高精度な多ニューロン Ca^{2+} 画像法で 神経ネットワークの動作原理に迫る*

Elucidating Neural Circuitry Using Functional Multineuron Calcium Imaging

高橋直矢** 池谷裕二**, ***
Naoya TAKAHASHI and Yuji Ikegaya

Key words neuron, imaging, calcium, network

1. はじめに

私たちの脳は、無数のニューロンからなる巨大なシステムである。知覚、運動、記憶などのあらゆる脳内情報処理は、それらニューロンが織りなす神経ネットワークの活動によって担われている。ここでいうニューロンの活動とは、主にスパイク（発火）とシナプス活動である。スパイクはそのニューロンの情報の出力であり、その出力を他のニューロンへと媒介するのがシナプス活動である。それらの活動はミリ秒単位の時間ダイナミクスをもち、シナプス回路の構造に裏打ちされた空間特異性を有している。

これまで神経活動の計測には、電極をニューロンの内外に設置し、電気信号として観測する手法が汎用されてきた。電気生理学的手法は神経活動の速い時間ダイナミクスを記録するには適しているものの、空間情報をほぼもたず、ごく限られた少数のニューロンの活動を観察するにとどまる。実際の神経活動は、巨大なネットワークに内在するニューロンの多様かつ散在的な活動パターンによって時空間的に規定されるものである。そのため神経回路の情報処理メカニズムを理解するためには、大規模な活動記録手法が不可欠である。

問題の解決する糸口となる手法が、近年発展が著しい神経活動の画像化（イメージング）技術である。これはニューロンの電氣的活動を光学シグナルに変換して画像化する手法であり、これまでにさまざまなアプローチ法が考案されている。例えば、電位感受性色素を利用した画像法は、

神経回路の発火活動や、シナプス活動を閾値以下の電位活動として直接的にモニタすることが可能である。しかし現行の電位感受性色素ではスパイクに対するシグナル変化が1%に満たず、同等の試行を繰り返し加算平均する必要がある。また、細胞膜内において機能するという色素の性質上、神経組織内において個々のニューロンを分離して活動を記録することはほぼ不可能である。

単一細胞レベルの空間解像度を保ちながら、神経ネットワークの活動を記録することが可能な手法として、機能的多ニューロンカルシウム画像法（functional multineuron calcium imaging; fMCI）が広く用いられている（図1）。スパイクが発生すると、電位感受性カルシウムチャネルが活性化され、細胞内のカルシウム濃度が一過性に上昇する（図2）。fMCIでは、あらかじめカルシウムに感受性のある蛍光指示薬を神経組織に負荷しておくことで、ニューロンの発火活動をカルシウム蛍光変化として画像化する（図3）。同手法では単一スパイクに対する蛍光変化が2~30%と高く、それぞれのニューロンが「いつ、どこで、どう活動したか」をリアルタイムに観察することができる。また画像化システムを最適化することで、10000個以上の多数

池谷裕二

1993年東京大学薬学部卒業。1998年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。同大学院助手および講師を経て、現在、准教授。2002~2005年コンビア大学にて客員研究員。

*原稿受付 平成22年11月3日

**東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室（東京都文京区本郷7-3-1）

***JSPJST 戦略的創造研究推進事業さきがけ（埼玉県川口市本町4-1-18）

高橋直矢

2004年京都大学薬学部総合薬学科卒業。同年から東京大学大学院薬学系研究科に進学し、現在博士課程3年。

図1 筆者らが用いている fMCI システム

図2 fMCIの原理

海馬のニューロンのスパイク発火に伴い、細胞体において一過性のカルシウム蛍光上昇が生じる。

図3 fMCIを用いた神経回路活動の記録

海馬の神経回路を観察した際のfMCI画像。各ニューロンの蛍光強度変化を参照することで、発火活動の時系列パターンをラスタープロットとして再構築することができる(右)。

のニューロンのスパイク活動を一齐に記録することも可能である(図4)¹⁾。

本稿では、まずfMCIを用いた神経活動の計測について述べる。そして、同技術の応用例として、神経ネットワーク活動パターンを解析した研究を紹介したい。通常、fMCIによって計測される生命現象はニューロンのスパイク活動であるため、以下では断りのない限り、スパイク活動を単に「活動」として略記する。

2. fMCI法の原理と特徴

fMCIの歴史は、カルシウム感受性の蛍光指示薬の細胞膜透過性前駆体が開発されたことから始まる。通常の蛍光指示薬は負電荷を帯びており水溶性であるため、細胞を覆っている脂質二重膜を通過することは不可能である。しかしながら、疎水性であるacetoxymethyl (AM) 基が付加された指示薬は容易に細胞膜を通過することができる。細胞内に移行した後は、AM基が速やかに加水分解されて元来の蛍光指示薬としての機能を果たす。またAM基が切断された指示薬は水溶性化合物として細胞内に蓄積されていく。つまり細胞外から蛍光指示薬を適用するだけで、組織内の細胞群に指示薬を負荷することが可能となる。この原理を神経組織へと応用することで、1991年Yusteらの研究グループは、カルシウム蛍光指示薬を用いて神経回

図4 fMCIで構築した巨大なラスタープロット

低倍率の対物レンズと広域型のCCDカメラを用いることで、10000個以上のニューロンの活動を記録することが可能である。

路の活動を画像化できることを初めて報告した²⁾。当時は現在ほど光学技術が整っておらず、同時に観察できる細胞数も数十個程度に限られていた。また時間分解能の面においても、数秒に1枚の画像を取得するのが限界であり、ニューロンのスパイク活動のようなミリ秒単位の活動を正確に記録することは困難であった。

しかし、その後fMCIの技術は飛躍的に進展し、世界中の研究者の間で用いられるようになってきている。とりわけ光学システムにかかわる環境の改善は目覚ましく、現在では脳の組織標本のみならず生体動物の脳から直接イメージングを行うことも可能になっている³⁾。時空間解像度においても、筆者らの研究室をはじめとして2000 Hz以上の画像取得速度を達成しているほか、同時に10000個以上のニューロンの活動を観察することも可能となっている⁴⁾。現在の神経生理学分野において、これほど大規模に神経ネットワークの活動を計測する手法はfMCIだけである。

ここで、fMCIを用いる最大の利点として、同手法が空間情報をもった記録手段であることを特筆しておきたい。すなわち、ニューロンが「どこで」活動したのかを知ることができる。このことは、多様な細胞種、秩序だった細胞配置をもつ神経回路の活動を理解する上で重要な手がかりとなる。とりわけ、記録したすべての細胞の位置を特定できるため、その細胞が「活動しない」という情報を得ることができる。これにより、「回路中の何%のニューロンが

活動したか」という電気生理学では答えることの難しかった疑問にも答えることができる。また、fMCI の高い S/N 比を生かして、リアルタイムでネットワークの活動を観察し、その活動性にもとづいて特定の細胞を刺激することや、パッチクランプ法などの電気生理学的な記録を施すことも可能である。例えば、筆者らの研究室では、ROTING (reverse optical trawling) と呼ばれる大規模なシナプス結合マッピング技術を開発することに成功している⁵⁾。これは、fMCI によるリアルタイム観察とパッチクランプ記録を併用することで、神経回路内のニューロン間のシナプス結合パターンを網羅的に同定する手法である。これまでパッチクランプ法を用いてシナプス結合パターンを同定するには、膨大な労力と時間を費やす必要があった。ところが ROTING 法を用いれば、そうしたコストを飛躍的に軽減することができる。次の段落では、fMCI の応用例としてこの ROTING 法を用いた当研究室での研究成果について紹介したい。

3. fMCI を用いた神経ネットワーク特性の解析

神経回路は多数のニューロンと、それらを結びつけるさらに多くのシナプスによって構成されている。シナプス回路網上をスパイクがめぐり、情報が生成変容される。神経活動が回路構造と密接な関係があることは歴然としている。ところが、これまでの神経回路研究では、両者を個別に調べたものが多く、「神経活動（機能）-回路構造」の関係について記述した例はほとんどない。そのため、同期発火や脳波活動といった特定の神経活動が、どのようなシナプス回路モチーフから生じるのかといった基本的な疑問についても解明されずにいた。この手の研究がなされなかった理由として、適切な実験技術が欠如していたことが挙げられる。従来の電気生理学研究では、同時に記録できる細胞数は 2~3 個程度に限られ、それら少数のニューロンの間のシナプス結合と神経活動との関係を観察するにとどまっていた。そこで筆者らは、fMCI とその応用技術である ROTING 法を用いることで、上記の課題に取り組んだ。あらかじめ fMCI によってネットワーク活動を記録した後、ROTING 法を適用し、回路内のニューロン間のシナプス結合パターンを網羅的に同定した (図 5)。ROTING 法では、まず後シナプス細胞となるニューロンにパッチクランプ記録を行い、シナプス入力記録する。次に周囲のニューロンに対して、興奮性伝達物質であるグルタミン酸を個別に適用することで発火を誘導し、fMCI によってニューロンごとの発火タイミングを観察する。発火したニューロンとパッチクランプ記録されている後シナプス細胞との間にシナプス結合があれば、発火の直後に後細胞においてシナプス入力観察されることになる。すなわち発火と入力のタイミングと比較することで、パッチクランプ記録されている細胞に対する周辺ニューロンからのシナプス投射を網羅的に同定することが可能となる。筆者らは同手法を最適化することで、同一回路内の 100 個にもおよぶニュー

記録された後シナプス細胞の空間配置

シナプス結合パターン
後シナプス細胞 #1

図 5 ROTING 法による回路内シナプス結合の探索

ROTING 法を用いることで観察視野内のシナプス結合パターンを大規模に同定することができる。観察されたすべてのニューロンを円周上に再配置し、シナプス結合をもつニューロンペアを直線で結んだ (下)。

ロンの活動とそれら細胞間のシナプス結合の分布とを比較することに成功した。まず、最初に記録された神経活動を精査したところ、面白い現象に気づいた。特定のニューロン群がしばしば同期して発火していたのである。そうした同期グループは回路内にいくつか見られた。グループを構成する個々のニューロンは回路全体に散在していたため一見するだけ見極めるのは困難であったが、クラスター解析法を用いることでそれらのグループをあぶりだすことができた。では、同期グループはどのようなシナプス回路構造によって支持されているのか？ ROTING 実験の結果から、グループ性とシナプス結合パターンとを比較したところ、グループ内のニューロン間で高い確率でシナプス結合が存在することがわかった。つまり、グループ内の一部のニューロンから発したスパイク活動は、グループ内の密なシナプス回路を介して増幅され、グループ全体の同期発火を導いていると考えられる。シナプス結合の分布が特定のニューロン群に偏っていたことで、同期グループといった特徴的な神経活動が生まれたのであろう。こうした知見は、空間情報をもった大規模な記録技術である fMCI でしか成しえなかった研究成果である。

4. fMCI の今後の展開

fMCI は、単一細胞の空間解像度をもった大規模な神経活動の記録手段として有用なツールである。本稿で紹介した ROTING 法のような応用例も含め、fMCI を用いた研究は今後さらに拡大していくものと期待される。それに伴って、fMCI の実験環境や技術もより汎用性・応用性の高い

ものへと改善されていくであろう。最後に、現状の fMCI が抱える 2 つの課題とそれらに対する今後の方向性について触れたい。

1 つ目は fMCI を用いる新規のカルシウム蛍光センサについてである。現在最も汎用されている蛍光センサは、合成化合物である。fMCI を行う際には、あらかじめこれらの指示薬を脳組織に負荷しておく必要がある。指示薬の負荷効率、脳領域や実験動物の日齢（月齢）によって大きく異なる。一般に、細胞外組織の形成・成熟が進んだ成体期以降の動物のニューロンに指示薬を負荷することは困難である。そのため fMCI の実験には、比較的若い動物が用いられることが多い。また外部より負荷された蛍光指示薬は、レーザー光の照射や細胞内での代謝を受けて徐々に不活性化されるため、長期的に神経活動を観察することは困難である。こうした課題を克服するため、近年、遺伝子工学の分野からカルシウム感受性をもつ蛍光タンパク質の開発や改良が進められている⁶⁾。これらは内在性のカルシウム結合タンパク質を改変することで、細胞内でカルシウムが結合した場合に蛍光を増加するように工夫したものである。あらかじめこれらのタンパク質をコードする遺伝子を動物個体もしくは脳組織に導入しておくことで、観察直前に蛍光指示薬を負荷することなく、直接 fMCI により神経活動をイメージングすることが可能である。したがって原理的にあらゆる脳領域から動物の日齢にかかわらずイメージングすることができ、特定の遺伝子転写システムを用いれば、細胞種選択的に蛍光プローブを発現させることもできる。またこれらのタンパク質プローブは、細胞内において常時合成されるため、長期的に神経活動を観察することも可能である。このようにタンパク質プローブが有用なツールであることは間違いないが、現行のプローブでは蛍光指示薬に比べて単一スパイクに対する十分な蛍光量変化が得られないとの課題も抱えている。今後、タンパク質プローブを用いた fMCI が汎用化されていくためには、S/N 比の改善が重要なポイントとなる。現在、世界中でプローブの改良が進められており、高い S/N 比をもったタンパク質プローブが開発されている。fMCI の適用範囲の大きく拡大することを期待したい。

fMCI が抱えるもう 1 つの課題は、生体動物からのイメージング時に、対象となる動物の運動が制限されてしまうことである。fMCI の観察時には、動物の頭部は顕微鏡下

に固定され、自由行動は著しく制限されている。このため、動物の行動と神経活動との関係を見ることは非常に困難であった。ところが近年、こうした問題を解消するいくつかの研究例が報告されはじめている。

Dombeck らは、頭部が固定されたマウスを体よりも大きなボールに乗せてその上を歩かせるというシステムを考案している⁷⁾。そしてマウスの眼前に広げたスクリーン上にバーチャル空間を投影し、その環境がマウスの動きに応じて変化するという工夫が図られている。これにより彼らは、動物が空間内を擬似探索する際の神経活動をイメージングすることに成功している⁸⁾。

一方、Helmchen らはマウスの頭部に乗せられる最小の顕微鏡システムを開発している⁹⁾。カルシウム蛍光像は頭部に固定された対物レンズを通過した後に、光ファイバを中継して取得される。光ファイバを用いることで動物の動きにも柔軟に対応することができ、自由行動中の動物から神経活動を記録することが可能である。ただし、現行のシステムでは空間解像度が低く、高精度のイメージングを行うことは難しい。また自由行動に伴って記録画像の揺れが大きくなり、特定のニューロンの蛍光シグナルを取り出すことが難しくなっている。今後は頭蓋固定型顕微鏡システムの装置部の改良だけでなく、ソフトウェア面からもサポートすることで、行動動物からの安定した fMCI 記録が実用化されていくであろう。

参 考 文 献

- 1) S. Namiki, N. Matsuki and Y. Ikegaya : Nat. Precedings, (2009) 2009.2893.1.
- 2) R. Yuste and L.C. Katz : Neuron, **6** (1991) 333.
- 3) C. Stosiek, O. Garaschuk, K. Holthoff and A. Konnerth : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **100** (2003) 7319.
- 4) N. Takahashi, T. Sasaki, W. Matsumoto, N. Matsuki and Y. Ikegaya : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **107** (2010) 10244.
- 5) T. Sasaki, G. Minamisawa, N. Takahashi, N. Matsuki and Y. Ikegaya : J. Neurophysiol., **102** (2009) 636.
- 6) A. Miyawaki : Neuron, **48** (2005) 189.
- 7) D.A. Dombeck, A.N. Khabbaz, F. Collman, A.L. Adelman and D.W. Tank : Neuron, **56** (2007) 43.
- 8) J. Sawinski, D.J. Wallace, D.S. Greenberg, S. Grossmann, W. Denk and J.N.D. Kerr : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **106** (2009) 19557.
- 9) F. Helmchen, M.S. Fee, D.W. Tank. and W. Denk : Neuron, **31** (2001) 903.