

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18370

研究課題名(和文)2光子多細胞機能イメージングにより解明する一次運動野第6層の神経活動

研究課題名(英文)Two photon calcium imaging of layer 6 neurons in primary motor cortex

研究代表者

田中 康裕(Tanaka, Yasuhiro)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：20533128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大脳新皮質の最深層である第6層は動物個体の運動中に神経活動が記録された例が少なく、その神経活動と動物個体の運動を関連付けることは、大脳皮質研究の喫緊の課題の一つである。我々は、動物の行動課題中に、一次運動野第6層の2光子多細胞機能イメージングを行った。赤色のカルシウム指示タンパク質であるRCaMP1.07を用い、脳表から800マイクロメートルほどの第6層でも安定した記録が可能となった。研究過程で開発した画像取得と揺れ補正の技術を用いた学術論文を発表した。

研究成果の概要(英文)：The functional significance of layer 6, the deepest layer, of the neocortex in animal behaviors is poorly understood because the recordings of neurons in layer 6 was rather limited in behaving animals. We performed two photon calcium imaging of layer 6 in the primary motor cortex of behaving mice. We established stable recordings of multiple single neurons in layer 6 which were located ~800-micrometer deep from the brain surface, by using RCaMP 1.07, a genetically encoded calcium indicator. Throughout this research period, I wrote various scripts for image acquisition and motion correction, which were used in some published papers.

研究分野：大脳皮質機能学

キーワード：6層 大脳皮質 2光子カルシウムイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は哺乳類の知性の源と考えられるが、その計算原理はいまだ明らかでなく、さらなる研究が必要である。大脳新皮質の最深層である第6層は動物個体の運動中に神経活動が記録された例は少なく、その神経活動と動物個体の運動を関連付けることは、大脳皮質研究の喫緊の課題の一つであった。申請者はこれまで、大脳新皮質第6層への局所回路内での入力を明らかにしてきた。さらに局所回路外からの入力などの知見に基づき1次運動野第6層が自発行動課題へ抑制的な役割を果たす可能性に思い至り、その検証を図った。

### 2. 研究の目的

動物の自発的前肢運動課題中に、一次運動野第6層の2光子多細胞機能イメージングを行い、一次運動野第6層神経活動と自発的行動の関係を解明する。特に、行動の抑制が起きるような課題において、その神経活動との関係を明らかにする。大脳皮質6層においては、投射先の異なる2種類の神経細胞、皮質視床投射ニューロンと、皮質間投射ニューロンの存在が知られている。そのため、これらを区別するために逆行性標識物質であるレトロビーズを視床あるいは第1次感覚皮質へ注入することで、これら2種類の細胞を区別することのできる状態で神経活動を観察する。

### 3. 研究の方法

マウスに自発的レバー引き行動を学習させる。レバー引き課題を学習したマウスを頭部固定し、頭蓋の一次運動野直上に作られたガラス窓から2光子顕微鏡で観察した(図1)。神経細胞の活動を可視化するためにカルシウム指示性の蛍光タンパク質を用いた。蛍光タンパク質は、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてニューロンに発現させた。取得した行動データ及び神経活動データは数値計算ソフトであるMATLABを用い、主に申請者自身が書いたスクリプトで解析した。

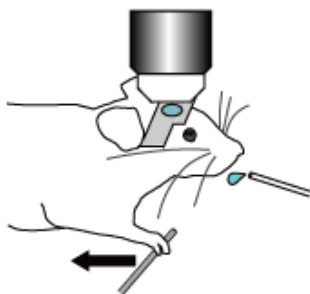


図1: 訓練中のイメージング

### 4. 研究成果

第6層の2光子多細胞機能イメージングを行う際に用いるカルシウム指示性蛍光タンパク質には、赤色蛍光輝度変化により活動電位発生時のカルシウム濃度変化を知ることのできるRCaMP1.07を用いた。

