

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22680031  
 研究課題名（和文） 行動中のマウスにおける小脳ニューロンの活動とそのシナプス基盤

研究課題名（英文） Activities of cerebellar neurons in behaving mice

## 研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA KAZUO)  
 東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：60423159

研究成果の概要(和文)：小脳による運動の制御、運動学習メカニズムを明らかにするために、顕微鏡下で頭部固定に馴化させたマウスにおいて飲水運動や前肢レバー押し運動を課す運動課題装置を作成し、マウスに効率的に学習を行わせることに成功した。また、小脳皮質の機能単位である帯域構造と機能の関係を明らかにするために、小脳帯域を可視化できる遺伝子改変マウスを開発し、帯域の境界が登上線維応答の同期性と1細胞レベルの空間的精度で相関していること明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of cerebellar dependent motor control and motor learning, we have developed an efficient motor task apparatus for mice to perform licking and mechanical lever-pushing under head-fixed configuration. Furthermore, we have shown that synchrony of climbing fiber responses in Purkinje cells correlate with the longitudinal stripes of cerebellar cortex at single cell level.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2012年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学／神経・筋肉生理学

キーワード：神経科学, 生理学, パッチクランプ, 2光子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

動物個体におけるホールセル記録や2光子励起イメージングによる単一ニューロンの機能解析は主に麻酔下の動物において研究が行われているが、麻酔薬が中枢神経系に与える影響を無視することはできず、それゆえ用いる麻酔薬の種類によって得られる結果に矛盾が生じることもしばしば見受けられる。

しかしながら、無麻酔覚醒時の動物において、これらの解析を行うことは従来の方法では非常に困難で、成功例は世界的に見てもごくまれである。また、行動中の動物においては、手法の開発に関する論文があるのみである。

これまで、麻酔下のラットおよびマウスの小脳においてプルキンエ細胞のホールセル記録と2光子励起イメージングによって、小

脳の情報処理に関する解析を進めてきた。しかしながら、小脳は運動の制御や運動学習に重要なはたらきをしている領域であるため、その機能を明らかにするためには、行動中の動物において2光子イメージングなどを用いた細胞レベルの機能解析が必須である。そこで、本研究では、覚醒行動中のマウスにおける小脳ニューロンからの2光子イメージングやホールセル記録を行うことを目的として研究を開始した。さらに、小脳皮質は、微小帯域と呼ばれる矢状断方向に伸びる帯状の構造を示し、これが機能単位となっていることが示唆されている。従って、小脳皮質における機能-構造相関を明らかにすることが重要であると考えられている。

## 2. 研究の目的

以上のような背景の下、覚醒行動中のマウスにおいて2光子イメージングを可能とするため、まず、顕微鏡下で頭部固定に馴化させたマウスにおいて飲水運動や前肢レバー押し運動を課す運動課題装置を作成し、マウスに効率的に学習を行わせることを第一の目的とした。また、小脳皮質では、様々な分子が矢状断方向に沿った帯状に発現していることが知られている。なかでも、脳特異的に発現する解糖系酵素であるアルドラーゼCは、小脳プルキンエ細胞に特に強く発現し、皮質上で13本の縦縞を形成している。一方、電気生理学的研究から、小脳ニューロンが機能的にも縦縞状のゾーンを形成しており、プルキンエ細胞の登上線維応答が矢状断方向に強く同期していることなどからも、微小帯域と呼ばれる機能的な構造が存在することが明らかとなっている。これらのことから、アルドラーゼCの縞状発現と機能的微小帯域の関係が示唆され、実際、形態学的解析によって、下オリブ核、小脳皮質微小帯域、深部小脳核で閉回路を形成していることが示され、多電極アレイを用いた記録によって、同じアルドラーゼC帯域内のプルキンエ細胞が同期した登上線維応答を示すことが明らかとなっている。しかしながら、これらの機能的神経回路がどの程度の精度で形成されているかは、これまで明らかでない。そこで、単一細胞レベルの分解能をもつ2光子イメージングを用いた活動計測によって、アルドラーゼCとプルキンエ細胞の登上線維応答の関係を調べることを目的として研究を行った。最終的には、運動課題実行中のマウスにおいて、小脳皮質の機能-構造相関を明らかにし、運動制御における小脳ニューロンのはたらきを明らかにすることが目標である。

## 3. 研究の方法

全ての実験は、東京大学医学部動物実験委員

会で実験計画の承認を受けた上で、関連法規に則って行った。遺伝子改変マウスを用いた実験は、東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会の承認を受けた上で、関連法規に則って行った。

顕微鏡下において頭部を固定した状態でマウスに運動課題を行わせるために、リッキングおよびレバー押しを行うと、報酬として水を与える課題装置を用いる。水飲み口に光センサーを設置し、マウスの舌の運動をモニターするとともに、マウスが把持している金属製のレバーの位置を静電センサーにより検出する。課題制御のために、高低2種類の周波数の音刺激を用い、Go/No-Go課題が可能な装置とした。マウスの行動検出と報酬供与、音合図のタイミングはコンピューターで制御することにより、マウスが自動的に運動と報酬の関係を学習することを可能にした。麻酔下においてマウスの頭蓋骨に頭部固定用の金具を設置し、数日の回復期間の後に、飲水制限を開始する。同時に課題装置にて頭部固定に馴化させるとともに、運動課題を行うことで成功報酬が得られることを学習させる。この訓練を1週間~10日程度継続することで学習を完了する。

小脳皮質の帯域構造を可視化するために、帯域構造の分子発現マーカーとして知られている、アルドラーゼCの遺伝子部位に赤色蛍光タンパク質tdTomatoをノックインしたマウスを作成した(aldoc-tdTomatoマウス)。麻酔下のaldoc-tdTomatoマウスにおいて、プルキンエ細胞の活動を可視化するためのカルシウムインジケーターを小脳皮質に注入する。プルキンエ細胞における自発および感覚刺激誘発性のカルシウムシグナルを2光子顕微鏡でイメージングし、アルドラーゼCの発現とプルキンエ細胞活動の関係がどのように対応しているかを観察する。

## 4. 研究成果

### (1) 頭部固定マウスによる運動課題装置

頭部固定下で2光子観察が可能な状態のマウスに、運動課題を行わせる装置を作成した。まず、麻酔下において頭部固定のための金属板を後頭部の頭蓋骨に歯科用セメントで固定した。回復期間の後に、飲水制限を開始し訓練を行った。飲水制限による体重減少は15%で、飼育ケージにおける行動観察においては特に変化は見られず、ストレスを受けている兆候はなかった。非常に簡単な条件（何もしなくても報酬が出る）から始めて、徐々に条件を厳しくすることで、約1週間~10日で音合図と行動、成功報酬の関係を学習できることが分かった。また、課題実行中のマウス小脳において、2光子カルシウムイメージングが可能であることも確認した(図1)。これにより、小脳による随意運動制御と運動

学習の皮質メカニズムを解析することが可能になったと言える。



図1. 随意運動課題実行中のマウス小脳における2光子イメージング

(2)小脳皮質の帯状構造と機能の相関

小脳皮質の機能単位である帯域構造と機能の関係を明らかにするために、小脳帯域を可視化できる遺伝子改変マウスを開発した。小脳皮質に縦縞状に発現する分子であるアルドラーゼCの遺伝子座に赤色蛍光タンパク質 tdTomato をノックインすることで、アルドラーゼCを発現する細胞に特異的に蛍光タンパク質を導入した (aldoc-tdTomato マウス)。作成したマウスの小脳皮質を蛍光顕微鏡で観察したところ、これまで固定脳の免疫染色で報告されているアルドラーゼCの発現パターンと同様の蛍光発現を確認することができた。また、aldoc-tdTomato マウス小脳皮質の2光子励起顕微鏡観察により、蛍光タンパク質がプルキンエ細胞に強く発現していること、アルドラーゼC帯域の境界を1細胞の分解能で明確に同定できることを確認した (図2)。また、バークマングリア細胞における蛍光タンパク質の発現も観察され、過去の免疫染色による観察結果とよく一致していた。これらの観察から、作成したaldoc-tdTomato マウスによって、生きたマウスの小脳皮質でアルドラーゼC帯域を可視化できることが確認された。

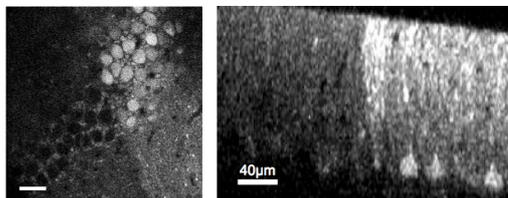


図2. Aldoc-tdTomato マウスの2光子イメージング。プルキンエ細胞層の水平断面(左)と分子層の垂直断面(右)

次に、aldoc-tdTomato マウスの小脳にカルシウム感受性色素を注入してプルキンエ細胞を染色し、アルドラーゼC帯域境界付近におけるプルキンエ細胞集団の活動を計測した。過去の研究から、カルシウムイメージ

ングで得られるシグナルは、登上線維応答を反映していることが明らかとなっており、カルシウムイメージングを行うことで、アルドラーゼC帯域とプルキンエ細胞登上線維応答の関係を単一細胞レベルで解析することが可能である。図3に示す通り、自発カルシウムシグナルの同期性は、アルドラーゼC帯域の境界をまたいで急激に変化することが明らかとなった。すなわち、アルドラーゼC陽性帯域にあるプルキンエ細胞は同じ陽性帯域にある他のプルキンエ細胞との同期性が高く、アルドラーゼC陰性帯域内でも同様であった。一方、アルドラーゼC陽性帯域のプルキンエ細胞は隣のアルドラーゼC陰性帯域のプルキンエ細胞との同期性は低く、その逆についても同様であった。プルキンエ細胞同士のカルシウムシグナルの相関係数を用いた相関行列を作成したところ、登上線維応答の同期性の境界がアルドラーゼC帯域の境界と非常によく一致していた (図4)。すなわち、これまで大まかにはその相関が示唆されていた、アルドラーゼC帯域と機能的微小帯域が、極めて高い精度で形成されているということが明らかとなった。

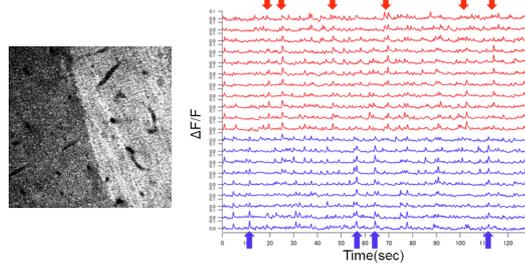


図3. Aldoc-tdTomato マウスにおけるプルキンエ細胞のカルシウムイメージング。アルドラーゼC帯域境界付近の分子層(左)で、プルキンエ細胞樹状突起のカルシウムシグナルを観察した(右)。赤:アルドラーゼC陽性細胞、青:アルドラーゼC陰性細胞のシグナル変化。矢印で示した箇所はそれぞれの帯域内で同期性が高い反応を示す。

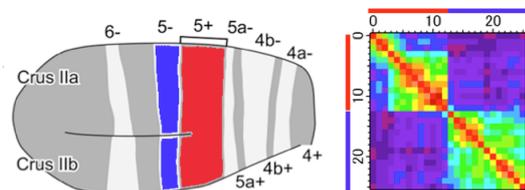


図4. 小脳半球第2脚におけるアルドラーゼC帯域(左)と境界付近におけるカルシウムシグナルの相関行列の一例(右)。同じ帯域内の細胞同士は同期性が高く、同期性の境界がアルドラーゼC帯域の境界と1細胞レベルで一致している。

この結果は、登上線維の投射パターンが極めて精緻に形成されていることを示しており、今後、運動制御におけるこれらの精密な回路の役割の解明が待たれる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- (1) Kano, M., Nakayama, H., Hashimoto, K., Kitamura, K., Sakimura, K. & Watanabe, M. Calcium-dependent regulation of climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Physiol.* in press. 査読有
- (2) Hira, R., Ohkubo, F., Ozawa, K., Isomura, Y., Kitamura, K., Kano, M., Kasai, H. & Matsuzaki, M. Spatiotemporal Dynamics of Functional Clusters of Neurons in the Mouse Motor Cortex during a Voluntary Movement. *J. Neurosci.* 33, 1377-1390 (2013). 査読有
- (3) Kitamura, K. & Kano, M. Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. *Neural Networks* published online (2012). 査読有
- (4) Nakayama, H., Miyazaki, T., Kitamura, K., Hashimoto, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Sakimura, K., Watanabe, M. & Kano, M. GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384-396 (2012). 査読有
- (5) Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. Locally synchronized synaptic inputs. *Science* 335, 353-356 (2012). 査読有
- (6) 喜多村和郎, 橋本浩一, 狩野方伸. 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 (2012). 査読無
- (7) 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). 査読有
- (8) Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki, M., Shin, H.-S., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M. Postsynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2447-2457 (2011). 査読有
- (9) Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M. & Kasai, H. In vivo

two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Physiol.* 589, 2447-2457 (2011). 査読有

[学会発表] (計21件)

