

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03336

研究課題名（和文）シームレスイメージング解析により捉えた運動学習時の皮質運動野の動的神経回路の本質

研究課題名（英文）Correlated LM and EM analysis of cortical microcircuit remodeling during learning

研究代表者

窪田 芳之（Kubota, Yoshiyuki）

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：90192567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体脳観察と電顕観察を組み合わせた光顕-電顕相関法を開発し、前肢を用いたタネ掴み運動学習時にM1皮質で生じる神経回路変化を解析した。学習課題実行中のマウスM1皮質で、2次運動野(M2) M1神経路は「運動学習」に重要な役割を担う一方、体得した「運動記憶」は視床 M1神経路に引き継がれ、神経回路リモデリングが生じていることを観察した。「記憶」は「学習」の延長にあることから、これまでは「学習」によって新たな神経回路が形成され、それが成熟し「記憶」神経回路として機能すると考えられていた。この研究で、「学習シナプス」は「記憶シナプス」の形成を助け、学習記憶が成立するという新説を提唱するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、脳が「学習」した事柄をいかにして「記憶」に変換していくのかについて、新たな知見を示すことができました。例えば、箸の使い方を練習すると、初めは一生懸命に指先に神経を払う必要がありますが、練習すればするほど箸使いが上手になります。そのうちに、会話したり、テレビをみたり、新聞を読んだりしながら、無意識下で箸を上手に使いこなして食事をとるようになります。このような日常の運動学習に関わる脳の学習メカニズムの解明につながる成果だと考えています。

研究成果の概要（英文）：We developed correlated light and electron microscopy (CLEM) with combination of in vivo imaging using two photon microscopy and large volume electron microscopy using automated tape collecting ultramicrotome (ATUM) to analyze the cortical neural microcircuit changes that occurred in the M1 cortex for seed reaching task motor learning task using with forelimb. During the learning task, we observed that the secondary motor cortex (M2) M1 neural pathway plays an important role in “motor learning” while the acquired “motor memory” is transferred to the thalamus M1 neural pathway, indicating that neural circuit remodeling has been occurred in M1 cortex. We concluded that “synaptic connections for learning” helps in formation and maturation of “synaptic connections for memory” for the skill learning.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 神経回路 リモデリング シナプス スパイン 視床 運動学習 光顕電顕相関

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳では、神経細胞間で情報が複雑にやり取りされ、巨大なネットワークを形成しています。特に、神経細胞間で情報を伝達する結合部はシナプスと呼ばれ、学習や記憶に非常に重要な働きをしていると考えられています。実際、マウスに、特定の運動課題トレーニングをさせると、大脳皮質の中の運動を担う領域（第一次運動野）で、新たなシナプスが形成され、神経回路が変化していることはわかっていました。しかし、それを神経回路の変化として明らかにした研究は過去になく、具体的にどのような特性をもつ信号が関わっているかなどその詳細は知られていませんでした。

### 2. 研究の目的

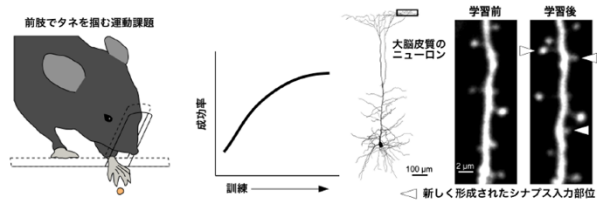
運動学習は大きく学習初期、学習後期、完成期（自動相学習習得後、安定した運動課題遂行が可能になる時期）に分類されます。大脳皮質第一次運動野（M1）の第5層錐体路細胞は脊髄などの皮質下へと軸索を伸ばしています。この錐体路細胞（pyramidal tract: PT）の房状分枝樹状突起には無数の棘突起が存在し、主に興奮性シナプスの入力部位となっています。この棘突起は運動の学習前後で新生・消失を繰り返しており、細胞間シナプス結合の可塑的变化を表すとされています。しかし、その神経ネットワークの局所神経回路の構造は分かっていません。そこで、本研究は、運動学習の各段階においてM1の錐体路細胞が受けるシナプス入力の変化を観察することで、運動学習成立の機序を明らかにすることを目的とします。

### 3. 研究の方法

大脳皮質の一部の神経細胞が緑色蛍光蛋白（GFP）で遺伝的に標識されているマウスに、前肢を用いた運動学習課題トレーニングを続けたところ、前肢の運動を制御している大脳皮質の第一次運動野に新しいシナプスができることを確認しました（図1）。さらに、その新しいシナプス結合が、脳のどこからの情報を伝達しているかを検討しました（図2）。学習初期（学習1日目～4日目）においては、新しいシナプス結合が頻繁にできること、また、より運動が上達したマウスほど、その数が多いことを突き止めました（図3）。すなわち、運動技能の上達には新しいシナプス結合の形成が重要であることがわかりました。その多くは、より高次の運動皮質（第二次運動野など）から送られてきていることを明らかにしました。高次の運動皮質からは、意識的に運動を補正するための信号情報（教師信号）が送られることから、学習初期にはその運動課題を習得するために、動物は様々なことを「試行錯誤しながら」行っていると推察できます。

