

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03543

研究課題名（和文）随意運動における小脳機能モジュールの作動原理

研究課題名（英文）Modular organization of cerebellar cortex during voluntary movements

研究代表者

喜多村 和郎（KITAMURA, Kazuo）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60423159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：小脳皮質の特徴的なモジュール構造の生理的意義を明らかにするために、小脳ゾーンを可視化できるマウスにおいて2光子カルシウムイメージングを行った。目標志向行動であるGo/No-go課題を実行中のマウス小脳における登上線維活動を観察したところ、運動の準備や開始、速度など運動情報に加えて、Go/No-goシグナルや報酬など非運動情報も同時に入力していることを明らかにした。また、苔状線維にカルシウムプローブを発現するマウスを用いて、運動中のマウス小脳で運動に同期した苔状線維活動を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳において最も数多くの神経細胞が存在する小脳は、動物の多様な行動の発現や適応に重要な役割を果たすと考えられている。これまで、小脳の運動制御や運動学習のメカニズムは、単純な反射運動や眼球運動をモデルとして研究されてきたが、外部の環境に応じた判断をして適切な行動を行い報酬を得るといった複雑な行動における小脳の役割についてはよくわかっていない。本研究によって、行動に関する様々な情報が各モジュールで並列に処理されていることを示した。この結果は、これまで主に運動機能に着目して研究が進められてきた小脳が、非運動機能に関わる情報も同時に処理し、高度な行動の発現に貢献していることを示している。

研究成果の概要（英文）：To clarify the physiological significance of the characteristic modular structure of the cerebellar cortex, we performed two-photon calcium imaging and observed climbing fiber activity in the cerebellum of mice performing the go/no-go task. We found that the activity of the climbing fibers represents motor information such as preparation, initiation, and speed of movements, and also found that they represent non-motor information such as go/no-go and rewards signals. In addition, using mice expressing calcium sensors in the mossy fibers of the cerebellum, we could successfully observe their activities during motor behavior.

研究分野：神経生理学

キーワード：運動制御 運動学習 2光子イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小脳皮質には、体の前後軸(矢状断)方向に沿った帯状の組織学的および生理学的構造が存在し、「ゾーン」と呼ばれている。また、各ゾーンはマイクロゾーンと呼ばれるサブ構造から成り、各マイクロゾーンのプルキンエ細胞と結合する小脳核と下オリーブ核を含む神経回路が、小脳の最小機能単位(マイクロコンプレックス)であると考えられている。我々は、これまで小脳の感覚運動情報処理におけるゾーンの機能を明らかにするために、生きたマウスでゾーンを蛍光で可視化できるマウス(Aldoc-tdTomato マウス)の作製に成功し、個体によらず組織学的なゾーンの境界と生理学的ゾーン構造が1細胞レベルで一致していることや、ゾーン同士の機能的カップリングが感覚情報処理に重要であることを示した(Tsutsumi et al., 2015)。さらに、運動制御や学習におけるゾーンの機能を2光子イメージングで解析するための、マウス用運動課題を開発した。しかし、2光子カルシウムイメージングを用いた研究では、登上線維入力があった時しかプルキンエ細胞のカルシウム応答が観察できないという問題があり、運動制御や運動学習の細胞過程を解析するために必須な、もう一つの入力である苔状線維の活動を、解析することができなかった。そこで、本研究では、まず、小脳へのもう一つの入力である、苔状線維からの情報を直接2光子イメージングにより可視化する方法を確立し、小脳への入力情報を大規模に解読する方法を開発することを目的とした。さらに、我々が開発に携わってきた、新規の多色高感度カルシウムセンサ(Inoue et al., 2015, 2019)を用いることで、苔状線維と登上線維の活動を同時に可視化して、その時空間的な相互作用を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

(1) 苔状線維活動の可視化による運動情報の解読

苔状線維にカルシウムプローブ G-CaMP を発現したマウスを用い、運動課題中の活動を可視化し、運動情報がどのように表現されているかを明らかにする。

(2) 登上線維入力の可視化による小脳ゾーンごとの運動情報解明

登上線維活動をプルキンエ細胞のカルシウムシグナルとして捉えることで、登上線維入力による運動情報をどのように表現するのかを、ゾーンごとに解析することで、各小脳ゾーンの機能を明らかにする。また、苔状線維と登上線維の活動の同時可視化によって異なる入力の相互作用を明らかにする。

(3) 光遺伝学または薬理遺伝学的手法を用いた運動学習と小脳回路活動の因果律の証明

光遺伝学または薬理遺伝学的手法を用いて、プルキンエ細胞活動あるいは登上線維および苔状線維の入力を操作した時に運動そのものの制御や、運動学習の増強・消去が起こるか否かを通じてその因果律を証明する。

