

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300148

研究課題名(和文) 大脳領野間機能的シナプス結合の系統的マッピングと領野間シナプス可塑性の研究

研究課題名(英文) Systematic functional mapping of synaptic connections between cerebral cortical areas

研究代表者

松崎 政紀 (Matsuzaki, Masanori)

基礎生物学研究所・光脳回路研究部門・教授

研究者番号：50353438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：高次運動野(M2)と一次運動野(M1)の間での機能的・解剖学的シナプス結合様式を系統的に調べた。ChR2光刺激法と電気記録を組み合わせることで、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ーの実験においてこの機能結合層非対称性は支持された。またアデノ随伴ウイルスを用いてGCaMPを広域の大脳皮質の神経細胞に発現させ、それを広範囲に2光子イメージングする実験系を覚醒マウスにおいて確立した。ChR2の光刺激時間を長くすることで複雑運動の大脳皮質における表現様式を系統的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We used an in vivo Channelrhodopsin-2 (ChR2) photostimulation method to systematically trace the functional connections between the mouse rostral forelimb area (RFA) and the caudal forelimb area (CFA). Simultaneous electrical recordings were utilized to detect spiking activities induced by synaptic inputs originating from photostimulated areas. This method, in combination with anatomical tracing, demonstrated that the RFA receives strong functional projections from layer 2/3 and/or layer 5a, but not from layer 5b, of the CFA. Further, the CFA receives strong projections from layer 5b neurons of the RFA. Next, we investigated complex movements induced by long-duration ChR2 photostimulation over a broad cortical area of awake mice. Many complex movements including forepaw-to-mouth and locomotion-like movements were mapped in several functional modules in the cerebral cortex. In addition, we developed a method of two-photon calcium imaging in a broad cortical area.

研究分野：神経科学

キーワード：脳・神経 高性能レーザー 運動野 大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

大脳においては局所的な領野内における情報処理だけではなく、例えば、その情報を低次領野から高次領野へのフィードフォワード投射によって、また高次領野から低次領野へのフィードバック投射によって、大脳全体に伝達している。ある領野から別の領野にどのように信頼性高く情報を伝えるのかという問題を理解するための方法として、トレーサー染色による解剖学的投射先同定法は投射様式の骨格を提供するが、その機能性について定量的に議論することが難しい。また、経頭蓋骨磁気刺激法 (TMS) と機能的 MRI を組み合わせた刺激領野からの投射領野の機能的同定法は強力な方法であるが、細胞レベルでの空間解像度を持たず、また刺激された領野でどのような細胞が活性化されたのか不明である。刺激した領野での細胞も同定しつつ、その投射領域と投射細胞を同定することを系統的に行うためには、刺激部位を系統的に走査することが必要である。

2. 研究の目的

大脳においては局所領域内での神経活動だけではなく、複数の領野にわたって信号を受け渡しし、多数の神経細胞が協調的にかつ持続的に活動している。そこでげっ歯類において、光刺激マッピング法と広域神経活動光計測を組み合わせることで、大脳領野間の機能的シナプス結合を系統的に明らかにし、高次・低次領野間の結合様式を解明し、異感覚情報の統合領野を同定するとともに、領野間シナプス結合様式と可塑性の性質を明らかにすることを目的とする。

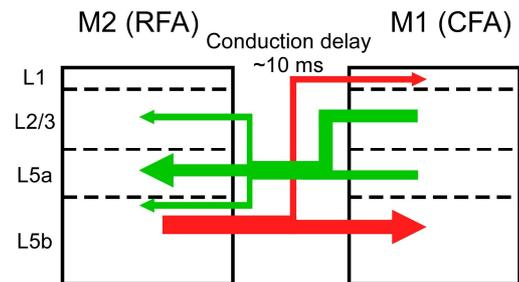
3. 研究の方法

ChR2 遺伝子導入マウスを用いて、広範囲の大脳領域に対して光刺激マッピングを行う。同時に膜電位色素蛍光高速 CCD イメージングを行って光刺激によって反応する領域を見出し、刺激した領域と反応した領域との相関を系統的に調べる。次に光刺激と反応領域での 2 光子カルシウムイメージングを同時に行う。さらに光刺激の高頻度刺激、またはシナプス入力領域と出力領域でそれぞれ光刺激を繰り返すことで、出力領域での反応性が変化するかどうかを調べる。