RCaMP1.07は2光子励起波長が1100nm程度と非常に長く大脳新皮質深層でのイメージングが可能である。実際にヒトシナプシンプロモーター制御化で発現させたところ、脳表から800-1000マイクロメートル付近の第6層でも安定した記録が可能となった(図2, 3)。

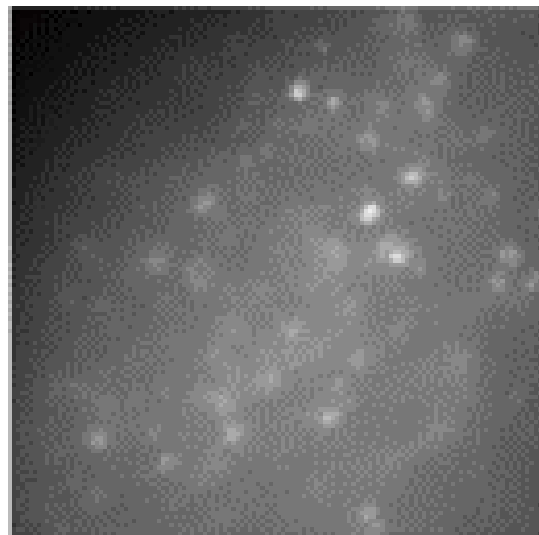


図2: 第6層での2光子カルシウムイメージング(1辺500マイクロメートル)

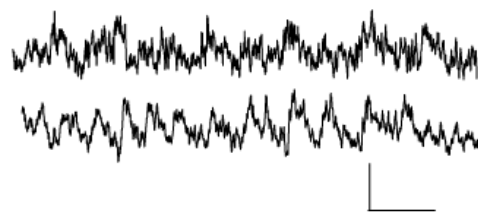


図3: 図2より抽出された代表的な2細胞の神経活動のパターン。スケールバー(縦)50%輝度変化、(横)10秒

また、事前にレトロビーズを注入することにより、投射先依存的な活動を観察することについては、固定脳透明化技術により、カルシウムイメージングを行った細胞について標識の有無を判定することができた。注入されたビーズは軸索より取り込まれ、一次運動野第6層の皮質視床投射ニューロンと皮質間投射ニューロンを標識できる。赤のレトロビーズを用いた場合、RCaMPと色が重なってしまうという問題点があったが、撮影法を工夫することにより、RCaMPと区別してイメージングすることに成功した。

同時並行的に行動課題の開発を行った。自発的運動課題により、6層の神経活動を検索することが目標であるが、行動の抑制との関係を調べていくために、現状の課題では不十分であることが分かってきた。自発的レバー引きにおいては、レバー引き終了後に次のレバー引きを開始するまでの時間を待ち時間と定義して、この待ち時間に応じた報酬量を与えるという課題が考えられる。この場合、マウスは短い待ち時間と長い待ち時間を区別して報酬を選択することが次第に可能となるが、自発的レバー引き課題においては、動物が待っているのか、課題自体を無視しているのか明らかなでないケースもしばしばみられることがわかった。そこで、レバー引き行動よりも単純な舌舐め行動において、キューと待ち時間の存在下で適切なタイミングで舌舐め行動を行うことができるかどうかを検討した。350 msecの待ち時間を設定した場合、訓練を進めるにしたがって、下舐め行動の潜時が400 msecほどに収束していくことが分かり、キューを伴う待ち時間のある行動課題を成立させることができた。

より長い時間の待ち時間を設定した場合の行動課題の詳細と行動時の神経活動については現在解析中である。

本研究を進める過程で、オリンパス顕微鏡で取られた画像を直接数値計算ソフトに取り込むことができるスクリプトを開発し、学術論文に貢献し (Kondo et al., eLife 2017;6:e26839 DOI: 10.7554/eLife.26839; Ebina et al., Nature Communications 9) さらに一般公開した。  
(<https://github.com/YR-T/oir2stdData>)

