文。

(2) 特許出願

特になし

(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)

日本神経科学大会(2020年)

日本神経科学学会奨励賞受賞(2020年)

日本動物学会第92回米子大会シンポジウム(2021年)