これらを総合し、随意運動の制御と学習における小脳機能モジュールの作動原理を解明する。

3. 研究の方法

(1) 苔状線維活動の可視化による運動情報の解読：苔状線維特異的に G-CaMP を発現するマウス(Thy1-G-CaMP マウス)を用い、小脳皮質における苔状線維終末の活動を2光子カルシウムイメージングにより可視化した。前肢によるレバー引き課題実行中に、運動の開始、維持、停止の各フェーズにて苔状線維終末の活動を観察した。

(2) 登上線維入力の可視化による小脳ゾーンごとの運動情報解明：登上線維入力による活動を可視化するために、プルキンエ細胞にカルシウムプローブ GCaMP をウイルスを用いて発現させる。ゾーンごとの活動を観察するために、Aldoc-tdTomato マウスを用いる。各ゾーンごとの多様な機能を調べるため、マウスに音弁別 Lick/No-lick 課題を学習させ、課題実行中の登上線維入力による反応を2光子カルシウムイメージングにより観察した。

(3) 各小脳ゾーン選択的に光遺伝学または薬理遺伝学的手法を用いてプルキンエ細胞活動を操作するために、aldolase C 発現プロモーターを用いて、aldolase C 陽性または陰性プルキンエ細胞選択的にチャンネルロドプシンや DREADD 分子を発現することのできるマウスを作製する。

4. 研究成果

(1) レバー引き運動学習後の Thy1-GCaMP マウス小脳において、苔状線維終末の活動を可視化したところ、レバー引き運動に対して様々なフェーズで苔状線維活動が観察された。すなわち、苔状線維の活動としてレバー引き運動の情報を表現していることが示唆された。さらに、レバー引き運動のみならず、レバー引き後の報酬獲得による活動も観察されたことから、運動情報に加えて報酬に関する情報も同時に、苔状線維入力として小脳へ伝えられていると考えられた。

(2) 音弁別 Lick/No-lick 課題を実行中のマウス小脳半球 Crus において、プルキンエ細胞のカルシウムイメージングによって登上線維入力の活動を観察したところ、ゾーンごとに課題の異なるフェーズで登上線維活動が確認された。音刺激直前の一過的な活動減少、音刺激直後・運動開始に伴う急激な活動増加、運動持続中の活動上昇、報酬獲得時における活動上昇と減少があることがわかった(図)。

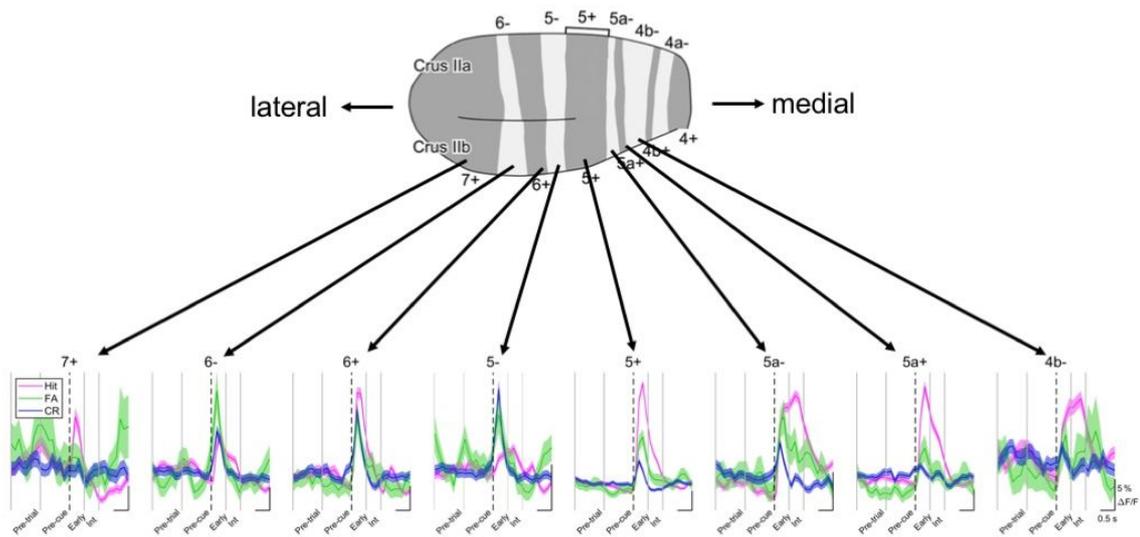


図. 音弁別 Lick/No-lick 課題を実行中のマウス小脳半球 Crus II における登上線維活動の網羅的解析

一般化線形モデルを用いてこれらの活動が行動パラメータでどのように説明されるのかを調べたところ、音刺激直前の活動減少は、Crus 内側で運動の開始と相関していることがわかった。課題学習後は音刺激が提示される間隔はほぼ一定となることから、この刺激提示直前の活動減少は、運動開始の準備あるいは音刺激提示の予測に対応するものと考えられる。音刺激直後・運動開始に伴う活動増加は Crus 全域で観察され、運動の開始とそのタイミング、運動速度といった運動パラメータとの相関に加え、音刺激の種類 (Go か No-go か) にも相関している事がわかった。これらの登上線維活動と行動の相関は、ゾーンごとにその内容が異なっていた。運動持続中の活動上昇は主に Crus 内側で観察され、運動速度と正に相関していた。

