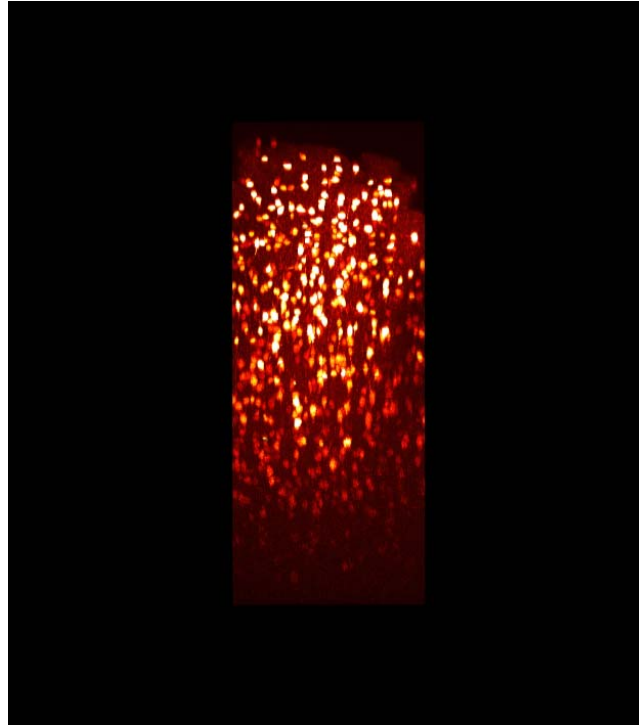


抑制回路を介したコリン作動性ニューロンによる 覚醒脳の動作制御機構



惣谷和広

RIKEN・BSI・大脳皮質回路可塑性研究チーム

平成26年2月24日月曜日

電気通信大学脳科学ライフサポートセンターセミナー

本日のトピック

1. イントロダクション～局所神経回路網解析と方法論～
2. 大脳皮質一次視覚野ニューロンの方位(傾き)選択性について
3. 抑制回路を介したコリン作動性ニューロンによる
覚醒脳の動作制御機構

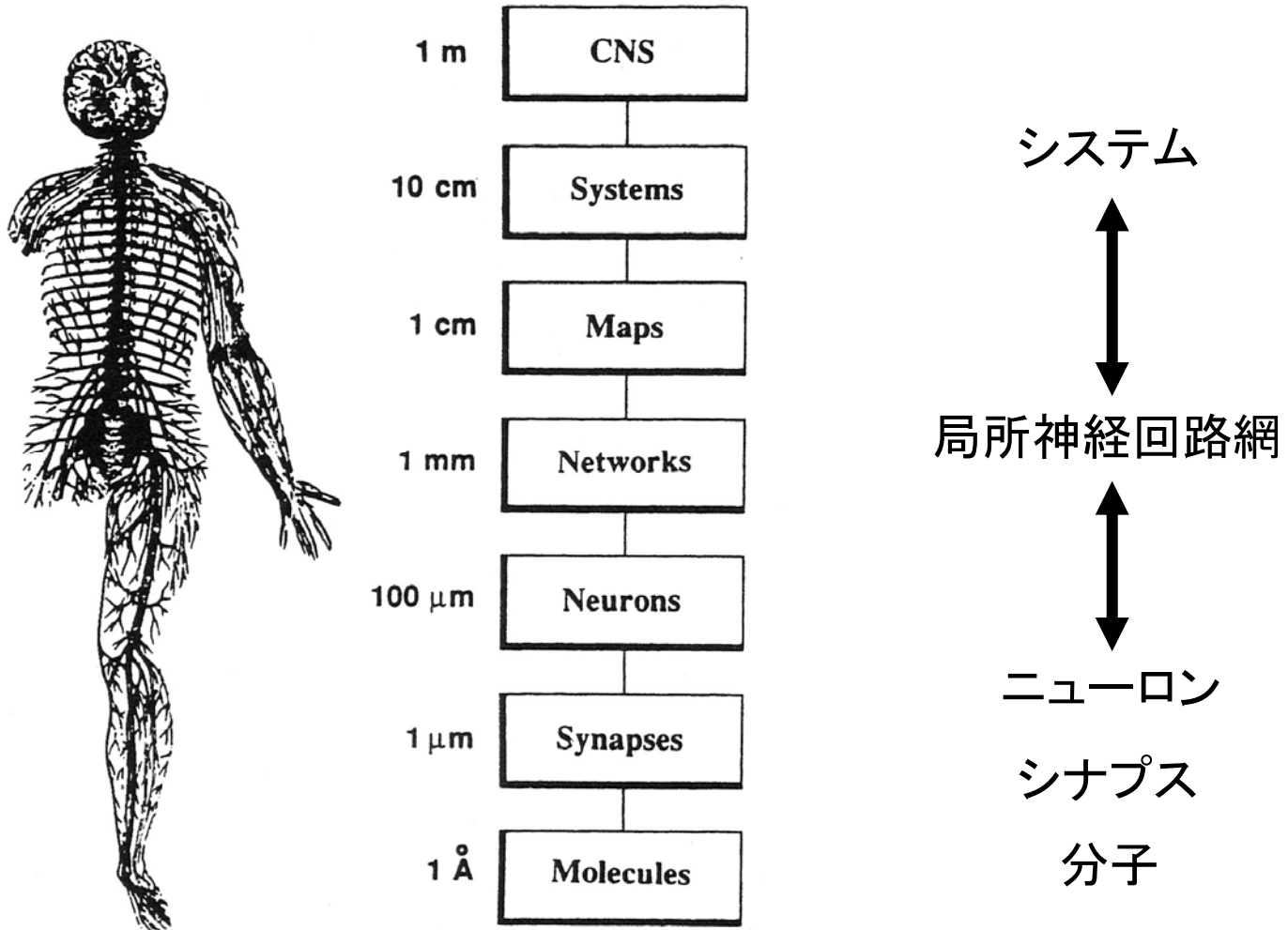
本日のトピック

1. イントロダクション～局所神経回路網解析と方法論～

2. 大脳皮質一次視覚野ニューロンの方位(傾き)選択性について

3. 抑制回路を介したコリン作動性ニューロンによる
覚醒脳の動作制御機構

神経系のスケール



(Chuchland and Sejnowski, *The Computatinal Brain*. 1992)

局所神経回路解析の必要性

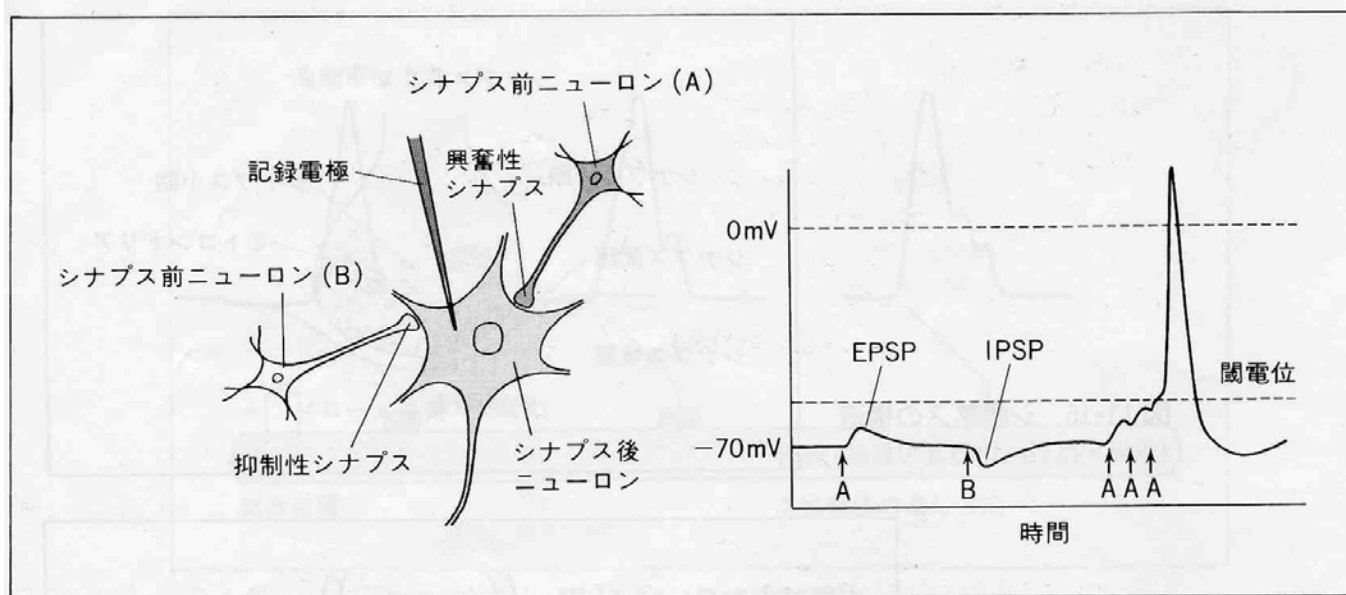


図 13・17 興奮性シナプス後電位(EPSP)と抑制性シナプス後電位(IPSP)

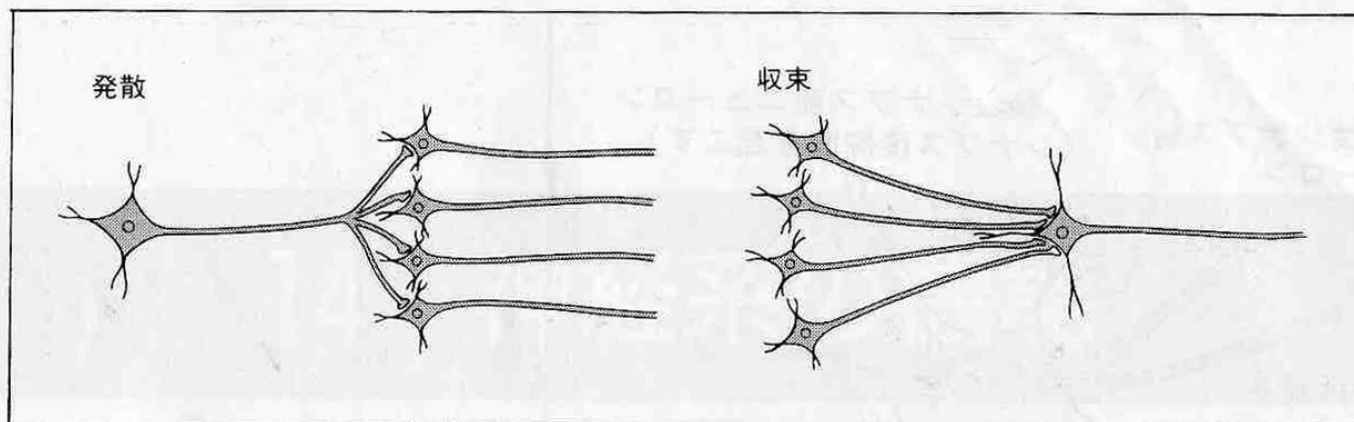
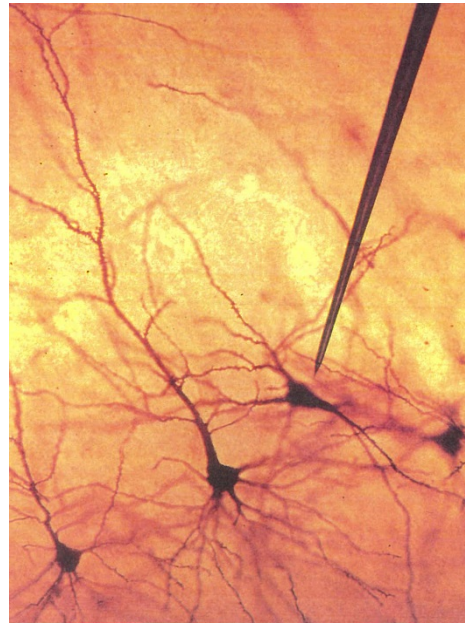


図 13・18 発散と収束 (収斂)

(シンプル生理学 貴邑 富久子、根来 英雄より)

電気生理学的計測法

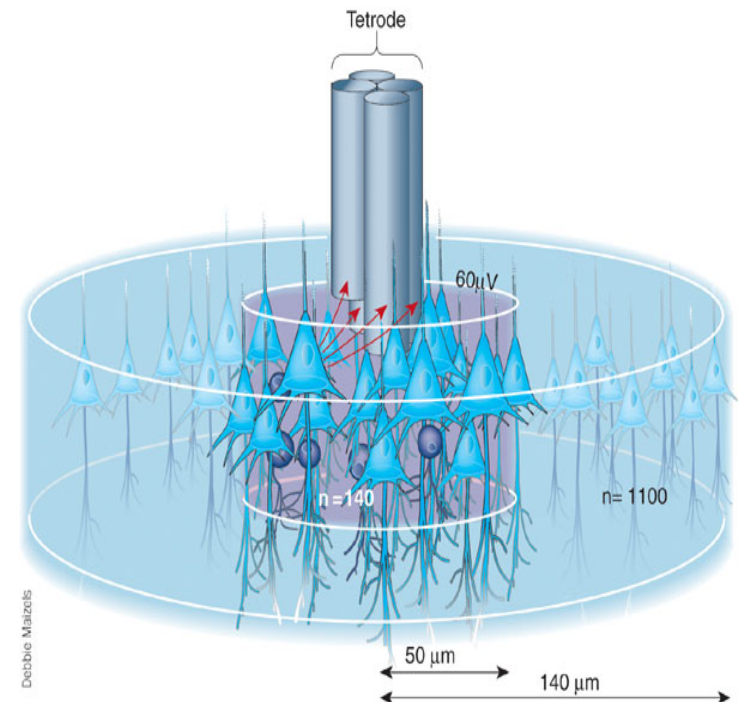
Single-cell recording と Multi-cell recording



Hubel, DH, Eye, brain and vision, Scientific American Library, 1988



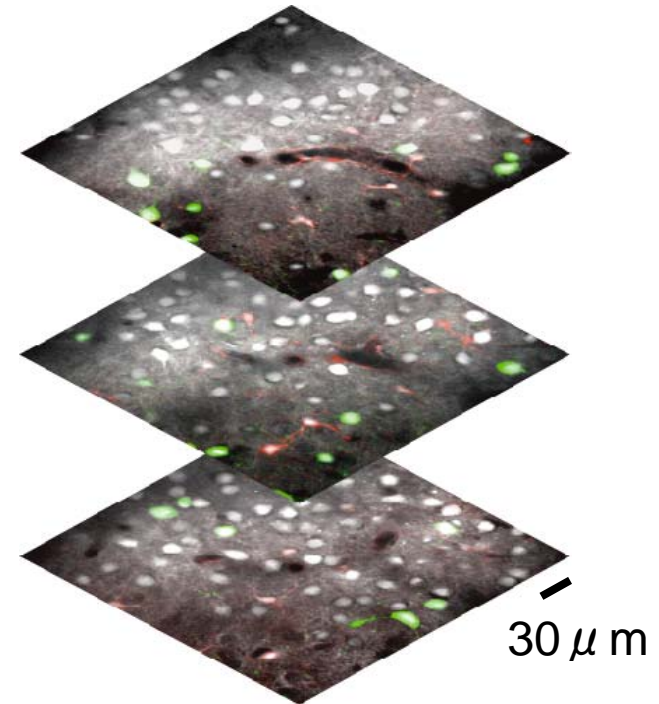
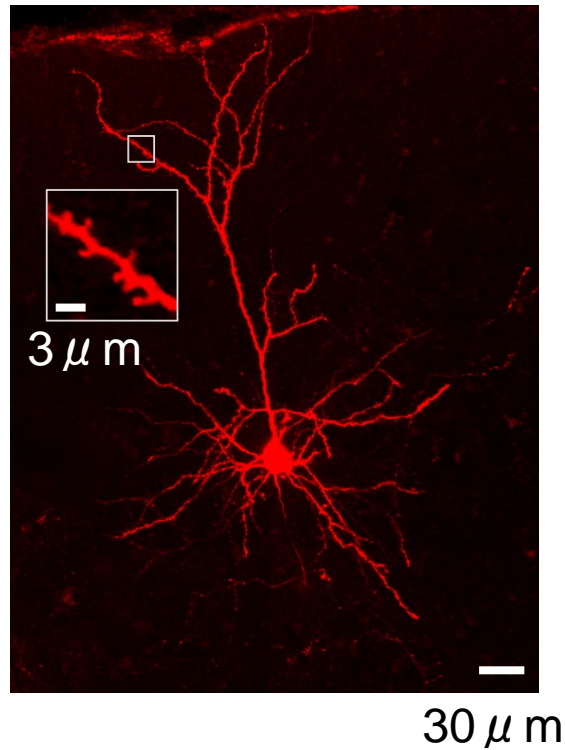
Jiang B et al., Neuron, 2010



Buzsaki et al., Nature Neurosci., 2004

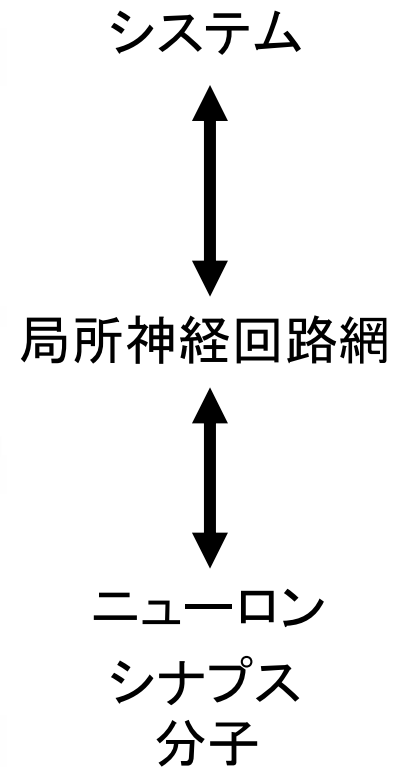
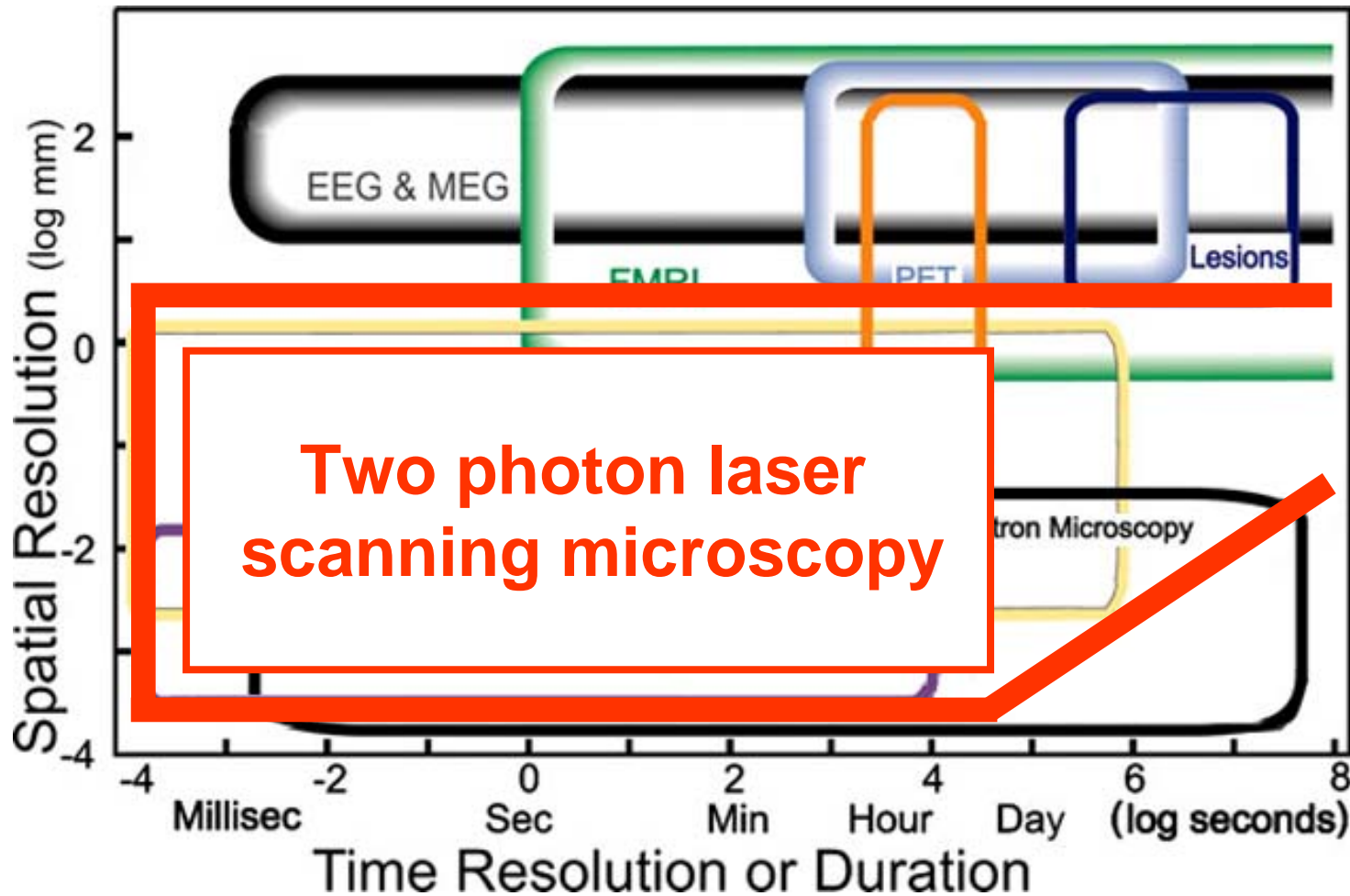
その他、EEG, MEGなども

二光子レーザー走査型顕微鏡を使って、 シナプス機能探求から局所神経回路網探求へ



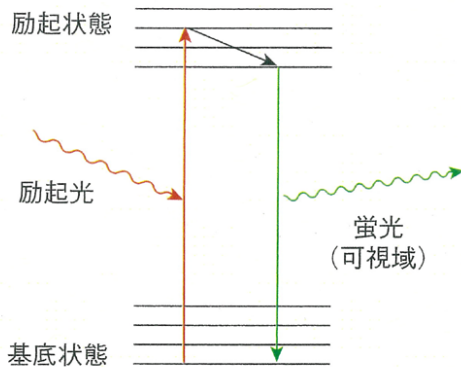
Sohya K, et al., J Neuroscience, 2007

神経機能探索に用いられるツール

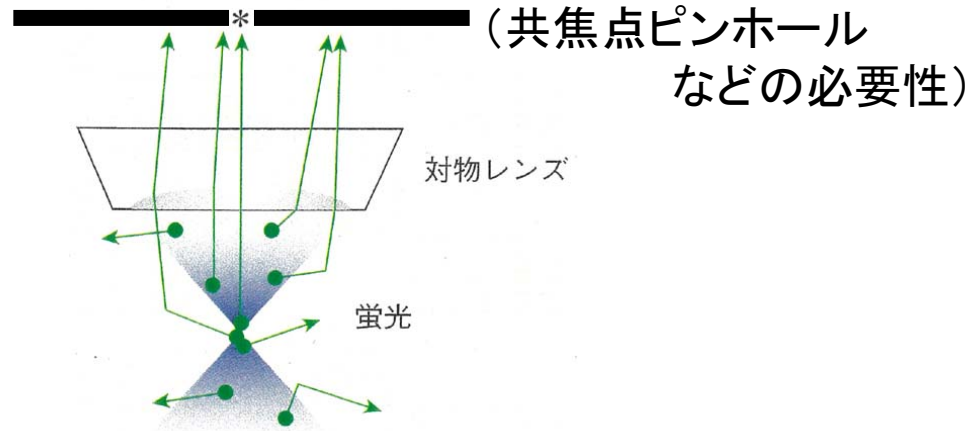


(Modified from Grinvald A, PNAS, 2005)

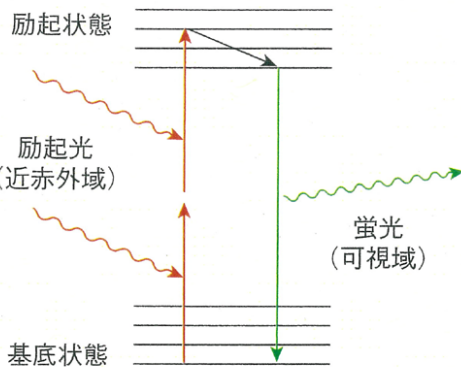
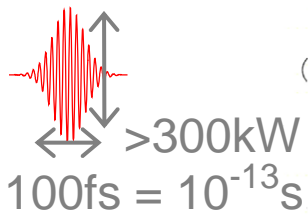
一光子励起と二光子励起蛍光イメージング法の原理



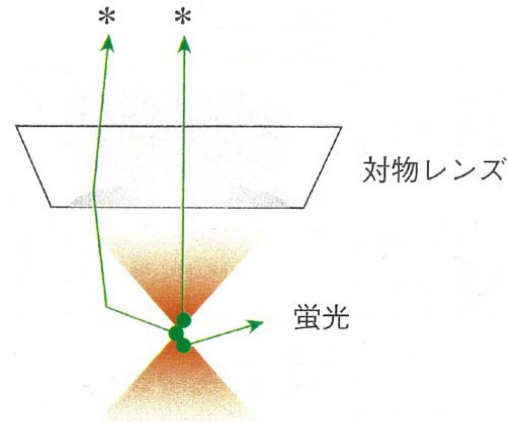
ジャブロンスキー模式図



一光子励起顕微鏡模式図



ジャブロンスキー模式図

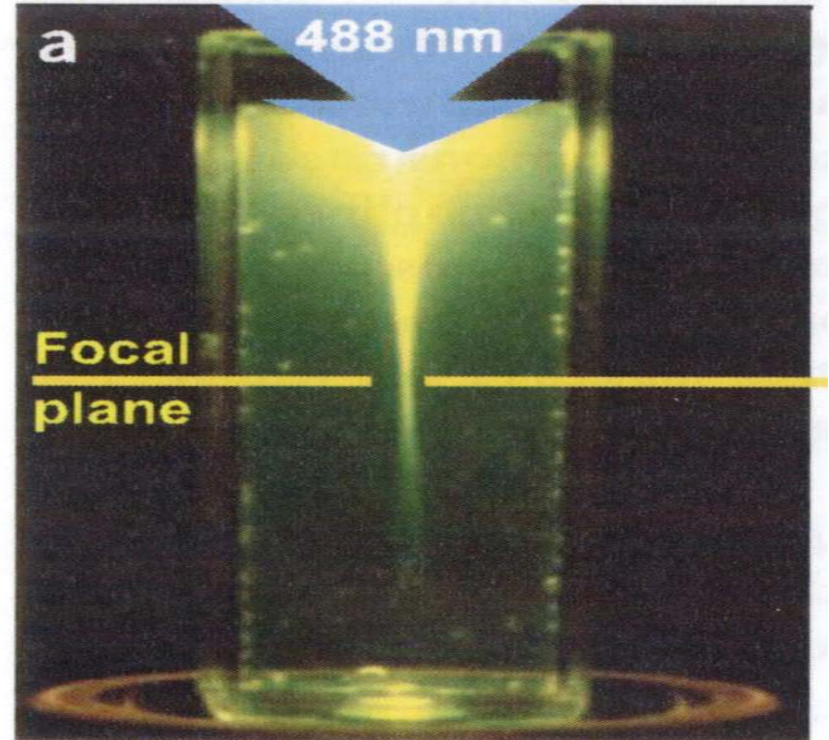
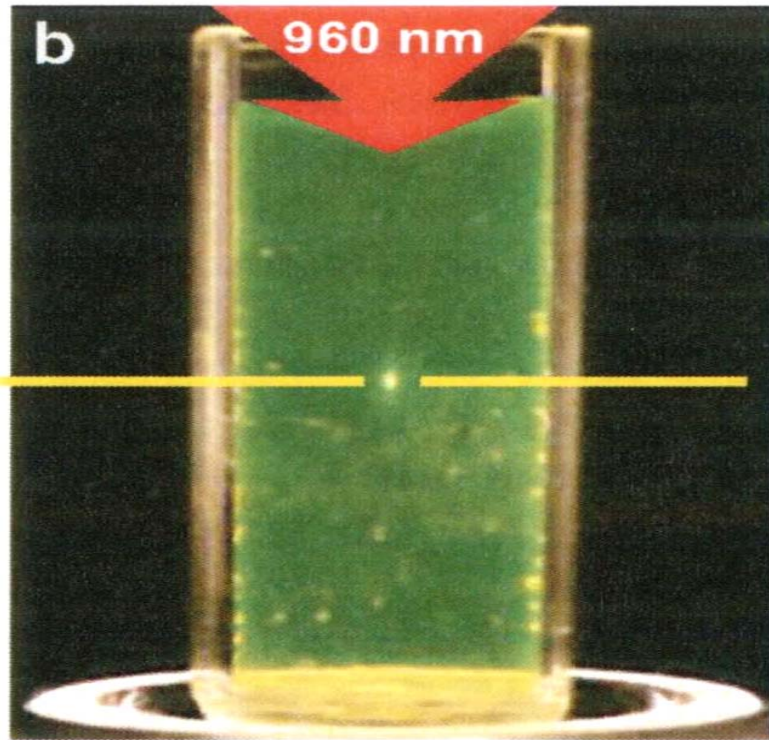


二光子励起顕微鏡模式図

励起法の違いによる励起領域の比較

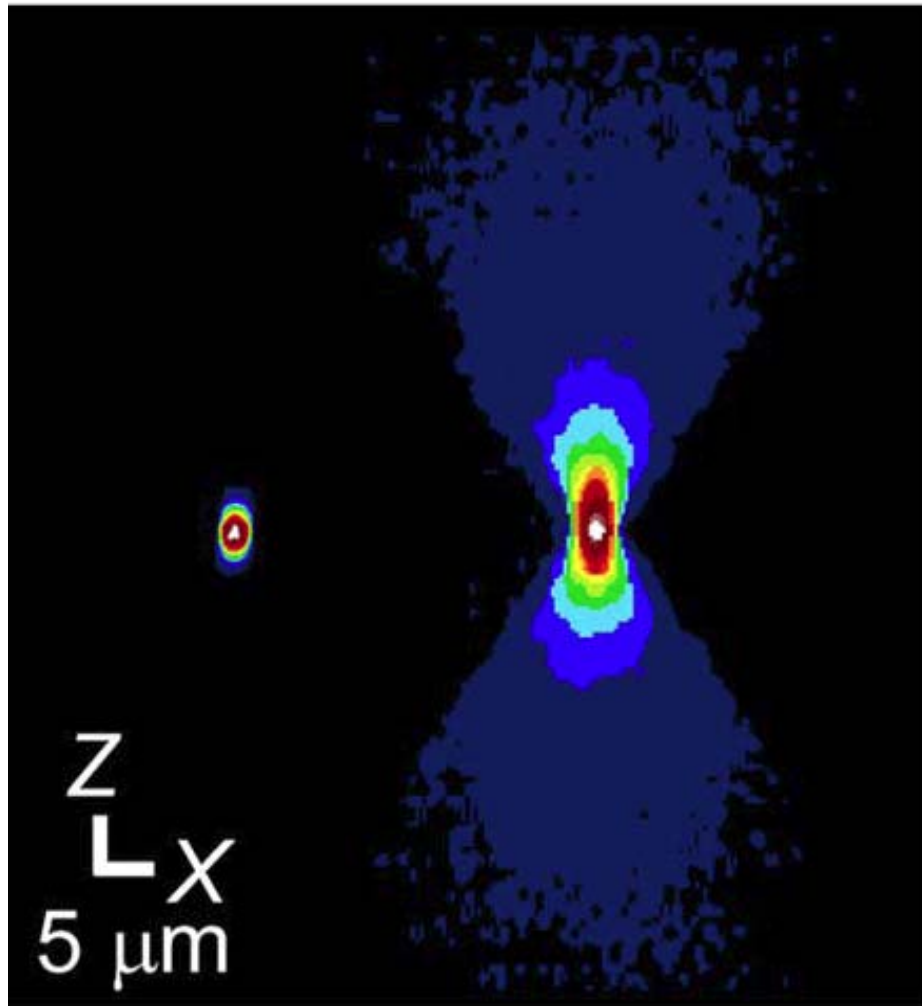
Two-Photon

One-Photon



励起法の違いによる 蛍光ビーズのX-Z断層像の比較

Two-photon One-photon



多光子顕微鏡の特徴

1.励起波長がSingle Photonの約n倍

⇒2Photonは約2倍、3Photonは約3倍の励起波長

1-1.波長が長いということは、標本による励起光の散乱が少なく
励起光が標本深部まで達する。

1-2.励起波長が長くUV光の様な光毒性的ダメージが低い。

⇔但し、熱的なダメージは有り。

1-3.励起光と蛍光の波長差が大きく分離が容易。

多光子顕微鏡の特徴

2.一つの分子に複数の光子が同時に当たる確立は極めて低い

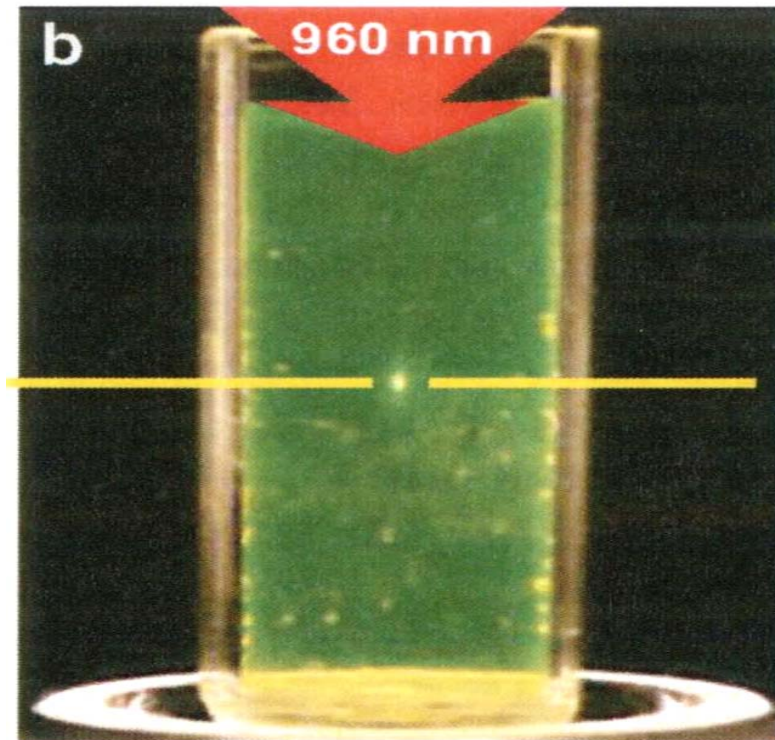
2光子吸収が起きる確率は
1光子吸収の1億分の1以下

2-1.光子密度の高い対物LENSのピント
面でしか励起が起こらない。

2-1-1.励起光による標本の空間的ダメージが少ない。

2-1-2.光刺激や体積計測等の励起光
の空間分解能を必要とする
Applicationに最適。

Two-Photon

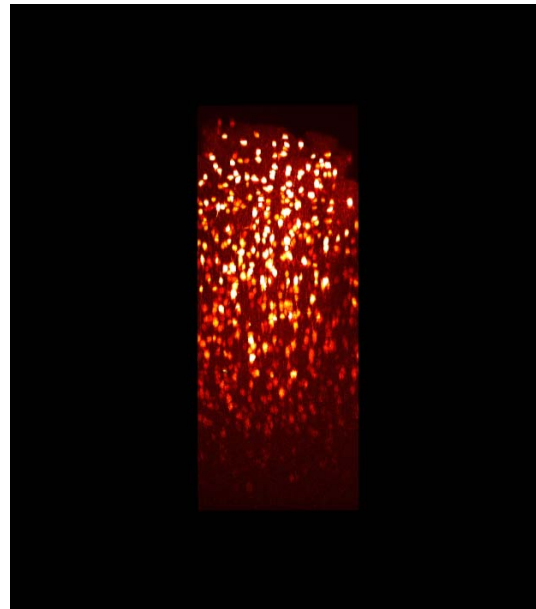


多光子顕微鏡の特徴

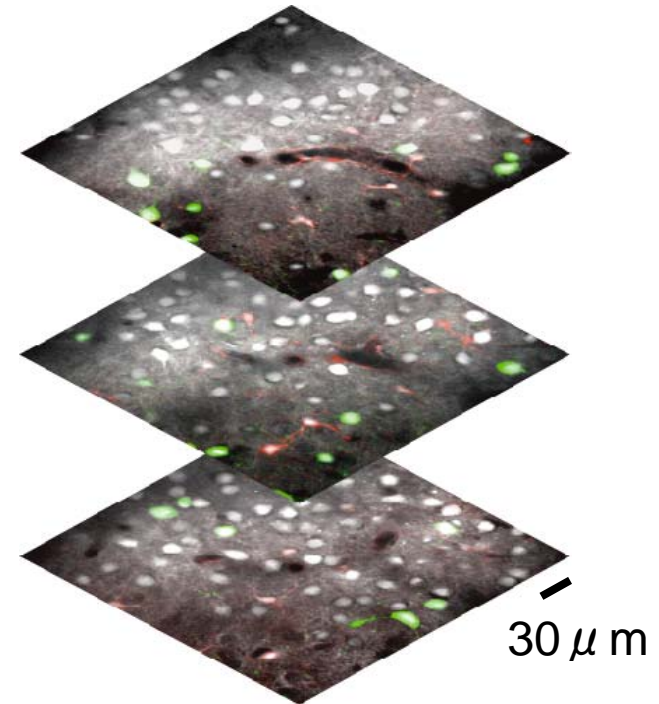
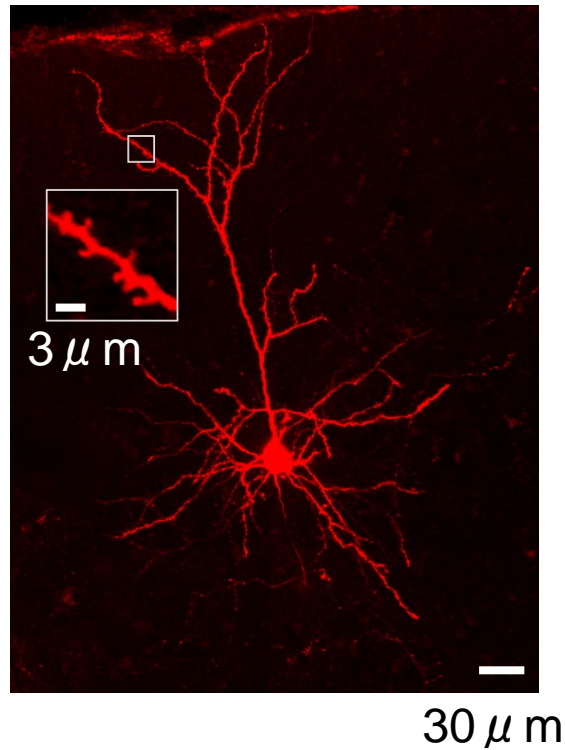
3. 標本深部観察性能に優れる

(近赤外波長 + 空間分解能) 励起

- ・ 標本での励起光散乱が少ない。
- ・ 対物レンズピント面以外の余分な蛍光が少ない。



二光子レーザー走査型顕微鏡を使って、 シナプス機能探求から局所神経回路網探求へ



Sohya K, et al., J Neuroscience, 2007

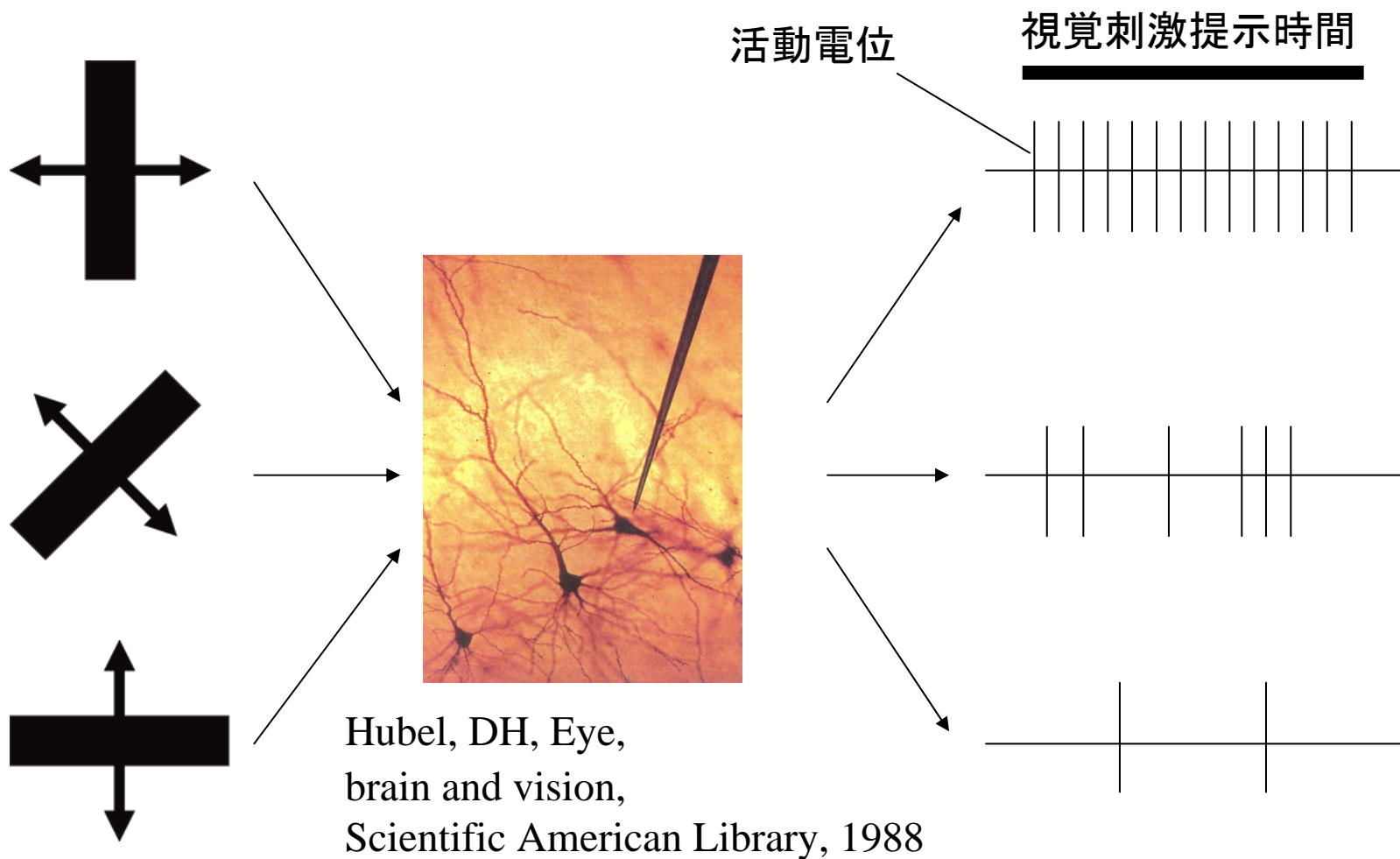
本日のトピック

1. イントロダクション～局所神経回路網解析と方法論～

2. 大脳皮質一次視覚野ニューロンの方位(傾き)選択性について

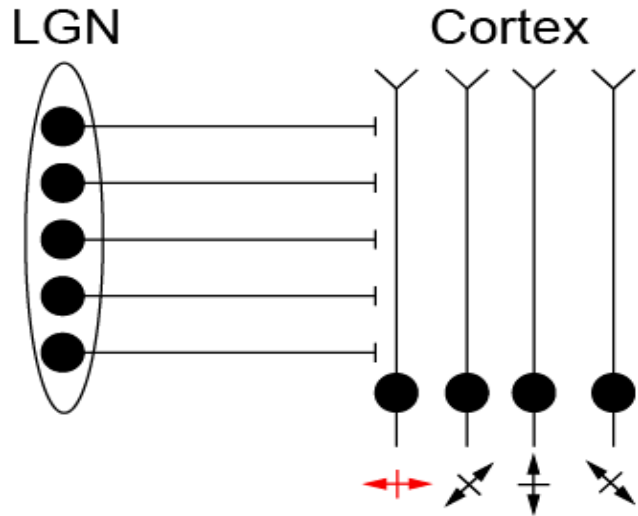
3. 抑制回路を介したコリン作動性ニューロンによる
覚醒脳の動作制御機構

大脳皮質一次視覚野ニューロンの方位選択性

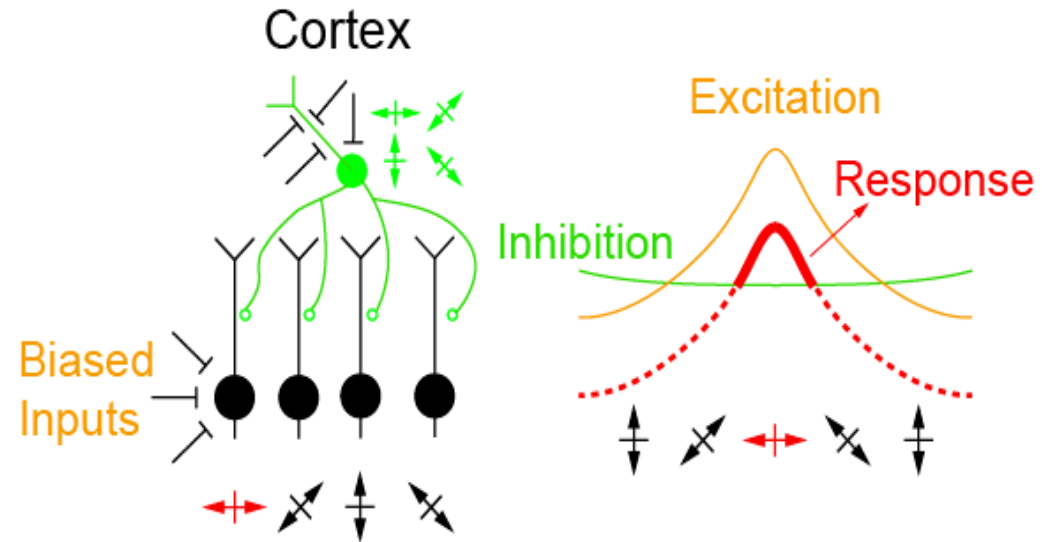


方位(傾き)選択性の形成メカニズムモデル

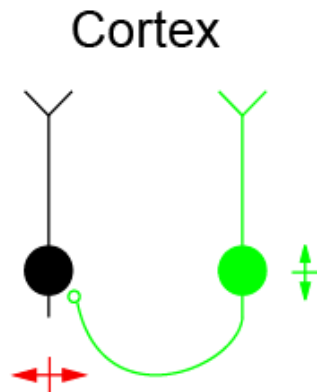
a. Excitatory Convergence Model



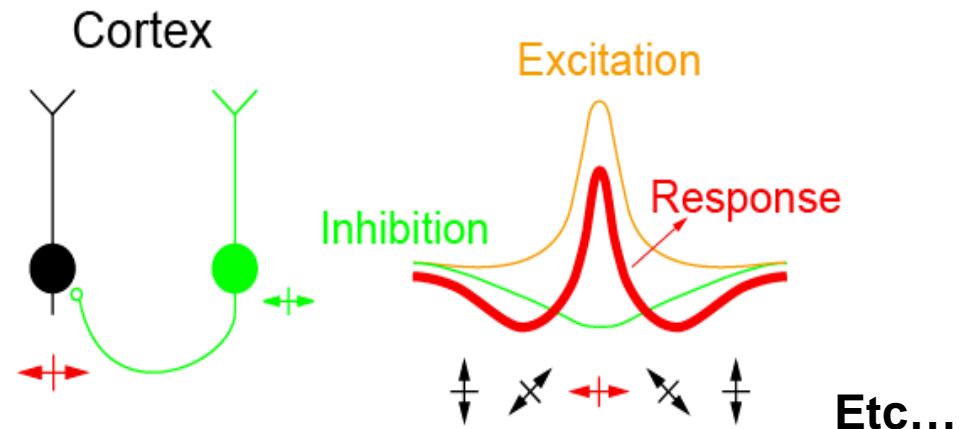
b. Biased Inputs Model



c. Cross-Orientation Inhibition Model



d. Iso-Orientation Inhibition Model



Etc...

遺伝子改変動物を用いた *in vivo* 二光子励起機能的Ca²⁺イメージング法

細胞の活動

Changes in [Ca²⁺]_i → fura-2 AM

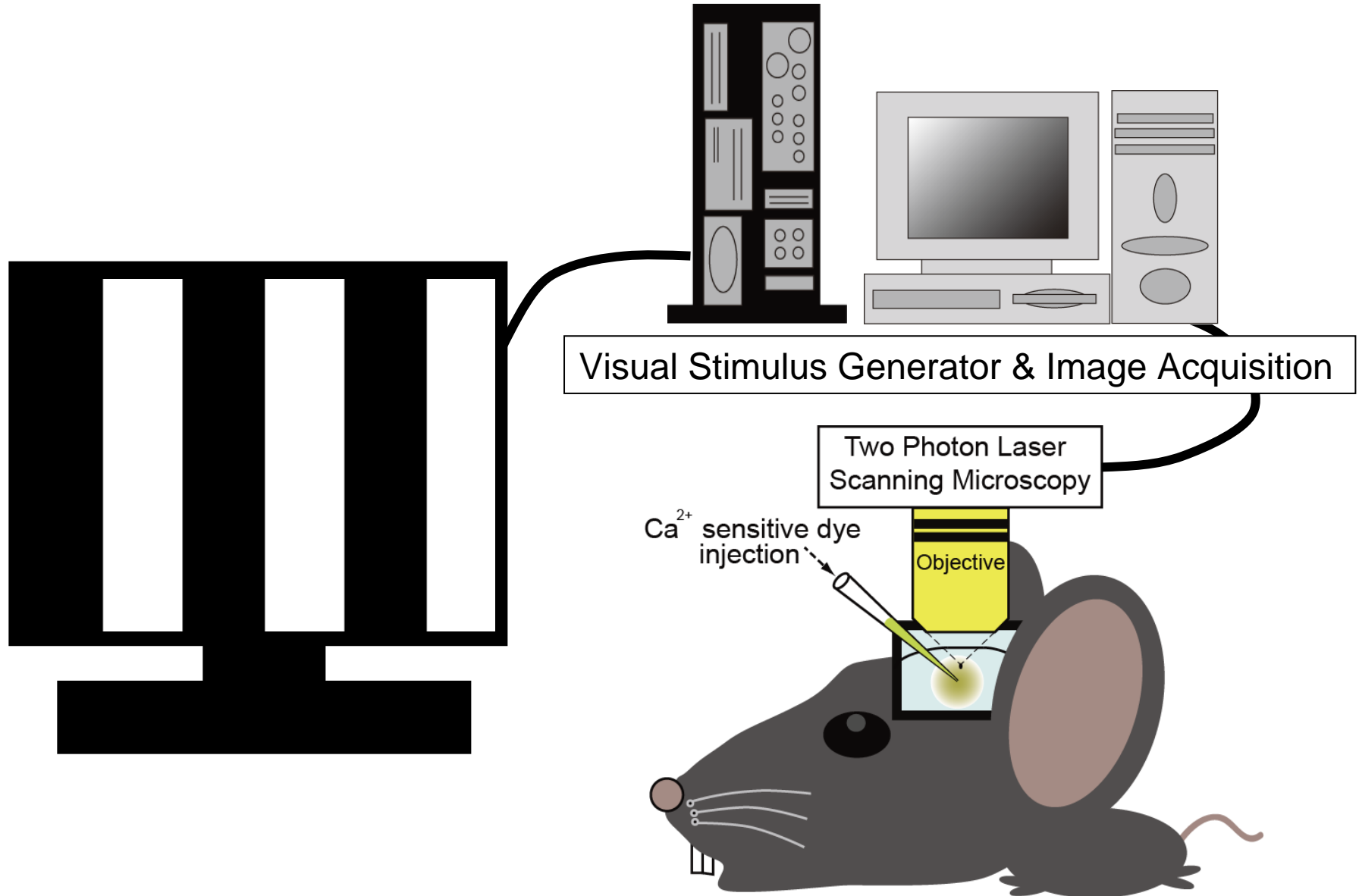
細胞種の同定

GABAニューロン → EGFP, Venus
(GAD67-GFP knock-in mice)
(VGAT-Venus mice/rat)

アストロサイト → Sulforhodamine 101 (SR101)

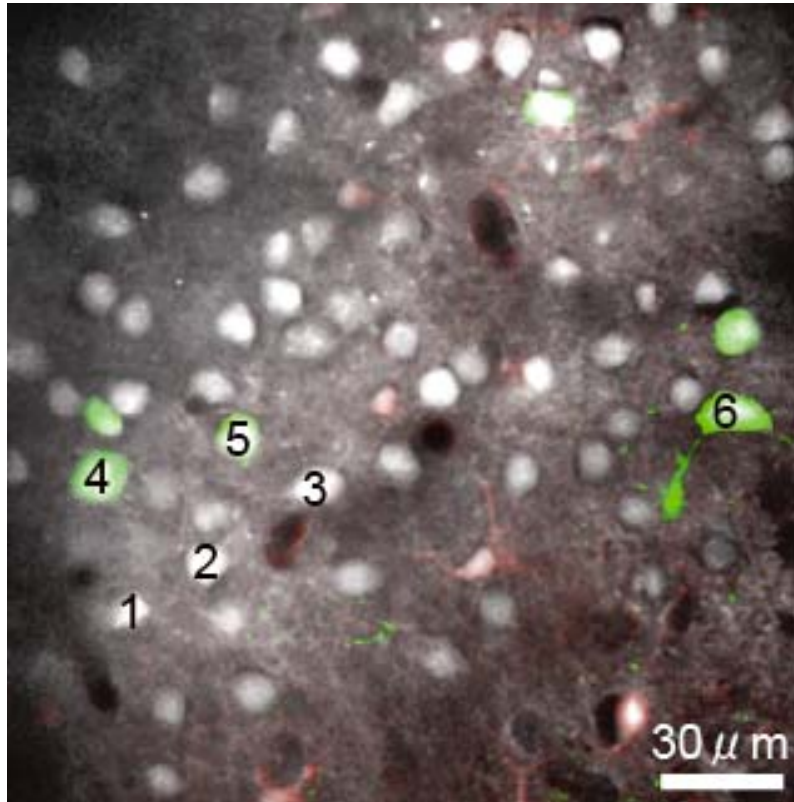
興奮性ニューロン → No GFP & No SR101

遺伝子改変動物を用いた *in vivo* 二光子励起機能的Ca²⁺イメージング法



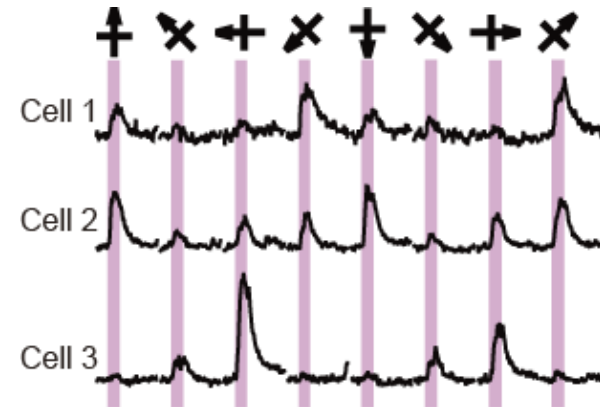
マウス大脳皮質一次視覚野における 興奮性ニューロンとGABAニューロンの方位選択性の違い

深さ160 μm のマウス大脳皮質視覚野

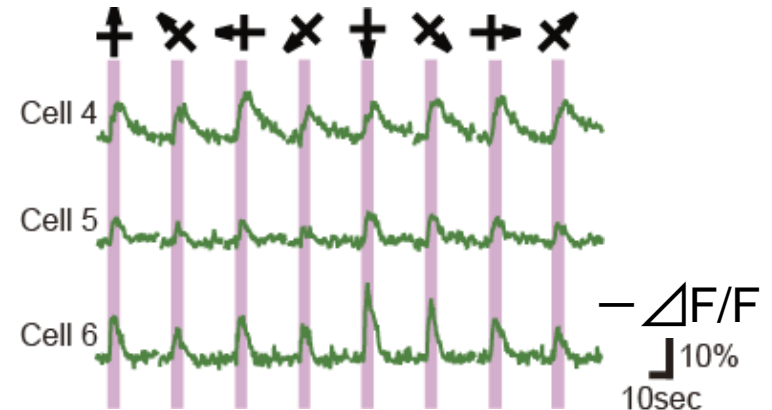


白:興奮性ニューロン 緑:GABAニューロン
赤:アストログリア

興奮性ニューロンの光反応の例



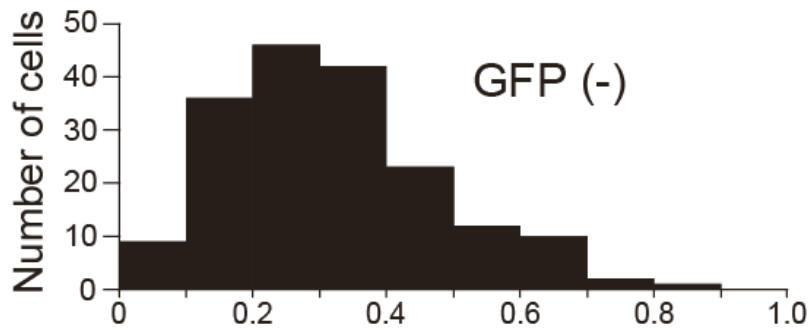
GABAニューロンの光反応の例



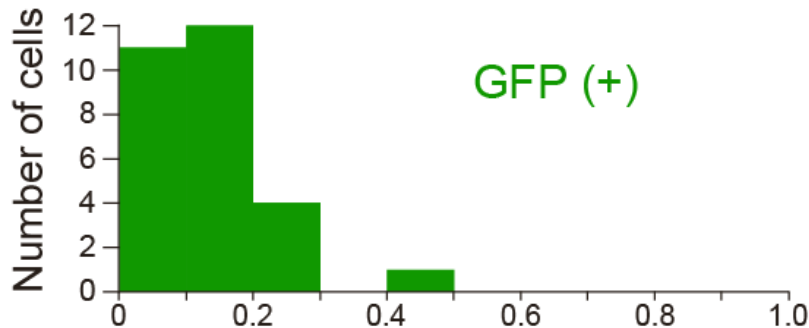
縦桃縞は光刺激時間を黒矢印は刺激の種類を示す。

マウス大脳皮質一次視覚野における 興奮性ニューロンとGABAニューロンの方位選択性の違い

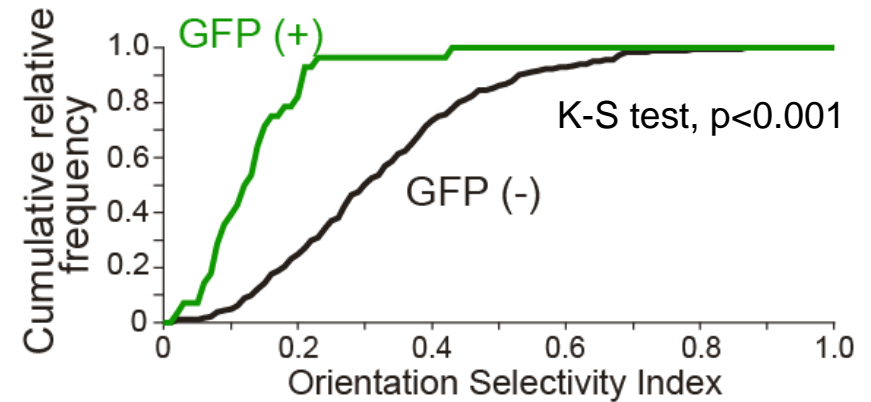
a. 興奮性ニューロンの OSI 分布



b. GABAニューロンの OSI 分布

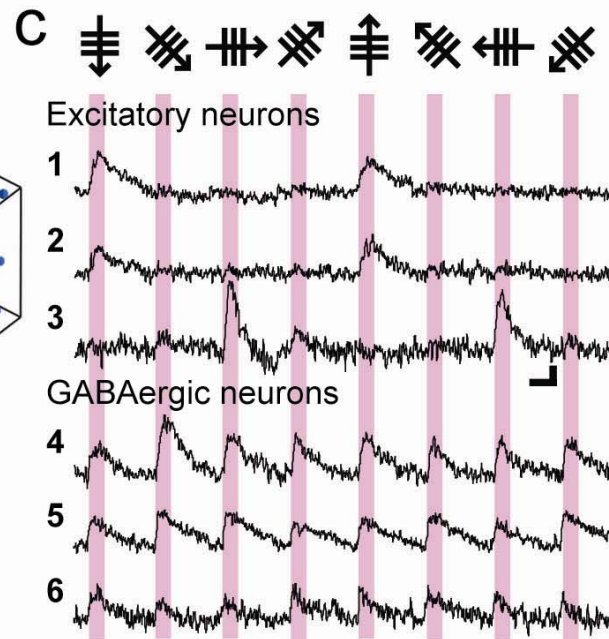
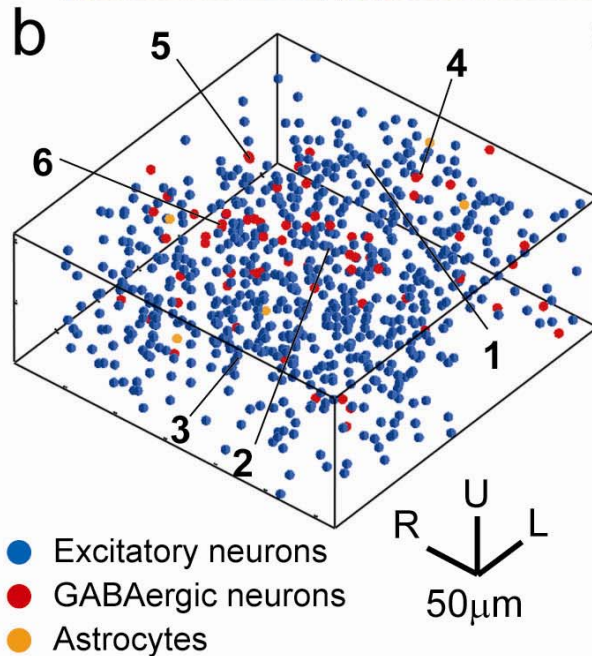
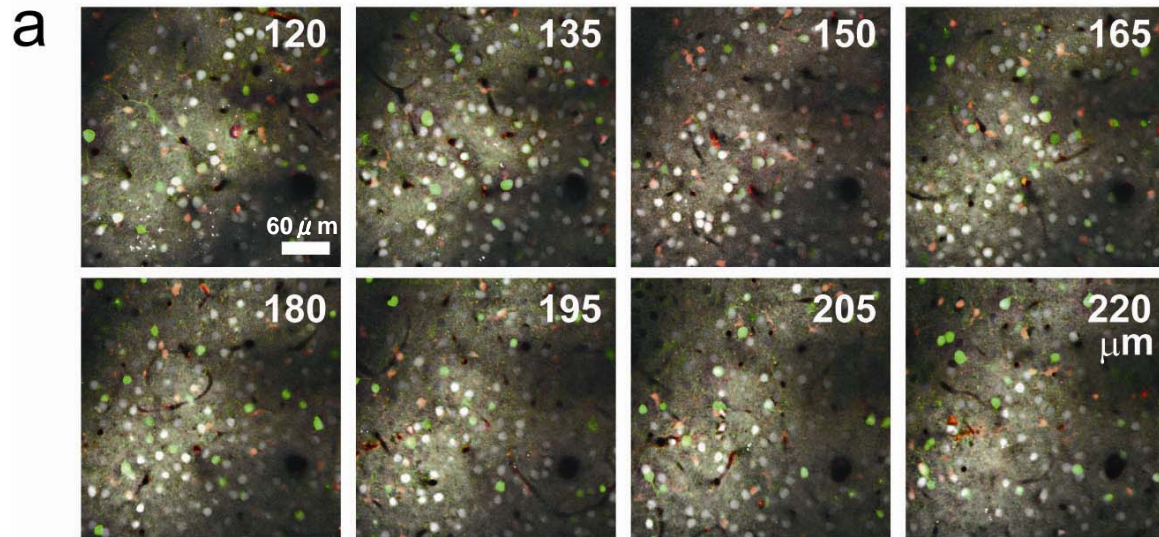


c. 両ニューロンのOSI分布の比較

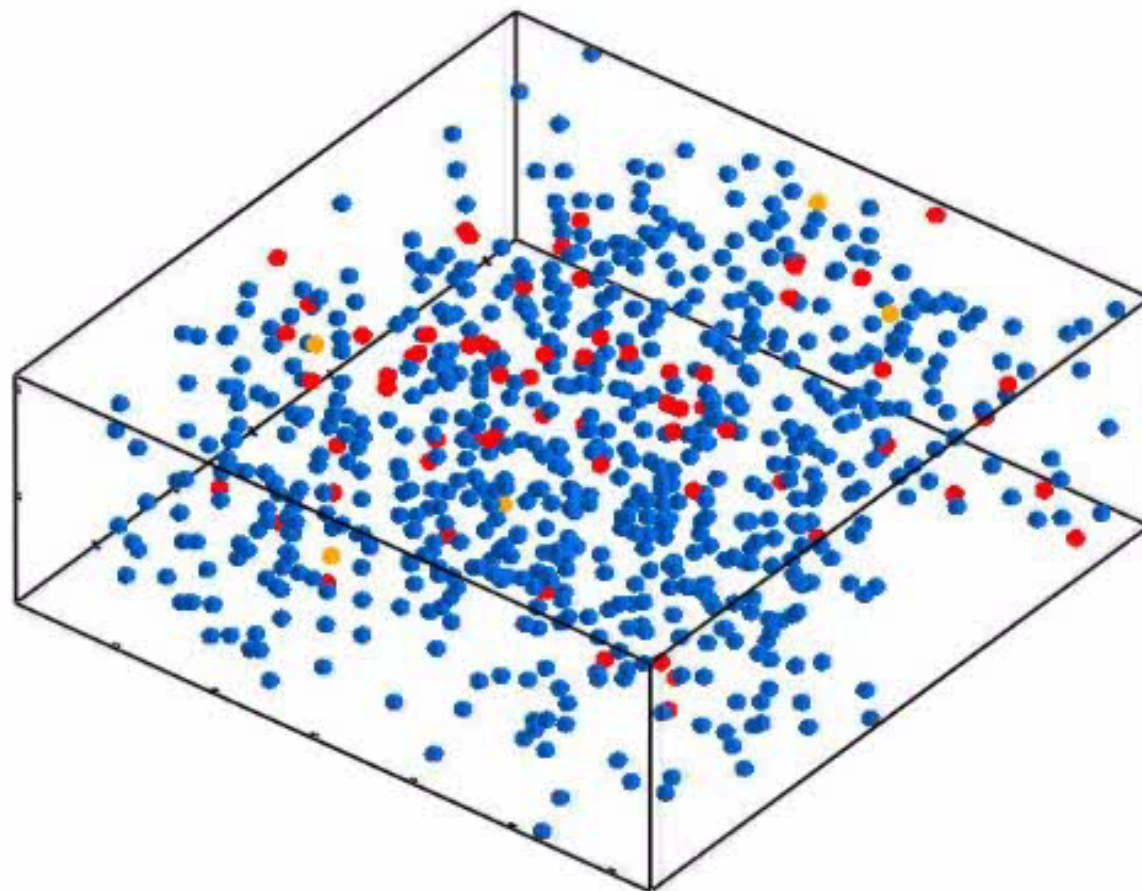


$$OSI = \frac{\sqrt{(\sum R(\theta_i) \sin(2\theta_i))^2 + (\sum R(\theta_i) \cos(2\theta_i))^2}}{\sum R(\theta_i)}$$

マウス大脳皮質一次視覚野を GABAニューロンの配置とニューロン活動から解析を行う。



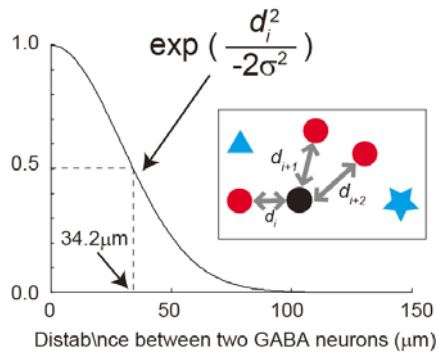
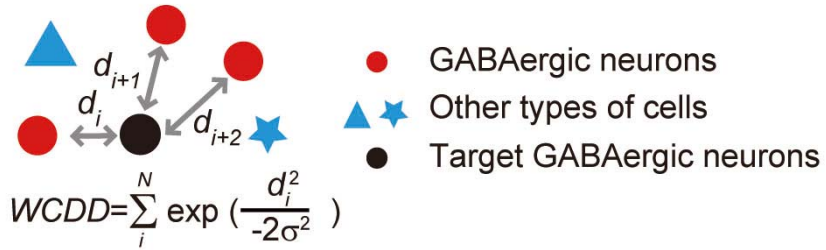
マウス大脳皮質一次視覚野ニューロンの配置



- Excitatory neurons
- GABAergic neurons
- Astrocytes

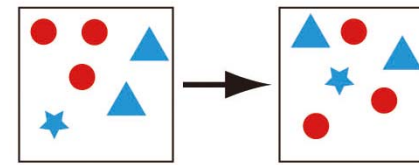
マウス大脳皮質一次視覚野GABAニューロンの配置解析法

a Weighted cell-to-cell distance density (WCDD)

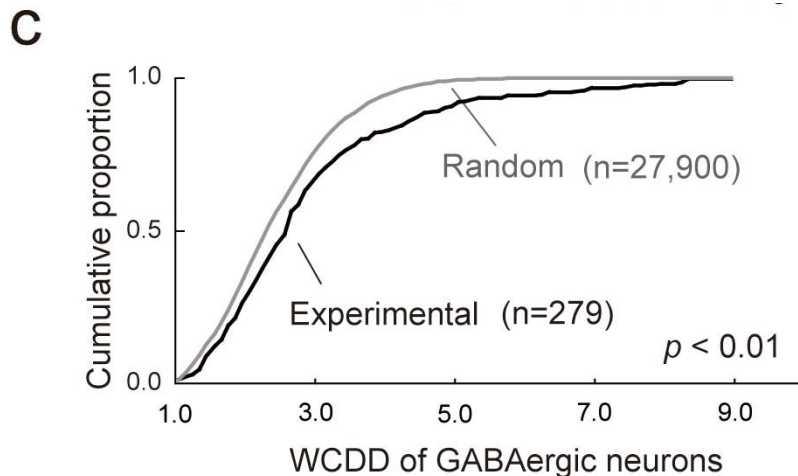
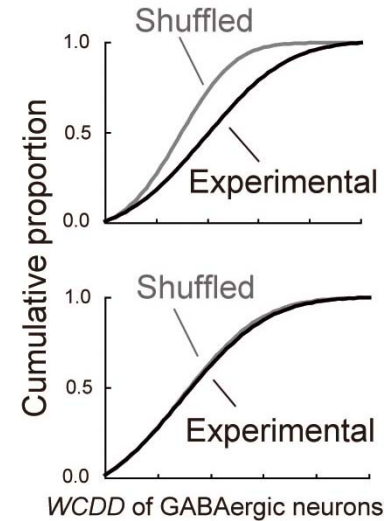
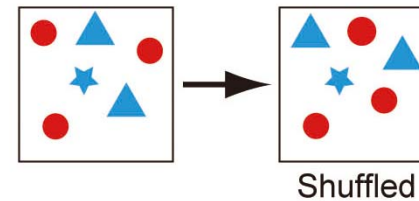


b Two possibilities:

1. Clustered distribution



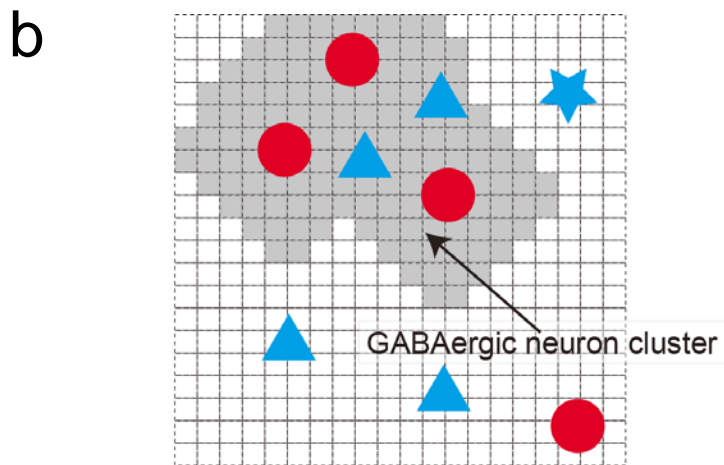
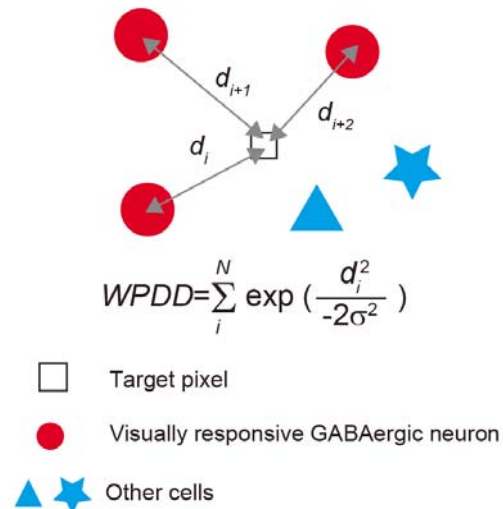
2. Random distribution



視覚応答を示すGABAニューロンには、
固まって配置するものがある。

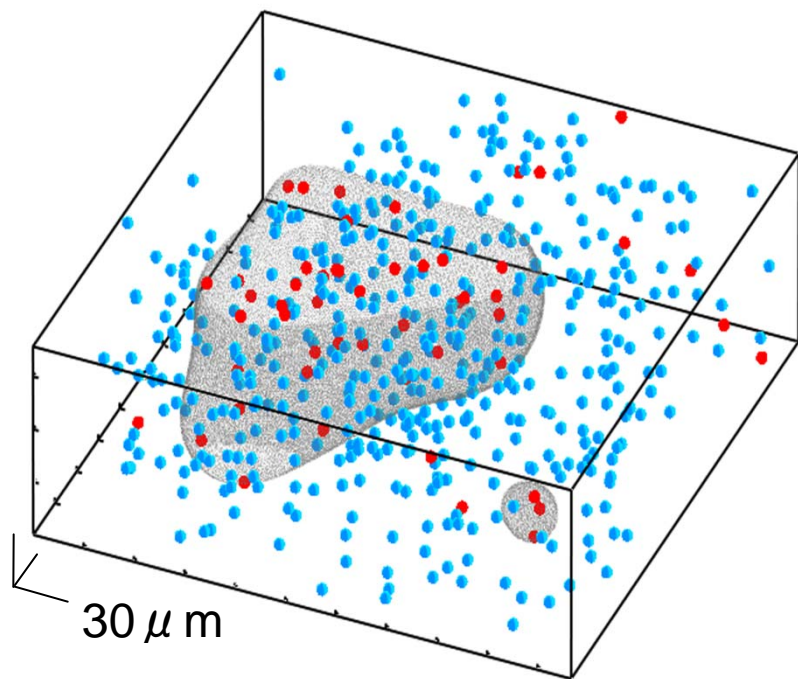
マウス大脳皮質一次視覚野GABAニューロンの配置解析法 (GABAニューロンクラスター空間の見積)

a Weighted Pixel-to-Cell Distance Density (*WPDD*) was calculated for each spatial location.



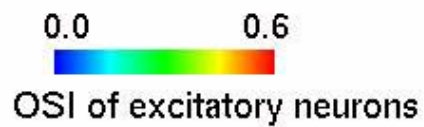
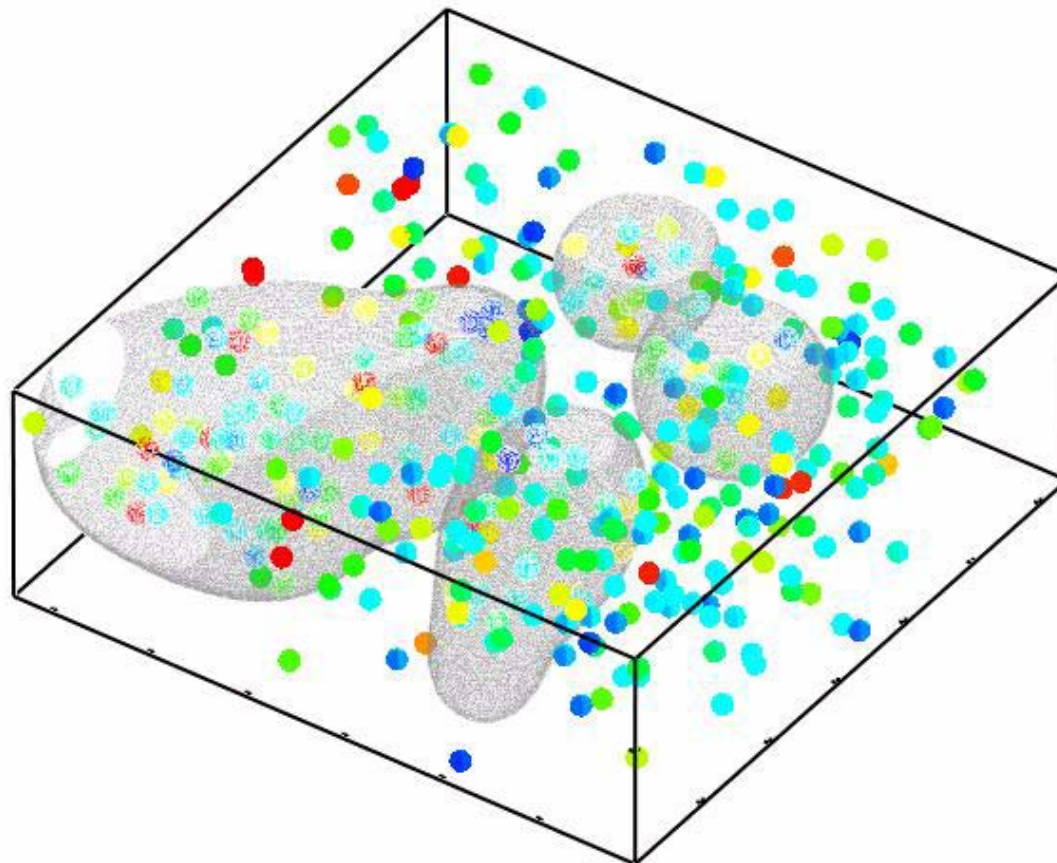
- Locations with *WPDD* higher than the mean *WCDD* of the experimental data
- Other locations

c

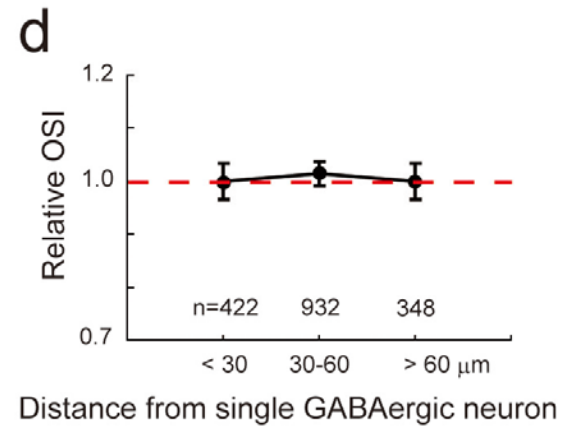
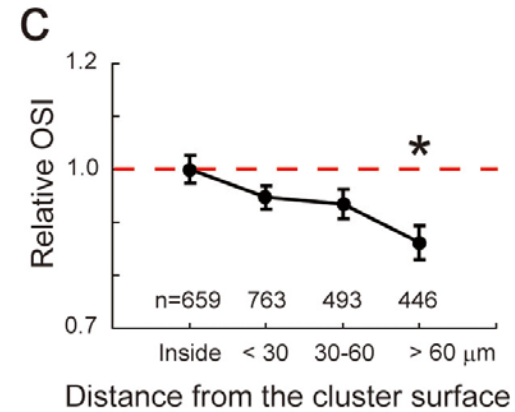
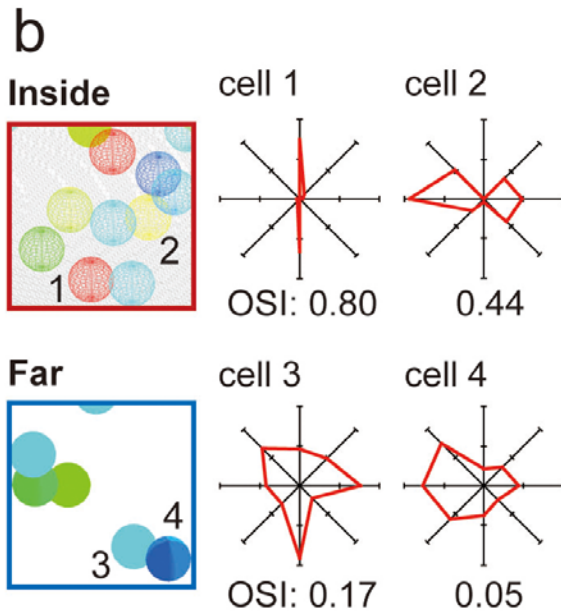
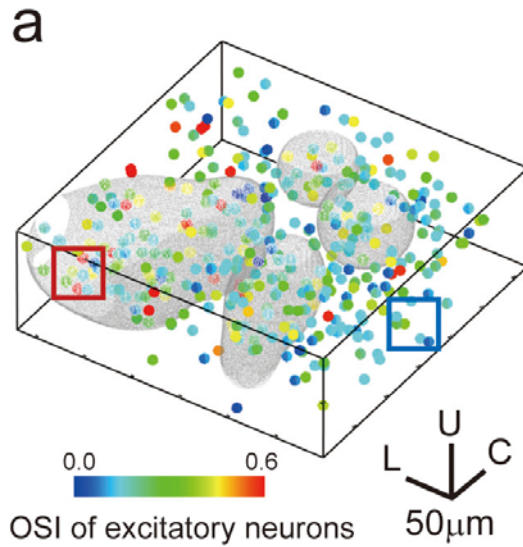


- Excitatory Neuron
- GABAergic Neuron

マウス大脳皮質一次視覚野GABAニューロンの配置解析法 (GABAニューロンクラスター空間と機能解析へ向けて)



マウス大脳皮質一次視覚野GABAニューロンクラスター空間 と興奮性ニューロンの方位選択性の関係



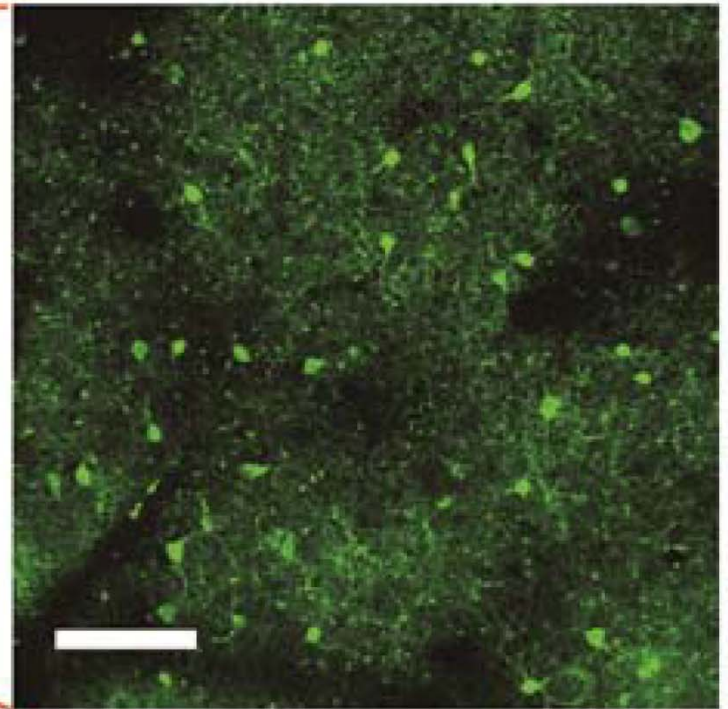
マウス大脳皮質一次視覚野 GABAニューロンクラスター空間内の抑制入力

GCaMP3 imaging

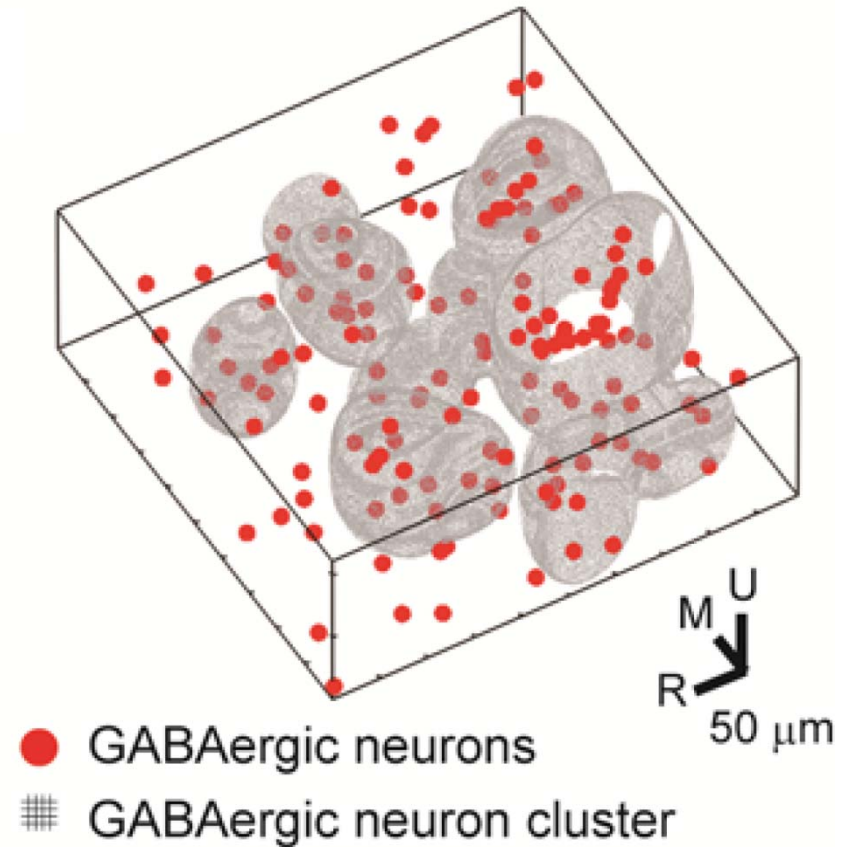
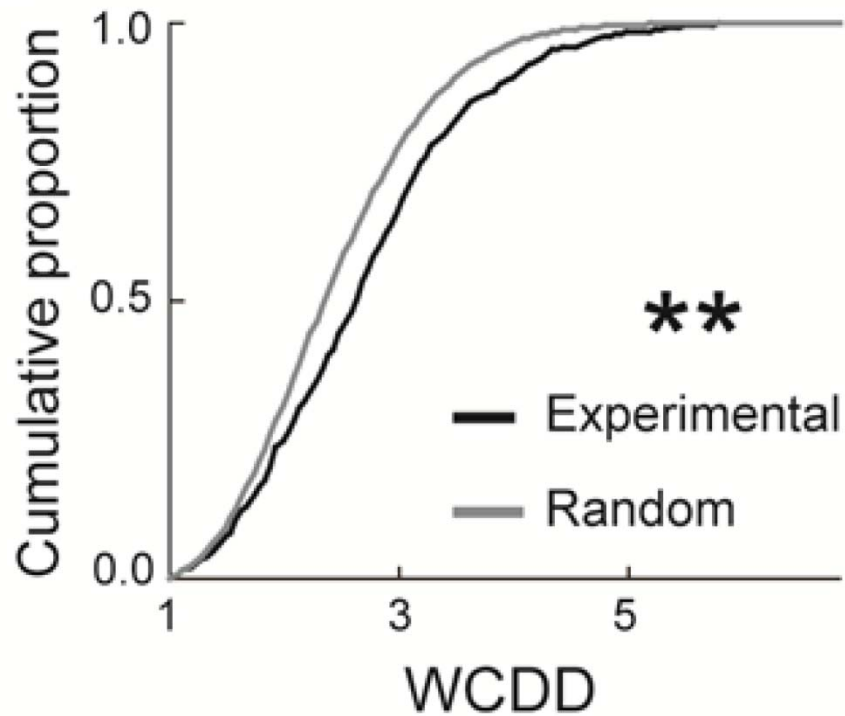
$\Delta d = 10 \mu\text{m}$

100 μm

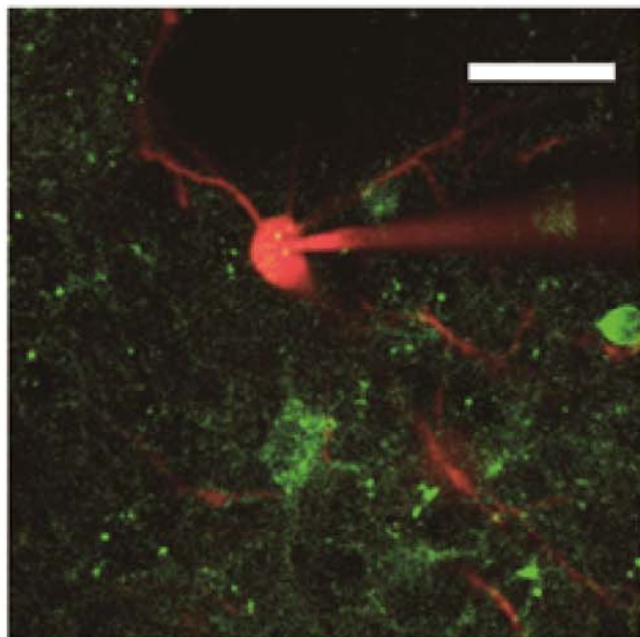
512 μm



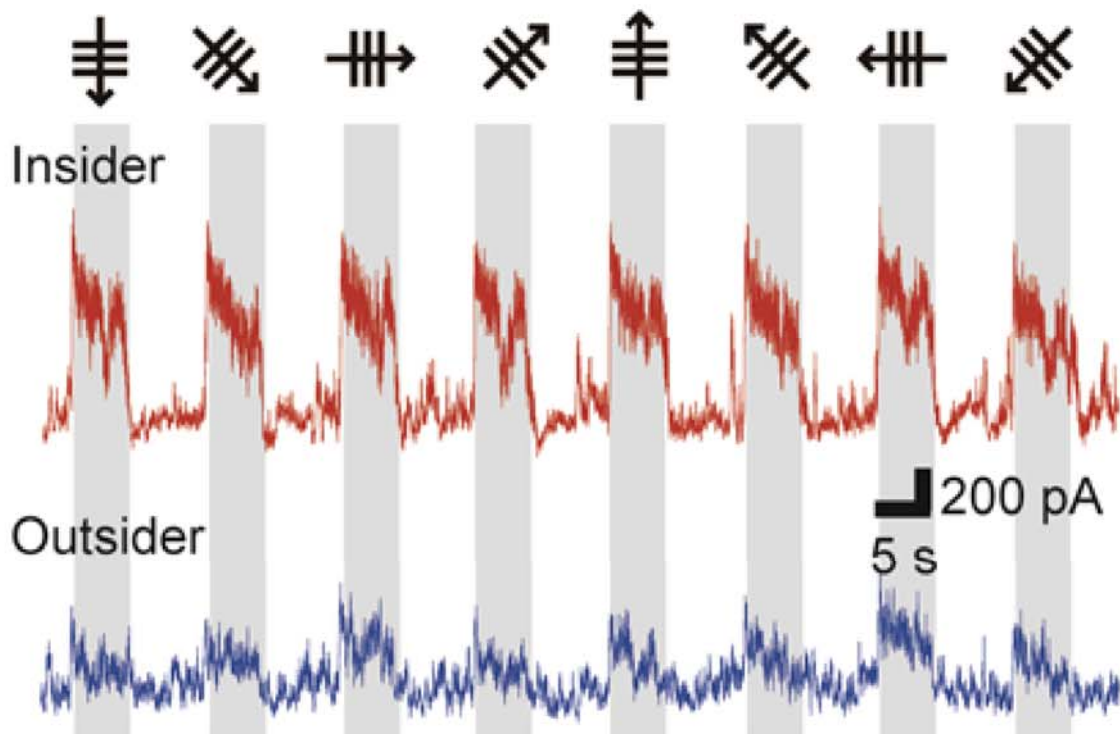
マウス大脳皮質一次視覚野 GABAニューロンクラスター空間内の抑制入力



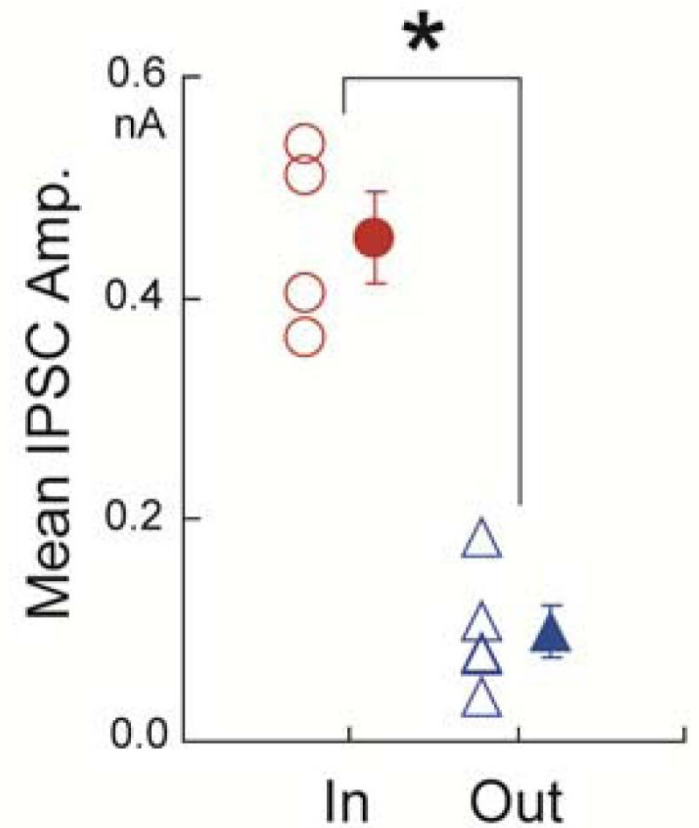
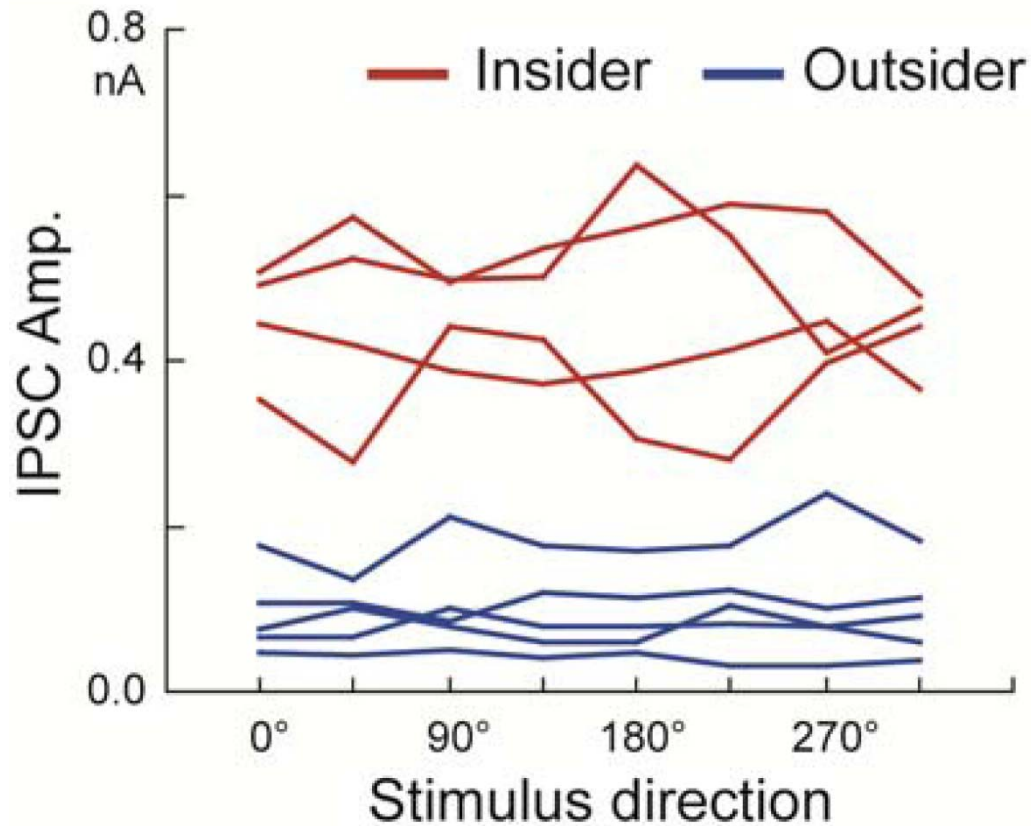
マウス大脳皮質一次視覚野 GABAニューロンクラスター空間内の抑制入力



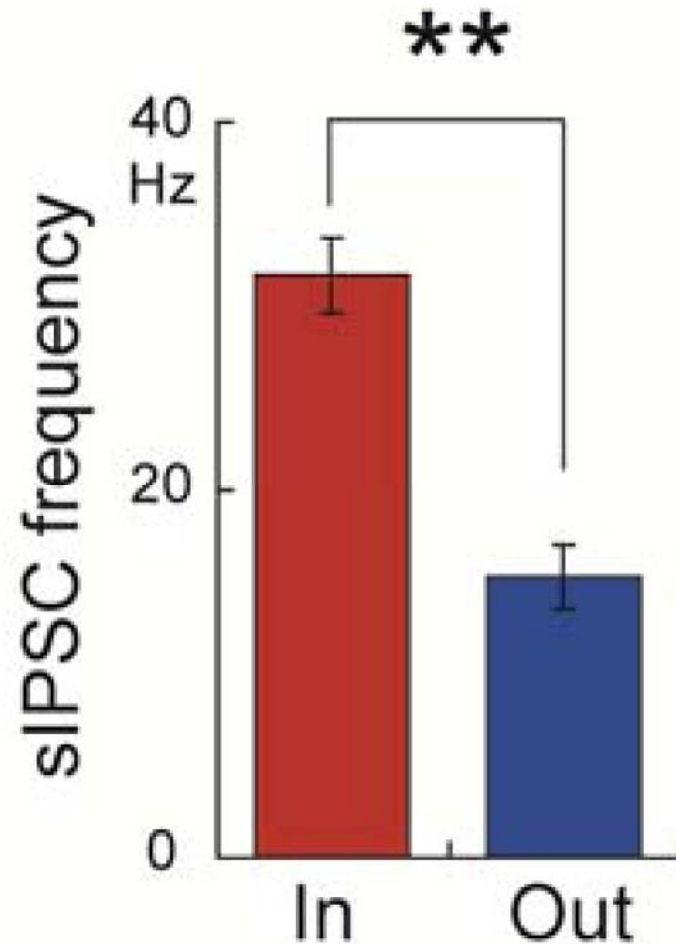
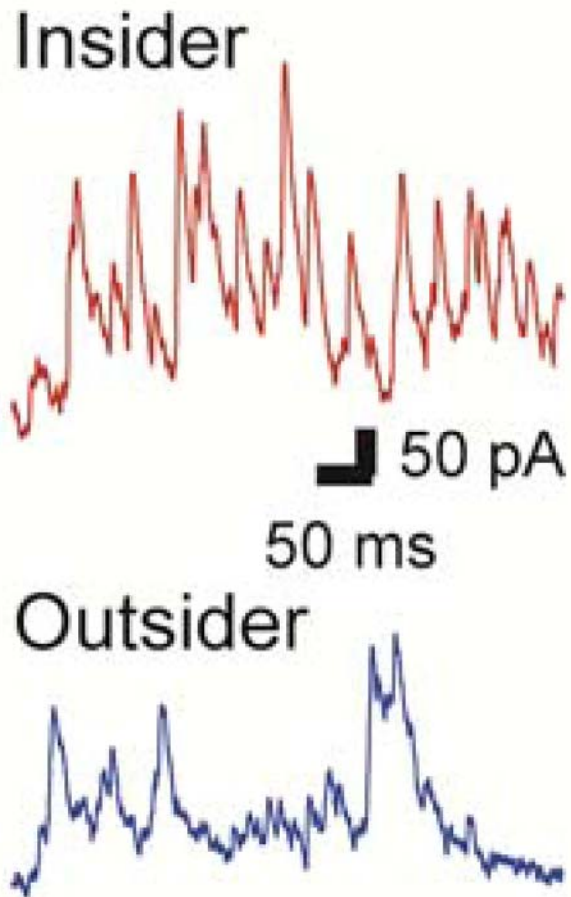
Visually evoked IPSC



マウス大脳皮質一次視覚野 GABAニューロンクラスター空間内の抑制入力



マウス大脳皮質一次視覚野 GABAニューロンクラスター空間内の抑制入力



まとめ 1

- 1、マウス大脳皮質一次視覚野神経回路網内において、GABAニューロンは、興奮性ニューロンよりも方位選択性が鈍い。
- 2、マウス大脳皮質一次視覚野神経回路網内には、視覚応答を示すGABAニューロンの密度が高い空間が存在する。
- 3、視覚応答を示すGABAニューロン密度と興奮性ニューロン方位選択性強度には、相関関係がある。
- 4、視覚応答を示すGABAニューロンの密度が高い空間内に存在する興奮性ニューロンは、視覚応答を示すGABAニューロンの密度が高い空間外に存在する興奮性ニューロンよりも多くの抑制性入力を受け取っている。

本日のトピック

1. イントロダクション～局所神経回路網解析と方法論～
2. 大脳皮質一次視覚野ニューロンの方位(傾き)選択性について
3. 抑制回路を介したコリン作動性ニューロンによる
覚醒脳の動作制御機構

覚醒下の遺伝子改変ラットを用いた *in vivo* 二光子励起機能的Ca²⁺イメージング法の開発

覚醒ラットの保定装置全体像



保定中の覚醒ラットの様子

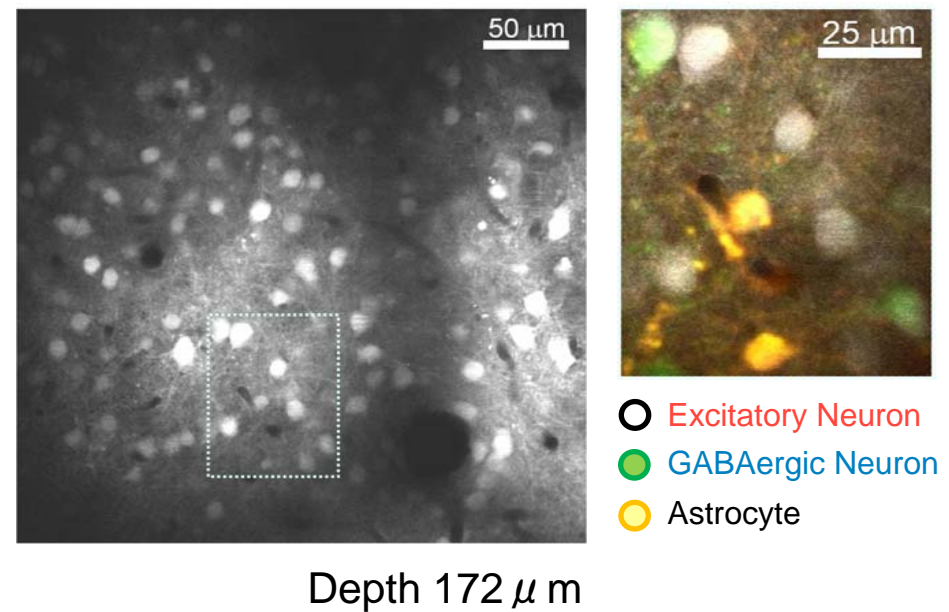
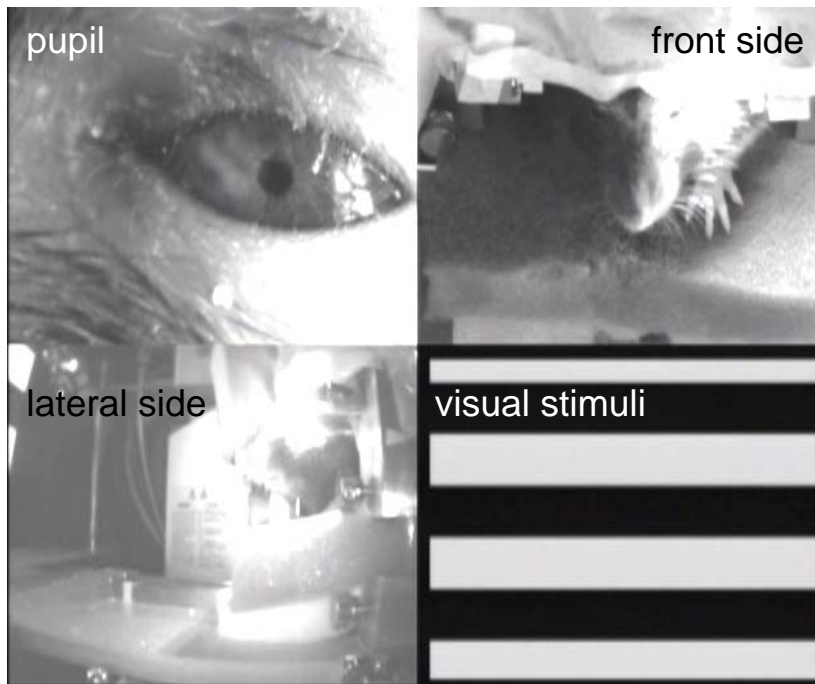


(理化学研究所 動物実験計画承認済み・承認番号H22-EP082)

覚醒下の遺伝子改変ラットを用いた *in vivo* 二光子励起機能的Ca²⁺イメージング法の開発

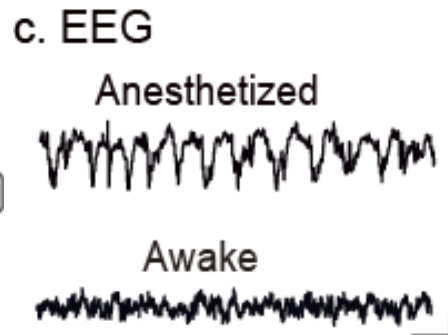
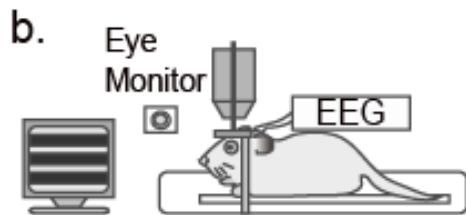
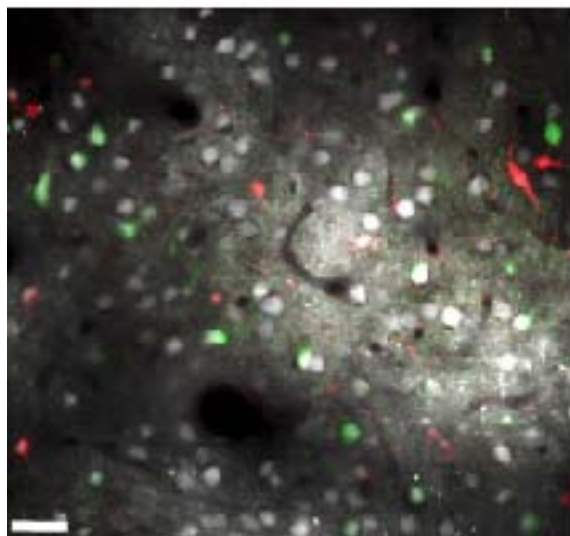
覚醒ラットの状態を二光子レーザー
走査型顕微鏡と同期させてモニターする。

in vivo 二光子レーザー励起機能的
Ca²⁺イメージング画像

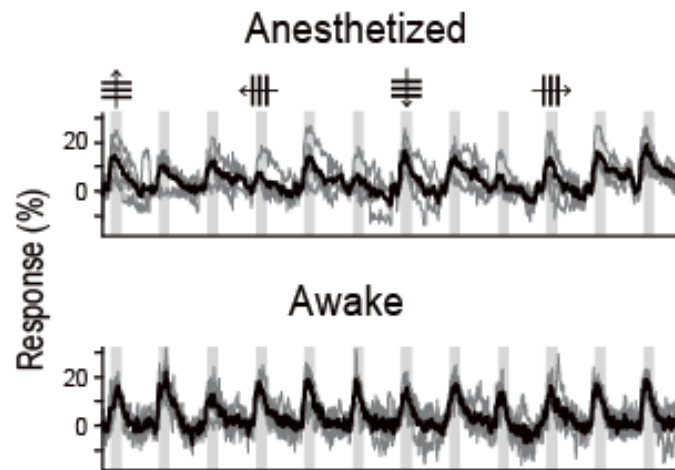


覚醒時と麻酔時におけるラット大脳皮質一次視覚野内の興奮性・GABAニューロンの視覚応答

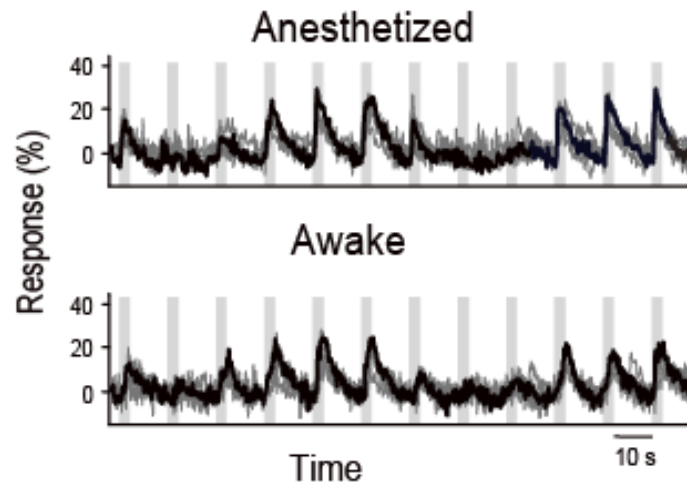
a. Two-photon image



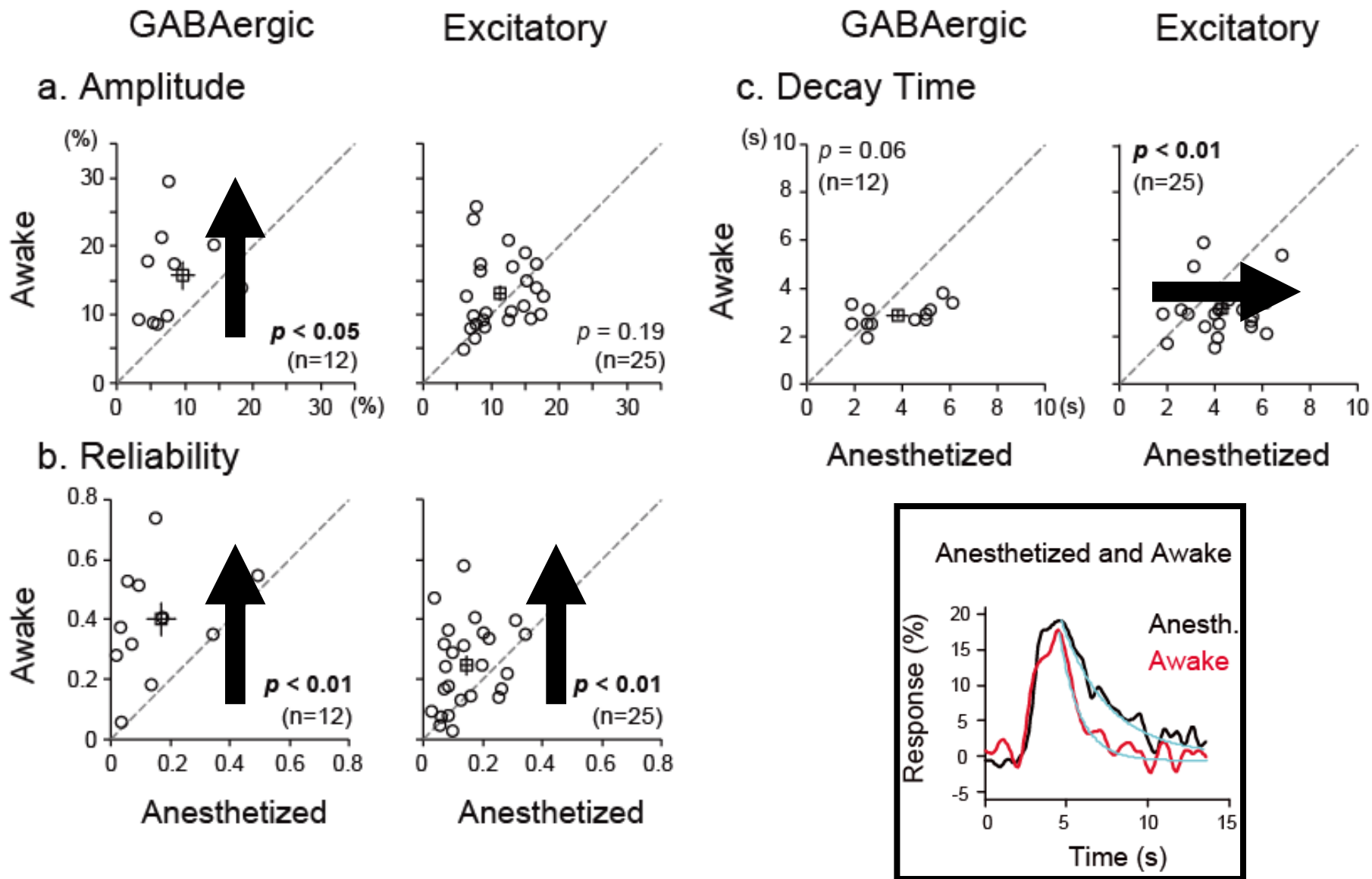
d. GABAergic neuron



e. Excitatory neuron



覚醒時と麻酔時におけるラット大脳皮質一次視覚野内の興奮性・GABAニューロンの視覚応答



脳の主なコリン作動性ニューロン回路

The basal forebrain contains two groups of cholinergic neurons:

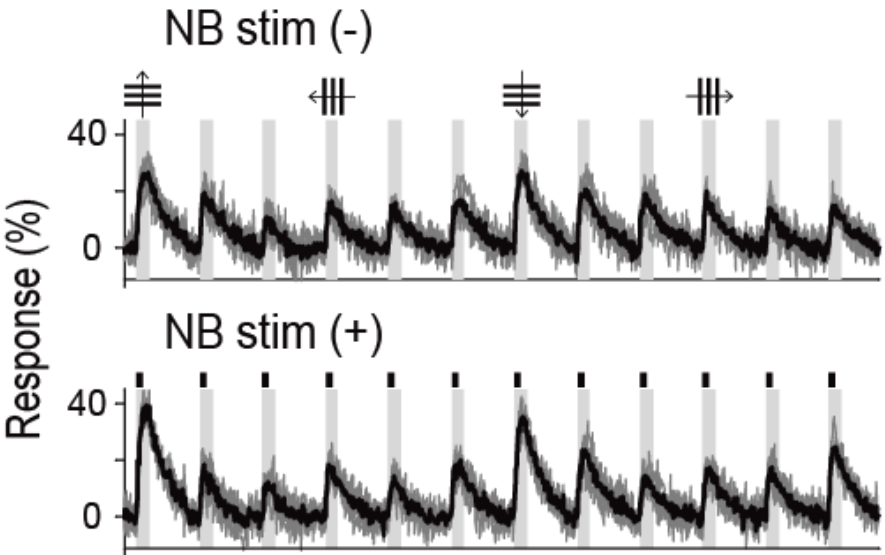
- 1- The medial septal group (medial septal nucleus and vertical diagonal band: ms and vdb) that project cholinergic axons to the hippocampus and parahippocampal gyrus
- 2- **The Nucleus Basalis group** (nucleus basalis, substantia innominata and horizontal diagonal band: bas, si, hdb) that project cholinergic axons to all parts of the neocortex, parts of limbic cortex and to the amygdala (Woolf, 1991; Woolf, 1996).

In rodents the nucleus basalis magnocellularis (NBM) is the equivalent of Meynert nucleus in the primates.

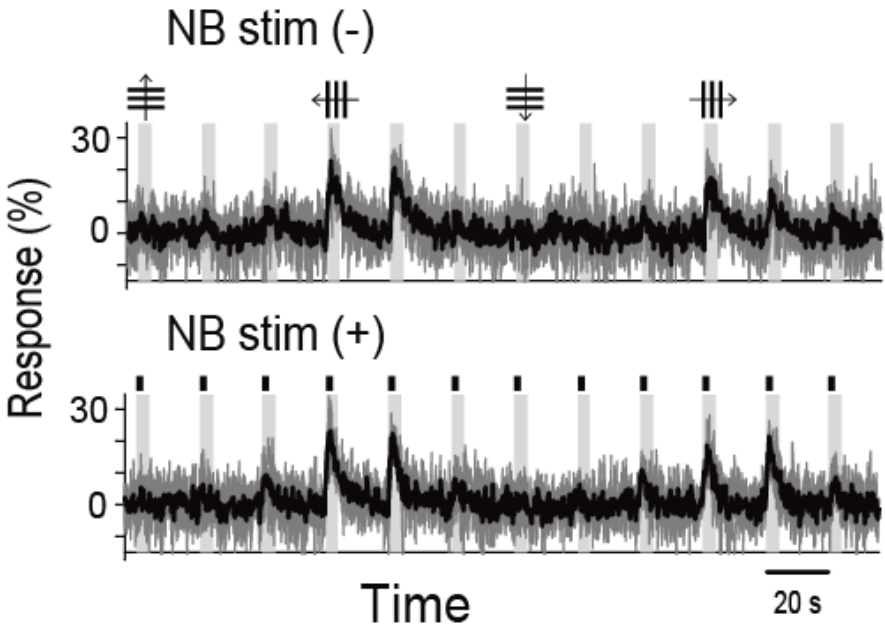
The cholinergic pontomesencephalon neurons (laterodorsal tegmental and pedunculo pontine tegmental nuclei: ldt and ppt) project onto hindbrain, thalamus, hypothalamus and basal forebrain.

the nucleus basalis magnocellularis: NB電気刺激時におけるマウス大脳皮質一次視覚野内の興奮性・GABAニューロンの視覚応答

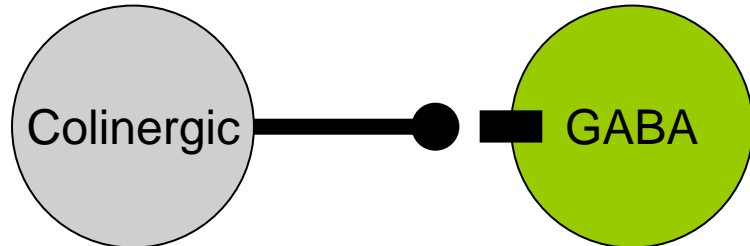
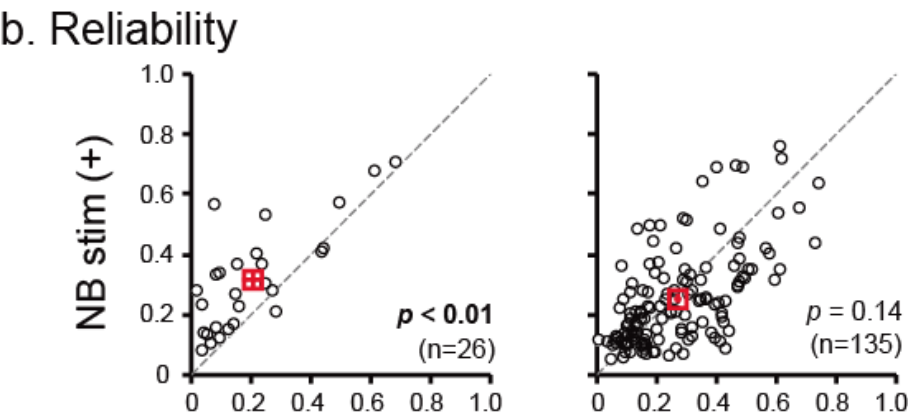
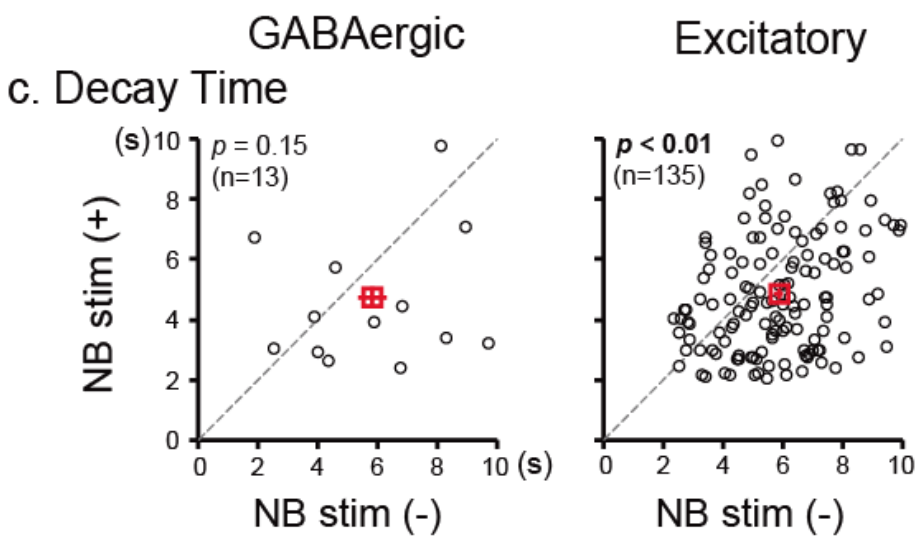
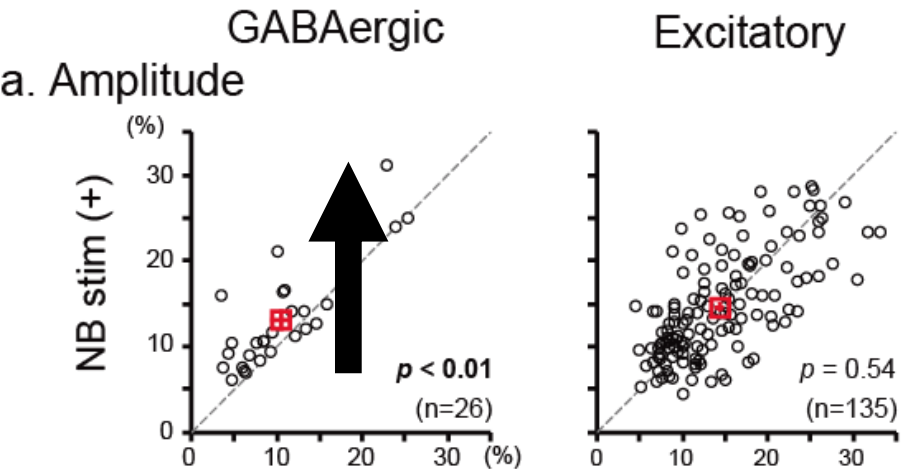
a. GABAergic neuron



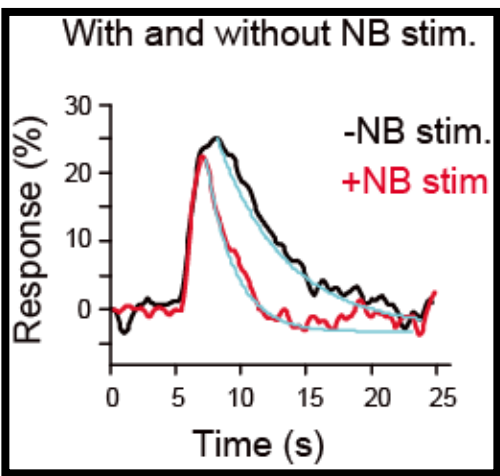
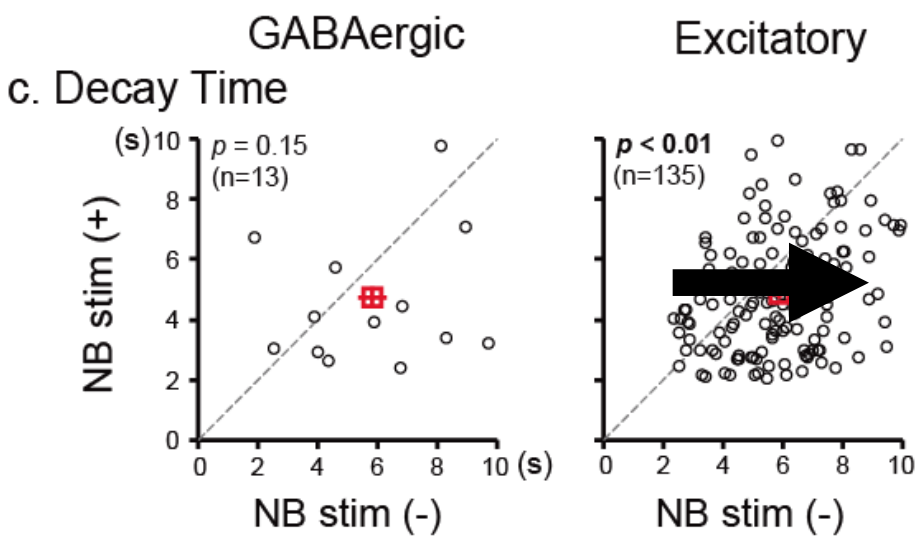
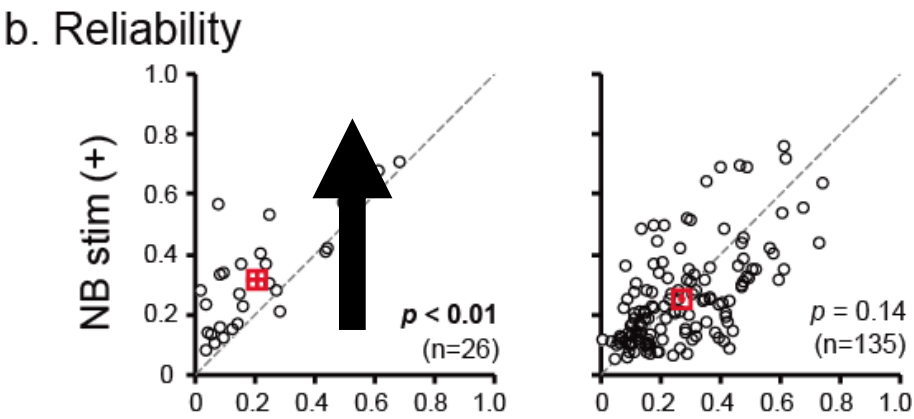
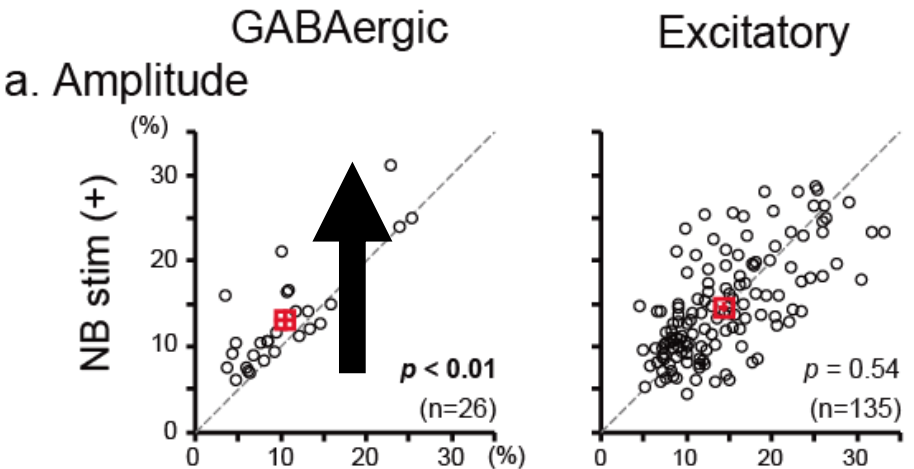
b. Excitatory neuron



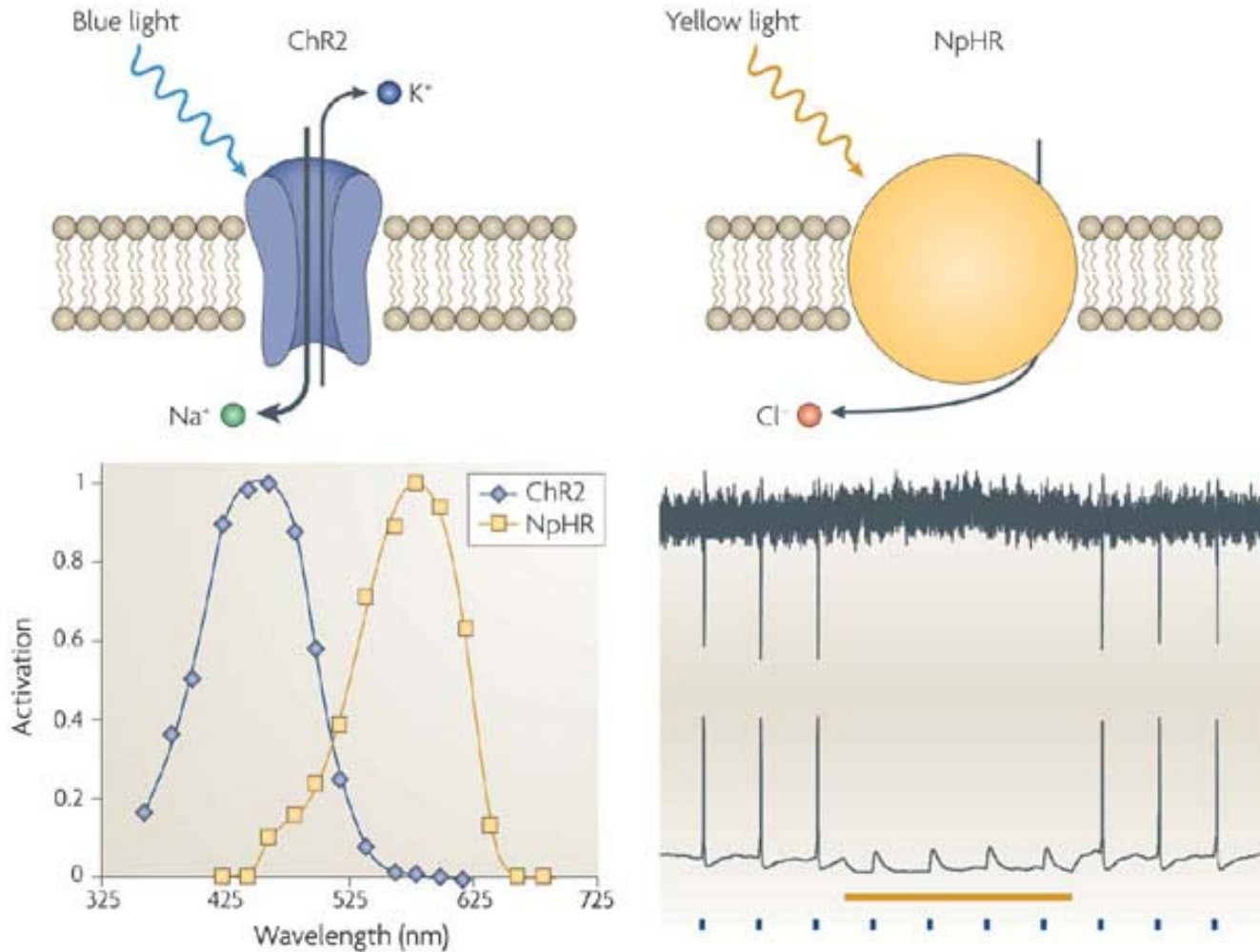
the nucleus basalis magnocellularis: NB電気刺激時におけるマウス大脳皮質一次視覚野内の興奮性・GABAニューロンの視覚応答



the nucleus basalis magnocellularis: NB電気刺激時における マウス大脳皮質一次視覚野内の興奮性・GABAニューロンの視覚応答

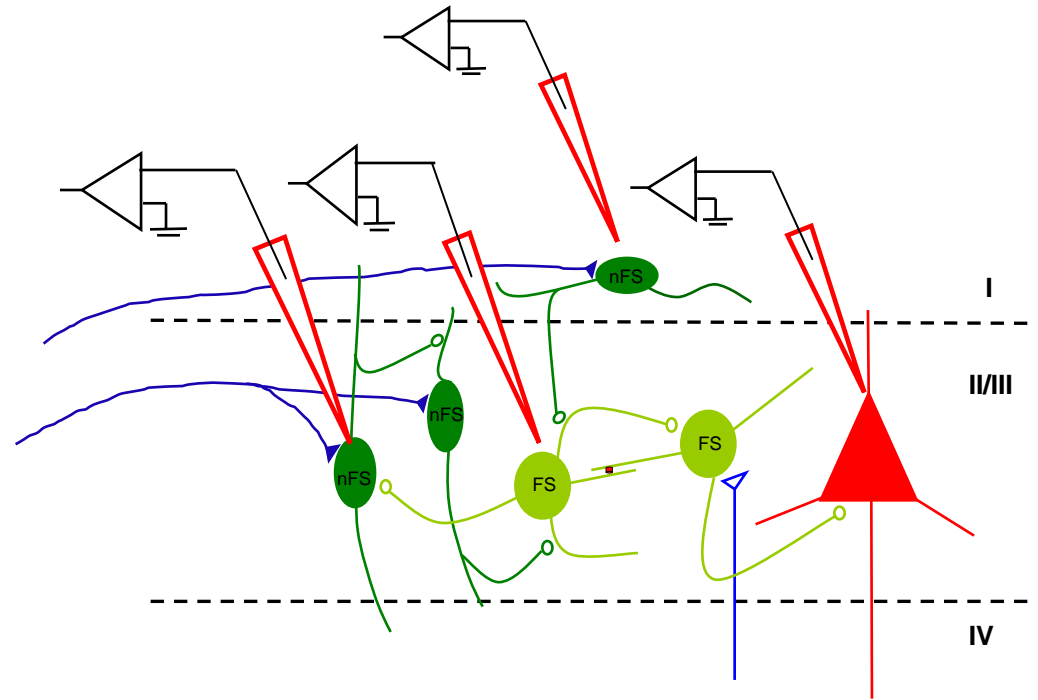
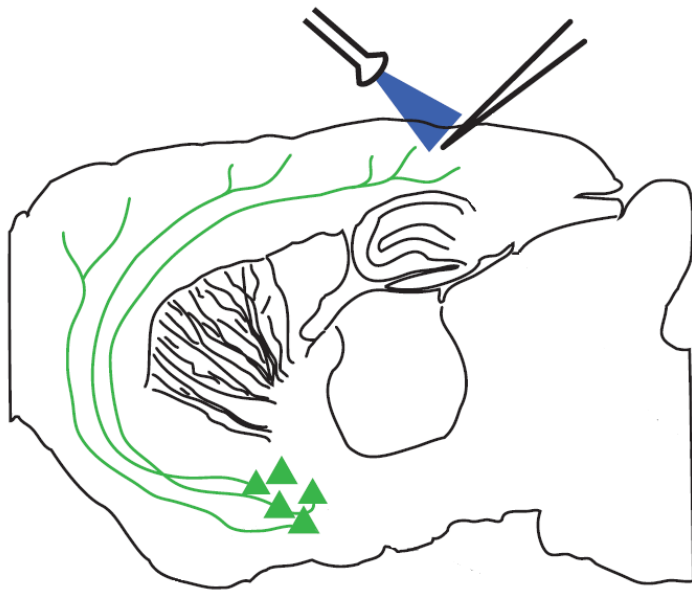


光によって神経細胞を刺激する



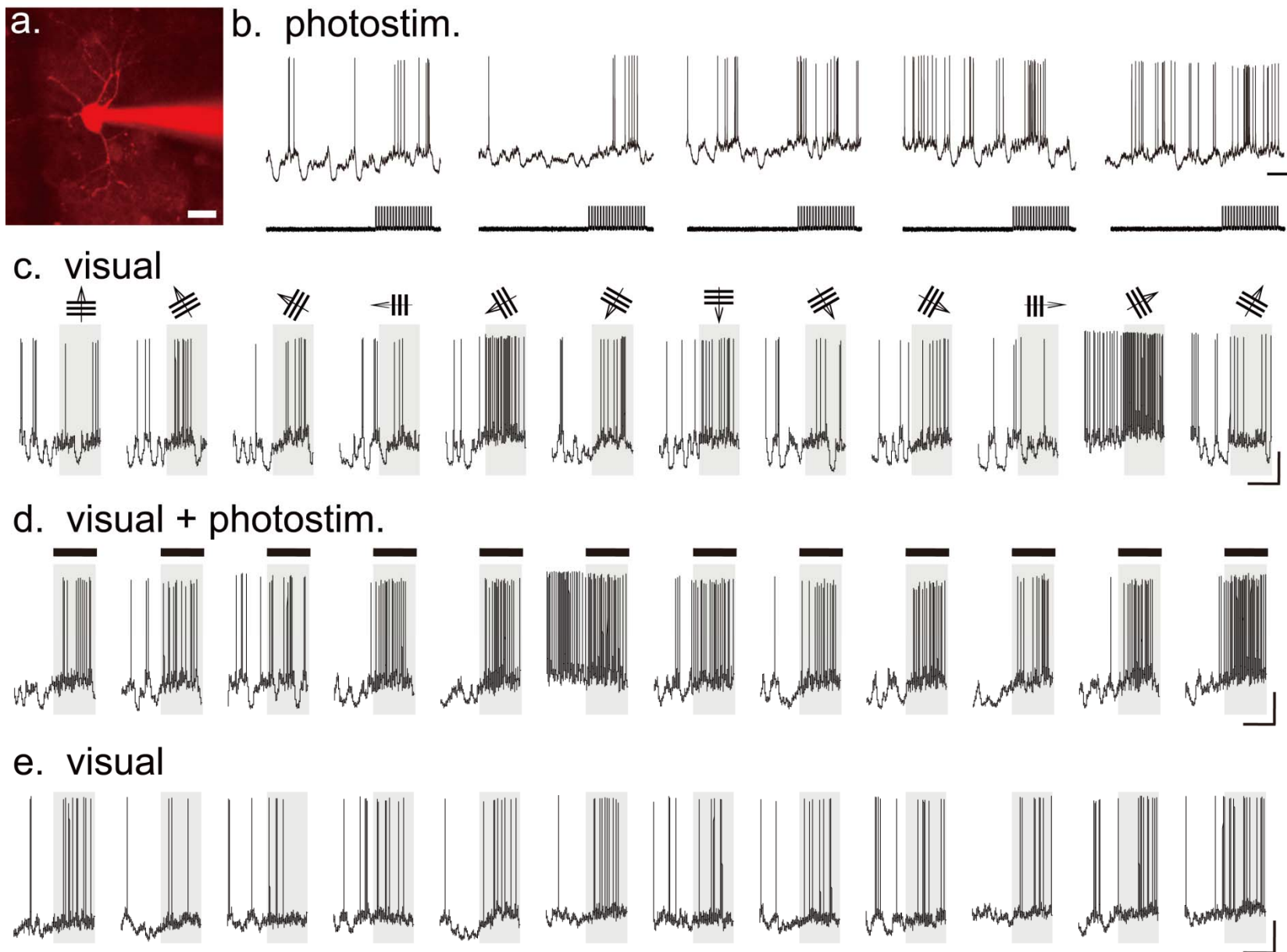
(Zhang F et al. Nature Reviews Neuroscience 2007)

コリン作動性ニューロンChR2刺激時における マウス大脳皮質一次視覚野内のニューロンの膜電位変化



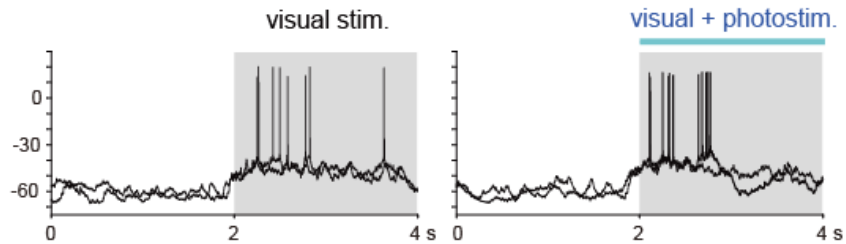
Arroyo S, et al., J Neuroscience., 2012

コリン作動性ニューロンChR2刺激時における マウス大脳皮質一次視覚野内のGABAニューロンの視覚応答

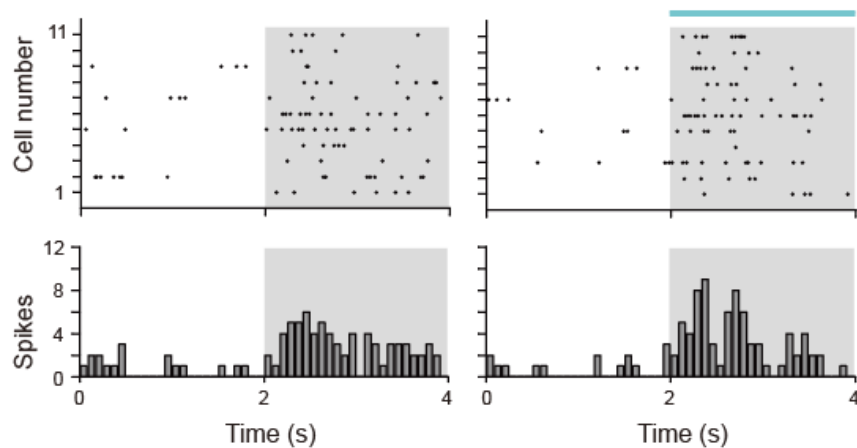


コリン作動性ニューロンChR2刺激時における マウス大脳皮質一次視覚野内のニューロンの視覚応答

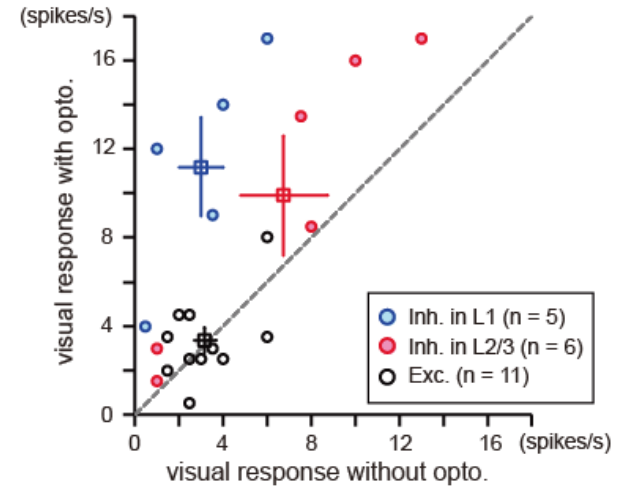
a. Visual responses (Membrane potentials)



b. Visual responses (Action potentials)

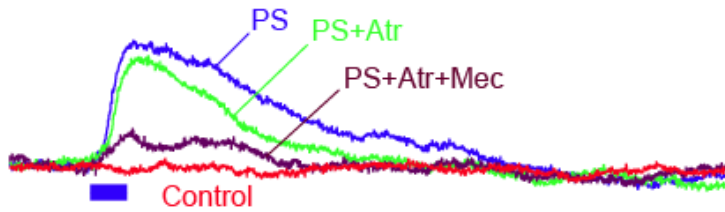


c. Summary

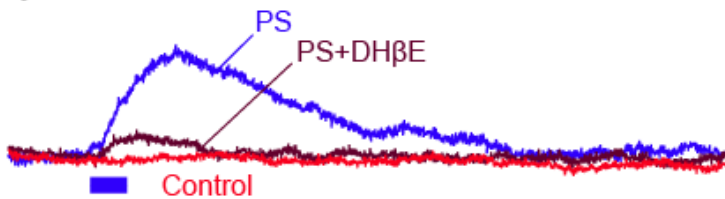


コリン作動性ニューロンChR2刺激時における マウス大脳皮質一次視覚野内のニューロンの膜電位変化

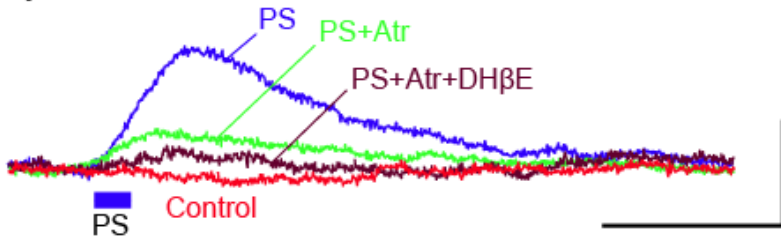
a. Layer 1 non-FS neuron



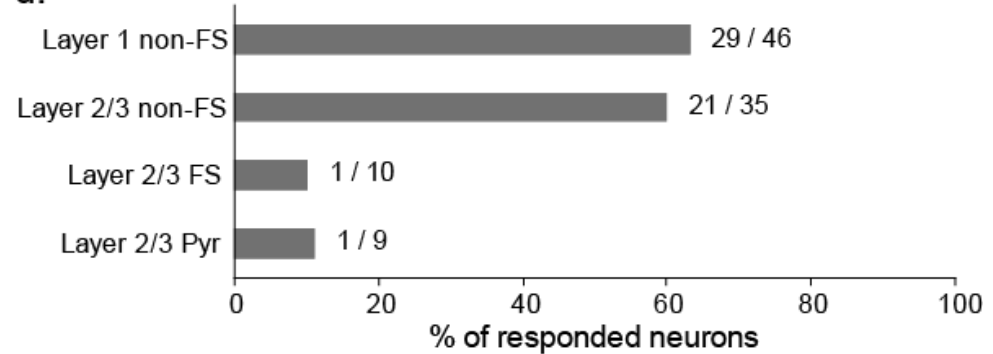
b. Layer 1 non-FS neuron



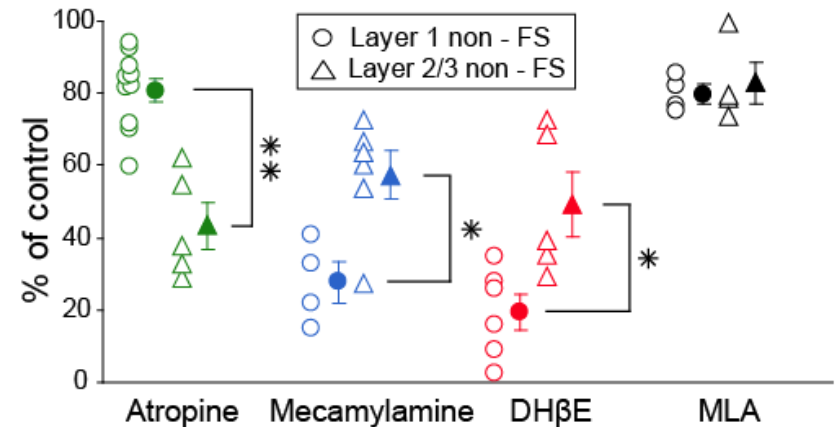
c. Layer 2/3 non-FS neuron



d.

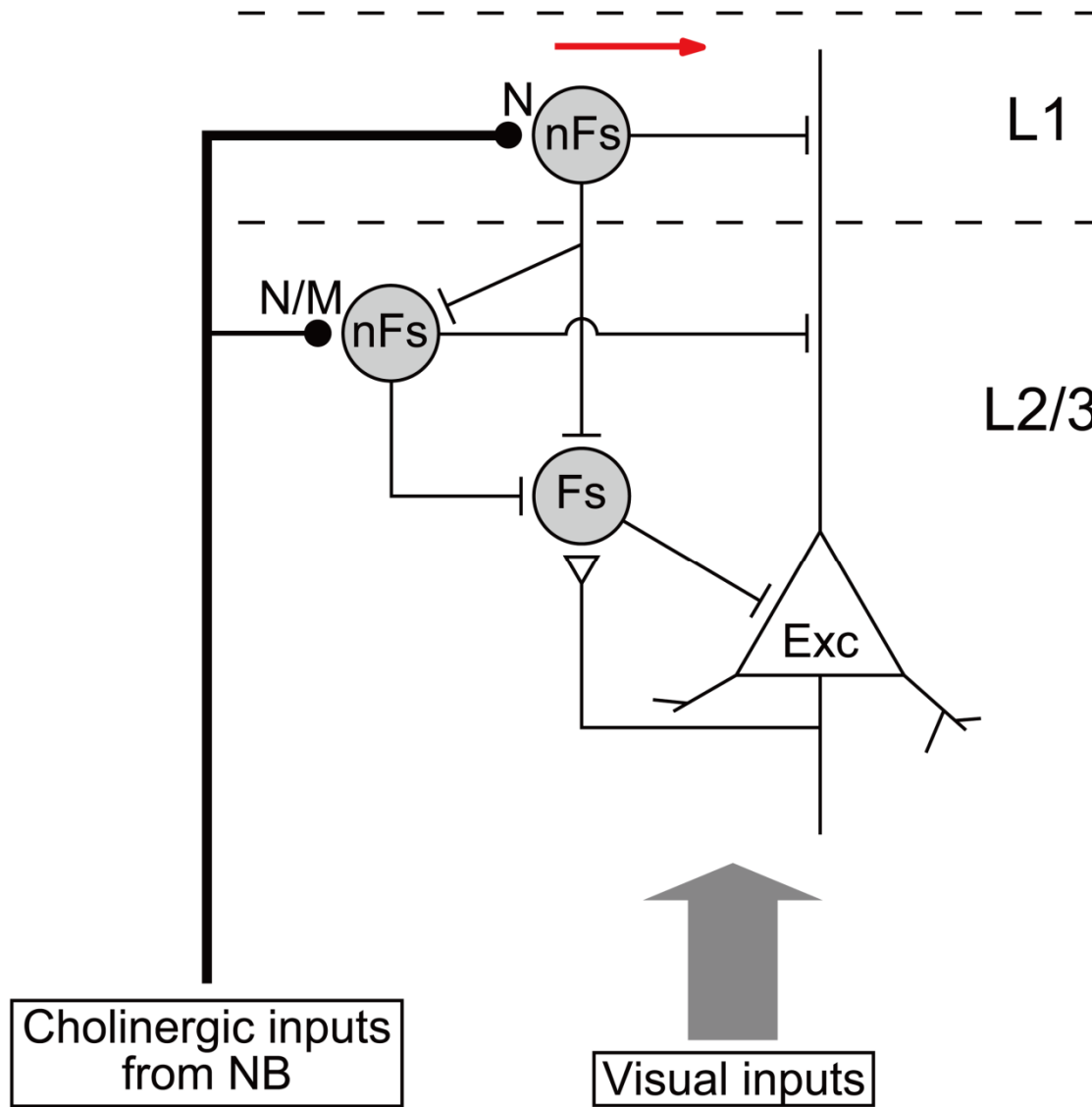


e.



DHβE: dihydro- β -erythroidine hydrobromide
(antagonist selective for non- $\alpha 7$ nicotinic receptors)
MLA: methyllycaconitine citrate
(antagonist selective for $\alpha 7$ nicotinic receptors)

まとめ 2



共同研究者

RIKEN・BSI・

大脳皮質回路可塑性研究チーム

津本 忠治

蝦名 鉄平

木村 墨

Yin Shu-ting

Jiang Bin

Sarihi Abdolrahman

Seyed Javad Mirnajafizadeh

Mir Shahram Safari

尾関 宏文

山田 麻紀

米野 久栄

服部 美穂

RIKEN・BSI・

認知判断モデルユニット

加藤英之

玉川大学脳科学研究所

磯村 宜和

木村 梨絵

群馬大学大学院医学系研究科

柳川 右千夫

金子 涼輔

謝辞

北海道大学電子科学研究所

根本 知己 先生

基礎生物学研究所

松崎 政紀 先生

九州大学大学院医学系研究科

大木 研一 先生

名古屋大学大学院医学系研究科

山中 章弘 先生

京都大学大学院医学系研究科

今吉 格 先生

鳥取大学大学院医学系研究科

畠 義郎 先生

亀山 克郎 先生

RIKEN・BSI・平瀬研究ユニット

平瀬 肇 先生

高田 則雄 先生

RIKEN・BSI・細胞機能探索チーム

宮脇敦史 先生

群馬大学大学院医学系研究科

安田 浩樹 先生