- (1) 喜多村和郎、狩野方伸. マウスバレル皮質における感覚シナプス入力の可視化. 第90回日本生理学会大会 2013年3月27日~29日. 東京
- (2) 堤新一郎、多田真弓、崎村建司、喜多村和郎、狩野方伸. マウス小脳における登上線維応答の同期性とAldolaseC発現パターンとの関連. 第90回日本生理学会大会 2013年3月27日~29日. 東京
- (3) Jean-Marc Good, Kazuo Kitamura, Kenji Sakimura, Masanobu Kano. Climbing fiber network refinement and desynchronization of Purkinje cell population activity during postnatal cerebellar development. 第90回日本生理学会大会 2013年3月27日~29日. 東京
- (4) T. KAWASHIMA, K. KITAMURA, K. OHKI, K. SUZUKI, M. NONAKA, S. KAMIJO, S. TAKEMOTO-KIMURA, M. KANO, H. OKUNO, H. BITO. Visualization of an active ensemble of cortical neurons in vivo using a novel activity-dependent promoter E-SARE. *Neuroscience 2012* 2012年10月13日~17日. New Orleans, USA.
- (5) Jean-Marc Good, Kazuo Kitamura, Kenji Sakimura, Masanobu Kano. Postnatal climbing fiber synapse remodeling desynchronizes population activity of Purkinje cells in developing cerebellum. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日. 名古屋
- (6) 川島尚之、喜多村和郎、大木研一、鈴木敢三、野中美応、上條諭志、竹本さやか、狩野方伸、奥野浩行、尾藤晴彦. 新規活動依存的プロモーターE-SAREを用いた、大脳皮質における機能的回路の同定. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日. 名古屋
- (7) Kazuo Kitamura, Yuji Ikegaya, Masanobu Kano. Heterogeneous organization of individual synaptic inputs in the mouse barrel cortex. *FENS Forum 2012* 2012年7月14日~18日. Barcelona, Spain.
- (8) 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. FENS Forum 2012 2012年7月14日～18日. Barcelona, Spain.
- (9) 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 2012年7月5日～6日. 名古屋
  - (10) 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～」2012年6月14日～15日. 岡崎
  - (11) Kazuo Kitamura. Two-photon imaging of neuronal population activities in cerebellar cortex. 第34回分子生物学会年会 2011年12月13日～16日. 横浜
  - (12) Kazuo Kitamura. Heterogeneous organization of sensory synaptic inputs in the mouse barrel cortex. 生理研国際研究集会 2011年12月8日～9日. 岡崎
  - (13) Miki Hashizume, Kazuo Kitamura, Kenji Sakimura and Masanobu Kano. Enhanced synchrony of climbing fiber-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in cerebellar Purkinje cells caused by elevated synchronous activity of inferior olivary neurons in GluR $\delta$ 2 (GluR $\delta$ 2) knockout mouse. Neuro2011 2011年9月14日～17日. 横浜
  - (14) Kazuo Kitamura. Two-photon imaging of Purkinje cell dendritic activity in vivo. 8<sup>th</sup> IBRO World Congress 2011年7月14日～18日. Florence, Italy.
  - (15) K. Kitamura & M. Hausser. Dendritic activities of cerebellar Purkinje cell in vivo. 第88回日本生理学大会 2011年3月28日. 誌上開催 (震災のため)
  - (16) 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 2010年9月9日～10日. 岡崎
  - (17) 橋本浩一、辻田実加、喜多村和郎、宮崎太輔、山崎真弥、Hee-Sup Shin、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸. 登上線維の発達過程における P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルの役割. Neuro2010 2010年9月2日～4日. 神戸
  - (18) 橋爪幹、喜多村和郎、崎村建司、狩野方伸. GluR $\delta$ 2 (GluR $\delta$ 2) 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. Neuro2010 2010年9月2日～4日. 神戸
  - (19) K. Kitamura, M. Hausser & M. Kano. Simultaneous two-photon calcium imaging and patch-clamp recordings in vivo. Jacques Monod Conference

“Imaging brain circuits in health and disease” 2010年6月30日～7月4日. Roscoff, France.

- (20) 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 2010年5月22日～23日. 大津
- (21) 橋本浩一、辻田実加、宮崎太輔、山崎真弥、喜多村和郎、Hee-Sup Shin、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸. 小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達における P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルの役割. 第87回日本生理学大会 2010年5月19日～21日. 盛岡

〔図書〕 (計3件)

- (1) 喜多村和郎. in vivo イメージング 第8章-3, 脳神経科学イラストレイテッド, 羊土社 (2013)
- (2) Kazuo Kitamura. Two-photon targeted patch-clamp recordings in vivo. Chapter 12, Patch Clamp Techniques (Y. Okada ed.), Springer (2012).
- (3) 喜多村和郎. in vivo イメージングパッチ法, 第12章, 最新パッチクランプ実験技術法, 岡田泰伸 編, 吉岡書店 (2013).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA KAZUO)  
東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 60423159

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし