

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22115005

研究課題名（和文）大脳メゾ回路におけるシナプス情報統合様式の解析

研究課題名（英文）Synaptic integration in mesoscopic circuits in the cerebral cortex

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） 42,600,000円

研究成果の概要（和文）：頭部固定マウスにおいてレバー引き運動オペラント課題を開発し、これをマウスが遂行中に大脳運動野2/3層の2光子カルシウムイメージングに成功した。次に、この課題の学習中2週間にわたって、運動野の浅層から深層（脳表から約500 μm ）に至るまで、延べ八千個の神経細胞の活動を計測することに世界で初めて成功した。その結果、学習期間において動物が運動課題に熟達する中期から後期にかけて、学習した運動の記憶が運動野5a層、特に大脳基底核へ信号を送る細胞の新たな活動パターンとして保持されることがわかった。さらに運動野1層樹状突起やそこに入力する軸索の運動課題実行中における活動を計測可能とした。

研究成果の概要（英文）：We conducted two-photon calcium imaging of mouse layer 2/3 motor cortex during a self-initiated lever-pull task. In the imaging session after 8-9-day training, head-restrained mice had to pull a lever for approximately 600 ms to receive a water drop. We found two types of task-related cells and clarified their spatial distribution. Next, we conducted two-photon calcium imaging in the motor cortex during 14 training sessions of the self-initiated lever-pull task. In layer 2/3, the accuracy of neuronal ensemble prediction of lever trajectory remained unchanged globally during the training period. However, in layer 5a, the ensemble prediction accuracy steadily improved and one-third of neurons, including subcortical-projecting neurons, evolved to contribute substantially to ensemble prediction in the late stage of learning. Furthermore, we performed two-photon imaging of dendritic activity and axonal activity in layer 1 during the mouse task performance.

研究分野：神経科学

キーワード：脳・神経 高性能レーザー 大脳皮質 神経細胞 運動野

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の樹状突起構造の多様性は神経細胞の機能の多様性を意味し、単一細胞に入力するシナプス情報の統合に決定的な役割を果たすと考えられている。過去 20 年間の研究によって、樹状突起におけるイオンチャネルの分子実体などの理解が進んできたが、樹状突起構造の複雑性と、そこに入力している細胞もまた多様であるがゆえに、その情報処理としての機能を理解することは難しい。実際の樹状突起の情報演算機構を理解するためには、動物の行動中に脳内の樹状突起活動を観察するだけでなく、その活動を人工的に制御して、回路活動・行動の変化を予測検証できる新しい実験・理論的方法論が必要である。

2. 研究の目的

個々の神経細胞は全長で数ミリメートルにも及び複雑な樹状突起構造を持つ。その中でも、大脳皮質 5 層錐体細胞が脳表近く 1 層まで伸ばす樹状突起部位は、高次領野および視床からの入力を受けること、運動学習によって運動野 1 層でのシナプス生成・消失が起こること、から、この部位でのシナプス情報統合の重要性が想定されている。しかし、その実態、機能、意義については不明である。そこで本研究では、大脳皮質運動野第 1 層樹状突起・シナプスを異なったメゾ回路からの情報が統合される基盤構造と位置づけ、この実態と演算機能、運動野メゾ回路最終出力としての個体運動に対する寄与を、主に生理学的手法を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

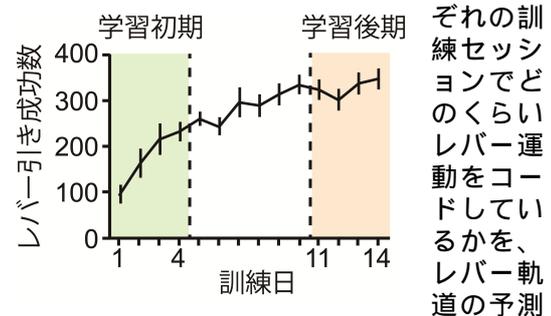
まず、頭部固定マウスにおける前肢レバー引き運動課題を構築し、マウスが本課題を遂行しているときの大脳皮質運動野の神経細胞(体)活動を 2 光子カルシウム蛍光イメージングによって計測する実験系を開発する。次に個々の細胞(体)の蛍光変化から細胞活動を抽出するための画像処理法や画像解析法を確立する。これらを確立した後に、細胞体からだけではなく、微細構造である樹状突起やそこに入力する軸索の活動の 2 光子カルシウムイメージングを実現するために、顕微鏡の改良や蛍光タンパク質発現法の改良を行う。運動課題中の微細構造イメージングは、細胞体よりも体動による揺れ補正が難しいため、揺れ補正法をさらに改良する。これらを達成した上で、運動課題実行中の樹状突起、軸索活動を明らかにする。頭蓋骨計測窓の改良や遺伝子発現法の改良、光学系の改良を通して、運動課題を学習している長期(2週間)にわたって細胞活動の変化や樹状突起スパインの生成過程を明らかにできるようにする。さらに、これらの活動が運動と関連しているかどうかを明らかにするため、一部の細胞に、光活性化型カチオンチャネル、ChR2、や光活性化型プロトンポンプ、ArchT を発現

させ、それぞれ選択的に光刺激する実験系を確立する。

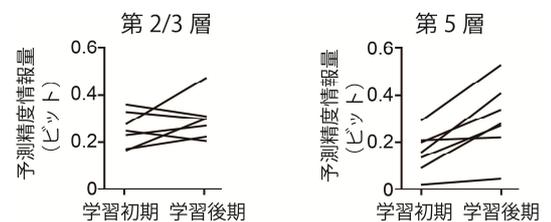
4. 研究成果

運動課題遂行中のマウスの大脳運動野の細胞活動をイメージングするため、頭部固定マウスにおける右前肢レバー引き内発性運動課題(右前肢でレバーを 600-700 ミリ秒引き続けると水が報酬として与えられる課題)を開発した。次に、マウスにこの課題を約 10 日練習させてレバー引きが上達してから、運動野にカルシウム感受性蛍光小分子化合物を注入し、課題遂行中に 2 光子イメージングを行い、運動野 2/3 層課題関連細胞を同定し、その空間配置の特性を明らかにした(Hira et al., 2013a)。この際、体動による画像揺れを自動的に補正する画像処理法を構築した。

次に、レバー引き運動課題の訓練 2 週間中の運動野活動の変化を調べるために、カルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP を神経細胞にアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて発現させ、運動野 2/3 層および 5a 層の多細胞 2 光子イメージングを行った。2 週間の学習期間において、マウスはまず初期(1-4 日目)で成功率などのパフォーマンスを大きく向上させ、その後ゆっくりとした向上を示したのち、学習後期(11-14 日目)ではパフォーマンスは一定に達していた(下図; 9 個体平均)。そこで、各細胞および細胞集団がそれ



ぞれの訓練セッションでどのくらいレバー運動をコードしているかを、レバー軌道の予測精度情報量という単一の指標として算出し、その変化を解析した。その結果、予測精度情報量を学習初期と後期で比較すると、2/3 層では集団活動は増減するものの、イメージング領域間で平均すると情報量に変化がなく運動技能の改善とは相関が見られなかったが、5a 層の集団活動は統計有意に上昇し、運動技能の改善と相関が見られた(下図)。単



一細胞活動で見ると、2/3 層では情報量を増加させるグループと減少させるグループが存在したがその割合は同程度であった。一方、5a 層では、約三分の一の細胞群が情報量を上昇させ、学習後期にはアンサンブル活動に大きく寄与するようになることを見出した。さ

らに 5a 層での細胞活動変化が皮質下投射先に依存しているか調べるため、対側線条体投射 (CCS) 細胞または脊髄投射 (CSp) 細胞のみに GCaMP を発現させ、この蛍光変化を学習期間中に計測した。その結果、CCS 細胞、CSp 細胞においても約 1/3 の細胞が運動予測精度情報量を増加させる細胞であることを見出した。さらなる解析によって、2/3 層や CSp 細胞には学習初期にも後期にも、ある運動に参与する細胞 (例えば、ある運動において必ず誘発される感覚に関連する細胞) が一定数存在するのに対し、5a 層錐体細胞および 5a 層の CCS 細胞では、学習した運動を新しく表現する細胞群が新たに形成されることが示唆された (Masamizu et al., 2014)。

CSp 細胞は CCS 細胞とは異なり 1 層まで広く樹状突起を伸ばしており、この細胞の樹状突起に対して視床細胞が強いシナプス入力を与えて学習後の運動を制御している可能性がある。そこで、ChR2 を視床細胞へ AAV を用いて導入し、CSp 細胞を逆行的に蛍光標識した。このマウスから大脳皮質スライス標本を作成し、このスライス標本で CSp 細胞から電気記録を行いながら、光刺激を網羅的に行うと、視床細胞の軸索から CSp 細胞へのシナプス入力部位をマッピングすることができる。その結果、CSp 細胞は視床から 1 層と 3 層、5 層においてシナプス入力を受けていることが判明した。さらにこの入力を実際のマウスの前肢運動に影響を与えられるかを調べるために、視床から運動野に入力する細胞に ChR2 または ArchT を AAV を用いて導入した。この動物の運動皮質に青色レーザーを照射することで前肢運動を誘発することに成功した。さらにレバー運動課題中に ChR2 または ArchT を青色または黄色照射によって光活性化すると、レバー引き運動に変化を与えることが出来た。このことは視床からの入力が脊髄投射細胞の樹状突起に運動関連の情報を与えていることを示唆している。

さらに 1 層における樹状突起活動と 1 層へ入力する視床細胞軸索のイメージングを可能とし、この時の画像揺れを 3 次元動画から再構築する画像処理法を開発した。その結果、レバー引き運動に特異的に関連した (レバー引き時、戻し時など) 樹状突起活動や軸索活動が多数存在することがわかった。このことから樹状突起の情報演算機構を理解するうえで決定的となる実験系を確立することができた。

加えて、運動学習中にこれらの軸索入力を含む 1 層での樹状突起スパイン新生・除去を明らかにするため、毎日のレバー運動学習直後にスパインイメージングをできる実験系を確立した。

これらの実験とその結果の解析を進めることで、樹状突起に入力する活動がどのように樹状突起で演算され、運動出力に変換されるのか、それがどのようなシナプス可塑性を

伴って記憶されるのかについて、今後明らかにしていきたいと考えている。

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 15 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.
Matsuzaki M., Hayama T., Kasai H.

and Ellis-Davies G.C.R.
Two-photon uncaging of γ -aminobutyric acid in intact brain tissue. *Nature Chemical Biology* 6, 255-257, 2010. 査読有
DOI: 10.1038/nchembio.321.
Obi N., Momotake A., Kanemoto Y., Matsuzaki M., Kasai H. and Arai T.
1-Acyl-5-methoxy-8-nitro-1,2-dihydroquinoline: A biologically useful photolabile precursor of carboxylic acids. *Tetrahedron letters* 51. 1642-1647, 2010. 査読有
DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.12.081.
*Kantevari S., *Matsuzaki M., Kanemoto Y., Kasai H. and Ellis-Davies G.C.R.
Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA. *Nature Methods* 7. 123-125, 2010. 査読有
DOI: 10.1038/nmeth.1413.

〔学会発表〕(計 18 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, パルセロナ)
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)
松崎政紀 Imaging and optical
manipulation of neural activity in the
brain.
第 88 回日本生理学会大会 2011.3.28
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
松崎政紀 Neural function revealed by
new methods of chemical biology and
optogenetics.
第 84 回日本薬理学会年会 2011.3.23
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
松崎政紀 Optical methods for
revealing the synaptic function and
structure in the local circuit.
第 33 回日本神経科学大会 2010.9.3
神戸コンベンションセンター (兵庫県神
戸市)
松崎政紀 Optical methods for
revealing the synaptic function and
structure in the local circuit.
The Fifth International Neural
Microcircuitry Conference 2010.6.30
日本科学未来館 (東京江東区)
松崎政紀 Optical methods for
revealing the synaptic function and
structure in the local circuit.
The Fourth International Neural
Microcircuitry Conference 2010.6.25

カヌチャリゾート (沖縄県名護市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 生体動物脳における単一神経細胞での
多重遺伝子発現
発明者: 河崎洋志 松崎政紀 他
権利者: 国立大学法人 東京大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-248940
出願年月日: 2010 年 11 月 5 日
国内外の別: 国内

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