また、イメージング中の体動などに起因する揺れを粒子フィルタという数値的な手法によって補正する技術を開発した。この技術によって、従来は見過ごされていた撮像平面に垂直な揺れも補正した状態で神経細胞活動を計測することが可能となった。その成果が認められ、平成29年3月コニカミノルタ画像奨励賞を受賞した。  
([https://www.konicaminolta.jp/about/csr/contribution/corporation/research/foundation/past\\_prize.html](https://www.konicaminolta.jp/about/csr/contribution/corporation/research/foundation/past_prize.html))

#### 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 3 件)

Ebina, T., Masamizu, Y., Tanaka, Y.R., Watakabe, A., Hirakawa, R., Hirayama, Y., Hira, R., Terada, S.-I., Koketsu, D., Hikosaka, K., Mizukami, H., Nambu, A.,

Sasaki, E., Yamamori, T., Matsuzaki, M. Two-Photon Imaging of Neuronal Activity in Motor Cortex of Marmosets during Upper-Limb Movement Tasks. Nature Communications 9 (査読有) 2018 doi:10.1038/s41467-018-04286-6.

Kuramoto, Eriko, Haruki Iwai, Atsushi Yamanaka, Sachi Ohno, Haruka Seki, Yasuhiro R. Tanaka, Takahiro Furuta, Hiroyuki Hioki, and Tetsuya Goto. Dorsal and Ventral Parts of Thalamic Nucleus Submedius Project to Different Areas of Rat Orbitofrontal Cortex: A Single Neuron-Tracing Study Using Virus Vectors. Journal of Comparative Neurology 525: 3821-39 (査読有) 2017 doi:10.1002/cne.24306.

Kuramoto, Eriko, Shixiu Pan, Takahiro Furuta, Yasuhiro R. Tanaka, Haruki Iwai, Atsushi Yamanaka, Sachi Ohno, Takeshi Kaneko, Tetsuya Goto, and Hiroyuki Hioki. Individual Mediodorsal Thalamic Neurons Project to Multiple Areas of the Rat Prefrontal Cortex: A Single Neuron-Tracing Study Using Virus Vectors. Journal of Comparative Neurology 525: 166-85 (査読有) 2017 doi:10.1002/cne.24054.

[学会発表](計 5 件)

Tanaka YR, Tanaka YH, Matsuzaki M Temporal dynamics of motor thalamic activities during forelimb movement. MONA2 - Modelling Neural Activity 2016

Tanaka YH, Tanaka YR, Hira R, Kondo M, Terada S, Kawaguchi Y, Matsuzaki M. Thalamocortical dynamics mediate learning and execution of self-initiated movement. The 40rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 2017

Yasuhiro Tanaka. Dynamics of thalamocortical inputs during motor learning.

Computational principles of the nervous system: elucidated from the observations of neural population activity  
2017

田中康裕  
実験神経科学者がデコーディングをやってみた。  
次世代脳冬のシンポジウム「デコーディング脳科学 ~細胞から心まで~」  
2017

田中 康代, 田中 康裕, 近藤 将史, 寺田 晋一郎, 川口 泰雄, 松崎 政紀  
Dynamics of thalamocortical activities during motor execution and learning  
第 95 回日本生理学会大会  
2018

〔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〕

研究室ホームページ  
<http://plaza.umin.ac.jp/~Matsuzaki-Lab/index.html>

リサーチマップ  
<https://researchmap.jp/mani-mani/>

グーグルスカラー個人ページ  
<https://scholar.google.com/citations?user=Gh8s8XYAAAAJ&hl=en>

公開コードレポジトリ  
<https://github.com/YR-T>

平成 28 年度コニカミノルタ画像奨励賞受賞  
(粒子フィルタによる揺れ補正と神経細胞微小構造観察系の最適化で実現する神経細胞入出力の高速機能撮像)  
[https://www.konicaminolta.jp/about/csr/contribution/corporation/research/foundation/past\\_prize.html](https://www.konicaminolta.jp/about/csr/contribution/corporation/research/foundation/past_prize.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 康裕 (TANAKA, Yasuhiro)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20533128

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

田中康代 (TANAKA, Yasuyo)