

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 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800071

研究課題名（和文）最新の光技術を用いた運動学習過程での大脳細胞活動遷移と可塑性誘導機構の連関の解明

研究課題名（英文）Revelation of linkage between the change of cortical neural activity and the induction mechanism of plasticity during motor learning with the newest optical methods

研究代表者

正水 芳人（MASAMIZU YOSHITO）

基礎生物学研究所・光脳回路研究部門・特別協力研究員

研究者番号：90608530

研究成果の概要（和文）：脳表からの深さでマウスの一次運動野第2/3層および第5層を同定し、自発的なレバー引き課題を行っている際に、各層での神経細胞の2光子カルシウムイメージングを数週間、行った。運動学習によって、第2/3層よりも第5層の方が、課題実行時、発火するようになる神経細胞が多いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：I performed two-photon calcium imaging in L2/3 and L5 of the mouse primary motor cortex during a few weeks of a self-initiated lever-pull task, identifying L2/3 and L5 based on the cortical depth of the imaging plane. During motor learning, increasing firing rate of neurons was frequently observed in L5 than L2/3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：カルシウムイメージング、2光子励起顕微鏡、運動学習

1. 研究開始当初の背景

運動技能は、繰り返し練習して身につけた動作で、運動学習が重要な役割を果たす。学習は段階的に進行し、学習初期は動きが未熟でこちないが、練習により行動の正確さや

速度が増し、学習後期に運動は自動化される。運動を行う際に、大脳基底核、小脳、高次運動野からの運動情報は、大脳新皮質の一次運動野に入力し統合され、その情報は一部の一次運動野第5層の神経細胞が脊髄に出力し、運動が実行される。

大脳新皮質は、哺乳類のみに存在する大脳の表面を覆う領域で、多くの認知機能に関わる。6層構造からなる大脳新皮質は、各層の神経細胞が異なる入出力を持ち、記憶や学習が関与する認知課題を行う際には、様々な領域とネットワークを形成し、情報処理を行っている。これまでの研究では、学習過程で、同一の神経細胞での神経活動が経時的にどのように変化するのか、課題関連神経細胞の空間的分布がどのように変化するのが明らかにされていなかった。また、大脳新皮質各層での神経活動の時間的・空間的分布の違いも着目されていなかった。

2. 研究の目的

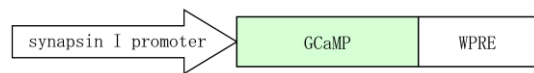
運動学習過程で、マウスの一次運動野の同一の神経細胞での神経活動を経時的に計測し、一次運動野第2/3層および第5層での随意運動学習過程における細胞活動の時間的・空間的分布を明らかにし、運動学習メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

マウスの一次運動野の同一の神経細胞での神経活動を数週間、経時的に計測するために、アデノ随伴ウイルス (AAV) で、GECI (genetically encoded calcium indicator) の蛍光カルシウムセンサー (GCaMP) を一次運動野に遺伝子導入した。GCaMP はカルシウムイオンと結合すると構造が変化し、緑色蛍光を発し、神経細胞に遺伝子導入した際には、蛍光シグナルの変化率は神経活動と強い相関関係にあることが知られている。

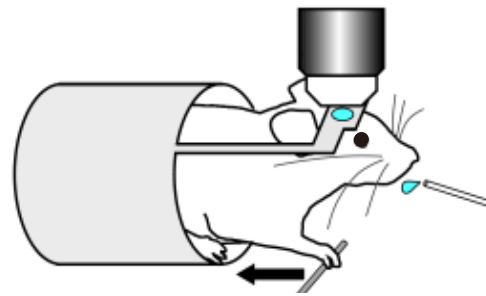
遺伝子導入用のベクターとして、GCaMP3 cDNA を GCaMP3 ベクター (Dr. L. L. Looger から譲渡, Howard Hughes Medical Institute, Addgene plasmid 22692) から取り出し、pAAV