報酬獲得時における活動については、Crus 外側部では報酬獲得が活動減少と相関し、内側部のあるゾーンでは報酬獲得と活動上昇が相関していた。これらの結果を総合すると、大まかな機能的分類として、Crus 内側部は運動準備や実行、調節に関わる情報が、外側部は感覚情報が、Crus 全域に報酬獲得の情報が登上線維入力として伝えられていると考えられる。これまで、登上線維入力は運動の誤差シグナルあるいは学習の教師シグナルとして、運動学習や時々刻々の運動の調節に関わっていると考えられてきたが、学習した運動課題を実行中には、運動の様々なパラメータや報酬の情報を、各小脳ゾーンごとに適切なタイミングで伝えていることが明らかとなり、これらの情報が複雑な行動を実行する上で重要な働きをしていると考えられる (Tsutsumi et al., 2019)。

(3) 小脳ゾーン選択的な神経活動操作のため、aldolase C のプロモーターにより Cre リコンビナーゼを発現するマウスと、Cre 発現の有無によって、フリッパーゼ (FLP) またはテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) を発現するマウスを掛け合わせることで、aldolase C 発現の有無で遺伝子発現を制御できるマウスの開発に着手した。研究期間内にマウスを得るには至らなかったが、今後、交配を進めることで目的とするマウス系統を確立する。

< 引用文献 >

Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. Rational Design of a High-Affinity, Fast, Red Calcium Indicator R-CaMP2. *Nat Methods*. 2015 Jan;12(1):64-70. doi: 10.1038/nmeth.3185.

Inoue M, Takeuchi A, Manita S, (20 名省略), Kitamura K, Bito H. Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics. *Cell*. 2019 May 16;177(5):1346-1360.e24. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.007.

Tsutsumi S, Yamazaki M, Miyazaki T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K. Structure-function Relationships Between Aldolase C/zebrin II Expression and Complex Spike Synchrony in the Cerebellum. *J Neurosci*. 2015 Jan 14;35(2):843-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2170-14.2015.

Tsutsumi S, Hidaka N, Isomura Y, Matsuzaki M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K. Modular Organization of Cerebellar Climbing Fiber Inputs During Goal-Directed Behavior. *Elife*. 2019 Oct 9;8:e47021. doi: 10.7554/eLife.47021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Tsutsumi Shinichiro, Hidaka Naoki, Isomura Yoshikazu, Matsuzaki Masanori, Sakimura Kenji, Kano Masanobu, Kitamura Kazuo | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Modular organization of cerebellar climbing fiber inputs during goal-directed behavior | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.47021 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nakao Harumi, Kishimoto Yasushi, Hashimoto Kouichi, Kitamura Kazuo, Yamasaki Miwako, Nakao Kazuki, Watanabe Masahiko, Kano Masanobu, Kirino Yutaka, Aiba Atsu | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is essential for the formation but not expression of associative eyeblink memory | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43744-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Inoue Masatoshi, Takeuchi Atsuya, Manita Satoshi, (20名省略), Kitamura Kazuo, Bito Haruhiko | 4. 巻 177 |
| 2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell | 6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1360.e24 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2019.04.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Good Jean-Marc, Mahoney Michael, Miyazaki Taisuke, Tanaka Kenji F., Sakimura Kenji, Watanabe Masahiko, Kitamura Kazuo, Kano Masanobu | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Maturation of Cerebellar Purkinje Cell Population Activity during Postnatal Refinement of Climbing Fiber Network | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 2066 ~ 2073 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2017.10.101 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Mizuno Hidenobu, Ikezoe Koji, Nakazawa Shingo, Sato Takuya, Kitamura Kazuo, Iwasato Takuji | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 123 ~ 135 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.012 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計23件(うち招待講演 1件/うち国際学会 17件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidaka N, Ikezoe K, Tsutsumi S, Isomura Y, Kano M, Kitamura K |
| 2. 発表標題 Cerebellar climbing fiber signals represent voluntary forelimb lever-pull trajectories. |
| 3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Inoue M, Takeuchi A, Manita S, (12名省略), Kitamura K, Bito H |
| 2. 発表標題 Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. |
| 3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ikezoe K, Kitamura K |
| 2. 発表標題 Neuronal representation for speed and acceleration of walking in mouse cerebellar cortex. |
| 3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Kitamura K |
| 2 . 発表標題 Functional connectivity between the neocortex and the cerebellum. |
| 3 . 学会等名 IBRO2019 (国際学会) |
| 4 . 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Mizuno H, Ikezoe K, Nakazawa S, Sato T, Kitamura K, Iwasato T. |
| 2 . 発表標題 Patchwork-type spontaneous activity in neonatal somatosensory cortex transmitted via thalamocortical projections. |
| 3 . 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Mochizuki T, Manita S, Shimura H, Imai Y, Ihara T, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Mitsui T, Takeda M, Kitamura K. |
| 2 . 発表標題 Control of micturition by manipulation of the activity of the anterior cingulate cortex. |
| 3 . 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Hidaka N, Tsutsumi S, Ikezoe K, Isomura Y, Kano M, Kitamura K. |
| 2 . 発表標題 Activity of cerebellar climbing fibers represents forelimb movements during voluntary lever-pull task in mice. |
| 3 . 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Choo M, Hira R, Matsuzaki M, Ikezoe K, Augustine GJ, Kano M, Kitamura K. |
| 2. 発表標題 Organization of the functional inputs from the sensorimotor cortex to the cerebellum revealed by transcranial optogenetic mapping. |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mochizuki T, Manita S, Mitsui T, Takeda M, Kitamura K. |
| 2. 発表標題 Regulation of micturition by the activity of the anterior cingulate cortex in mice. |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 喜多村和郎 |
| 2. 発表標題 小脳の運動機能と非運動機能：マウスを用いた研究. |
| 3. 学会等名 第9回小脳研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Manita S, Ikezoe K, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Kitamura K. |
| 2. 発表標題 Measurement of multiple cerebellar mossy fiber activities by calcium imaging in mouse. |
| 3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Murakami M, Cazes F, Mainen ZF, Kitamura K. |
| 2. 発表標題 Neural substrates of action timing decisions. |
| 3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ikezoe K, Kitamura K. |
| 2. 発表標題 Neuronal tuning to speed and acceleration of locomotion in mouse cerebellar cortex. |
| 3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 日高直樹, 堤新一郎, 池添貢司, 磯村宣和, 狩野方伸, 喜多村和郎 |
| 2. 発表標題 随意運動における小脳登上線維シグナルの2光子イメージング解析 |
| 3. 学会等名 第64回中部日本生理学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuo Kitamura, Shinichiro Tsutsumi, Naoki Hidaka, Yoshikazu Isomura, Masanori Matsuzaki, Kenji Sakimura, Masanobu Kano |
| 2. 発表標題 Functions of cerebellar modules during goal-directed behavior |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Michael Mahoney, Jean-Marc Good, Taisuke Miyazaki, Kenji F Tanaka, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano |
| 2. 発表標題 Maturation of cerebellar climbing fiber and Purkinje cell population activities during postnatal development |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidenobu Mizuno, Koji Ikezoe, Takuya Sato, Kazuo Kitamura, Takuji Iwasato |
| 2. 発表標題 Barrel-confined patchwork activity of the somatosensory layer 4 neurons in neonates |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Satoshi Manita, Koji Ikezoe, Taiyo Kawaguchi, Kazuo Kitamura |
| 2. 発表標題 Establishment of a method to observe cerebellar activities during reaching and grasping in mice |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Naoki Hidaka, Shinichiro Tsutsumi, Koji Ikezoe, Yoshikazu Isomura, Masanobu Kano, Kazuo Kitamura |
| 2. 発表標題 Two-photon imaging of cerebellar climbing fiber signals during a voluntary movement |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------|
| 1. 発表者名 喜多村和郎 |
| 2. 発表標題 小脳モジュールの機能解析 |
| 3. 学会等名 次世代脳冬のシンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 日高直樹, 堤新一郎, 池添貢司, 磯村宣和, 狩野方伸, 喜多村和郎 |
| 2. 発表標題 2光子イメージングによる随意運動中のマウスの小脳登上線維シグナル解析 |
| 3. 学会等名 次世代脳冬のシンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuo Kitamura |
| 2. 発表標題 Two-photon imaging of cerebellar activity in vivo |
| 3. 学会等名 Two-photon functional imaging in the living brain: Theory and Practice (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Satoshi Manita, Koji Ikezoe, Kazuo Kitamura |
| 2. 発表標題 A novel method for assessment of reaching and grasping movements in head-fixed mice |
| 3. 学会等名 第94回日本生理学大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|