

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14312

研究課題名(和文)小脳における運動学習と運動タイミングの情報表現

研究課題名(英文)Representation of motor learning and motor timing in the cerebellum

研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA, Kazuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：60423159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小脳皮質は帯状の機能構造(ゾーン)を示す。生きたマウスでゾーンを可視化することのできる遺伝子改変マウスを作製し、目標指向性の運動課題(Go/No-go課題)を学習中のマウスにおいて、各ゾーンにおける登上線維入力の2光子イメージングによる解析を行った。その結果、Go試行における反応の開始、No-go試行における反応の抑制、感覚フィードバックに関する情報が異なるゾーンに入力し、学習の進行とともに変化することを明らかにした。これらの結果は、感覚運動および認知の情報が異なる小脳帯域で同時に処理されることで、高度に統合された行動学習が実現されていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Climbing fiber (CF) inputs to Purkinje cells carry error and/or timing signals for motor control and learning. CFs separately project to longitudinal clusters of Purkinje cells (cerebellar zones), which are characterized by the expression of aldolase C. We investigated the representation of CF inputs to the distinct cerebellar zones in Crus II of the cerebellar hemisphere by using two-photon calcium imaging in mice learning a go/no-go auditory discrimination task. CF inputs to the lateral aldolase C-positive zones were timed to the go cues and enhanced during the course of learning. Those to the lateral aldolase C-negative zones were timed only to the no-go cues, which declined along with learning. Those to the medial zones were longer in latency and showed lick-related representation. Our results indicate that differential and parallel processing of sensorimotor and cognitive information in the distinct cerebellar zones may collectively sophisticate goal-directed behavior.

研究分野：神経生理学

キーワード：システム神経生理学 小脳 運動制御 運動学習

1. 研究開始当初の背景

運動制御・運動学習における小脳の役割とそのメカニズムに関する研究は、半世紀以上に渡る長い歴史があり、膨大な実験結果とそれに基づく多数のモデルが考案されている。なかでも、運動の目標軌道と実現軌道間の誤差信号をもとに、プルキンエ細胞のシナプス可塑性が起こって学習が成立するという、フィードバック誤差学習が小脳運動学習の基本メカニズムとして考えられ、多くの研究がこの仮説 (Marr-Albus-Ito 理論) を支持する結果を報告している。ここで運動の誤差信号を小脳に送っているのが下オリーブ核ニューロンの軸索である登上線維である。一方で、下オリーブ核ニューロンは 10Hz の閾値下膜電位振動を示す細胞であり、下オリーブ核ニューロンの発火やプルキンエ細胞で観察される登上線維応答は、これと同じ周波数のリズムを示すことから、登上線維シグナルが運動のタイミングを決めるクロックとして働いていると考えられている (タイミング仮説)。登上線維が一体どちらの信号を表現しているのかについて、これまで長い論争が続いているが、両者は相反するものではないため、両方とも正しいということも考えられる。そこで、本研究では、これまで研究代表者が開発してきたマウス用運動課題と 2 光子イメージングを組み合わせることで、運動タイミングの学習が必要な課題を学習中に、登上線維シグナルが、小脳のどこでいつどのような信号を表現しているのかを明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

運動タイミング学習が必要な運動課題をマウスに学習させる。まず音を手がかりとした単純な Go/No-Go 課題を学習させた後、手がかり刺激と反応開始までに待ち時間を設け、反応開始のタイミングを一定時間内にするように学習させる。運動課題としては、リッキングを行わせる。この運動課題を学習中のマウスにおいて、小脳プルキンエ細胞の登上線維応答を 2 光子イメージングにより記録し、登上線維シグナルが、運動の誤差およびタイミングについての情報をどのように表現しているのかを明らかにする。その際、小脳が示す帯状の機能構造のマーカーである Aldolase C/Zebirin II の発現を生体内で可視化できるマウス (Aldoc-tdTomato) を用いることで、小脳帯域ごとに登上線維が送る信号が異なるのか、同じ登上線維が学習過程で異なる情報をコードするようになるのか、常に両方の情報を持っているのかについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

2 光子顕微鏡下で Go/No-go リッキング課題を可能にする課題装置を使用した。これらの課題を行っているマウス小脳において 2 光子カルシウムイメージングを行った。これら

の実験は、小脳帯域を可視化できるマウス (Aldoc-tdTomato、図 1) を用い、小脳皮質における部位を厳密に同定した上で行った (Tsutsumi et al., 2015)。

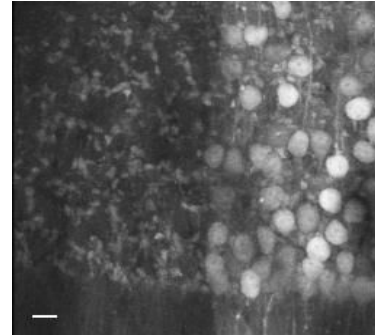


図 1. AldolaseC の発現を可視化するマウス。AldolaseC を発現しているプルキンエ細胞だけが可視化できる。スケールバー：20 μ m。

Aldoc-tdTomato マウスにあらかじめカルシウムセンサー GCaMP6 をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) を注入し、発現させた。この方法で観察できるプルキンエ細胞のカルシウム反応は、登上線維由来であることが研究代表者自身の研究を含めた過去の研究でわかっている (Miyakawa et al., 1992; Kitamura & Häusser, 2011)。

プルキンエ細胞集団で登上線維応答を記録し、学習過程で登上線維シグナルがマウスの行動変化に応じてどのように変化するかを解析した。特に、登上線維シグナルが運動および課題のどのような情報を表現しているのかに着目して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 頭部固定下における音弁別 Go/No-go 課題の学習

まず、2 光子顕微鏡下で音弁別 Go/No-go 課題をマウスに学習させた。高音音 (10kHz) および低音音 (4kHz) をそれぞれ、Go キューおよび No-go キューとして提示し、Go キューに対するリッキングによる反応で報酬である水を与えた。一方、No-go キューに対する反応は、誤答に対する罰として待ち時間の延長 (4.5 秒) を課した。この課題を 1 日 1 セッション (約 300 試行) 行い、正答率の変化を観察したところ、実験した 16 匹のマウス全てにおいて、1 週間以内に感度指数 (d') が 3 以上 (Hit rate > 98%, Correct rejection rate > 85%) の熟練レベルに達した。また、課題の正答率に応じてリッキングの行動がどのように変化するかを調べたところ、正答率の向上に伴って、Go キュー直後にリッキングが集中し無駄なリッキングが抑制されることと、キューからリッキング開始までのタイミングのばらつきが小さくなることが観察され、正答率向上と行動の効率化が並行して起こっていることが明らかとなった。

(2) 課題学習中のマウスにおける登上線維応

答の2光子イメージング

音弁別 Go/No-go 課題における登上線維シグナルの役割を明らかにするために、リッキング運動に関わる小脳半球第2脚 (Crus 2) において、2光子カルシウムイメージングを行った。小脳帯域ごとの機能を調べるために、帯域構造の指標である Aldolase C / zebrin

の発現を生体内で可視化する事のできる Aldoc-tdTomato マウス (Tsutsumi et al, 2015) を用いた。Aldoc-tdTomato マウスの小脳プルキンエ細胞にカルシウムセンサータンパク質の GCaMP6f を AAV により発現させ、課題学習中の登上線維シグナルの変化をモニターした。麻酔下動物において観察した我々の先行研究 (Tsutsumi et al, 2015) と同様に、覚醒行動中のマウスにおいても、登上線維シグナル構造の境界が帯域構造の境界と一致していたことから、アルドラーゼ C による帯域構造が、課題実行に関する機能的構造を示していると考えられた。

次に、帯域毎の登上線維シグナルが課題の学習とともにどのように変化するかを解析した。主に大脳とのループを形成していることが分かっている半球外側部の帯域のうち、アルドラーゼ C 陽性の帯域においては、Hit 試行において Go キューに対して顕著な反応が観察され、学習の進行とともにこれらの反応は増強された。一方、False alarm (FA) 試行においては、学習初期にアルドラーゼ陽性および陰性帯域の両方において強い反応が観察されたが、これらの反応は学習に伴って減弱した。また、主に末梢からの感覚入力を受けていると考えられる内側部では、Hit 試行のみで反応が観察された。これら内側部の反応は、反応時間が遅く、感覚フィードバック情報を表していると考えられた。

登上線維入力の同期性が、運動開始や運動学習に重要であることから、我々は次に、学習過程における登上線維シグナルの同期性の変化を解析した。まず、外側部のアルドラーゼ C 陽性帯域では、Hit 試行および FA 試行においてリッキングの直前に同期性がピークとなることから、リッキング開始に関係していることが考えられた。学習初期においては、同期的な登上線維シグナルとリッキング開始のタイミングには相関が見られたことから、学習過程で同期的な登上線維シグナルが運動開始に必要であると考えられた。しかしながら、学習後期ですでに運動に熟練した段階では、このような相関は見られなかったことから、外側部アルドラーゼ C 陽性帯域における登上線維シグナルは、Go キューに反応して運動を開始するタイミングの学習に重要であることが示唆された。

帯域ごとの登上線維シグナルが、課題学習におけるどのような情報を表現しているのかを明らかにするために、集団活動の機械学習によるデコーディング解析を行った。外側部アルドラーゼ C 陽性帯域においては、学習に伴って Go キューの表現が上昇するのに対

して、リッキングに関する表現は高いままあまり変化しなかった。また、外側部アルドラーゼ C 陰性帯域では、学習初期における FA 試行の表現が学習の進行とともに減少した。一方、内側部の帯域では学習過程を通してリッキングに関する表現が高く、課題やキューに関する情報表現は、ほとんど見られなかった。次に、単一プルキンエ細胞における登上線維シグナルの学習過程における変化を調べるために、単一細胞によるデコーディング解析を行った。その結果、外側部アルドラーゼ C 陽性帯域にあるプルキンエ細胞への登上線維シグナルは、学習初期においてリッキングや No-go キューの情報を表現しているが、学習の進行に伴い徐々に Go キューの表現に変わること、外側部アルドラーゼ C 陰性帯域では、初期の No-go キューに対する表現が徐々に消失すること、内側部の帯域では一貫してリッキングの情報を表現していることが明らかとなった。

本研究により、アルドラーゼ C の発現によって規定される小脳帯域が、高度な認知運動課題の学習において異なる役割を果たしていることが明らかとなった。外側部アルドラーゼ C 陽性帯域は、ターゲットとなる行動の開始に重要であることが示唆される。これらの帯域における登上線維入力の頻度および同期性はリック開始直前にピークとなり、特に学習初期において同期性とリッキング開始の相関が高くなることから、Go キューに対して運動を開始するタイミングの学習に必要であると考えられる。また、これらの帯域では、学習の進行に伴って Go キューの表現が増加する一方で No-go キューの表現が減少することから、音刺激に対する選択的注意または判断のシグナルを伝えているとも解釈できる。一方で、外側部アルドラーゼ C 陰性帯域においては、学習初期における FA 試行つまり目標外のキューに対するエラー行動のときのみならず、登上線維が入力し、学習の進行に伴ってこれらのシグナルは消失する。従って、これらの帯域においては、登上線維シグナルは誤った行動を抑制するために必要なフィードバック誤差情報を表現していると考えられる。内側部の帯域においては、学習の過程で一貫してリッキング行動後の遅いタイミングで登上線維シグナルが入力しており、これらのシグナルは感覚フィードバック情報を表現していると考えられる。これらの結果を総合すると、小脳においては認知・運動・感覚の情報処理が異なる帯域で同時に行われることで、高度に統合された行動学習が実現されていると言える。今回開発した方法を用いることで、小脳皮質における運動および高次機能を系統的に解析できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Manita S, Miyakawa H, Kitamura K, Murayama M. Dendritic spikes in sensory perception. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 査読有,11, 2017, 29. DOI: 10.3389/fncel.2017.000290

〔学会発表〕(計 14 件)

Manita S, Ikezoe K, Kitamura K. A novel method for assessment of reaching and grasping movements in head-fixed mice. 第 94 回日本生理学大会, 2017 年 03 月 28 日, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

Kitamura K. Representation of cerebellar climbing fiber signals during goal-directed behavior and learning. NIPS International Workshop "Toward elucidation of memory engram", 2016 年 12 月 07 日, 生理学研究所(愛知県・岡崎市)

Tsutsumi S, Hidaka N, Isomura Y, Matsuzaki M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K. Functional differences in climbing fiber inputs to distinct cerebellar stripes during goal-directed behavior. *Neuroscience 2016*, 2016 年 11 月 15 日, San Diego(USA)

喜多村和郎. 2 光子イメージングによる小脳回路研究:発達から運動機能まで. 第 63 回中部生理学学会, 2016 年 11 月 04 日, 岡崎カンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

喜多村和郎. 脳機能の 2 光子イメージング. *BioOpto Japan 2016*, 2016 年 09 月 15 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Choo MJ, Hira R, Matsuzaki M, Kano M, Kitamura K. Cerebellar lobules receive spatiotemporally specific inputs from the cerebral cortex. 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 07 月 22 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hoang HT, Yamashita O, Tokuda IT, Kitamura K, Sato M, Kawato M, Toyama K. Hyperacuity Bayesian technique to enhance temporal resolution of two-photon recording of complex spikes of cerebellar Purkinje cells. 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 07 月 22 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Shinichiro Tsutsumi, Naoki Hidaka, Y oshikazu Isomura, Masanori Matsuzaki, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Kazuo Kitamura. Differential learning related changes in climbing fiber inputs to cerebellar stripes. 第 93 回日本生理学学会大会, 2016 年 03 月 22 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Myeong Jeong Choo, Riichiro Hira, Masanori Matsuzaki, Masanobu Kano, Kazuo Kitamura. Optogenetic mapping of cerebra-cerebellar communication loop in mice. 第 93 回日本生理学学会大会, 2016 年 03 月 22 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Kazuo Kitamura. Functional organization of cerebellar modules during skilled behavior. 第 93 回日本生理学学会大会, 2016 年 03 月 22 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

M. INOUE, A. TAKEUCHI, S.-I. HORIGANE, H. FUJII, S. KAMIJO, S. TAKEMOTO-KIMURA, M. OHKURA, K. GENGYO-ANDO, M. KANO, J. NAKAI, K. KITAMURA, H. BITO. Rational design of ultrafast, high-affinity red calcium indicator for monitoring neuronal activity. *Neuroscience 2015*, 2015 年 10 月 17 日, Chicago (USA)

Masatoshi Inoue, Atsuya Takeuchi, Shin-ichiro Horigane, Masamichi Ohkura, Keiko Gengyo-Ando, Hajime Fujii, Satoshi Kamijo, Sayaka Takemoto-Kimura, Masanobu Kano, Junichi Nakai, Kazuo Kitamura, Haruhiko Bito. Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 07 月 28 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Huu Thien Hoang, Shinichiro Tsutsumi, Miki Hashizume, Okito Yamashita, Isao T. Tokuda, Masa-Aki Sato, Mitsuo Kawato, Masanobu Kano, Kazuo Kitamura, Keisuke Toyama. Identification of complex spikes in two-photon recording of Purkinje cell calcium responses by machine learning and ROC analysis of the performance. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 07 月 28 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

喜多村和郎. In vivo 光学イメージングと電気生理学の融合. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 07 月 28 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/physio02>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA Kazuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 60423159