(Dr. K. Deisseroth から譲渡, Stanford University, Addgene plasmid 26973) に挿入した。作成したベクターには、神経細胞特異的に発現する synapsin I プロモーターおよび WPRE 配列 (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) が含まれている (図1)。WPRE 配列は、Woodchuck hepatitis virus 由来の配列で mRNA の安定性を高める。このベクターを使用したアデノ随伴ウイルスの合成および精製に関しては、研究協力者の岡田 尚巳 室長 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部) に行っていた。



(図1) GCaMP 遺伝子導入用のベクター

一次運動野に GCaMP を遺伝子導入したマウスを用いて、2光子励起顕微鏡下、報酬をともなう随意運動課題実行中に第2/3層および第5層の単一細胞レベルで多細胞の神経活動をリアルタイムに計測した (図2)。



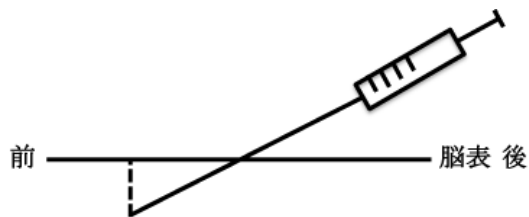
(図2) 報酬をともなう随意運動課題装置

頭部に固定具を取り付けることによって、マウスの頭は動かない。一次運動野上の頭蓋骨を取り除き、代わりに取り付けられた観察用の透明なカバーガラス窓に対物レンズを近づけ、2光子励起顕微鏡を用いて、課題中、単一細胞レベルで多細胞の神経細胞の活動をリアルタイムに計測する。なお右前肢のレバーは可動式で一定時間以上レバーを引くと

ノズルから報酬の水が出る。

なお2光子励起顕微鏡では、1つの蛍光分子が2つの光子を同時に吸収して励起状態となる。その励起状態からエネルギーの低い安定した状態に戻る際に、エネルギーが蛍光として放出される。近赤外光を励起に用いるため、脳深部の観察が可能となる。またAAVによる遺伝子導入では、導入遺伝子はほとんど染色体DNAには組み込まれないが、神経細胞などの非分裂細胞では、1回の遺伝子導入で、1年以上の長期的な遺伝子発現が得られることが知られている。

一次運動野第5層をGCaMPでカルシウムイメージングする際には、ハミルトンシリンジを用いて、第5層に斜めにGCaMPのAAVウイルス液を注入することによって、第5層の神経細胞にGCaMPを発現させた(図3)。



(図3) 大脳新皮質の一次運動野第5層へのGCaMPの遺伝子導入

4. 研究成果

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)で、GECI (genetically encoded calcium indicator)の蛍光カルシウムセンサー(GCaMP)をマウスの大脳新皮質一次運動野に遺伝子導入し、報酬をとまなう随意運動課題装置を用いて、2光子励起顕微鏡下、一次運動野の同一の神経細胞での神経活動を数週間、経時的に計測する系を確立した。

(2) ハミルトンシリンジを用いて、マウスの大脳新皮質一次運動野に斜めにGCaMPの

AAVウイルス液を注入することによって、深層第5層の神経細胞にGCaMPを発現させ、第5層の神経細胞の神経活動を経時的に計測する系を確立した。

(3) 計測によって得られた一次運動野の浅層第2/3層および深層第5層の神経細胞の活動を解析し、運動学習によって、第2/3層よりも第5層の神経細胞の方が、運動課題実行時、発火頻度が上昇する(課題関連細胞になる)ことを明らかにした。

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1件)

Riichiro Hira, Fuki Ohkubo, Yasuhiro R. Tanaka, Yoshito Masamizu, George J. Augustine, Haruo Kasai, and Masanori Matsuzaki.

In vivo optogenetic tracing of functional corticocortical connections between motor forelimb areas.

Frontiers in Neural Circuits. 査読有、7巻、2013、1-10

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/circuits/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正水 芳人 (MASAMIZU YOSHITO)

基礎生物学研究所・光脳回路研究部門・特別協力研究員

研究者番号：90608530

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：