

平成 31 年 4 月 25 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年

受付番号 524

氏 名

平 理 一 郎

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: サンタバーバラ (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

多領域 2 光子イメージングによる頭頂連合野学習機構の解明

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学サンタバーバラ校

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究計画では、新規の頭部固定マウスの行動課題の開発と多領域に分布する単一神経細胞活動の同時カルシウムイメージングを方法論的主軸とした頭頂連合野の機能解明を目的としていた。この 2 年間に於いて、それらの目的はほぼ達成し、現在論文投稿準備中である。以下では、行動課題の開発、広域 2 光子カルシウムイメージングと、行動課題中の多細胞活動の解析に分けて、遂行状況と成果を報告する。

【1】頭部固定マウスの行動課題の開発

頭頂連合野の機能探索のために頭部固定マウスを用いて開発されてきた行動課題には、ヴァーチャルリアリティを用いたナビゲーション関連活動の可視化を主な目的としたものが主流であった。本研究計画では、頭頂連合野の機能をナビゲーションとは切り離して捉えたいと考えていたため、行動出力を最小化できるリッキング行動を使用した課題構築を行った。頭部固定マウスに 2 つのリックポートを提示し、視覚刺激のタイプあるいは行動履歴によって正しい選択を行うように訓練した

(図 1)。

視覚刺激にはマウスの生活環境に近いケージの内部のビデオを記録したものを用いた。マウスは 4 秒間のサンプリング期間の間視覚刺激を受け、それによって左リッキング、右リッキングを正しく行うと報酬となる水が与えられた。この課題は 4 秒間のサンプリング期間と応答時間を

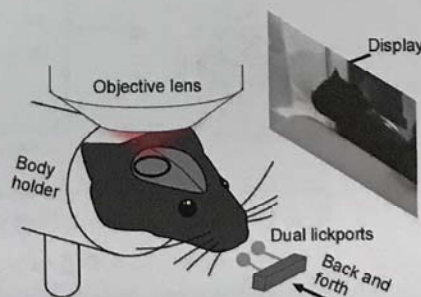


図 1. 頭部固定マウスに対して課した識別課題。マウスは 4 秒間のサンプリング期間において左視野に提示された視覚刺激のタイプによって、応答期間中に左または右のリッキングを適切に選択することで報酬を得る。サンプリング期間におけるリッキングを防止するため、リックポートはサンプリング期間の間は舌が届かない位置にある。視覚弁別課題が終了したあとに、行動履歴に基づく課題が課されるがその場合も全く同じデバイス・刺激を用いて訓練した。

分離することによって視覚関連の神経細胞活動と選択関連のそれを区別することができるように設計されている。

視覚刺激による弁別課題を課したものと同じ動物を用いて、今度は行動履歴に基づいた選択を行う課題を課した。この課題でマウスは各試行ごとに前の試行における選択と逆方向の選択を行うことを要求された。正解となるリッキング方向は視覚刺激とは全く独立であるからマウスは視覚刺激を無視して自分の行動履歴のみを記憶しながら行動選択をすることが求められる。視覚刺激の弁別課題と同様に視覚刺激のサンプリング期間を与えているため、マウスはこの間情報を保持する必要がある。この課題はこのように、行動履歴情報の保持に関与する神経細胞活動を抽出するために設計されている。

これらの一連の課題を習得させるために、視覚刺激を前の試行の逆のものとする課題も訓練した。この課題ではマウスは視覚刺激、行動履歴のいずれかあるいは両方を用いて正解を得ることができる。マウスはまずこの課題を習得したあと、視覚弁別課題に以降し、その後行動履歴課題に以降した。それぞれの課題習得後に広域2光子カルシウムイメージングを行い、以下のように様々な細胞活動をマッピングすることに成功した。

【2】行動課題中の広域2光子カルシウムイメージングイメージング

2光子カルシウムイメージングにはその単一細胞空間解像度を維持しつつ多くの細胞活動を同時に記録することができるという長所がある。この特徴をさらに改善すべく、単一細胞の活動記録を可能としたままできるだけ広い領域を同時に記録するためのスキャン方法を決定することから始めた。頭頂連合野は視覚野、体性感覚野、脳梁膨大後部皮質といった周囲の皮質領域と相互作用することが知られている。この全ての領域をカバーしつつ、単一細胞解像度を維持しながら、最速のスキャンレートを実現するため、様々なスキャン方法を試した結果、3mm x 3mmの視野を5.4 frame/sでスキャンする方法を見出した(図2)。

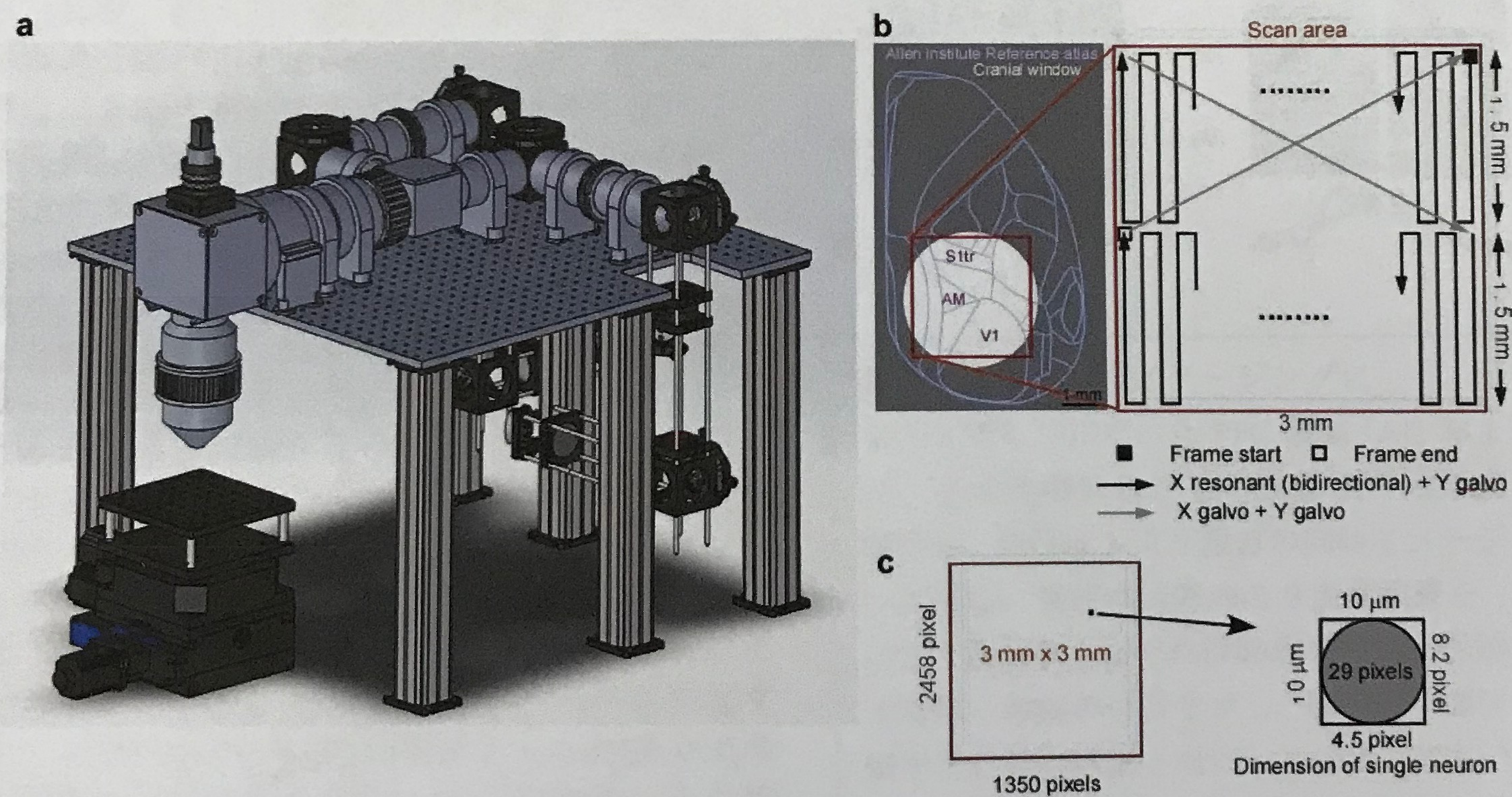


図2. a. 新規に開発された広域2光子顕微鏡。この顕微鏡は大型のスキャンレンズ、チューブレンズ、対物レンズがいずれも Smith 研で設計・最適化されている特注品である。約 5.5 ミリメートルの視野を有し、完全に独立な 2 つのスキャンシステムを有する。それぞれのスキャンシステムは 2 つのガルバノミラーと 1 つのレゾナントスキャナーを有し、超広域の視野を自由に動き回ることができる。さらに光路の途中に Deformable Mirror を配置しており、レーザーの波面を任意にコントロールすることで 2 光子励起効率の上昇や焦点の形状・位置を自由かつ高速に変更可能となっている。b. 本研究で用いた視野とスキャン方式。マウスの頭頂連合野を中心とする 3mm 四方の領域を 2 つの長方形スキャン領域によってカバーしている。c. スキャン範囲を広域化することで単一細胞あたりの 2 光子励起が疎になるが、今回のスキャンレートでは 29 pixel (100 以上のパルス数)を確保している。

このスキャン方法によって、頭頂連合野を中心とした8つの領域の細胞活動が同時に観察可能となり、1万以上の神経細胞を記録することに成功した。この同時記録数は現在の世界最高水準である。さらに単一パルスあたりの2光子励起効率を改善するために、Deformable Mirror (DM) を用いたビームシェイプの最適化を試みた。しかし、視野全域に渡った改善は認められず、視野によって最適化することによって改善があったため、スキャナとDMの同期制御が必要となると考えられたがこれは今後の課題とした。また、この顕微鏡の対物レンズは設計上5.5 mm以上の視野を有し、さらに2つの独立なスキャンシステムを同時に用いることを想定して設計されている。しかし、これらを十分に運用することはできなかったため、今後の課題とした。

【3】多細胞活動のデータの解析

【1】で説明した2つの行動課題と、【2】で示したスキャン方法を用いて、行動課題中の神経細胞を同時に1万個程度記録した。課題中のイメージングは体動による画像のズレが生じるため、画像補正を行ったあと、ローカルピクセルの相関をもとにして細胞の輪郭を自動的に抽出することに成功した。個々の細胞活動を視覚刺激や応答開始時間でアラインして表示すると特定の視覚刺激や選択方向、選択方向の履歴情報を保持した細胞活動が見出された。例えば行動履歴課題においては、頭頂連合野内部のAI領域を中心に、行動履歴情報を前の試行から継続して保持し続ける神経細胞が認められた(図3)。これらの細胞はサポートベクトルマシンのを用いたDecoding解析によって、行動履歴情報だけでなく、次の試行の行動を反映したものであることがわかった。つまり、これらの細胞活動はワーキングメモリの特徴を備えていた。様々な活動選択性を有する神経細胞をマッピングするために、多変量線形モデルと行動・刺激パラメータを用いていわゆるエンコーディングモデルを構築し、それらのパラメータによって個々の細胞活動をフィッティングした。有意にフィッティングに貢献したパラメータを特定することで、個々の細胞活動がどんな行動や刺激に反応しているかを知ることができる。この値(回帰モデルにおけるt統計量)をカラーコードすることで視覚刺激に反応する細胞、選択行動に反応する細胞、行動選択の履歴情報を反映する細胞をマップした。視覚刺激に反応する細胞は一次視覚野と、後部側の頭頂連合野を含む高次視覚領域に分布していた一方、行動選択、選択の履歴情報を有する細胞は一次感覚野と前部側の頭頂連合野に分布していた。この分離は従来の研究報告にはない極めて排他的なものであり、頭頂連合野周辺の機能構造がこれまで考えられてきたものよりも遥かに鮮明であることがわかった。

これらの成果の一部は、北米神経科学会(2018年)にてポスター発表したほか、日本神経科学会(2018年)にて口頭発表を行い提示した。また、現在これらの成果をまとめ、論文執筆最終段階にある。

