

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13277

研究課題名(和文) In vivoホールセル記録と光遺伝学で解明する運動関連神経活動安定化の神経基盤

研究課題名(英文) Neural mechanism underlying stable neural responses during a learned movement

研究代表者

蝦名 鉄平(Ebina, Teppei)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：30611206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歩く、走る、何かを掴むといった運動に伴って、脳は特定のパターンを持った神経活動を生成する。運動の学習は、その運動をコードする神経活動を安定に再現できるようにして、ばらつきの少ない動作を可能にする。本研究ではこれまでに、このような安定な神経活動を生成する神経基盤を明らかにする事を目的として、運動中のマウス大脳皮質で同一のニューロンからその活動とシナプス入力を記録する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、運動中のマウス大脳皮質で同一のニューロンからその活動とシナプス入力を記録する方法を開発した。

運動実行時に単一細胞へのシナプス入力を記録する方法はこれまで、その技術的困難さからほとんど研究が行われてこなかった。そのため本研究で開発した技術によって、新規の神経活動安定化のメカニズムを明らかにできると期待される。また、運動実行にかかわる神経活動安定化のメカニズム解明を通して、例えば、脳損傷後のリハビリテーションなどの効率化へとつながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Motor learning reduces the trial-to-trial variability in neural responses during the learned behavior, but little is known how neurons generate the stable responses during the movement. In this research project, we developed a protocol to train mouse to use forelimbs to pull a lever, and also developed methods to measure the response and synaptic inputs from the same neuron during the task performance by combining cell-attached recording/two-photon imaging and whole-cell recording. Using these techniques, we will investigate the relationship between neural activity and excitatory/inhibitory synaptic inputs during a behavior.

研究分野：神経生理学

キーワード：in vivo ホールセル記録 2光子イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動の発現に伴って、脳の運動関連領域では特定のパターンを持った神経活動がみられる。例えば、手を伸ばして何かをつかむといった連続的な運動は、M1 のニューロンが逐次的に活動する事で体部位を緻密に制御し、実行されると想定されている。運動の正確さは、その時の神経活動のばらつきと関係している (Churchland et al., *Neuron*, 2006)。また、運動の学習はその運動に関連した神経活動を安定に再現する事につながっていて、これにより、運動のパフォーマンスが向上する (Peters et al., *Nature*, 2014; Masamizu et al., *Nat. Neurosci.*, 2014)。

最近の計算モデルによる研究は、いくつかの運動関連の神経活動が安定化されるメカニズムを提案しているが、実際の脳でこれらのメカニズムを検証した研究はほとんどない。例えば、運動関連の神経活動の安定化にバランスのとれた興奮性・抑制性シナプス入力が必要である事を示唆するモデルが提案されている (Hennequin et al., *Neuron*, 2014)。この結果は、細胞外記録法で計測された運動実行時の興奮性・抑制性ニューロンの同期発火現象 (Isomura et al., *Nat. Neurosci.*, 2009; Kaufman et al. *J. Neurophysiol.*, 2013) を良く再現している。しかし、細胞外記録法では、あるニューロンがどのようなシナプス入力を受けているのかはわからない。そのため、運動中の脳内で実際にバランスのとれたシナプス入力が生じられ、神経活動の安定化につながっているのかは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では以下の内容について研究を進める事とした。

どのようなシナプス入力が必要で運動関連の神経活動を形成するのか？

ニューロンがどのようなスパイク活動を生じるのかは、興奮性のシナプス入力と抑制性のシナプス入力によって決定される。そこで、運動している時のマウス大脳皮質を対象としてセルアタッチの状態では興奮性ニューロンのスパイク活動記録を行う。その後、ボルテージクランプ記録へ移行して、同じ細胞から興奮性と抑制性のシナプス入力を計測する。これらの結果から、レバー引き課題に関連する興奮性ニューロンの活動がどのようなシナプス入力に基づいているのかを明らかにする。

運動実行のための神経活動安定化のメカニズムはどのようなものか？

運動中のマウス大脳皮質で神経活動を光遺伝学の方法で制御して、外乱を加える。外乱のタイミング、強度を網羅的に変化させて、スパイク応答、シナプス入力への影響を計測する。上述したモデル研究では、抑制性入力による神経活動の安定化を想定しているが、抑制性入力がない場合にどのような安定化機構が存在するのかはよくわかっていない。そこで、抑制性入力のないニューロンが存在する場合には、興奮性入力によって単純に運動関連のスパイク応答が形成されるのかを検討する。また、興奮性・抑制性の入力を受けるニューロンについては、モデル研究で示唆されているような安定化機構が実際に存在するのかを検証する。

これらの結果をもとに、運動実行のための神経活動、シナプス入力外乱によってどのような影響を受け、元の状態へと戻るのかを解析して、運動実行に関連する神経活動の安定化メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

課題実行時のスパイク活動記録、ボルテージクランプ記録

運動課題実行中のマウス大脳皮質の興奮性ニューロンからスパイク活動と、シナプス入力を記録する。はじめに、短時間作用性のガス麻酔科でマウスの頭蓋骨を開窓し、ガラス窓を装着する。パッチクランプ記録はガラス窓の隙間からガラス電極を刺入して、大脳皮質 2/3 層のニューロンを対象に行う。ガラス窓の設置後に、頭部固定用の金属プレートを頭蓋骨に接着する。

手術後 1 ~ 4 週間の回復期において、レバーを引く事を要求する運動課題の訓練を開始する。これまでの予備実験の結果から、2 週間のトレーニングによって、マウスはこのタスクを十分に学習する事がわかっているため、この期間を経て学習を終えたマウスをパッチクランプ実験に用いる。

パッチクランプ記録ははじめに、2 光子顕微鏡下で脳表から 100 ~ 250  $\mu\text{m}$  (2/3 層) の興奮性ニューロンにパッチ用ガラス管電極をガイドして (Kitamura et al., *Nat. Methods*, 2008; Ebina et al., *Cell Rep.*, 2014) ギガシールを形成する。この状態でレバー引き課題を行わせ、この時のスパイク応答を記録する。その後、ホールセル状態へと移行して、ボルテージクランプ法による興奮性・抑制性のシナプス入力を記録する。これらの結果から、シナプス入力とスパイク活動のタイミングを比較して、どのようなシナプス入力によってスパイク活動が生じるのかを明らかにする。

光遺伝学による神経活動の制御方法

神経活動を光遺伝学的に制御し神経活動へ外乱を加える。外乱によって M1 ニューロンの

スパイク応答、シナプス入力がどのように変化して、元の活動へと戻るのかを解析する。そのために、パッチクランプ記録用の手術に追加して、チャンネルロドプシン 2 (ChR2) やアーキロドプシン T (ArchT) などの遺伝子をコードしたアデノ随伴ウイルス (AAV) をシリンジポンプで注入し、遺伝子を細胞体へ導入する。手術後、3 ~ 4 週間で光刺激に応じた神経活動の制御が可能となる。ChR2 は 488nm、ArchT は 563nm の光刺激によって、それぞれ細胞活動を促進、阻害する事ができる。遺伝子導入した個体を、野生型の個体と同様のプロトコルでトレーニングして、パッチクランプ記録を行う。タスク中の様々なタイミングで光刺激を行って、スパイク活動、興奮性・抑制性シナプス入力の変化を記録する。

#### 外乱による影響の計測と解析

先行研究の結果から、ニューロンのスパイク応答は光刺激後すぐに、外乱がない時と同程度まで回復する事が予想される。そこで、実際に外乱によるスパイク応答を計測し、光刺激による影響からの復帰時間を計測する。その後、ボルテジクランプ法でシナプス入力を計測する。この結果から、モデル研究で示唆されているような、興奮性・抑制性シナプス入力のバランスによって神経活動が安定化されているのかを検証する。これらの結果から、運動実行に関連する神経活動の安定化がどのようにして起こっているのかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

スパイク活動とシナプス入力を運動中のマウス大脳皮質で記録するためには体動などに起因する組織の揺れなどを十分に抑え、長時間安定した記録を行う必要がある。本研究では、はじめに記録用ガラス電極、脳観察用のガラス窓の設置方法について検討し、運動課題実行中のマウス一次運動野において興奮性・抑制性シナプス入力を単一の神経細胞から記録する実験方法を確立した。次に、運動課題中のマウス大脳皮質で単一神経細胞からスパイク活動とシナプス入力を記録するための実験方法最適化を進めた。研究開発当初はセルアタッチ記録によって電氣的なスパイク応答を単一のニューロンから記録し、その後、ホールセル記録に移行する方法を予定していたが、セルアタッチ記録した状態からホールセル記録に移行した際に十分なクオリティでシナプス入力を記録する事が難しかった。また、ターゲットとしたニューロンが必ずしも十分な頻度のスパイク応答を示さなかった事もあり、電気生理学的なスパイク計測法の代わりに 2 光子イメージング法によって神経細胞活動を記録し、運動中の活動パターンを同定した後でこれをターゲットとしたホールセル記録を行う方針とした。研究期間内には、この方法についても検討を進め、クオリティは低いものの、実際に記録を行う事が可能である事を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ebina Teppei, Masamizu Yoshito, Tanaka Yasuhiro R., Watakabe Akiya, Hirakawa Reiko, Hirayama Yuka, Hira Riichiro, Terada Shin-Ichiro, Koketsu Daisuke, Hikosaka Kazuo, Mizukami Hiroaki, Nambu Atsushi, Sasaki Erika, Yamamori Tetsuo, Matsuzaki Masanori | 4. 巻<br>9       |
| 2. 論文標題<br>Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of marmosets during upper-limb movement tasks  | 5. 発行年<br>2018年 |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1038/s41467-018-04286-6">https://doi.org/10.1038/s41467-018-04286-6</a>   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-       |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Ebina Teppei, Obara Keitaro, Watakabe Akiya, Masamizu Yoshito, Terada Shin-Ichiro, Matoba Ryota, Takaji Masafumi, Hatanaka Nobuhiko, Nambu Atsushi, Mizukami Hiroaki, Yamamori Tetsuo, Matsuzaki Masanori | 4. 巻<br>116                 |
| 2. 論文標題<br>Arm movements induced by noninvasive optogenetic stimulation of the motor cortex in the common marmoset  | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>22844 ~ 22850 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1903445116">https://doi.org/10.1073/pnas.1903445116</a>   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                   |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuzaki Masanori, Ebina Teppei  | 4. 巻<br>64              |
| 2. 論文標題<br>Common marmoset as a model primate for study of the motor control system | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Current Opinion in Neurobiology   | 6. 最初と最後の頁<br>103 ~ 110 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi:10.1016/j.conb.2020.02.013                          | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T.   |
| 2. 発表標題<br>Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of common marmosets during reaching tasks |
| 3. 学会等名<br>国際ワークショップ「遺伝子導入技術の利用による霊長類脳機能操作とイメージング」（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Masamizu, Y., Ebina, T., and Matsuzaki, M.   |
| 2. 発表標題<br>Two-photon calcium imaging in the motor cortex of common marmosets during upper-limb movement tasks. |
| 3. 学会等名<br>The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T.   |
| 2. 発表標題<br>Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of common marmosets during reaching tasks                         |
| 3. 学会等名<br>Joint symposium of 10th Optogenetics Research Conference and Second International Symposium on Brain Information Dynamics |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T., Masamizu, Y., Obara, K., and Matsuzaki, M.  |
| 2. 発表標題<br>Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of non-human primate during reaching tasks |
| 3. 学会等名<br>9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (国際学会)                   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T., Masamizu, Y., and Matsuzaki, M.  |
| 2. 発表標題<br>Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of common marmosets during upper-limb movement behavior tasks |
| 3. 学会等名<br>Neuroscience 2018 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>岡本和樹, 藤井直樹, 蝦名鉄平, 小西邦昭, 佐藤由宇, 中野利沙子, 日置寛之, 山口瞬, 竹内春樹, 湯本潤司, 松崎政紀, 池谷裕二 |
| 2. 発表標題<br>テルビウムドープガラスの蛍光を手がかりにした標的パッチクランプ法                                       |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T., Masamizu, Y., Tanaka, YR., Watakabe, A., Hirakawa, R., Hirayama, Y., Hira, R., Terada, S., Koketsu, D., Hikosaka, K., Mizukami, H., Nambu, A., Sasaki, E., Yamamori, T. and Matsuzaki, M. |
| 2. 発表標題<br>Two-photon imaging of neuronal activity in the motor cortex of marmosets during reaching tasks.  |
| 3. 学会等名<br>第8回日本マーモセット研究会大会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Obara, K., Ebina, T., Masamizu, Y., Uka, T., Komatsu, M., Ichinohe, N., Watakabe, A., Mizukami, H., Yamamori, T., Kasai, K., and Matsuzaki, M. |
| 2. 発表標題<br>Functional imaging of the auditory cortex in common marmosets: For elucidating the mechanisms of the auditory mismatch negativity              |
| 3. 学会等名<br>第8回日本マーモセット研究会大会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T., Masamizu, Y., Hirakawa, R., Watakabe, A., Ohkura, M., Kobayashi, K., Koketsu, D., Nambu, A., Hikosaka, K., Sasaki, E., Nakai, J., Yamamori, T. and Matsuzaki, M. |
| 2. 発表標題<br>Two-photon imaging in primary motor cortex during a forelimb movement task in the head-restrained common marmoset   |
| 3. 学会等名<br>The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Okamoto, K., Fuji, N., Ebina, T., Konishi, K., Sato, Y., Kashima, T., Nakano, R., Hioki, H., Takeuchi, H., Yumoto, J., Matsuzaki, M. and Ikegaya, Y. |
| 2. 発表標題<br>Fluorescent glass pipettes for optically targeted electrophysiological recordings.   |
| 3. 学会等名<br>Neuroscience 2019 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Obara, K., Ebina, T., Masamizu, Y., Terada, S., Uka, T., Komatsu, M., Ichinohe, N., Watakabe, A., Mizukami, H., Yamamori, T., Kasai, K. and Matsuzaki, M. |
| 2. 発表標題<br>Calcium imaging of the auditory mismatch negativity (aMMN) responses in common marmosets.   |
| 3. 学会等名<br>The 42th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ebina, T., Obara, K., Masamizu, Y., Terada, S., Watakabe, A., Matoba R., Hatanaka, N., Nambu, A., Mizukami, H., Yamamori, T. and Matsuzaki, M. |
| 2. 発表標題<br>Upper-limb movements induced by optogenetic stimulation of the motor cortex in the common marmoset.  |
| 3. 学会等名<br>The 42th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |