

「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

H24 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) 礪村グループ

① 主たる共同研究者: 礪村 宜和 (玉川大学脳科学研究所、教授)

② 研究項目

- ・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

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、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)

松崎グループは、8-9日間の訓練後の自発性前肢レバー引き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い多数の課題関連細胞を同定した。両領域において、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細胞が存在した(図1)。前者の活動はレバー引き運動と

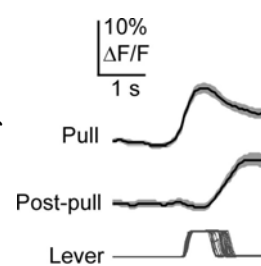


図1

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。前者は8個程度の細胞からなる空間的クラスターを約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。微小クラスター内の細胞群はその活動時間相関が高く、レバー引きに高い確率で反応することから、微小クラスター内では回帰性シナプス結合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引き運動に貢献することが示唆された⁴⁾。次にM2とM1の間でのシナプス結合様式を機能的・解剖学的に調べた。チャンネルロドプシン2(ChR2)を第5層もしくは全層で発現しているマウスにおいて、それぞれの領域を光刺激し、同時にもう片方の領域で電気記録することによって、M2からM1へは主に5層から、M1からM2へは主に2/3層からシナプス投射していることを見出した。逆行性および順行性蛍光トレーサの実験においてこの機能結合層非対称性は支持された。結合様式からM2はM1の上位機能を持っていることが示唆された⁵⁾。

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に、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてGCaMPをM1錐体細胞に発現させる実験系を確立した。また光刺激のため

の AAV 導入法の最適化を図った。

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。

(磯村グループ)

磯村グループは、ラットに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より効率良く学習させる装置を開発(特願 2011-139810; 図 2)し、自発的または聴覚誘発的に応答する「内発性・外発性運動課題」、聴覚刺激を弁別して応答する「Go/No-go 弁別課題」、レバーのトルクが変化する「強弱トルク運動課題」などを数日以内で学習可能とした³⁾。内発性・外発性運動に関する M1 および M2 の細胞活動に関しては、計 50 頭以上の実験データを取り終え、検出した数百対以上の同期的発火の性状を中心として、詳細な解析を進めている。Go/No-go 運動や強弱トルク運動についても、数十頭分の実験を終えて、同様の解析を進めている。さらに、運動課題遂行中に運動野細胞からのホールセル膜電位記録を確立し、運動発現中での近傍の局所フィールド電位と膜電位変化との関連性を見出しつつある。

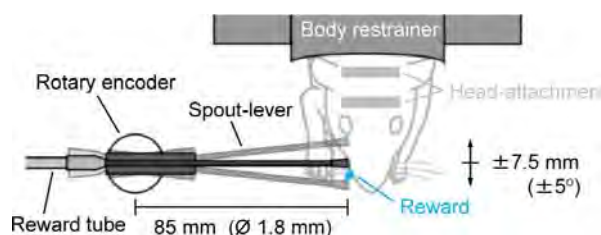


図 2

4. 今後の見通し

松崎グループは、運動関連細胞の M1-M2 間の投射様式と機能について焦点を当て、学習過程や異なった運動を行なうときのレバー運動表現の変化過程を明らかにすることを目標とする。また ChR2 の 2 光子刺激による課題関連細胞群のシナプス結合の直接的計測をめざす。

磯村グループは、これまでに得られた内発性・外発性運動における M1 と M2 のマルチユニット活動の同期的発火、Go/No-go 運動および強弱トルク運動における M1 と M2 のマルチユニット活動の同期的発火に関する解析を進め、またマルチユニット活動とガンマ・オシレーションやシータ・オシレーションとの関連性に着目して理論的に解析する。さらにホールセル記録の解析から、運動時での興奮性・抑制性シナプス入力、ガンマ・オシレーションとの関連性を明らかにする。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T (2012) Power-law inter-spike interval distributions infer a conditional maximization of entropy in cortical neurons. PLoS

- Computational Biology 8: e1002461 (DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002461)
2. Takekawa T, Isomura Y, Fukai T (2012) Spike sorting of heterogeneous neuron types by multimodality-weighted PCA and explicit robust variational Bayes. *Frontiers in Neuroinformatics* 6:5. (DOI: 10.3389/fninf.2012.00005)
 3. Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ohkubo F, Kitamura K, Matsuzaki M, Sakai Y, Isomura Y. Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *Journal of Neurophysiology* 108, 1781-1792. (DOI: 10.1152/jn.00356.2012)
 4. 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. *Journal of Neuroscience* 33, 1377-1390. (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2550-12.2013)
 5. 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. *Frontiers in Neural Circuits* (in press).