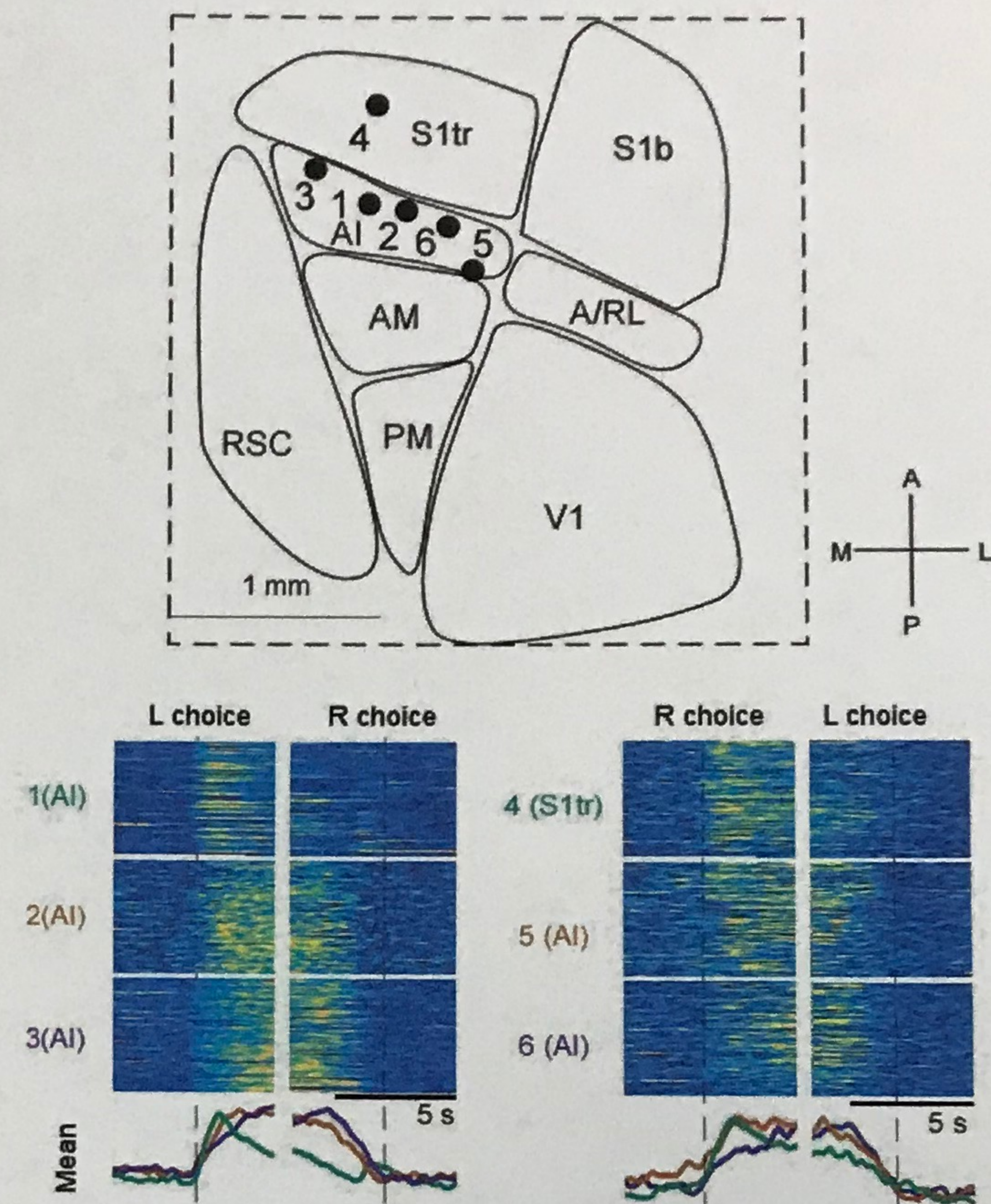


図3. 広域2光子イメージングによって明らかになったPPC領域(AI)および一次感覚野における行動履歴の短期記憶細胞。破線は3ミリ四方の同時イメージング領域、実践は視野内の8皮質領域を示す。黒点はそれぞれ行動履歴情報を保持する単一細胞の位置を示し、数値は下図に示すその細胞活動と対応している。左右いずれの選択行動に対してもその次のトライアルでの行動選択までの間神経活動を高い状態で維持している。ただし、個々の細胞によって発火頻度がピークとなる時間に差が見られた。したがって、行動履歴を維持する細胞活動は一様ではなくそこにはダイナミクスが存在している。