

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「脳神経回路の形成・動作原理の解明と
制御技術の創出」
研究課題「最先鋭技術で探る運動皮質回路の時空
間表現と光制御」

研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

研究代表者：松崎 政紀
(自然科学研究機構基礎生物学研究
所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、随意運動に関わる情報が脳内でどのように学習され表現されているのか、を大脳一次運動野(M1)全層および前部運動領域(M2と定義)全層での細胞活動と小脳プルキンエ細胞活動の計測・解析によって明らかにすることを目標とする。マウス・ラットを対象とした頭部固定オペラント課題法と、多細胞2光子カルシウムイメージング法、光遺伝学による光刺激法、ホールセル記録法、多電極記録法など最先鋭の技術を融合させる。

松崎グループは、頭部固定マウスにおける右前肢レバー引き内発性運動課題(右前肢でレバーを600-700ミリ秒引き続けると水が報酬として与えられる課題)を磯村グループと開発した。次に、マウスにこの課題を約10日練習させてレバー引きが上達してから、M1またはM2にカルシウム感受性蛍光小分子化合物を注入し、課題遂行中に2光子イメージングを行い、M1とM2の第2/3層課題関連細胞を同定した。その結果、レバー引き期間にポピュレーション活動は空間的にクラスター化すること、クラスター内細胞集団はクラスター外集団に比べ、レバー運動情報をより多く保持しており、また活動相関が高いことを見出した(Hira et al., 2013a)。またM1とM2の機能のおよび解剖学的シナプス投射様式が非対称であることを、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてM1とM2神経細胞にChR2を発現させ光刺激することで明らかにした(Hira et al., 2013b)。

次に、レバー引き運動課題の訓練2週間中のM1活動の変化を調べるために、カルシウム感受性蛍光タンパク質を神経細胞にAAVを用いて発現させ、M1第2/3層および第5a層の多細胞2光子イメージングを長期間行った。アンサンブル細胞活動、及び単一細胞活動の変化を細胞活動が保有するレバー運動情報量の変化として定量化し、これを学習初期と後期と比較すると、第2/3層ではアンサンブル活動は増減するものの、イメージング領域間で平均すると情報量に変化がなく運動技能の改善とは相関が見られなかったが、第5a層のアンサンブル活動は統計有意に上昇し、運動技能の改善と相関が見られた。単一細胞活動で見ると、第2/3層では情報量を増加させるグループと減少させるグループが存在したがその割合は同程度であった。一方、第5a層では、約三分の一の細胞群が運動情報量を上昇させ、学習後期にはアンサンブル活動に大きく寄与ようになること、皮質下投射細胞でも同様の傾向があることを見出した(Masamizu et al., 2014)。さらに第2/3層において、イメージングをしながら個々の細胞の活動変化をリアルタイム計測し、標的とした細胞活動がある閾値を超えた直後に水報酬を与える、という光学的単一細胞オペラント条件付け、を確立した。マウスが条件付けを始めて15分以内にその標的細胞だけの活動を上昇させること、周辺細胞では報酬タイミングに依存して活動を上昇させる細胞群と減少させる細胞群が存在することを見出し、第2/3層の局所回路では細胞活動のバランスが短期的に保たれながら再編成されることが示唆された(Hira et al., 2014)。これらの成果から、M1は短期的に運動調節を行う第2/3層と長期記憶を保持する第5a層という二つの異なった学習ネットワーク構造を持つ運動生成回路である、という仮説を提唱するに至った。

小脳皮質の運動制御・運動学習における役割を明らかにすることを目的として、小脳皮質の機能構造単位である帯(ゾーン)に着目し、生体内で小脳皮質のゾーン構造を可視化することのできる遺伝子改変マウスを作出した。このマウスは、ゾーン構造の指標であるアルドラーゼCのプロモーター下で蛍光タンパク質を発現している。このマウスを用いて、プルキンエ細胞における自発および感覚誘発性の登上線維応答を2光子カルシウムイメージングにより観察した。小脳皮質のゾーン構造と登上線維入力の同期性の関係を調べたところ、登上線維応答の同期性とゾーン構造が1細胞レベルで精密に一致していることを明らかにした。登上線維の起始核である下オリブ核のニューロン活動を操作する薬剤を投与しても、登上線維応答の同期性とゾーン構造の関係は保たれたままであったことから、この精密な一致は登上線維の投射パターンで決定されていると考えられる。また、覚醒状態で同様の実験を行った結果、ゾーンをまたいで複数のプルキンエ細胞集団が同期して活動することが分かった。すなわち、覚醒状態では小脳皮質の複数の機能単位が協調して活動することが重要であることを示唆している(Tsutsumi et al. 2015)。

磯村グループは、数日間で学習可能なレバーの前肢運動による「内発性・外発性運動課題」、「Go/No-go 弁別課題」、「強弱トルク運動課題」をラットにて構築した(Kimura et al. 2012)。これを

用いてイメージングでは難しい深部 6 層も含めた全層同時マルチニューロン記録法によって M1、M2 での前肢運動発現に機能的に関連する発火活動の計測、解析を行った。両運動野の神経細胞は、基本的な発火特性も、機能的活動の時間的変化や方向選好性なども、非常に類似していたが、異なる行動状況(動機付けや注意などの変化)で同一の運動を発現させると、M2 神経細胞は、M1 神経細胞よりも大きく機能的活動を変化させることを見出した。このことは、M2 は運動情報を内的情報と統合させる役割をもつことを示唆する(Saiki et al. 2014)。さらに、両運動野の神経細胞間にみられる数ミリ秒以内の同期的発火の性状を詳細に解析した。1,596 細胞の間の 23,450 細胞対の発火活動の相互相関を定量的に評価したところ、同期的発火の存在が統計学的にも確認された。同期的発火は、細胞サブタイプ(RS 細胞、FS 細胞)の組み合わせに応じて出現頻度や強度が異なるものの、課題関連性や機能的活動の異なる細胞の組み合わせや、運動局面の違いに大きくは依存せず、ほぼ普遍的にみられる現象であった(Kimura et al. 投稿準備中)。その他、運動発現に関連してシータ活動にカップルした2種類のガンマ活動が運動野に生じることや(Igarashi et al. 2013)、運動野の全層にわたり運動情報は報酬期待による修飾を受けないが、その投射先の線条体では、直接路、間接路の経路にかかわらず運動情報が報酬期待により強い修飾を受けること(Isomura et al. 2013)も明らかにした。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. Masamizu Y., Tanaka Y.R., Tanaka Y.H., Hira R., Ohkubo F., Kitamura K., Isomura Y., Okada T., and Matsuzaki M. (2014) Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nature Neuroscience* 17: 987-994. (松崎グループ)

概要:

マウスが道具を使って運動課題を学習する過程において、2光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法により大脳皮質運動野の浅層から深層(脳表から約 500 μm)に至るまで、延べ八千個の神経細胞の活動を2週間にわたって計測することに世界で初めて成功した。その結果、学習期間において動物が運動課題に熟達する中期から後期にかけて、学習した運動の記憶が大脳皮質 5a 層、特に大脳基底核へ信号を送る細胞の新たな活動パターンとして保持されることがわかった。

2. Hira R., Ohkubo F., Masamizu Y., Ohkura M., Nakai J., Okada T., and Matsuzaki M. (2014) Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single neuron operant conditioning. *Nature Communications* 5: 5551. (松崎グループ)

概要:

2 光子カルシウムイメージングを用いて神経活動をリアルタイムに解析する系を構築し、マウス大脳皮質の単一神経細胞の活動を水報酬と関連付けることにより、マウスがその単一細胞活動を15分以内に上昇させることを実証した。さらに、標的細胞の周辺細胞において、報酬と同期する細胞はその活動が促進され、報酬後に活動する細胞はその活動が抑制されることを見出し、この双方向性の局所回路活動変化を光遺伝学的実験によって再現した。

3. Isomura Y, Takekawa T, Harukuni R, Handa T, Aizawa H, Takada M, Fukai T. (2013) Reward-modulated motor information in identified striatum neurons. *Journal of Neuroscience* 33: 10209-10220. (磯村グループ)

概要:

報酬の有無を予想しつつ前肢運動課題を遂行するラットにおいて、線条体の傍細胞記録を実施し、直接路細胞、間接路細胞の両方において、運動の準備期、実行期ともに活動し、正の報酬予測活動を示すことを明らかにし、単純な拮抗関係だけでは両経路の活動を説明できないことを示唆した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 新規「スパウトレバー」による頭部固定ラット前肢レバー運動課題の開発(磯村グループ)

概要

操作部と報酬部を合一化した「スパウトレバー」の案出により、「内発性・外発性運動課題」「Go/No-go 弁別課題」、「強弱トルク運動課題」などを数日で学習させることを実現した。これらの成果は、実験装置(スパウトレバー部)に関して特許出願するとともに(特願 2011-139810)、行動解析のデータを中心に論文発表した(Kimura et al., *J. Neurophysiol.*, 2012)。

2. 頭部固定マウス前肢レバー運動課題の開発(松崎グループ)

概要:

頭部固定マウスにおいて、レバー引き運動オペラント課題を開発し、これをマウスが遂行中に大脳運動野第 2/3 層の 2 光子カルシウムイメージングに世界で初めて成功した。前肢を使ったマウス運動課題は汎用性が高く今後広く応用されることが期待される。開発の成果と得られた成果を論文発表した(Hira et al., *J. Neurosci.*, 2013)。課題システムの販売化を企

業と進めている。

3. ジョイスティック型スパウトレバー行動実験装置の開発(磯村グループ)

概要:

飼育(非拘束)下にあるラットの学習行動を効率よく評価するため、ジョイスティック型に改良した「スパウトレバー」を飼育ケージ内に設置して、視覚弁別学習課題の遂行状況を常に(24時間)モニターすることができる行動実験装置を開発した(特願 2013-205207)。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「松崎」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
松崎 政紀	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	教授	H21.10～H27.3
喜多村 和郎	山梨大学大学院総合研究部・医学部	教授	H21.10～H27.3
平 理一郎	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	助教	H21.10～H27.3
大久保 文貴	総合研究大学院大学基礎生物学専攻	M1～D4	H21.10～H27.3
正水 芳人	自然科学研究機構基礎生物学研究所	博士研究員	H22.4～H27.3
田口 美貴	自然科学研究機構基礎生物学研究所	技術支援員	H23.2～H27.3
堤 新一郎	東京大学・大学院医学系研究科	D1～D4	H23.4～H27.3
田中 康裕	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	博士研究員	H23.6～H27.3
田中 康代	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	博士研究員	H23.10～H27.3
齋藤 順子	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	技術支援員	H23.11～H27.3
日高 直樹	東京大学・大学院医学系研究科	M2～D2	H24.4～H27.3
寺田 晋一郎	京都大学大学院生命科学研究所	D1～D2、特別共同利用研究員	H25.9～H27.3
長谷川 亮太	総合研究大学院大学基礎生物学専攻	M1～M2	H25.9～H27.3
秋 明貞	東京大学・大学院医学系研究科	D1～D2	H25.9～H27.3
杉浦 悠	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	技術支援員	H26.4～H27.3
加藤 大輔	名古屋市立大学病院神経内科	特別協力研究員	H25.2～H26.3
小澤 克也	東京大学大学院医学系研究科	研究補助員	H21.10～H22.8
大原かおり	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	技術支援員	H27.1～H27.3

研究項目

- ・方法論の開発:顕微鏡構築および遺伝子導入法最適化
- ・大脳運動情報表現解析:
 - 細胞機能分布同定
 - 反響回路の検証

- シナプス結合の解析
- 情報表現の獲得過程の解析
- ・小脳運動情報表現解析
- ・5層細胞サブタイプ別入力マッピング法による視床入力の同定

①「礒村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
礒村 宜和	玉川大学・脳科学研究所	教授	H21.10～H27.3
塚元(藤原) 葉子	玉川大学・脳科学研究所	嘱託研究員	H22.4～H27.3
木村 梨絵	玉川大学・脳科学研究所	嘱託研究員	H22.4～H26.3
齊木 愛希子	玉川大学・脳科学研究所	嘱託研究員	H26.4～H27.3
酒井 裕	玉川大学・脳科学研究所	教授	H25.4～H27.3
瀧山 健	玉川大学・脳科学研究所 (日本学術振興会)	学振 SPD	H25.4～H27.3
吉田 純一	玉川大学・脳科学研究科	D1	H26.4～H27.3
重住 宙	玉川大学・脳科学研究科	M1	H26.4～H27.3
張 シンイ	玉川大学・脳科学研究所	研究補助員	H23.6～H24.3
大野 幸子	玉川大学・脳科学研究所	研究補助員	H24.1～H26.3
後藤 美帆	玉川大学・脳科学研究所	研究補助員	H26.5～H27.3

研究項目

- ・方法論の開発:運動課題・装置開発
- ・大脳運動情報表現解析:
 - 全層細胞電気計測
 - シナプスコンダクタンス解析

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 最先鋭技術で探る運動皮質回路の時空間表現と光制御（基礎生物学研究所 松崎グループ）

研究項目:A-1 同時光刺激・イメージング・電気記録の可能な顕微鏡の構築(H21-22)

実施方法:

本研究課題遂行に必須な、前肢レバー引き課題遂行中マウスの大脳光刺激と2光子イメージングを同時に可能とする新たな顕微鏡システムの構築を行う。

実施内容・成果:

2光子イメージングを行いながら、別に2光子レーザーや青色・橙色レーザーによる点刺激を可能とし、刺激点を走査して2次元マップすることを可能とした。また液晶光学変調素子を用いた光学照明系を新たに構築することで視野内での青色・橙色パターン刺激を実現化した。そのうえで、顕微鏡ステージ上に設置可能な頭部固定マウス用の前肢レバー引き課題装置を開発した。レバー位置や水報酬のタイミングを2光子顕微鏡のアナログ入力として同時記録することや、イメージングや光刺激のタイミングを、課題装置を制御する外部PCにデジタル信号として同時記録することを可能とした。このことによって、課題遂行中の2光子イメージングと光刺激が可能となり、課題装置のリアルタイム制御や実験後の画像解析が容易にできるようになった。さらに Cell-attach 電気記録とイメージングの同時計測、同時記録も実現した。装置開発は磯村グループと共同で行なった。本成果は課題装置に関しては、Hira et al., *J. Neurosci.* (2013) に、光刺激法に関しては Hira et al., *Front. Neural Circuits* (2013) に発表した。イメージングと光刺激の同時実験は Hira et al., *Nat. Commun.* (2014) に発表した。

研究項目:A-2 細胞光刺激のための遺伝子導入法の確立(H21-24)

実施方法・成果:

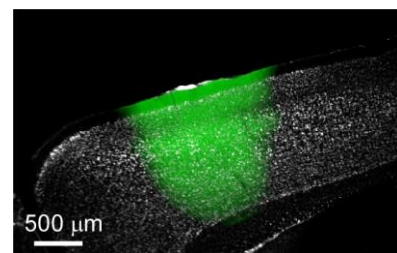
神経細胞活動を光制御するために、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてチャンネルロドプシン-2(ChR2)等を効率的に神経細胞に導入する系を確立する。

実施内容:

AAV-ChR2 変異体のコンストラクトを作製、また外部機関(主としてペンシルベニア大学のベクターコア)から購入可能な AAV を購入し、大脳皮質への注入によって効率よく大脳神経細胞に発現させた。AAV 濃度やガラス管注入法を最適化することで、大脳皮質に強く発現させることを可能とした。右図は AAV-ChR2-YFP を M2 に導入したマウスの脳スライス切片であり、M2 領野全層に ChR2-YFP が発現している。

次に大脳皮質 AAV-ChR2-YFP の注入によって、注入部位での細胞活動や注入部位から離れた領野間でのシナプス入力信号を誘発することに成功した。これは Hira et al., *Front. Neural Circuits* (2013) に発表した(結果は B-2 に記載)。

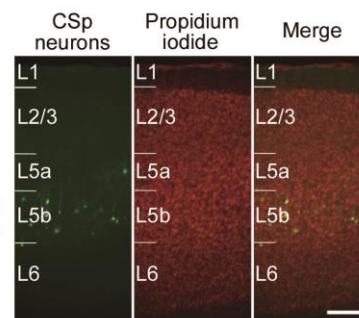
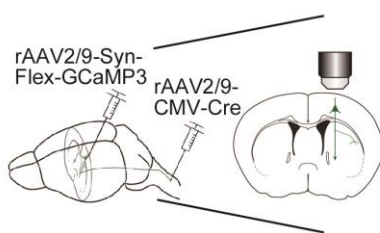
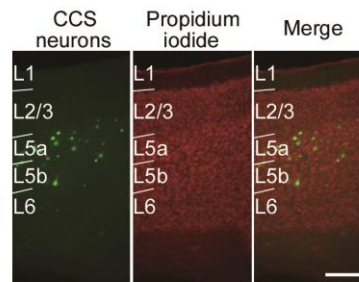
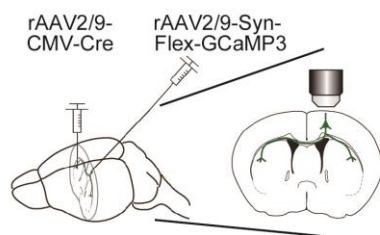
研究開始後、カルシウム感受性蛍光タンパク質がぞくぞくと発表された。そこで、これらをコードする遺伝子を AAV を用いて細胞に導入し、タンパク質を十分量発現させる実験系を構築することに主眼を置いた。GCaMP3, 5, 6, 7 をそれぞれ実験系で試し、これまでに3と7を用いたものを成果として発表した(Masamizu et al., 2014; Hira et al., 2014)。このことにより、運動野 2/3 層(L2/3)や 5a 層(L5a)それぞれに強く発現させることを可能とした。さらに長期(2週間以上)イメージングするための手術技法を確立し、学習期間中に安定してイメージングすることを可能とした(次ページ上図)。





また AAV が軸索から逆行的に取り込まれることを利用し、投射先特異的細胞をラベルしてイメージングする方法を世界で初めて確立した。具体的には、左側線条体に AAV-Cre を、右半球の M1 に AAV-Flex-GCaMP を導入することで右半球 M1 の対側線条体投射(CCS)細胞だけ(右上図)を発現させ、脊髄(C4)に AAV-Cre を、右半球の M1 に AAV-Flex-GCaMP を入れることで右半球 M1 の脊髄投射(CSp)細胞だけに GCaMP を発現させた(右図下)。GCaMP 長期イメージング法、投射先特異ラベル法を成果として Masamizu et al. (2014) に発表した。

さらに軸索ラベリングにも成功し、M2 からの M1 投射軸索細胞や、視床からの M1 投射軸索細胞の活動イメージング法も確立した。これらの結果として、光遺伝学を用いた光刺激だけでなく、L5a 細胞体や視床由来の第 1 層(L1)軸索の活動のイメージングも効率的に行なえるようになった。そこで研究項目 B-6 と D を追加した。またすべてのカルシウムイメージング実験で使用する指示薬を OGB-1 などの小分子化合物(研究項目 B-1 では使用)から AAV-GCaMP に移行した。



さらに軸索ラベリングにも成功し、M2 からの M1 投射軸索細胞や、視床からの M1 投射軸索細胞の活動イメージング法も確立した。

これらの結果として、光遺伝学を用いた光刺激だけでなく、L5a 細胞体や視床由来の第 1 層(L1)軸索の活動のイメージングも効率的に行なえるようになった。そこで研究項目 B-6 と D を追加した。またすべてのカルシウムイメージング実験で使用する指示薬を OGB-1 などの小分子化合物(研究項目 B-1 では使用)から AAV-GCaMP に移行した。

研究項目:B-1 大脳における運動関連細胞の同定と分布の解明(H22-24)

実施方法

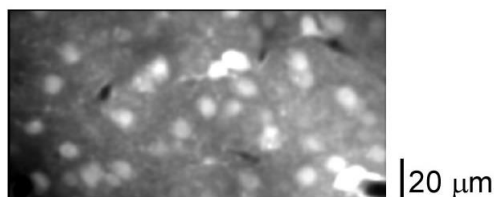
マウス大脳前肢運動野(M1、M2)における前肢レバー課題関連細胞を同定し、これらの空間分布、時間相関構造とレバー運動情報表現様式を明らかにする。M1 または M2 の L2/3 にカルシウム感受性蛍光小分子を導入し、これを前肢レバー引き課題遂行中のマウスにおいて 2 光子イメージングする。得られた個々の細胞の蛍光変化から課題関連細胞を同定し、それらの空間分布、時間相関、レバー運動情報量を定量化する。

実施内容・成果

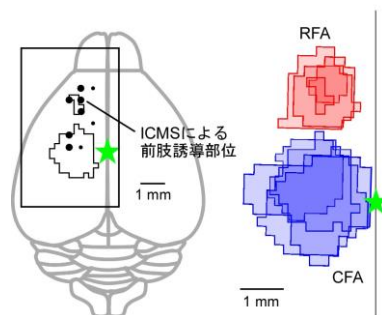
項目A-3 において、磯村グループと共同して頭部固定マウスでの前肢レバー引き課題を開発した(右図)。顕微鏡下で体動を最小限にしながらマウスが右前肢を使ってレバーを引ける装置を作製し、設定時間中、レバーを引き続けると水がスパウトから出されるようにした。マウスはこの装置で毎日1時間練習することによって、約 10 日で安定してレバー引きを行うことができるようになった。レバー引きができるよう



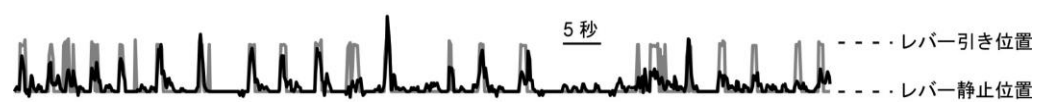
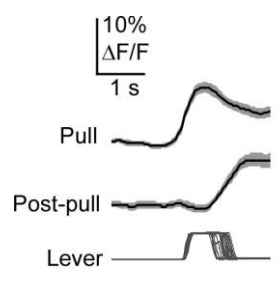
になってから開頭し、カルシウム蛍光指示薬である OGB-1 を注入し、その後カバーガラスで開頭部を密閉してから約1時間後からレバー引き課題を顕微鏡下で行わせ、同時に2光子カルシウムイメージングを行った(右図)。励起波長は 870 nm で行った。



イメージング部位とする前肢 M1 と前肢 M2 の位置の同定は、研究項目 A-1 で構築した顕微鏡を用いて行った。ChR2 遺伝子組み換えマウス的大脑皮質全体に対する青色光刺激マッピングによって、前肢誘導部位として2か所同定した(右図)。前方部位は RFA (Rostral forelimb area)、後方部位のブレグマ近辺は CFA (Caudal forelimb area)と定義されるが、本報告書では特に断りのない限り、RFA を M2, CFA を M1 として記述することとする。この2か所の部位は、皮質内電気刺激(ICMS)による前肢運動誘発部位と一致していた(右図)。



M1 または M2 の L2/3 で行った2光子カルシウムイメージング画像から揺れ成分を除くアルゴリズム、細胞体を抽出するアルゴリズム等を開発し、効率的に細胞活動の時系列を統計数理解析できるようにした。解析の結果、M1 と M2 にレバー引きに同期して活動する pull 細胞とレバーが戻った後に強く反応する post-pull 細胞が存在していた(右図)。前者の活動はレバー引き運動と良く相関し、後者は受動的、能動的レバー戻し運動や舌の水なめ動作に良く相関していた。細胞活動とレバー引き運動の関連性を定量化するため、多細胞または単一細胞の活動から、レバー軌道を多重線形回帰によって予測した(下図、灰色が実際のレバー軌道、黒色が予測したレバー軌道)。予測したレバー軌道と実際のレバー軌道との間の相関係数から、レバー運動情報を定義した。この指標を用いて、細胞が持つレバー運動情報と細胞の空間分布との関連を調べた。その結果、pull 細胞は5個以上の細胞からなる空間的クラスターを50%のイメージ領域で形成し、これらの細胞はクラスター外の細胞に比べてより高いレバー運動情報を保持していた。またポピュレーション活動の解析からもレバー引き期間に活動性の高い細胞が空間的クラスターを形成していた。空間的クラスター内の細胞群はその時間活動相関が高く、レバー引きに高い確率で反応した。これらから、空間的クラスター内では回帰性シナプス結合などによって強固なサブネットワークを形成することで安定にレバー引き運動情報を表現しレバー運動に貢献することが示唆された。今回の解析では、M2 での pull 細胞の活動開始時間が M1 の pull 細胞よりも早い傾向があったが、細胞活動に大きな差は見られなかった。



また、前肢レバー引き運動に加え、同一マウスでレバー押し運動も遂行させ、M1 の L2/3 においてレバー引き・押し関連細胞を同定することに成功した。M1 外側部では、前方にレバー押し関連細胞が、後方にレバー引き関連細胞が大きく分離して分布すること、内側部では、これらが小さなクラスターを持ちながらも混在していることがわかってきた。

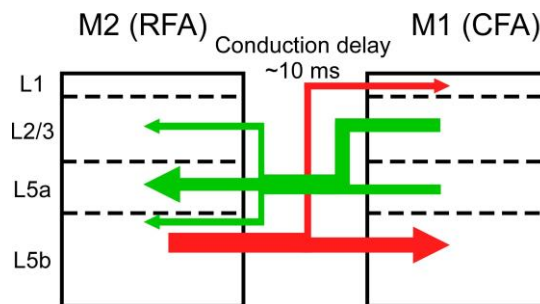
研究項目:B-2 大脳における運動情報表現の反響回路様式の解明(H23-26)

実施方法:

課題遂行中に課題関連ニューロンを光刺激することで、細胞活動、出力運動を変化させ、運動情報表現に関わる局所回路内または領野間反響回路の実体を明らかにする。

実施内容・成果

運動情報表現の反響回路として、M2 と M1 を結ぶ回路が候補として上げられることから、これらの領野間の結合を機能的、解剖学的に調べた。まず、L5 の錐体細胞で強く ChR2 を発現している遺伝子組み換えマウスを用いて大脳皮質に対して光刺激マッピングを行い、同時に M1 または M2 で電気記録を行った。その結果、M2 の光刺激で M1 でのシナプス入力が見出されたが、逆では見出されなかった。次に AAV-ChR2 を M1 または M2 の全層に発現させ、これを光刺激し、同時に電気計測を行った。その結果、M2 から M1 だけでなく、M1 から M2 のシナプス入力も見出された。光刺激して ChR2 発現細胞が活動してから、異なった領野で電気反応が取れるまで約 10 ミリ秒かかったことから、M2 と M1 間の伝達遅延時間は比較的長いことがわかった。次に逆行性蛍光トレーサーと順行性蛍光トレーサーを M1 または M2 に注入し、そこに投射している細胞体と投射先の軸索を M1 と M2 において計測した。その結果、M1 の L2/3 と L5a から M2 の L2/3、L5a、L5b へ強い入力がある一方で、M2 の L5b から M1 の L1 と L5b へ強い入力があることがわかった(右図)。このことは M2 と M1 の間の層結合が非対称であり、高次感覚野と低次感覚野の結合様式の類似性から考えると、M2 が M1 よりも高い階層性にあることが示唆された。この結果は Hira et al., *Front. Neural Circuits* (2013) として発表した。



研究項目:B-3 大脳における運動情報表現の回路構造の解明(H24-26)

実施方法

光刺激法によって、運動課題関連ニューロン間のシナプス結合を見出し、課題を司る回路内結合様式を単一細胞レベルで明らかにする。

実施内容・成果

M1 または M2 にそれぞれ ChR2 と GCaMP を発現させ、顕微鏡視野内の ChR2 発現軸索を光刺激しながら、近傍の GCaMP 発現樹状突起での蛍光上昇を計測できるように実験系を構築した。しかし、M1 と M2 の大きな運動機能差を見出すためには、単一細胞レベルでのシナプス結合を網羅的に調べその結合度の高い細胞集団を見出すよりも、大脳皮質運動野の全体的な運動マッピングを行い、さまざまな運動がどのように大脳皮質上で表現されているのかをまず明らかにすることが優先的であると考え、以下の実験を行った。

ChR2 遺伝子組み換えマウスにおいて、大脳皮質の光刺激による運動誘発をより詳細に行った。2012 年に、前肢の内転、外転を誘発する部位が M1 で分離した領野にまたがること Harrison et al., *Neuron* によって報告されたが、M2 を含むより広範囲でのマッピング、及び高性能な運動計測はされなかった。そこで、2台の高速カメラを用いて、マウスに対して側面または正面から計測することで、高速に、前肢のみならず口やヒゲなどの動きを3次元的に検出できる実験系を構築した。2 ミリ秒の刺激では、M1 と M2 は同じように反対側の前肢の動きが誘発されたが、刺激時間を 500 ミリ秒まで伸ばすことによって前肢の動きに大きな差があることを見出した。すなわち、M2 内側と M1 外側ではリーチング運動が誘発され、M1 内側ではロコモーションが誘発された。大脳皮質全体でマッピングを行うと、防御的な前肢の動きや、ものを掴んで口へ運ぶという一連の動きなどが、それぞれの対応する体性部位(舌、口)近接部位で見られた。これはサルにおいて、長期刺激(500 ミリ秒)での ICMS で引き起こされる動物行動学的所作に対応するものがほぼすべてマウスにおいても保存されており、それらが分離して大脳皮質に表現されていることを世界で初めて示すものである。

現在の松崎グループ、磯村グループの研究結果から、M2 と M1 の階層性はより複雑な運動や、長い運動準備期間を必要とする内的情報を統合する必要がある課題において顕著に表れるのではないかと考えている。実際に最近、ラットの遅延運動課題におけるマルチ電気記録によって、運

運動開始前に M2 で活動漸増する細胞群が検出された(Murakami et al., Nat. Neurosci. 2014)。また Guo et al., Neuron (2014) では、ヒゲ分別課題における M2 (RFA)より外側にある ALMが運動開始前の意思決定に重要な役割をもつことが示された。今後、これらの課題に関連する信号が M2 から M1 にどのように伝わって処理されるかが明らかにされることが期待される。

研究項目:B-6 大脳における運動情報表現の獲得過程の解明(H24-26)

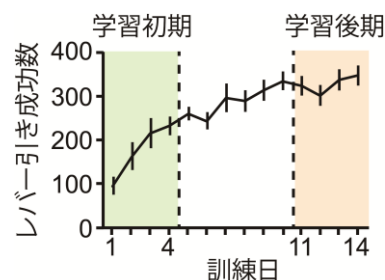
実施方法:

運動課題の学習期間中での運動野 L2/3、L5a における細胞活動の再編成の様式を学習期間2週間にわたる2光子カルシウムイメージングによって明らかにする。

実施内容と成果:

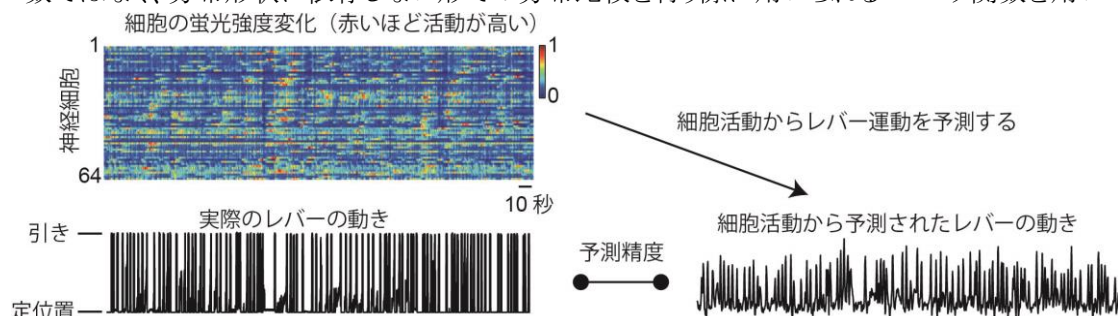
研究項目:A-2 において L5a での細胞活動イメージングが長期に可能となったことから、課題学習中でのL2/3とL5aでの変化と比較を計測・解析できるようになった。そこで、B-2とB-3よりも優先的に本項目を平成24年度から行った。

自発性前肢運動課題の学習訓練中での細胞活動変化を明らかにするため、前肢 M1(CFA)の L2/3 または L5a の GCaMP3 発現細胞を学習訓練中2週間(1日あたり1セッション1時間)にわたり、運動遂行中にイメージング(励起波長は 920 nm)を行った。そのために AAV-GCaMP3 を M1 に導入して安定的にイメージングする実験系を構築した(項目 B-2)。2週間の学習期間において、マウスはまず初期(1-4日目)で成功数などのパフォーマンスを大きく向上させ、その後ゆっくりとした向上を示したのち、学習後期(11-14日目)では比較的パフォーマンスはプラトーに達していた(右図;9個体平均)。これは多くの熟練運動学習においてみられる時間経過であり、この学習課題が一般的な運動学習のモデルとみなせることを示している。



本研究では、学習期間を通じて、前肢の運動とレバー運動は高い相関を維持しつづけており、学習中にレバーと関係のない前肢の動きが減るようなことはないことを確認したうえで、各細胞および細胞集団がそれぞれの訓練セッションでどのくらいレバー運動をコードしているかを、運動情報量として単一の指標を用いてその変化を解析した。

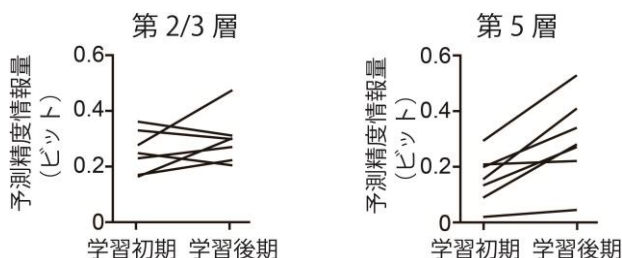
各細胞の蛍光輝度変化の時系列データをまず、デコンボリューションしてスパイク列とした後に、これらの多細胞活動から、サポートベクター回帰を用いて、訓練用の実際のレバー軌道とフィットさせた。そのパラメータを用いてテスト用のレバー軌道を予測する、ということを繰り返す交差検定を行い、イメージング中の全期間での予測を行った(下図)。予測されたレバー軌道と実際のレバー軌道との関係を求めるために、レバー位置が正規分布を取らないことから通常用いられる相関係数ではなく、分布形状に依存しない形での分布比較を行う際に用いられるコピュラ関数を用いて定



量化し、その予測精度をコピュラエントロピーとして定義した。この時、レバー軌道のベニング数が値に大きく影響するが、赤池情報量を用いてこれを最適化した。この運動情報量は今回初めて新しい数式として定式化し導入したが、いくつかの他の指標やシミュレーションなどを用いて、コピュラエントロピーによって導かれるふたつの分布の類似性を示す値としての妥当性を確認した。

多細胞活動が持つ運動情報量を、学習初期と後期で比較すると、L2/3 では全体としてアンサンブル活動による運動情報量に変化がなくレバー引き効率の改善とは相関が見られなかったが、L5a層のアンサンブル活動はすべての計測領域(7領域)で上昇していた(下図)。L5aでの情報量の増加はパフォーマンス向上度と相関があることから、学習が進むほどL5aの運動情報量が増加することがわかった。

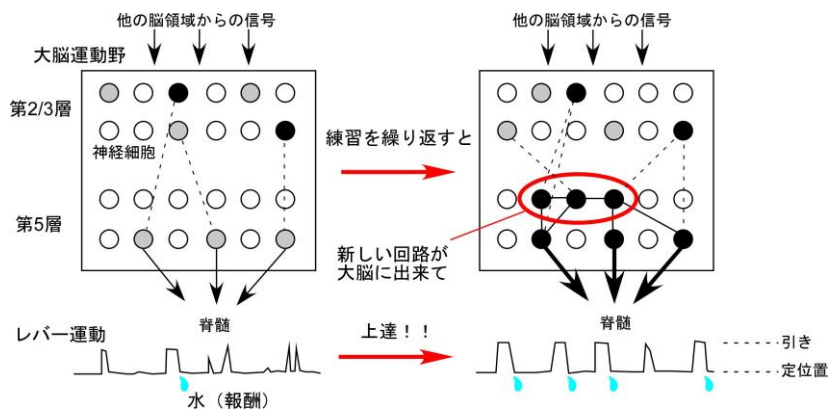
次に単一細胞が持つ運動情報量を計算し、学習中での変化を解析した。L2/3では情報量が増加する細胞群と減少する細胞群が20%程度ずつ存在したが、L5aでは、約1/3の細胞が運動情報量を増加させていた。レバー引き時でのこれらの細胞活動平均を比較すると、運動情報量を増加させるL5a細胞では、レバー引き中での活動が学習初期から後期にかけて有意に上昇していた。さらに、運動情報量を増加させるL5a細胞の運動情報量変化の時間経過を調べると、学習初期の間にはあまり情報量に変化が見られないが、学習中期から後期にかけて情報量を漸増させていた。



L5aでの皮質下へ投射する細胞として、CCS細胞がある。CSp細胞は主としてL5bに存在するが、L5aにもわずかではあるが存在する。そこで、CCS細胞とCSp細胞がL5a細胞の全体的な挙動と同様の挙動を示すかどうかを調べるために、項目A-2で確立したAAV逆行性感染法を用いて、CCS細胞またはCSp細胞のみにGCaMPを発現させ、この蛍光変化を学習期間中に計測した。その結果、CCS細胞、CSp細胞においても約1/3の細胞が運動情報量を増加させる細胞であることを見出した。

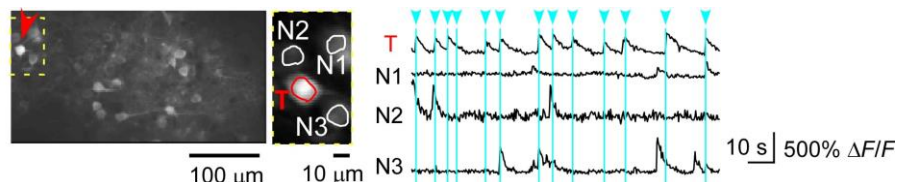
最後にL2/3、L5a、CCS、CSp各細胞において、学習初期と後期で安定して高い運動情報量を保持する細胞が存在するかどうかを検討した。個々のセッション、イメージング領域での全細胞のうちトップ20%の高い運動情報量を持つ細胞を安定細胞と定義し、この割合を算出した。L2/3細胞では学習初期の安定細胞のうち、約半数の46%が学習後期にも安定細胞であるのに対し、L5a細胞では学習初期の安定細胞のうち、23%だけが学習後期にも安定細胞であった。さらにL5aのCCS細胞では計測した細胞数が少ないものの、学習初期の安定細胞のうち17%が学習後期にも安定細胞であるのに対し、CCS細胞では学習初期の安定細胞はすべて、学習後期でも安定細胞であった。このことはL2/3やCSp細胞には長期学習の有無にかかわらず、ある運動に関与する細胞(例えば、ある運動において必ず誘発される感覚に関連する細胞)が一定数存在するのに対し、L5aおよびL5aのCCS細胞では、学習した運動を新しく表現する細胞群が新たに形成されることを示唆している。

これらの結果から、M1は、バランスを保ちながら情報量を増減させるL2/3ネットワークと、学習された運動情報を記憶するL5aネットワークという異なった可塑性を持つ構造を持っていることが強く示唆された。運動学習においては線条体細胞の活動が漸増することが知られている。L5aは線条体へ強く投射していることを考えると、L5aはその投射先のひとつである線条体と運動記憶回路を形成して、十分に学習したのちの熟練運動を表現する新しい回路を形成する可能性が高い(下図)。



L2/3 のバランスされた細胞活動変化は細胞活動の適応性の柔軟さに関連すると仮定した。短期的な局所回路再編成が L2/3 で起こるのかを明らかにするために、2光子カルシウムイメージングによる単一細胞オペラント条件付け法を開発した。M1 または M2 の L2/3 でカルシウムイメージングを行いながら、イメージング領域内のある単一細胞を標的としてこの細胞の蛍光上昇が起こった直後、約 200 ミリ秒後に

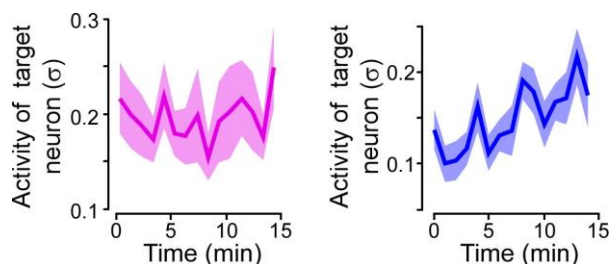
個体マウスに水報酬を与える条件付けを行った (右図の T が標的細胞、水色矢頭が水報酬)。



その結果、開始後 15 分以内に条件付けした細胞でのみ統計有意な活動上昇が起こり、報酬回数も増加することを見出した。

この実験では、単一細胞条件付けの前に、レバー引き課題を学習させていた。レバー引き関連細胞を標的細胞とすると、マウスは単一細胞条件付け開始直後からレバー引き回数を増やしたまま、減ることがなく、標的細胞の活動も条件付け 15 分の期間中で上がることはなかった (下図、マゼンタ)。このことは、15 分ではマウスはそれまでに学習したレバー引きと報酬の関係性を消去し、標的細胞活動と報酬の関係を新たに学習するに至らなかったといえる。一方で、レバー引きに関連しない細胞を標的細胞にした場合、標的細胞の活動はすべて上昇し (右図、青色)、レバー引き運動自体の増減は見られなかった。このことは既知の学習とは無関係なオペラント課題に対してマウスは早く対応できることを意味している。

次に、レバー引きに関連しない細胞を標的とした場合の条件付けで、周辺細胞の活動が 15 分間でどのように変化するかを解析した。標的細胞からの距離や、レバー引きに関連するかどうかは、周辺細胞の活動変化とは関係がなかったが、標的細胞の活動と



相関の高い活動を示す細胞は、その活動を有意に上昇させていた。次に、周辺細胞の活動タイミングと報酬タイミングの関係を調べた。報酬が与えられたとほぼ同時に強く反応した細胞は活動が上昇し、報酬後 2-4 秒後に活動を強く示した細胞は活動を減少させた。前者は後者に比べ、単一細胞条件付けを行う前から標的細胞と活動相関が高かったが、標的細胞からの距離、レバー関連の有無では他の周囲の細胞と違いはなかった。この双方向性の活動修飾は、L2/3 の ChR2 発現細胞を光刺激によって強制的に活動させ、これと水報酬を同期させることによって再現された。すなわち、光刺激を水報酬の 250 ミリ秒前に与え続けると、光刺激された細胞の自発活動は上昇し、光刺激を水報酬の 2.5 秒後に与え続けると、光刺激された細胞の自発活動は減少した。従って、この双方向の修飾は細胞種に依存せず、報酬に伴うドーパミン放出 (細胞外濃度など) と関連している可能性があると考えている。

これらの結果から、環境変化に適応するために細胞活動が変化する時、L2/3 においては適応に重要で活動を上げる細胞と同じアセンブリを形成する細胞群の活動が上がり、適応に重要な細胞とは異なるアセンブリを形成する細胞群の活動は下がるという拮抗する形で回路再編成が起こることが示唆された。これまでの電気計測によるオペラント条件付けでは、標的としない細胞群の挙動を空間位置も含め定量的に評価することは難しかったが、2 光子イメージングによって初めてこれらの結果を見出すことができた。

学習中のイメージングに関しては、ほぼ時期を同じくして、マウスレバー押し課題学習中における L2/3 の 2 光子カルシウムイメージングが報告されたが (Peters et al., Nature, 2014)、L5a はイメージングできていない。またイメージング中の細胞活動変化をリアルタイム検出してオペラント条件付けすることに関してもつい最近、Clancy et al., Nat. Neurosci. (2014) で報告された。しかし標的とした

細胞が物理的な身体運動とどのように関わっているのか、すでに形成されている細胞集団がどのように活動を変化させるのか、特に報酬タイミングとの関係での双方向性の活動変化による局所回路再編成は見出せていない。従って、本研究で得られた成果は世界的競争が激しい中においても、新規性が高くかつ本質的な脳回路動作原理を提供したものと位置づけできると考えている。

研究項目:C 小脳における運動情報表現機構の解明(H22-26)

実施方法:

前肢レバー引き時や舌運動課題における学習運動誤差と小脳細胞活動の関連性を明らかにする。

実施内容・成果:

運動課題装置を小脳記録用に最適化し、覚醒行動中マウスの小脳半球および小脳傍虫部において、カルシウムイメージングにより、課題実行中のプルキンエ細胞の活動を捉えることに成功した。また、小脳微小帯域を蛍光タンパクにより可視化する遺伝子改変マウスを用いて、麻酔下および覚醒マウスで微小帯域活動を捉えることに成功した。

研究項目:D 5層細胞サブタイプ別入力マッピング法による視床入力同定(H23-26)

実施方法:

線条体由来、小脳由来の視床経由大脳皮質入力 M1 と M2 での L2/3 錐体細胞、L5 脊髄投射細胞、線条体投射細胞へのシナプス結合様式を解明する。川口チームとの共同研究である。

実施内容・成果:

視床由来軸索を光刺激するため、マウスの視床 VA-VL 核と VM 核に AAV-ChR2 を注入した。十分 ChR2 が発現した後に、M1 を含む脳スライス標本を作成し、AAV-ChR2 を発現した視床細胞の M1 軸索の光刺激マッピング法を行った。同時に脊髄または対側線条体からの投射先から逆行生蛍光標識された M1 の L5 細胞にホールセル記録を行い、シナプス後電流を計測する実験系を構築した。実験の結果、CCS 細胞よりも CSp 細胞の L1 樹状突起へ視床からの強いシナプス入力があることを見出した。これらの成果に関しては、2014 年の日本生理学大会と日本神経科学大会で発表を行った。

次に L1 視床入力レバー引き運動とどのように関連しているのかを明らかにするため、視床に AAV-GCaMP を導入したマウスにレバー引き運動課題を行わせ、課題実行中に M1 の L1 視床由来軸索の2光子カルシウムイメージングを現在行っている。

3.2 最先鋭技術で探る運動皮質回路の時空間表現(玉川大学 磯村グループ)

研究項目:A-3 頭部固定 Go/No-go 等前肢・舌運動課題装置の開発・効率化・汎用化(H21-23)

実施方法:

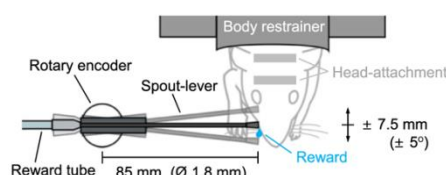
行動中のげっ歯類の運動野を対象として、二光子イメージングやマルチニューロン記録などの精密な脳活動計測を実現するために、頭部を固定したマウスやラットにオペラント運動課題を効率よく学習させるための実験装置を新規に開発し、研究目的に合わせた運動課題とその訓練プロトコルを確立する。

実施内容・成果:

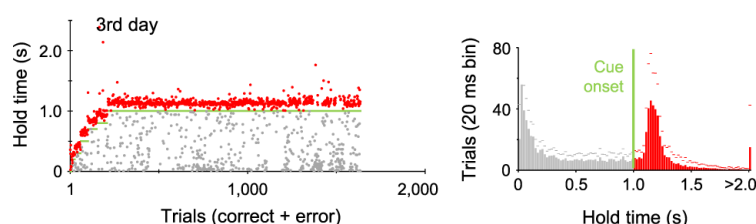
小動物の頭部を固定した条件で行動課題実験を実施することは、感覚刺激を適切に与え、運動応答を詳細に観察することができるうえに、電極や光学レンズを空間的に正確に配置して大型の計測装置を頭上に設置できるという実験上の利点がある。しかし、従来、頭部を固定したマウス

やラットでは、レバー押しなどのオペラント学習課題を学習させることは極めて困難であると考えられており、実際の成功例も極めて少なかった。そこで、本項目では、頭部固定下で前肢レバー押し動作や舌の水なめ動作の応答を求めるオペラント運動課題を効率よく学習させる装置の開発を目指した。

オペラント学習は、刺激 S、応答 R、報酬 O の関連性を見出す学習である。そのうちの応答と報酬の関連性の学習を容易にする効果を期待して、レバー操作部と報酬スパウト(飲み口)を合一化する「スパウトレバー」を案出した(右図)。頭部を固定されたラットは、右前肢でスパウトレバーを握り、それを適切に前後に操作することを学習する。実施例では、スパウトレバーを前方に押し保持すると、約1秒後に手がかり音が呈示され、すぐさま手前に引くと、スパウトレバーの先端から与えられる報酬の水滴を舌で舐める、という運動課題(外発性(Go)運動課題)を学習させた。ほとんどのラットはこの単純な運動課題をわずか3日間で学習するという劇的な効果を示した(右図)。

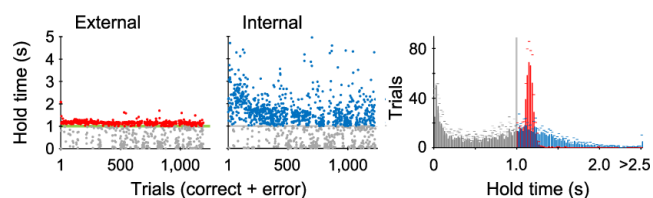


さらに、外発性運動課題の学習を完了したラットに、外発性運動課題に加えて、手がかり音の呈示がなくても自発的に(自らのタイミングで)スパウトレバーを引く内発性運動課題をランダムに課したところ(「外発性/内発性運動課題」)、その日のうちに両タイプの課題を遂行できることも確認した(下図)。また、外発性(Go)運動課題の学習を完了したラットに、別の手がかり音ではレバーを引かない No-go 運動課題をランダムに課したところ(「Go/No-go 弁別課題」)、数頭に1頭の割合ではあるが、数日のうちに Go/No-go 弁別課題を学習することも確認した(下図)。同様に、ラットはレバーのトルクが変化する「強弱トルク運動課題」も遂行可能であった。

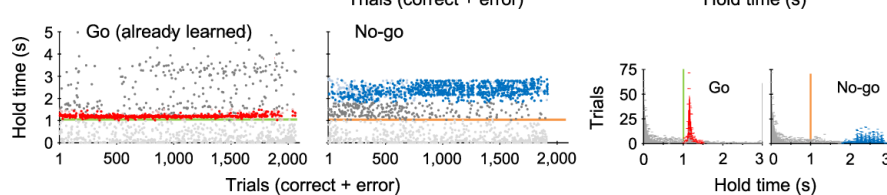


これらの研究成果は、学術論文として発表するとともに (Kimura et al. 2012)、特許として出願した(特願 2011-139810)。スパウトレバーを活用した本実験装置の効率は当初の想定

を大きく上回っており、数時間の学習過程に沿って同一細胞群の発火活動の変化を追跡できることから、今後は学習に伴う運動野の可塑的変化の探索も視野に入れた研究を展開したい。



なお、スパウトレバーを使ったオペラント学習実験系は、頭部固定条件のみならず、自由行動条件でも有用であると期待される。そこで、自由行動下(飼育ケージ内)のラットを対象として、ジョイスティック状のスパウトレバーで環状に配置した白色 LED の指標を選択する行動実験装置を試作した(特願 2013-205207)。

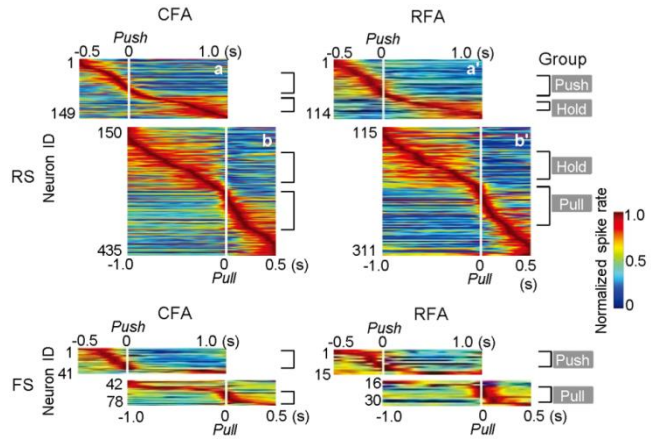


研究項目:B-4 運動野(M1,M2)全層からの電気記録による運動関連活動の解析(H22-26)

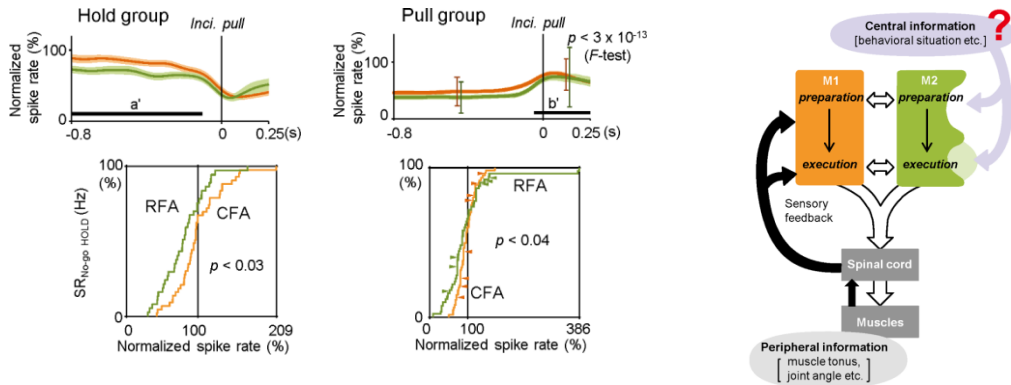
実施方法:
研究項目 A-3 で確立した「内発性・外発性運動課題」や「Go/No-go 弁別課題」を遂行するラットを対象として、運動発現を担う M1 および M2 の浅層と深層のマルチニューロン記録、傍細胞記録、局所フィールド電位記録を実施し、神経細胞の発火活動(発火活動や同期性など)をミリ秒単位の時間精度で解析して、両領域の運動関連機能上の相違点を検証する。

実施内容・成果:

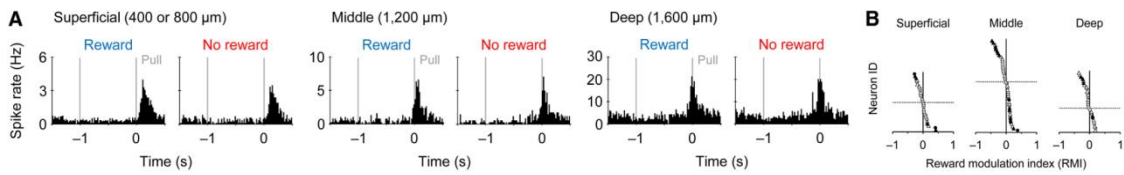
まず、スパウトレバーを操作している頭部固定ラットの M1 前肢領域(CFA)と M2 前肢領域(RFA)からのマルチニューロン記録を試みた。研究項目 A-3 で確立した Go/No-go 弁別課題を遂行するラットにおいて、CFA または RFA の深層に 16 チャンネルのシリコンプローブを挿入し、マルチニューロン記録をおこなった。先行研究 (Isomura et al. 2009) から予想される通り、主に興奮性の錐体細胞と推察される regular-spiking (RS) 細胞ではレバーの保持期間に活動するものやレバーを動かす期間に活動するものが観察され、主に抑制性の介在細胞と推察される fast-spiking (FS) 細胞はほとんどがレバーを動かす期間に活動を示した。この活動パターンは、CFA と RFA ではほぼ一致していた (右図)。また、レバーを動かす際に活動する細胞の方向選好性の分布も両領域で差異はなかった。



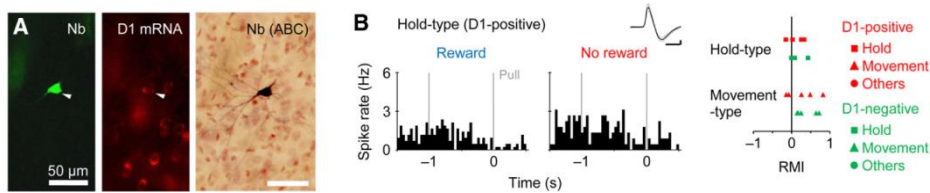
ところが、各細胞において、Go 試行と No-go 試行のレバー操作に関連する発火活動を比較したところ、1)レバー保持に関連する活動は CFA よりも RFA の方が有意に早く減弱すること (下左図)、2)レバー引きに関連する細胞は CFA よりも RFA の方が増減幅が大きいこと、を見出した (下中図)。このことより、解剖学的知見も考え合わせると、両領域ともに脊髄に運動指令を直接送る指揮系統であるが、特に CFA (M1) は筋骨格系からの体性感覚情報のフィードバックを忠実に受け取って運動発現を外因的に制御する一方、RFA (M2) は行動状況の違いに起因して (注意や動機づけなど) 内因的に運動発現を制御するという機能的差異が存在する可能性が示唆された (下右図)。この研究成果は、最近、学術論文として発表された (Saiki et al. 2014)。



次に、運動野の浅層と深層のマルチニューロン活動や局所フィールド電位の性状を探る実験を実施した。ラットには報酬の有無を予測できる条件でレバー操作運動課題を遂行させた。そのラットの一次運動野 M1 の異なる深さの位置 [皮質表面より 400 μm (第 2/3 層)、800 μm (第 5a 層相当)、1,200 μm (第 5b 層相当)、1,600 μm (第 6 層)] にシリコンプローブを留置してマルチニューロン活動を記録したところ、各層の RS 細胞や FS 細胞はレバー操作に関連する機能的な発火活動を示す一方、報酬が予測される状況で活動が増強されることはなかった (下図)。このことは、M1 の各層の神経細胞は、(線条体細胞の活動とは異なり、) 運動情報を符号化するが報酬情報は含まないことを示している (Isomura et al. 2013: 理研 BSI との共同研究)。

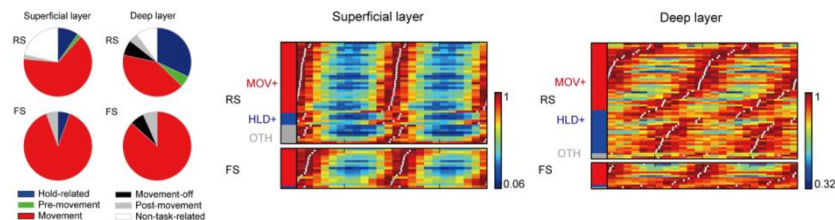


なお、この研究では、傍細胞記録法とドーパミン D1 受容体の *in situ* ハイブリダイゼーションを組み合わせて、M1 の投射先である背外側線条体の神経細胞の発火活動も解析し、線条体の直接路投射細胞と間接路投射細胞はともに、運動の実行や静止（保持）に関連する活動を示し、報酬予測に対して正の修飾を受けることを明らかにした（下図）。



運動発現中の運動野の浅層と深層にみられる局所フィールド電位を解析したところ、レバーの保持期間には遅いガンマ波（ $\sim 40\text{Hz}$ ）が、レバーの動作期間には速いガンマ波（ $\sim 80\text{Hz}$ ）が出現することを見出した。これらのガンマ波はシータ波成分（ $\sim 7\text{Hz}$ ）とクロスカップリングしており、遅いガンマ波はシータ波のピーク付近で、早いガンマ波はシータ波のトラフ付近で、それぞれ出現確率が高まっていた（右図）。興味深いことに、統計上、レバー引きの開始はシータ波の位相（トラフ）と一致することが多く、オシレーション活動が運動の開始に関与する可能性が示唆された。

運動野の浅層と深層の神経細胞（特に RS 細胞）の発火活動に関しては、浅層（第 2/3 層）では運動実行（レバー引き期間）に関連する細胞が多く、深層（第 5 層）では運動静止・準備（レバー保持期間）に関連する細胞と運動実行に関連する細胞の両方が分布していた（下図）。ほとんどの運動野細胞はガンマ波の同じ位相（トラフ）と一致して発火を示した。また、浅層の細胞はシータ波の同じ位相（トラフ）で発火するが、深層の細胞は、シータ波の多様な位相で発火を示すことも明らかとなった（下図）。このような運動野の浅層と深層の発火活動とオシレーション位相との関連性は、両層の機能的活動の違いで統一的に説明できることを提案した（Igarashi et al. 2013: 理研 BSI との共同研究）。



平成 25 年度より、上記の実験系にチャンネルロドプシン2発現トランスジェニック・ラットを導入し、マルチニューロン記録とオプトジェネティクスを組み合わせた新たな脳活動計測実験を実施している。現在、光刺激プロトコルや光応答発火の検出プロトコルなどの基礎的データを蓄積しており、研究期間内に本格的な計測実験を展開する予定である。

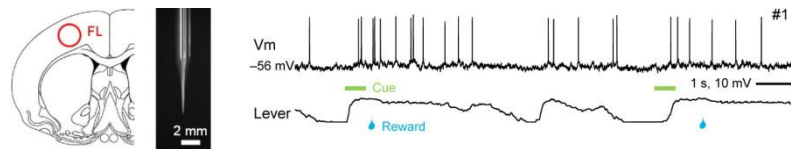
研究項目:B-5 ホールセル記録による運動関連シナプス性コンダクタンスの解析(H22-26)

実施方法:

運動発現を担う運動野や線条体の神経細胞の膜電位やシナプス入力の特徴を、単一神経細胞のホールセル記録と運動野の ECoG 記録を併用することにより解析する。

実施内容・成果:

研究項目 A-3 で確立した頭部固定下での行動実験系は機械的な面で十分に安定しており、各種の脳活動計測に最適であるため、実際に行動中のラットの大脳からのホールセル記録を実現化することを試みた(下図;Kimura et al. 2012)。なお、このインビボ・ホールセル記録の実現化に先立ち、オシレーション活動を示すスライス標本を使ったインビトロ・ホールセル記録でインビボ実験条件を決定する予備的試行を完了しておいた(F.-Tsukamoto et al. 2010)。



本研究では、頭部を固定したラットにスパウトレバーの操作課題を遂行させ、その遂行中あるいは休息中に、運動野またはその投射先の背外側線条体の神経細胞からホールセル記録法により膜電位を記録した。実際、運動発現中には、運動野にも線条体にも、レバー操作に関連した発火頻度および膜電位の変化を示す細胞が多数観察された。運動野表面の ECoG 記録では、運動発現中には研究項目 B-4 でみられたガンマ波活動が観測され、休息中には特徴的な高振幅紡錘波 high-voltage spindle(HVS)の出現が観測された。運動野での HVS の出現中に、運動野細胞や線条体細胞では HVS の位相と一致して膜電位の変化や発火活動がみられた。この膜電位変化は、パッチ内液を高 Cl 内液に替えると変化がみられるか、詳細な定量的解析を進めつつある。本研究項目は、ホールセル記録細胞に形態学的解析を加えるために、同志社大学の藤山文乃研究室との共同研究を進めており、すでに数十細胞分の記録データと複数の可視化細胞の形態データを蓄積しており、現在は鋭意解析中である。今後、速やかに研究成果をまとめて論文発表したい。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 27 件)

■原著論文(国際(欧文)誌)

1. Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Imanishi M, Ninomiya T, Tsukada M, Yanagawa Y, Fukai T, Takada M. (2010) Prototypic seizure activity driven by mature hippocampal fast-spiking interneurons. *J Neurosci*. 30: 13679-13689.
2. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. (2010) Accurate spike-sorting for multiunit recordings based on wavelet transform and robust variational Bayes. *Eur J Neurosci*. 31: 263-272.
3. Safonov LA, Isomura Y, Kang S, Struzik ZR, Fukai T, Câteau H. (2010) Near scale-free dynamics in neural population of waking/sleeping rats revealed by multiscale analysis. *PLoS ONE*. 5: e12869.
4. Ako R, Wakimoto M, Ebisu H, Tanno K, Hira R, Kasai H, Matsuzaki M, Kawasaki H. (2011) Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain. *Mol Cell Neurosci*. 48: 246-257.
5. Kitamura K, Häusser M (2011) Dendritic calcium signaling triggered by spontaneous and sensory-evoked climbing fiber input to cerebellar Purkinje cells in vivo. *J Neurosci*. 31: 10847-10858.
6. Takahashi N, Kitamura K, Matsuo N, Mayford M, Kano M, Matsuki N, Ikegaya Y. (2012) Locally synchronized synaptic inputs. *Science*. 335: 353-356.
7. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. (2012) Spike sorting of heterogeneous neuron types by multimodality-weighted PCA and explicit robust variational Bayes. *Front Neuroinform*. 6: 5.
8. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T. (2012) Power-law inter-spike interval distributions infer a conditional maximization of entropy in cortical neurons. *PLoS Comput Biol*. 8: e1002461.
9. Nakayama H, Miyazaki T, Kitamura K, Hashimoto K, Yanagawa Y, Obata K, Sakimura K, Watanabe M, Kano M. (2012) GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron*. 74: 384-396.
10. Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ohkubo F, Kitamura K, Matsuzaki M, Sakai Y, Isomura Y. (2012) Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *J Neurophysiol*. 108: 1781-1792.
11. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T. (2012) Power-law inter-spike interval distributions infer a conditional maximization of entropy in cortical neurons. *PLoS Comput Biol*. 8: e1002461.
12. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. (2012) Spike sorting of heterogeneous neuron types by multimodality-weighted PCA and explicit robust variational Bayes. *Front Neuroinform*. 6: 5.
13. Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ohkubo F, Kitamura K, Matsuzaki M, Sakai Y, Isomura Y. (2012) Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *J Neurophysiol*. 108: 1781-1792.
14. Hira R, Ohkubo F, Ozawa K, Isomura Y, Kitamura K, Kano M, Kasai H, Matsuzaki M. (2013) Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. *J Neurosci*. 33: 1377-1390.
15. Hira R, Ohkubo F, Tanaka YR, Masamizu Y, Augustine GJ, Kasai H, Matsuzaki M. (2013) In vivo optogenetic tracing of functional corticocortical connections between motor forelimb areas. *Front Neural Circuits*. 7: 55.
16. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T. (2013) Neural dynamics and information representation in microcircuits of motor cortex. *Front Neural Circuits*. 7: 85.
17. Isomura Y, Takekawa T, Harukuni R, Handa T, Aizawa H, Takada M, Fukai T. (2013) Reward-modulated motor information in identified striatum neurons. *J*

- Neurosci.* 33: 10209-10220.
18. Hashizume M, Miyazaki T, Sakimura K, Watanabe M, Kitamura K, Kano M. (2013) Disruption of cerebellar microzonal organization in GluD2 (GluR62) knockout mouse. *Front Neural Circuits.* 7: 130.
 19. Igarashi J, Isomura Y, Arai K, Harukuni R, Fukai T. (2013) A θ - γ oscillation code for neuronal coordination during motor behavior. *J Neurosci.* 33: 18515-18530.
 20. Asrican B, Augustine GJ, Berglund K, Chen S, Chow N, Deisseroth K, Feng G, Gloss B, Hira R, Hoffmann C, et al. (2013). Next-generation transgenic mice for optogenetic analysis of neural circuits. *Front Neural Circuits.* 7: 160.
 21. Kawamura Y, Nakayama H, Hashimoto K, Sakimura K, Kitamura K, Kano M. (2013) Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fibre inputs to Purkinje cells during cerebellar development. *Nature Commun.* 4: 2732.
 22. Tada M, Takeuchi A, Hashizume M, Kitamura K, Kano M. (2014) A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci.* 39: 1720-1728.
 23. Masamizu Y, Tanaka YR, Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, Matsuzaki M. (2014). Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nature Neurosci.* 17: 987-994.
 24. Saiki A, Kimura R, Samura T, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y. (2014) Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *PLoS ONE.* 9: e98662.
 25. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M. (2014) Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single neuron operant conditioning. *Nature Commun.* 5: 5551.
 26. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito, H. (2015) Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nature Methods.* 12: 64-70.
 27. Tsutsumi S, Yamazaki M, Miyazaki T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K. (2015) Structure-function relationships between aldolase C/zebrin II expression and complex spike synchrony in the cerebellum. *J Neurosci.* 35: 843-852.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

(2-1) 総説

1. 松崎政紀. (2010) 光操作技術を駆使した神経科学研究の新展開. *実験医学.* 29: 2618-2622.
2. 磯村宜和, 木村梨絵, 高橋宗良. (2011) マルチニューロン記録実験の実用プロトコール. *日本神経回路学会誌.* 18: 14-21.
3. 喜多村和郎, 橋本浩一, 狩野方伸. (2012) 小脳プルキンエ細胞樹状突起活動の in vivo イメージング. *生体の科学.* 63: 26-33.
4. 松崎政紀. (2012) オプトジェネティクスの最前線. *化学と生物.* 50: 406-413.
5. 尾藤晴彦, 松崎政紀, 吉村由美子, 古田寿昭. (2012) 光技術を用いた神経回路機能の解読と操作. *実験医学.* 30: 100-106.
6. Kitamura K, Kano M. (2012) Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. *Neural Net.* 47: 11-17.
7. 松崎政紀, 平理一郎, 大久保文貴. (2013) 多光子励起過程による行動・運動を司る神経細胞ネットワーク活動のイメージングと光操作. *レーザー研究.* 41: 86-91.

(2-2) 著書

1. 喜多村和郎. (2011) in vivo イメージングパッチ法. In: 最新パッチクランプ実験技術法(岡

- 田泰伸編), pp. 121-128, 京都:吉岡書店.
2. 磯村宜和. (2012) 運動指令を形成する皮質内機能的回路の探索. In: ブレインサイエンスレビュー2013(ブレインサイエンス振興財団編), pp. 9-26, 東京:クバプロ
 3. Kitamura K. (2012) Two-Photon Targeted Patch-Clamp Recordings In Vivo. In: Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols (Okada Y, ed), pp. 183-193, Springer Protocols Handbooks, Springer.
 4. 磯村宜和. (2014) 神経系の構造と機能 (1). In: 心理学辞典(編集代表:下山晴彦), pp. 460-462, 東京:誠信書房.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 46 件、国際会議 18 件)

■招待講演(国際)

1. Isomura Y. Intracortical mechanism underlying self-initiation of voluntary movements. Neural Circuits: The Hippocampus and beyond. New Jersey, USA, 2009.11.21.
2. Matsuzaki M. Optical Methods for revealing the synaptic function and structure in the local circuit. The 4th International Neural Microcircuitry Conference, Okinawa, 2010.6.24-27.
3. Isomura Y. Microcircuitry mechanism underlying self-initiation of voluntary movements. The 5th International Neural Microcircuitry Conference, Tokyo, 2010.6.29-30.
4. Matsuzaki M. Optical Methods for revealing the synaptic function and structure in the local circuit. The 5th International Neural Microcircuitry Conference, Tokyo, 2010.6.29-30.
5. Kitamura K. Two-photon imaging of Purkinje cell dendritic activity in vivo. IBRO World Congress, Florence, Italy. 2011.7.14-18.
6. Matsuzaki M. Neural functions revealed by two-photon imaging and stimulation methods. 12th RIES-Hokudai International Symposium. Sapporo, 2011.11.21-22.
7. Kitamura K. Heterogeneous organization of sensory synaptic inputs in the mouse barrel cortex. NIPS International Workshop 2011, Okazaki, 2011.12.8-9.
8. Isomura Y. Microcircuitry mechanism of voluntary movements. Japan-France Joint Symposium on Neural Dynamics and Plasticity: from Synapse to Network. Kyoto, 2012.1.12 -13.
9. Matsuzaki M. Spatial and temporal structure of cortical microcircuit activity for generating voluntary movement. 1st International Symposium/59th NIBB Conference, Neocortical Organization. Okazaki, 2012.3.10-13.
10. Isomura Y. Ensemble coding for voluntary movements in rat primary and secondary motor cortices. Dynamic Brain Forum (DBF) 2012, Carmona, Spain, 2012.9.3-6.
11. Isomura Y. Intracortical mechanism of voluntary movements in the rat. International Conference of Physiological Sciences, Suzhou, China, 2012.11.3.
12. Matsuzaki M. Spatial and temporal dynamics of function clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. Satellite Symposium of Neuroscience2013 “Neuronal Circuits: Cutting edge approaches to the complexity“, Kyoto, 2013.6.19.
13. Isomura Y. Reward-modulated motor information in dorsolateral striatum neurons. Dynamic Brain Forum 2013, The 4th International Conference on Cognitive Neurodynamics, Sigtuna, Sweden, 2013.6.26.
14. Matsuzaki M. Optogenetic mapping of synaptic connections and motor cortical areas in vivo. Optogenetics2013, Tokyo, 2013.9.26-27.
15. Isomura Y. Motor and reward information in striatal direct and indirect pathway

- neurons. NIPS International Workshop and Satellite Symposium of Neuroscience 2014, Okazaki, 2014.9.8.
16. Matsuzaki M. Two-photon imaging of dynamics of cortical ensembles during motor learning. 3rd Bioscience and Biotechnology International Symposium. Tokyo, 2015.1.5.
 17. Matsuzaki M. Two-photon imaging of dynamics of cortical ensembles during motor learning. 3rd Bioscience and Biotechnology International Symposium. Tokyo, 2015.1.5.
 18. Matsuzaki M. Dynamics of cortical ensembles during motor learning and neuronal operant conditioning. International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities. Kyoto, 2015.1.26.

■招待講演(国内)

1. 礪村宜和. Different activations among entorhinal and hippocampal subregions by neocortical slow oscillations. 第 87 回日本生理学会大会, 盛岡, 2010 年 5 月 19-21 日.
2. 喜多村和郎. 生体内における神経活動の2光子イメージング. 第 5 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 滋賀県大津市, 2010 年 5 月 22-23 日.
3. 松崎政紀. マウス大脳皮質運動野のニューロン活動の光制御、生理学研究所研究会・Motor Control 研究会, 岡崎, 2010 年 5 月 27-29 日.
4. 礪村宜和. 運動発現の皮質内回路機構. 第 25 回日本大脳基底核研究会, 福島, 2010 年 7 月 31 日-8 月 1 日.
5. 松崎政紀. Optical methods for revealing the synaptic function and structure in the local circuit. 第 33 回日本神経科学大会 (Neuro2010), 神戸, 2010 年 9 月 2-4 日.
6. 喜多村和郎. 樹状突起活動の in vivo イメージングと光操作. 第 2 回光操作研究会, 岡崎市, 2010 年 9 月 9-10 日.
7. 礪村宜和. 自発性運動の皮質回路機構—新しい行動・生理学的アプローチ—. ニューロコンピューティング研究会 (MEとバイオサイバネティクス研究会併催), 仙台, 2010 年 11 月 18-19 日.
8. 松崎政紀. Neural function revealed by new methods of chemical biology and optogenetics. 第 84 回日本薬理学会年会, 横浜, 2011 年 3 月 22-24 日.(※震災のため誌上開催)
9. 松崎政紀. Imaging and optical manipulation of neural activity in the brain. 第 88 回日本生理学会大会, 横浜, 2011 年 3 月 28-30 日.(※震災のため誌上開催)
10. 松崎政紀. マウス大脳皮質運動野のニューロン活動の光制御、生理学研究所研究会・第 5 回 Motor Control 研究会, 岡崎, 2011 年 6 月 16-18 日.
11. 松崎政紀. Imaging and manipulating neuronal activity in cortical circuits. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
12. 喜多村和郎. Two-photon imaging of neuronal population activities in cerebellar cortex. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
13. 礪村宜和. 傍細胞記録法: 行動課題を遂行するラットへの応用、生理学若手サマー(ウインター)スクール, 東京, 2012 年 2 月 11-12 日.
14. 松崎政紀. Two-photon imaging of motor cortical activity in vivo. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
15. 喜多村和郎. 生体内における神経活動の2光子イメージング. 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会, つくば, 2012 年 5 月 14-16 日.
16. 喜多村和郎. 大脳皮質における感覚シナプス入力の可視化. 生理研研究会「シナプス可塑性の動作原理～分子から行動まで～」, 岡崎, 2012 年 6 月 14-15 日.
17. 喜多村和郎. 生体内2光子イメージングによる単一ニューロン・単一シナプスの活動計測. 第 2 回睡眠研究会, 名古屋, 2012 年 7 月 5-6 日.
18. 松崎政紀. 脳機能イメージングと光操作. 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部門

- キックオフシンポジウム, 徳島, 2012年7月20日.
19. 礒村宜和. Motor information processing in rodent primary and secondary motor cortices. シンポジウム「意思決定とコミュニケーションの脳ダイナミクスと相互作用」, 仙台, 2012年7月27日.
 20. 喜多村和郎. 小脳におけるリズムと同期. 第12回生理学若手サマースクール, 東京, 2012年8月8-9日.
 21. 松崎政紀. 随意運動中のマウス運動野2光子イメージング. 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2012年9月23日.
 22. 松崎政紀. 大脳神経細胞活動の2光子イメージングと光操作. 「細胞を創る」研究会5.0, 東京, 2012年11月21日.
 23. 礒村宜和. ラットの四肢運動を担う皮質内回路機構. 平成24年度生理学研究所研究会「大脳皮質の作動原理究明をめざして」, 岡崎, 2012年12月6日.
 24. 松崎政紀. 2光子イメージングと光操作. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月13日.
 25. 礒村宜和. 運動発現を担う皮質内回路機構. システム神経科学セミナー, 東京, 2013年1月24日.
 26. 松崎政紀. Spatial and temporal dynamics of function clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. システム神経生物学スプリングスクール2013, 大阪, 2013年3月11日.
 27. 松崎政紀. 脳機能イメージングと光操作. 蛋白研セミナー「光の、光による、光のための蛋白質科学」, 大阪, 2013年4月21日.
 28. 礒村宜和. 運動発現を担う大脳皮質と大脳基底核の回路機構. 慶應大学 Brain Club セミナー, 東京, 2013年5月17日.
 29. 松崎政紀. 随意運動中のマウス大脳運動野活動の時空間ダイナミクス. 脳のセミナー, 京都, 2013年6月4日.
 30. 松崎政紀. 覚醒マウス大脳運動野イメージングと光操作. 名古屋大学 IGER セミナー, 名古屋, 2013年6月11日.
 31. 松崎政紀. 大脳運動野2光子イメージング. 第43回新潟神経学夏期セミナー, 新潟, 2013年7月25-27日.
 32. 松崎政紀. Two-photon imaging of neuronal activity in awake mice. 統合バイオサイエンスセンター サマースクール「生命システムの動秩序」, 岡崎, 2013年8月22-24日.
 33. 礒村宜和. ラットの運動発現の皮質回路機構. 東京都医学研究機構プロジェクトセミナー, 東京, 2013年8月27日.
 34. 喜多村和郎. 光で探る脳の活動 ~シナプスからニューロンまで~. 第22回日本バイオイメージング学会学術集会公開講座, 東京, 2013年9月14日.
 35. 松崎政紀. 大脳運動野活動の2光子イメージング. 北海道大学電子科学研究所研究支援部 ニコンイメージングセンター・ナノテクノロジープラットフォーム学術講演会, 札幌, 2013年11月18日.
 36. 喜多村和郎. 小脳皮質回路の機能構築と運動制御・運動記憶. 第2回記憶回路研究会, 岡崎, 2013年12月11日.
 37. 礒村宜和. 運動発現を担う大脳皮質と基底核の回路機構. 福島県立医科大学特別セミナー, 福島, 2013年12月13日.
 38. 礒村宜和. ラット運動野研究: 領域内から領域間へ. 第2回ヘテロ・ニューロアナリシス研究会シンポジウム, 仙台, 2013年12月16日.
 39. 松崎政紀. 随意運動中のマウス大脳運動野での細胞活動の時空間ダイナミクス. 第91回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014年3月17日.
 40. 松崎政紀. 運動学習中の大脳細胞活動2光子イメージング. 創薬薬理フォーラム第22回シンポジウム, 東京, 2014年9月26日.
 41. 礒村宜和. プレないアタマで挑む電気生理実験. Neuroscience2014, 横浜, 2014年9月11

日.

42. 松崎政紀. 頭部固定マウスの運動課題の開発と運動野細胞活動長期イメージング. Neuroscience2014, 横浜, 2014年9月11日.
43. 松崎政紀. Dynamics of cortical neuronal activity during learning of a motor task. Neuroscience2014, 横浜, 2014年9月12日.
44. Isomura Y. Motor and reward information in direct and indirect pathway neurons. Neuroscience 2014, 横浜, 2014年9月13日.
45. 礪村宜和. 大脳皮質-基底核回路メカニズムの探索～オペラント学習課題を活かして～. 平成26年度生理学研究所研究会 記憶回路研究会, 岡崎, 2014年10月8日.
46. 松崎政紀. 運動学習中でのマウス大脳皮質運動野細胞活動のダイナミクス. 国立遺伝学研究所研究会, 三島, 2014年12月1日.

② 口頭発表 (国内会議 10 件、国際会議 1 件)

■口頭発表(国際)

1. Kitamura K, Hausser M, Kano M. Simultaneous two-photon calcium imaging and patch-clamp recordings in vivo. Imaging brain circuits in health and disease. Jacques Monod Conference, Roscoff, France, 2010.6.30-7.4.

■口頭発表(国内)

1. 松崎政紀. 光刺激によるシナプス・ニューロン活動の誘発. 第 47 回日本生物物理学会年会, 徳島, 2009年10月30日-11月1日.
2. 喜多村和郎. 覚醒個体脳におけるホールセル記録と2光子イメージング. 第47回日本生物物理学会年会, 徳島, 2009年10月30日-11月1日.
3. 喜多村和郎. 発達期小脳における神経回路形成の in vivo 解析. 生理学研究所研究会(大脳皮質局所回路の機能原理), 岡崎, 2009年11月19-20日.
4. 喜多村和郎. 小脳シナプス回路の in vivo 解析. 第115回日本解剖学会総会, 盛岡, 2010年3月28-30日.
5. 橋爪幹, 喜多村和郎, 崎村建司, 狩野方伸. GluRδ2 ノックアウトマウスの小脳プルキンエ細胞集団の2光子カルシウムイメージング解析. 第33回日本神経科学大会 (Neuro2010), 神戸, 2010年9月2-4日.
6. 松崎政紀. ChR2 遺伝子導入マウスを用いた大脳運動野神経回路の光制御. 生理学研究所研究会・光操作研究会, 岡崎, 2010年9月9-10日.
7. Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y. Coordinated multineuronal spiking activities related to externally- and internally-initiated movements in rat primary and secondary motor cortices. 第35回日本神経科学大会, 名古屋, 2012年9月19日.
8. 木村梨絵, 齊木愛希子, 塚元葉子, 酒井裕, 礪村宜和. 頭部固定ラットの四肢運動課題遂行に伴う運動野の神経同期活動. 日本薬学会第133年会, 横浜, 2013年3月30日.
9. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M. Single-neuron operant conditioning by two-photon imaging induces reward-timing-dependent bidirectional modulation in cortical microcircuit. 第37回日本神経科学大会, Yokohama, 2014.9.12.
10. 田中康代. 自発運動時における視床から大脳皮質第1層への入力パターン. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014年9月13日.

③ ポスター発表 (国内会議 18 件、国際会議 11 件)

■ポスター発表(国際)

1. Igarashi J, Isomura Y, Harukuni R, Fukai T. Spike phase-locking to slow and fast gamma oscillations in motor cortex of behaving rat. COSYNE2011, Salt Lake City, Utah, USA, 2010.2.24-27.
2. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. Parallelized robust variational Bayesian based spike-sorting system tested on large multiunit recording data. The Spring Janelia Farm workshop "Challenges in Extracellular Electrophysiology: Data Extraction", Maryland, USA, 2010.5.16-18.
3. Kimura R, Sakai Y, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y. Coordinated multineuron activities related to externally- and internally-initiated movements in rat motor cortex. The 41st Annual Meeting of Society of Neuroscience, Washington DC, USA, 2011.10.12-16.
4. Hira R, Ohkubo F, Ozawa K, Isomura Y, Kitamura K, Kano M, Kasai H, Matsuzaki M. Spatial and temporal structure of cortical microcircuit activity for generating voluntary movement. The 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.7.14-18.
5. Kitamura K, Ikegaya Y, Kano M. Heterogeneous organization of individual synaptic inputs in mouse barrel cortex. The 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.7.14-18.
6. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M. Operant conditioning of single neurons in mouse motor cortex by two-photon calcium imaging. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2013.11.9-13.
7. Masamizu Y, Tanaka YR, Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, Matsuzaki M. Layer-specific dynamics of cortical ensembles and single neurons during motor learning. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2013.11.9-13.
8. Akiyoshi R, Wake H, Kato D, Tanaka YH, Masamizu Y, Hira R, Tanaka YR, Ohkubo F, Lee F., Fields RD, Nabekura J, Matsuzaki M. Disruption of myelin homeostasis impairs motor learning. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2013.11.9-13.
9. Saiki A, Kimura R, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y. Neuronal ensemble activity for motor control with different forces in rat caudal and rostral forelimb areas. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2013.11.9-13.
10. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M. Single-neuron operant conditioning by two-photon imaging induces reward-timing-dependent bidirectional modulations in cortical microcircuit. 2014 FENS (Federation of European Neurosciences), Milan, Italy, 2014.7.6.
11. Hira R, Matsuzaki M. Complex movements induced by prolonged transcranial optogenetic stimulation of the mouse motor cortex. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, 2014.11.19.

■ポスター発表(国内)

1. 塚元葉子, 礪村宜和, 今西美知子, 塚田稔, 高田昌彦. Different patterns of precursory afterdischarge generated in hippocampal/cortical subareas. 第33回日本神経科学大会 (Neuro2010), 神戸, 2010年9月2-4日.
2. Igarashi J, Isomura Y, Fukai T. Temporal relationship between the oscillatory local-field-potential components and spikes of identified neurons in the rat motor cortex. 第33回日本神経科学大会 (Neuro2010), 神戸, 2010年9月2-4日.
3. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. Information content analysis of multi-neuron spike trains in superficial and deep layer of rat motor cortex. 第33回日本神経科学大会 (Neuro2010), 神戸, 2010年9月2-4日.

4. Kitamura K, Hausser M. Dendritic activities of cerebellar Purkinje cell in vivo. 第 88 回日本生理学大会, 2011 年 3 月 28-30 日.(※震災のため誌上開催)
5. 大久保文貴, 平理一郎, 河西春郎, 松崎政紀. チャネルロドプシン 2 を用いた光刺激マッピングによる前肢運動野と運動野間機能的結合の同定. MotorControl 研究会(生理学研究so 研究会), 岡崎, 2011 年 6 月 16-18 日.
6. 大久保文貴, 平理一郎, 河西春郎, 松崎政紀. チャネルロドプシン 2 を用いた光刺激マッピングによる運動野間の機能的結合の同定. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011 年 9 月 14-17 日.
7. 塚元葉子, 礪村宜和, 今西美知子, 塚田稔, 高田昌彦. Area-specific generation of prototypic afterdischarge in the rat hippocampal and cerebral cortex. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011 年 9 月 14-17 日.
8. 木村梨絵, 酒井裕, 齊木愛希子, 塚元葉子, 礪村宜和. Ensemble spiking activities in rat motor cortex during externally- and internally-initiated movements. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011 年 9 月 14-17 日.
9. 齊木愛希子, 木村梨絵, 酒井裕, 藤原-塚元葉子, 礪村宜和. Ensemble spiking activity in rat motor cortex during execution/non-execution of voluntary movement. 第 89 回日本生理学会大会, 松本, 2012 年 3 月 29-31 日.
10. 田中康裕, 正水芳人, 松崎政紀. マウスの連続的レバー操作と運動野ニューロン活動との相互情報量推定. 第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013), Kyoto, 2013.6.20-23.
11. Saiki A, Kimura R, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y. Neuronal ensemble activity for motor control with different forces in rat caudal and rostral forelimb areas. 第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013), Kyoto, 2013.6.20-23.
12. Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y. Cooperative multineuronal spike activities related to externally- and internally-initiated movements in rat primary and secondary motor cortices. 第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013), Kyoto, 2013.6.20-23.
13. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M. Reward-timing dependent bidirectional modulation of spontaneous activity during single-cell operant conditioning with two-photon calcium imaging. The 91st Annual Meeting of the Physiology Society of Japan, Kagoshima, 2014.3.16-18.
14. 田中康代, 田中康裕, 和氣弘明, 正水芳人, 川口泰雄, 松崎政紀. 自発性随意運動時の大脳運動野における第1層視床皮質投射の役割. The 91st Annual Meeting of the Physiology Society of Japan, Kagoshima, 2014.3.16-18.
15. 松崎政紀. 運動課題学習中における大脳皮質運動野での層依存的な細胞活動変化. MotorControl 研究会, 筑波, 2014 年 8 月 7-9 日.
16. 正水芳人. 運動課題学習中の一次運動野第 2/3 および第 5a 層での集団および個々の細胞における神経活動変化. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014 年 9 月 11 日.
17. Saiki A, Kimura R, Samura T, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y. Different modulation of common motor information in rodent primary and secondary motor cortices. 第 37 回日本神経科学大会, Yokohama, 2014.9.11.
18. Kimura R, Sakai Y, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y. Population characteristics of spike synchrony in rat motor cortices during movement task. 第 37 回日本神経科学大会, Yokohama, 2014.9.11.

(4)知財出願

①国内出願 (2 件)

1. <<発明の名称:動物実験装置、発明者:礪村宜和、出願人:学校法人玉川学園、出願日:2015 年 2 月 13 日、特許第 5692681 号
2. <<発明の名称:動物学習支援装置、及び動物学習支援機能付き飼育ケージ、発明者:礪村宜和、出願人:学校法人玉川学園、出願日:2013 年 9 月 30 日、出願番号:

(5)受賞・報道等

①賞

1. 喜多村和郎. 平成 22 年科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞, 2010 年 4 月 13 日
2. 松崎政紀. 平成 25 年度科学研究費審査委員表彰, 2013 年 10 月 31 日

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. 毎日新聞(2010 年 10 月 13 日夕刊):「てんかん 新たなメカニズム、ラット実験で発見... 玉川大」(磯村グループのホールセル記録法による同期的発火に関する予備的実験の成果(J. Neurosci., 2010))
2. 朝日新聞(2010 年 10 月 13 日朝刊):「てんかんの仕組み、興奮抑え役の細胞が逆作用? 玉川大」(同)
3. 科学新聞(2010 年 10 月 22 日):「てんかん発作新メカニズム 介在細胞正常時の抑制作用が異常時は興奮作用に」(同)
4. 朝日新聞(2010 年 11 月 23 日朝刊):「脳を動かす光のスイッチ」(松崎グループの研究活動)
5. 科学新聞(2011 年 5 月 20 日):「標的は随意運動中の神経回路」(磯村グループの研究活動)
6. プレスリリース: 道具を使った随意運動中の大脳神経細胞の活動パターンが明らかに～神経活動パターンからの行動予測にも成功～(2013 年 1 月 24 日; Hira et al., J. Neurosci., 2013) 概要: マウスが道具を使う運動を行う際の、大脳皮質運動野の数十個の神経細胞の活動を同時に計測することに成功した。その結果、行動に関わる平均 8 個の神経細胞から成る微小な神経ネットワークを見だし、この神経細胞集団の活動のパターンから、マウスが行動を起こすタイミングの予測にも成功した。(松崎グループの研究活動)
 - 東奥日報(2013 年 1 月 24 日): 神経細胞の活動類型解明
 - Web マイナビ(2013 年 1 月 24 日): 随意運動の際に活動する微小な神経ネットワークを発見
 - Web 共同通信社(2014 年 1 月 24 日): 神経細胞の活動類型解明 マウス運動中、大脳観察
 - 日経産業新聞(2013 年 2 月 1 日): 神経の微小回路重要 道具使い方上達 動物実験で発見
 - 科学新聞(2013 年 2 月 1 日): 運動中のマウス大脳神経細胞の活動 基生研など同時計測に成功
7. 中日新聞(2013 年 2 月 7 日):「工夫重ね進む基礎研究」(松崎グループの研究活動)
8. プレスリリース: 運動学習は大脳皮質深部の神経細胞活動パターンとして記憶される～大脳皮質深部の神経活動を長期間にわたって記録することに世界で初めて成功～(2014 年 6 月 2 日; Masamizu et al., Nat. Neurosci., 2014) 概要: マウスが道具を使って運動課題を学習する過程において、2光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法により大脳皮質運動野の浅層から深層(脳表から約 500 μ m)に至るまで、延べ八千個の神経細胞の活動を2週間にわたって計測することに世界で初めて成功した。その結果、学習期間において動物が運動課題に熟達する中期から後期にかけて、学習した運動の記憶が大脳皮質深層、特に大脳基底核へ信号を送る細胞の新たな活動パターンとして保持されることがわかった。(松崎グループの研究活動)
 - Web マイナビ(2014 年 6 月 2 日): 深部の大脳皮質第 5 層までも含めた神経活動パターンの変化を観察
 - WebYahoo!ニュース(2014 年 6 月 2 日): (同)

- サイエンスポータル(2014年6月2日):「練習で上達」は大脳皮質深部の働き
 - 中日新聞(2014年6月2日):体得の「技」神経回路に
 - 東京新聞(2014年6月2日):大脳皮質が「技」記憶
 - 日刊工業新聞(2014年6月2日):脳の運動学習 仕組み解明
 - 日経産業新聞(2014年6月2日):運動・行為の学習大脳深部が関係
 - 信濃毎日新聞(2014年7月28日):「体で覚える」の正体は
 - 四国新聞(2014年8月1日):大脳の新回路で運動習熟
 - 中国新聞(2014年8月1日):運動習熟 大脳に新回路
 - 山陽新聞(2014年8月5日):大脳の新回路で運動習熟
 - 大分合同新聞(2014年8月11日):脳の深層に回路形成
 - 静岡新聞(2014年8月18日):大脳新回路で運動習熟
 - 岐阜新聞(2014年8月21日):大脳の深層に新回路
 - 山形新聞(2014年8月27日):運動習熟 仕組み解ける?
9. TBS によるテレビ番組「生命 38 億年スペシャル 最新脳科学ミステリー 人間とは何だ・・・!?」に出演し、脳科学について、特に 9 の成果について解説。

③その他

1. 理化学研究所プレスリリース:運動の指令を生み出す大脳皮質の個々の神経細胞の役割を解明－興奮性細胞と抑制性細胞のそれぞれの役割をキャッチー(2009年11月9日)
<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2009/091109/index.html>
 英語版:Shaping the way we move
<http://www.riken.jp/engn/r-world/info/release/press/2009/091109/index.html>
 JST サイエンスニュース:運動の指令 明らかになった神経細胞の"メカニズム"とは?(2009年11月30日)
http://www.science-news.jp/news/science/20091130_02.html
 (平成 22 年 3 月末日まで閲覧可能)
2. Research Highlight: Shaping and sharpening movements. RIKEN RESEARCH 5 (1): 7.
 (Jan. 15, 2010) (<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/6150>)
3. 日本神経科学学会ホームページ:最新論文 2010-1 手を動かせ!と指令する脳の仕組み(2010年1月22日)(<http://www.jnss.org/japanese/general/100122.html>)
4. 日本神経科学学会ホームページ:神経科学トピックス 2光子カルシウムイメージング法による運動学習中の大脳皮質運動野・第 2/3 層および第5a 層での神経活動の観察(2014年7月2日)(<http://www.jnss.org/140702-03/>)
5. ライフサイエンス新着論文レビュー 運動学習中に大脳皮質において起こる層に特異的な神経活動の変化(2014年7月11日)(<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9026>)

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

成果として出てきた特願 2011-139810 について、民間企業に向けて実施権許諾を1件、契約成立した。(磯村グループ)

②社会還元的な展開活動

得られた研究成果を、基礎生物学研究所 HP で公開し、一般に情報提供している。
(URL; <http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2013/01/24.html>、
<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2014/06/02.html>)

得られた研究成果を、玉川大学脳科学研究所 HP (URL; <http://www.tamagawa.ac.jp/teachers/isomura/index.html>)、および Researchmap (URL; <http://researchmap.jp/yoshikazuisomura/>) で公開し、一般に情報提供している。

日本神経科学大会(2014年9月11日横浜)において、松崎研究室と磯村研究室で確立された実験技術の情報を提供するランチョンセミナーを企画し、好評を博した(約 280 名参加)。

ラット用の新型頭部固定装置を成茂科学器械と協力して開発し、製品化に至った(SR-10R)。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011年11月 9日	岡崎高校特別授業 (SSH)	岡崎高校	40	神経回路に関する初歩的な 授業

§6 最後に

研究の目標等から見た達成度

開始当初は、頭部個体マウスでこれまで実現されていない難易度が高いレバー操作運動課題が達成できるのか、かつ安定した2光子カルシウムイメージングが可能か、という根本的な問題があった。しかし、これらは最終的にすべて克服され、かつAAVの導入により、長期的なイメージングが可能となった。また小脳はその位置から覚醒マウスでのイメージングが困難である可能性が当初あったが、これも課題装置の改良などを通じて可能となり、課題実行中マウスのプルキンエ細胞の活動を捉えることに成功した。このように、同時2光子イメージングが可能な頭部固定マウスでのレバー操作課題の開発という点で目標は十分に達成された。またラットの課題装置においては、操作部と報酬部を合一化した「スパウトレバー」、さらにジョイスティック型スパウトレバーと著しい改良を進めるとともに特許出願も行っている。このことで、より高次的な認知課題や、長期学習の効果に関する研究を進めることができると期待される。また現在多くの国内のラボで磯村が考案したラット課題装置が使用されており、今後ますます普及すると考えられ、課題開発という点では目標を上回る達成ができたと考えている。

また松崎グループはイメージングだけではなく、解剖学的な結合様式やイメージングした細胞の投射先を同定し、蛍光上昇と活動電位との対応、レバー運動と前肢や舌の運動との対応など、基本的な方法も最終的に取り入れイメージングの結果を補強することができた。層内の局所回路と層間での情報処理、特に可塑性の原理に近づくことができ、その点では目標を達成できたと考えている。一方で、ChR2の *in vivo* 2光子刺激法を確立できなかった点、皮質領野間のフィードフォワード・フィードバック情報間の相違や類似点とその意義に迫れなかったのは残念である。しかしこれらの実験を行うための要素技術にはすでに達成できており、またマウス運動適応課題を確立しつつあり、運動学習中での運動野に入力する軸索活動変化のイメージングも可能となったので、今年度のCRESTプロジェクト終了後も引き続きこれらのテーマに関して研究を進めていきたいと考えている。またM1とM2で劇的に異なる細胞活動の差異は両グループで検出できなかったが、磯村グループは電気記録データを詳細に解析することによって、M1は筋骨格系からの体性感覚情報のフィードバックを忠実に受け取って運動発現を外因的に制御する一方、M2は行動状況の違いに起因して(注意や動機づけなど)内因的に運動発現を制御するという機能的差異が存在する可能性を示唆する結果を得た。またそれぞれの領野はそれぞれの近傍、またはオーバーラップしている領野の機能とも非常に強く連関していることがわかりつつあり、行動によって柔軟にM1とM2の協調性の程度や階層性の程度を調整していることが示唆される。今後課題をより複雑な構成にし、内的情報をより必要とするものにするなど改良を続け、またそれぞれのフィードフォワード情報やフィードバック情報を丹念に計測し解析することで、その全容を明らかにしていきたい。

得られた成果の意義等の自己評価

頭部固定のマウスおよびラットで、画期的なオペラント学習課題を構築できたことは、世界的にも新しく、今後の発展性も高いことから、その意義は高い。さらに運動課題実行中および長期間での2光子イメージングやそこから得られた画像処理技術の確立、細胞活動と運動との関連性を相互情報量として定量化することを確立したことも革新的技術と考えている。またラットからの電気記録においても、異なる領野からのマルチ電極記録法と多細胞活動の相関解析、課題実行中ラットからのホールセル記録と、単一細胞膜電位変化とオシレーション活動との相関解析、など画期的な計測法と解析法を確立することができた。これらに関しても世界的に最先端の技術である。

また成果について特に、研究項目B-6で得られた大脳皮質の2つの中間層、L2/3とL5aでの運動学習中の長期細胞活動変化の差異というものはコンセプトとしても新規のもので大脳皮質での多層学習ネットワークという新しい概念を提唱できたと考えている。加えて、本研究で開発した2光子イメージングによる単一細胞オペラント条件付けでは、標的細胞をより機能的に分類することや、オペラント条件付けに関わる分子経路の薬理実験などが可能である。今後、ブレインマシンインターフェースに伴う神経回路の再編や効率的な細胞活動制御の基盤となる研究に発展させ、当CREST領域の戦略目標である、脳機能の改善・補助技術の展開につながる機構の解明、に資す

るものとして。このように研究項目 B-6 で発見した、多層回路としての長期可塑性と局所回路としての短期可塑性は、大脳皮質の神経回路再編成の基本原理のひとつである可能性があり、非常に意義が高いと結論づける。

今後の研究の展開：

現在、運動野—線条体—運動野（松崎、磯村グループ）についてはさらに研究内容が大きく進展しつつあり、運動野の入出力領野も含めた広域のネットワーク回路に関して、近い将来に重要な成果があげられるものと期待している。また本研究で開発された覚醒マウスでの2光子イメージングと細胞操作法や、ラットでの多細胞電気記録や光刺激法については、そのままマーマセットに 응용可能である。実際すでに、松崎はマーマセットへの応用を始めており、覚醒マーマセットでの多細胞2光子カルシウムイメージングに成功している。より高次脳機能に本研究技術を応用、発展させることでこれまで調べることが出来なかった脳機能回路に迫れるものと期待している。また松崎グループの項目 B-6 と D が直接的につながりつつあり、より発展できるものと考えている。最近では運動野でのスパイン構造可塑性が大きく注目されているが、これがどの領野からの入力を受けるのか、課題関連細胞特異的なのかなどは不明である。本実験系と技術はこの問題にもアプローチ可能である。今後発展させていき、運動野での運動学習における可塑性機構の全容をシナプス、多細胞、多層ネットワークのレベルで包括的に理解することを目指したい。

研究代表者としてのプロジェクト運営：

研究の方向性や実験内容の情報については、松崎、磯村、喜多村で頻繁に交換し議論を行った。また年に1回メンバー全員による発表と討論を行い、人的交流と意思疎通を図った。技術的にも問題点などがあれば、それぞれのラボに見学に行くなど、情報・技術共有という意味ではチーム内でのコミュニケーションはうまくいったと思われる。また、イメージングによる結果と電気計測の結果、マウスとラットの結果、という相補的な情報を共有してそれぞれのグループでの実験計画の修正や結果の解釈などを随時行えたこともプロジェクトの推進に有効であった。しかし一方で、2010年にラボを立ち上げたばかりで研究に集中する必要がある、本 CREST 研究を中心とした公開シンポジウムや国際シンポジウムなどを主催するまでは至らなかった。現在、覚醒動物での電気記録や2光子イメージングの実験と数理解析の両方に精通した若手研究者が育ってきており、今後に向けて大きな意義をもつプロジェクトになったと考えている。



2014年2月5日チームミーティング後の懇親会にて