4. 研究成果

運動情報表現の反響回路として、高次運動野(M2)と第一次運動野(M1)を結ぶ回路が候補として上げられることから、これらの領野間の結合を機能的、解剖学的に調べた。まず、5 層(L5)の錐体細胞で強く ChR2 を発現している遺伝子組み換えマウスを用いて大脳皮質に対して光刺激マッピングを行い、同時に M1 または M2 で電気記録を行った。その結果、M2 の光刺激で M1 でのシナプス入力が見出されたが、逆では見出されなかった。次にアデノ随伴ウイルス (AAV)-ChR2 を M1 または M2 の全層に発現さ

せ、これを光刺激し、同時に電気計測を行った。その結果、M2 から M1 だけでなく、M1 から M2 のシナプス入力も検出された。光刺激して ChR2 発現細胞が活動してから、異なった領野で電気反応が取れるまで約 10 ミリ秒かかった。従って、M2 と M1 間の伝達遅延時間は比較的長いことがわかった。次に逆行性蛍光トレーサーと順行性蛍光トレーサーを M1 または M2 に注入し、そこに投射している細胞体と投射先の軸索を M1 と M2 において計測した。その結果、M1 の 2/3 層(L2/3)と 5a 層(L5a)から M2 の L2/3、L5a、5b 層(L5b)へ強い入力がある一方で、M2 の L5b から M1 の 1 層(L1)と L5b へ強い入力があることがわかった(下図)。このことは M2 と M1 の



間の層結合が非対称であり、高次感覚野と低次感覚野の結合様式の類似性から考えると、M2 が M1 よりも高い階層性にあることが示唆された。この結果は Hira et al., Front. Neural Circuits (2013) として発表した。

CCDカメラで低解像度の領域マッピングを行なう予定であったが、単一細胞レベルでの高解像度反応を見ることができると2光子イメージングによるカルシウムイメージングが広範囲でも可能であることが判明したため、この実験系を優先的に構築した。研究分担者が作製した、カルシウム蛍光タンパク質 (GECI) をコードする AAV の大脳皮質 L2/3 への導入や GECI 遺伝子組み換えマウスを用いることによって、広域にわたって GECI を発現させることができるようになった。さらに遺伝子導入法の工夫や顕微鏡の改良によって、1 mm にわたる大脳皮質の細胞活動を同時に 2 光子カルシウムイメージングすることを可能とした。このことで異感覚情報を大脳全体のどこで処理しているかを系統的に明らかにするための実験系を確立できた。

AAV によって GECI を大脳皮質に導入し、M1 の GECI 発現細胞から対側 M1、M2、または頭頂葉へ投射する軸索活動を、前肢レバー操作運動課題遂行中に 2 光子イメージングすることに成功し、前肢運動に関連する活動を見出した。この際に、各種 GECI を試み、最適な種類と遺伝子導入方法を確立した。上に述べた M2 から M1 への投射軸索においても前肢運動関連活動を見出した。

運動課題遂行中のマウスの大脳皮質で広範囲の 2 光子カルシウムイメージングを行うと、様々な領域で運動関連活動が計測された。しかし皮質部位によって、レバー運動における

異なる運動（例えば、掴む、押す、引く、延ばす、姿勢など）の関連性が大きく異なる可能性があり、例えばある皮質領域の細胞活動が他のある領域の活動より早いからといって、運動の準備により関わるとは言えない。従ってまず、大脳皮質全体において、どのようにレバー操作のような複雑な運動が表現されているかを明らかにするべきである、と考えた。そこで、覚醒下のChR2遺伝子組換えマウスの大脳皮質に対して、長期間（500ミリ秒）光刺激を行うことで、単なる前肢の動きではない複雑運動を大脳皮質全体にマッピングすることを試みた。その結果、リーチング領域とリズム運動が大脳運動野の別々の領域で誘発されることがわかった。特にリーチング領域はM2と定義される領域のより側方側にあった。光刺激の頻度や強度を変化させることで、それぞれの領域での運動誘発の最適な細胞活動の周波数が異なること、運動速度とリズム速度は異なっており、それぞれ固有の値を持つことを見出した。さらにそれぞれの領野間では強い興奮性のシナプス結合は無いこと、むしろ領野間では抑制性のシナプス結合関係をもつことを見出した。

複雑運動には動物行動学的所作も含まれるがこれらを誘発する大脳皮質も系統的にマッピングすることに成功した。その結果、マウスの周囲の状況に依存して、誘導される行動も変わりうるということがわかった。これらの結果から、大脳皮質の各領域はある運動プリミティブの生成に重要な役割を持っている一方で、大脳皮質は新たな運動を誘発するために環境に素早く適応できる回路を内在させて空間的に最適の表現様式を取っていることが示唆された。

今後は様々な運動と広範囲での細胞イメージングを組み合わせることで、個々の運動要素と個々の細胞活動との対応を取りその関連性を明らかにしたうえで、領野間のシナプス結合やシナプス可塑性によってどのように新しい領野間の結合と新しい運動が獲得されるか、複数の感覚情報によって運動が起こる場合それが大脳のどこで統合されるかを、本研究によって確立された系統的イメージングと光刺激法によって明らかにしていく予定である。

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 12 件）

Hira R., Ohkubo F., Masamizu Y., Ohkura M., Nakai J., Okada T., and Matsuzaki M.
Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. *Nature Communications* 5, 5551, 2014.

査読有 DOI: 10.1038/ncomms6551.
Masamizu Y., Tanaka Y.R., Hira R., Ohkubo F., Kitamura K., Isomura Y., Okada T., and Matsuzaki M.

Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nature Neuroscience* 17, 987-994, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/nn.3739.

Asrican B., Augustine G.J., Berglund K., Chen S., Chow N., Deisseroth K., Feng G., Gloss B., Hira R., Hoffmann C., Kasai H., Katarya M., Kim J., Kudolo J., Lee L., Lo S., Mancuso J., Matsuzaki M., Nakajima R., Qui L., Tan G., Tang Y., Ting J.T., Tsuda S., Wen L., Zhang X, and Zhao S.

Next-generation transgenic mice for optogenetic analysis of neural circuits. *Frontiers in Neural Circuits* 7, 160, 2013. 査読有
DOI: 10.3389/fncir.2013.00160.

Hayama T., Noguchi J., Watanabe S., Takahashi N., Hayashi-Takagi A., Ellis-Davies G.C.R., Matsuzaki M., and Kasai H.

GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nature Neuroscience* 16, 1409-1416, 2013. 査読有
DOI: 10.1038/nn.3496.

Hira R., Ohkubo F., Tanaka Y.R., Masamizu Y., Augustine G.J., Kasai H., and Matsuzaki M.

In vivo optogenetic tracing of functional corticocortical connections between motor forelimb areas. *Frontiers in Neural Circuits* 7, 55, 2013. 査読有
DOI: 10.3389/fncir.2013.00055.

Hira R., Ohkubo F., Ozawa K., Isomura Y., Kitamura K., Kano M., Kasai H., and Matsuzaki M.
Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. *Journal of Neuroscience* 33, 1377-1390 2013. 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2550-12.2013.

Kimura R., Saiki A., Fujiwara-Tsukamoto Y., Ohkubo F., Kitamura K., Matsuzaki M., Sakai Y. and Isomura Y.

Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *Journal of Neurophysiology* 108, 1781-92, 2012. 査読有

DOI: 10.1152/jn.00356.2012.
Ako R., Wakimoto M., Ebisu H., Tanno K., Hira R., Kasai H., Matsuzaki M. and Kawasaki H.
Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain.
Molecular and Cellular Neuroscience 48, 246-257, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.mcn.2011.08.005.
Kanemoto Y., Matsuzaki M., Morita S., Hayama T., Noguchi J., Senda N., Momotake A., Arai T., and Kasai H.
Spatial distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca²⁺ transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons.
PLoS One 6. e22652, 2011. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0022652.
Matsuzaki M. and Kasai H.
Two-Photon Uncaging Microscopy. Cold Spring Harbor Protocols, pdb.prot5620, 2011. 査読有
DOI: 10.1101/pdb.top111.
Noguchi J., Nagaoka A., Watanabe S., Ellis-Davies G.C.R., Kitamura K., Kano M., Matsuzaki M. and Kasai H.
In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. Journal of Physiology 589, 2447-2457, 2011. 査読有
DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207100.
Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C.R., Kanemoto Y. and Kasai H.
Simultaneous two-photon activation of presynaptic cells and calcium imaging in postsynaptic dendritic spines. Neural Systems & Circuits 1. 2, 2011. 査読有 DOI: 10.1186/2042-1001-1-2.

[学会発表](計 13 件)

松崎政紀 Dynamics of cortical ensembles during motor learning and neuronal operant conditioning. MDFLI 国際シンポジウム 2015.1.26 国立京都国際会館(京都府京都市)
松崎政紀 Two-photon imaging of dynamics of cortical ensembles during motor learning. 3rd Bioscience and Biotechnology International Symposium 2015.1.14 東京工業大学(神奈川県横浜市)
松崎政紀 運動課題学習中の大脳運動野神経活動のダイナミクス 第 37 回日本神経科学大会 2014.9.12 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松崎政紀 随意運動中のマウス大脳運動野での細胞活動の時空間ダイナミクス 第 91 回日本生理学会大会 2014.3.17 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
松崎政紀 Optogenetic mapping of synaptic connections and motor cortical areas in vivo. Optogenetics2013 2013.9.26 慶應大学(東京都港区)
松崎政紀 Spatial and temporal dynamics of function clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. Satellite Symposium of Neuroscience2013 2013.6.19 稲盛財団記念館(京都府京都市)
松崎政紀 2 光子イメージングと光操作 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.13 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
松崎政紀 随意運動中のマウス運動野 2 光子イメージング 第 50 回日本生物物理学会 2012.9.23 名古屋大学(愛知県名古屋市) 平理一郎 Spatial and temporal structure of cortical microcircuit activity for generating voluntary movement. The 8th FENS Forum of Neuroscience 2012.7.14-2012.7.18 International Convention Center(スペイン, バルセロナ)
松崎政紀 イメージングと光操作による大脳運動野神経活動の研究 日本薬学会第 132 年会 2012.3.30 北海道大学(北海道札幌市)
松崎政紀 Spatial and temporal structure of cortical microcircuit activity for generating voluntary movement. 1st International Symposium/ 59th NIBB Conference 2012.3.11 OCC(愛知県岡崎市)
松崎政紀 Imaging and manipulating neuronal activity in cortical circuits 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.13 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
松崎政紀 Neural functions revealed by two-photon imaging and stimulation methods 12th RIES-Hokudai International Symposium 2011.11.22 シャトレゼガトーキングダムサッポロ(北海道札幌市)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

www.nibb.ac.jp/circuits/

6．研究組織

(1)研究代表者

松崎 政紀 (Matsuzaki, Masanori)
基礎生物学研究所・光脳回路研究部門
教授
研究者番号：50353438

(2)研究分担者

岡田 尚巳 (Okada, Takashi)
日本医科大学・大学院医学研究科
教授
研究者番号：00326828