

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」
平成 21 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

松崎 政紀

自然科学研究機構基礎生物学研究所・教授

最先鋭技術で探る運動皮質回路の時空間表現と光制御

§ 1. 研究実施体制

(1) 松崎グループ

① 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)

② 研究項目

- ・光計測・光刺激のための遺伝子導入法の確立
- ・大脳運動野における運動関連細胞のイメージング
- ・大脳運動野における運動情報表現の解析
- ・小脳における運動関連細胞のイメージング

(2) 磯村グループ

① 主たる共同研究者: 磯村 宜和 (玉川大学大学院脳科学研究科、教授)

② 研究項目

- ・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
- ・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
- ・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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究のねらい・概要

随意運動が脳皮質内の神経回路にどのように情報表現されているのかを解明することを目的とする。そのために、階層横断的方法論を結集・融合させ、運動に関わる皮質細胞の活動・分布を単一細胞レベルで明らかにし、それらの活動を光制御することで情報の流れと情報量を明らかにする。松崎グループはイメージングによって一次運動野 (M1)、高次運動野 (M2) での前肢を用いた随意運動に関連する機能的細胞分布を単一細胞レベルで明らかにし、細胞活動を層内、層間レベルで局所的に光制御し、M1、M2 間の回路、及び各々の局所回路の動作原理を明らかにする。磯村グループは電気計測を方法論の主軸とし、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運動関連活動をミリ秒以下の精度で計測し、各層間や領域間で活動を比較して、多層処理仮説を検証する。本年度は、松崎グループ、磯村グループともに、初年度から構築してきた顕微鏡・装置を用いて、実験データの取得及び解析を行なうとともに、次年度からの実験のための実験系の構築を進めた。

研究進捗状況

(松崎グループ)

自発性前肢運動課題遂行中のマウスの M1 及び M2 の第 2/3 層において、2光子カルシウムイメージングを行った。得られたイメージングデータ解析のため、揺れ補正、細胞体抽出などの画像解析法を構築した。解析の結果、多数の課題関連細胞を同定した。特に、運動開始前から活動する細胞グループ、運動中に最も良く活動する細胞グループ、運動直後に活動する細胞グループを同定し、これらの空間分布、および同期活動性の相関関係を明らかにした。これらの細胞群は基本的に混在していたが、時折クラスターしているものが見られ、これらの担う運動情報に関して定量化した。近傍の細胞ほど同じグループに属していることが多く、また同じ試行において活動しやすいことを見出した。この結果は感覚野の2光子イメージングによって報告されている一般的な結果と一致しており、多電極を用いた運動野での計測による報告結果とも一致していた。これに加えて、活動時間パターンに依存した、異なるグループの活動間での新たな時空間相関構造を見出した。また、課題関連細胞の感覚応答性や、非課題関連細胞と課題関連細胞の活動間の時空間相関構造を明らかにした。M2 は M1 よりも活動開始が早くから誘発されること、これまでの光刺激マッピング及び逆行性蛍光トレーサの注入実験の結果から、マウス M2 は機能・構造的に高次運動野に対応すると結論づけた。

カルシウム感受性タンパク質の遺伝子導入法を確立し、より広範囲にわたってカルシウムイメージングが出来るようになった。さらに運動課題装置を小脳記録用に最適化し、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、麻酔下では微小帯域活動を捉えることに成功した。

(磯村グループ)

これまでに、前肢で操作するレバー部と舌で報酬を舐めるスパウト部を統合した「スパウトレバー」を考案し、頭部を固定したラットに前肢レバー操作課題をわずか数日間で学習させる実験装置を開発した(特許出願済)。さらに、本装置を活用して、同一個体が自発性(内発性)運動と誘発性(外発性)運動をおこなう「外発性／内発性運動課題」や、異なる合図音を弁別して運動発現を実行する(Go)またはしない(No-go)「Go／No-go 運動課題」を、追加1日で学習させることにも成功した(論文準備中:研究項目「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」の目標を達成し完了)。

運動実行中の抑制性細胞の活動上昇(Isomura et al., 2009)は、不要な運動を抑えるための反回抑制を意味するのか、それとも運動を調節するバランス抑制を意味するのかを最終的に明らかにすることを目指して、運動課題を遂行中に運動野細胞のシナプス性コンダクタンスを電圧固定ホールセル記録法により計測する実験系の構築を進め、運動課題を遂行中のラットの一次運動野からの電流固定ホールセル記録の実験系を確立することに成功した。

4. 今後の見通し

松崎グループは、異なった前肢運動関連細胞を同定しその活動性の時空間相関を解析する。また個体脳での細胞光刺激法を確立し、M1, M2 細胞集団活動の攪乱による細胞活動の変化・行動の変化を調べる。また前肢運動課題および舌運動課題中に小脳プルキンエ細胞集団の活動をカルシウムイメージングする。

磯村グループは、引き続き運動課題を遂行中のラットの M1、M2 の浅層および深層において、シリコンプローブをもちいたマルチニューロン記録法によって複数の細胞活動をミリ秒単位の時間精度で同時記録し解析することを実施する。特に、マルチニューロン記録電極と傍細胞(ジャクスタセラー)記録電極を近接させて、傍細胞記録用のガラス電極を介して記録細胞を人為的に発火させる「ナノ刺激法」により、単一の傍細胞記録細胞の発火が周囲のマルチニューロン記録細胞の発火活動に与える影響を解析して、記録細胞間でみられる同期的発火の因果性(単シナプス性応答かどうか)を検証する実験系を確立することも試みる。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Ako R, Wakimoto M, Ebisu H, Tanno K, Hira R, Kasai H, Matsuzaki M, Kawasaki H. Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 48:246-257, 2011. (DOI: 10.1016/j.mcn.2011.08.005).
2. Kitamura K, Häusser M. Dendritic calcium signaling triggered by spontaneous and sensory-evoked climbing fiber input to cerebellar Purkinje cells in vivo. *J Neurosci.* 31:10847-10858, 2011. (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2525-10.2011)
3. Takahashi N, Kitamura K, Matsuo N, Mayford M, Kano M, Matsuki N, Ikegaya Y. Locally synchronized synaptic inputs. *Science.* 335:353-356, 2012. (DOI: 10.1126/science.1210362)
4. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T. Power-law inter-spike interval distributions infer a conditional maximization of entropy in cortical neurons. *PLoS Comput Biol.* in press.
5. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. Spike sorting of heterogeneous neuron types by multimodality-weighted PCA and explicit robust variational Bayes. *Front Neuroinform.* in press.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)