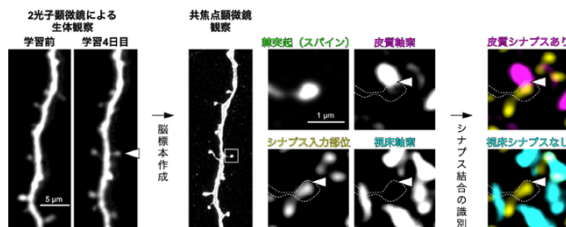
一方で、学習の後期（学習5日目～8日目）になると、学習初期に新たに形成されたシナプス結合の多くは消失しました。脳の深部には、自動運動信号を伝える視床と呼ばれる領域があります。マウスの第一次運動野には、視床からも新しいシナプスが形成され情報が伝達されていましたが、そのシナプス結合は残存

図1 学習により新しいシナプスが形成される



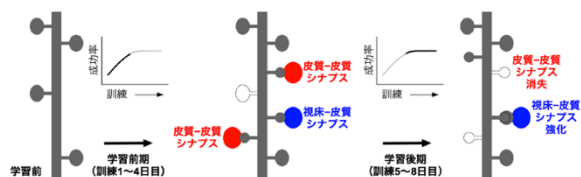
マウスに前肢を用いてタネを掴む運動課題を与えると、訓練によりその成功率は上昇しました。同時に2光子顕微鏡を用いて大脳皮質を観察すると、棘突起（スパイン）と呼ばれるシナプス入力部位が新たに形成されるのが観察されました。

図2 Post hoc免疫組織化学法による、新生シナプスへの入力源の同定



2光子顕微鏡により新たなシナプス形成を観察した後、脳標本を作成し、4重免疫組織化学法を施しました。それにより、学習時に新たに形成されたシナプスが、皮質-皮質間シナプス（Cortico-cortical synapse）であるか、視床から運動野へのシナプス入力（Thalamo-cortical synapse）であるかを識別することに成功しました。

図3 運動学習時における2種類の新生シナプスの動態



運動学習により、学習前期には皮質-皮質間シナプス（Cortico-cortical synapse）が多く形成されました。しかし、学習後期にはそれらの多くは消失し、代わりに視床から運動野へのシナプス入力（Thalamo-cortical synapse）が残存し、さらにそのシナプスが強化される所見が得られました。

し、しかも信号がより強化されていることを、  
がって、学習の後期には、学習した運動の情報  
処理が徐々に自動化運動化していると考えて  
います。

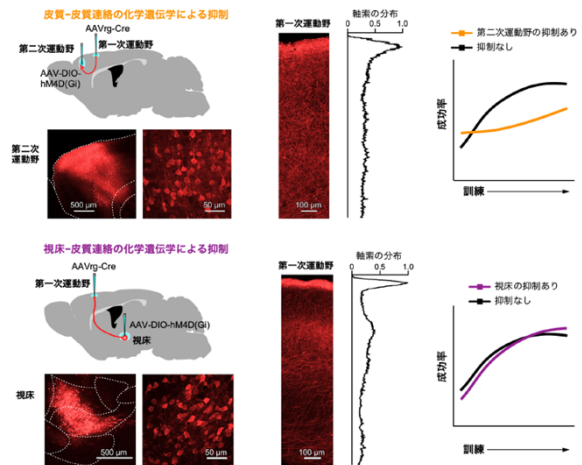
実際に、高次の運動皮質から第一次運動野への  
神経の情報伝達を実験的に抑制すると、第一  
次運動野で新しいシナプスはほとんどでき  
ず (図 4)、運動がうまくならないこともわかり  
ました。一方で、視床から大脳皮質運動野  
への神経の情報伝達を抑制しても運動は通常  
通りに上達しましたし (図 4)、新しく形成さ  
れるシナプスの数もほぼ同じでした。しかし、  
通常の動物ではあったシナプス結合を介した  
神経信号の強化は認められませんでした。こ  
れらのことから、高次の運動皮質から第一  
次運動野への神経の情報伝達は「運動学習」に  
重要な役割を担っていること、体得した「運  
動記憶」は、視床からのシナプス入力に引き  
継がれ新たに保存されるということがわかり  
ました (図 5)。これは、8 日間訓練し運動が  
十分上達したマウスで、訓練 9 日目に視床か  
ら第一次運動野への神経信号を実験的に抑制  
した場合に、その上達済の運動をまともに実  
行できなかったことから明らかです。

#### 4. 研究成果

生体脳観察と電顕観察を組み合わせた光顕-電顕相関法を開発し、前肢を用いたタネ掴み運  
動学習時に M1 皮質で生じる神経回路変化を解析しました。学習課題実行中のマウス M1 皮質  
で、2 次運動野 (M2) → M1 神経路は「運動学習」に重要な役割を担う一方、体得した「運動記  
憶」は視床 → M1 神経路に引き継がれ、神経回路リモデリングが生じていることを観察しまし  
た。「記憶」は「学習」の延長にあることから、これまでは「学習」によって新たな神経回路が  
形成され、それが成熟し「記憶」神経回路として機能すると考えられていました。この研究  
で、「学習シナプス」は「記憶シナプス」の形成を助け、学習記憶が成立するという新説を提  
唱するに至りました。

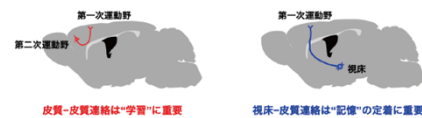
今回の研究で新たに見出しました (図 3)。した

図 4 皮質-皮質連絡の抑制は学習を阻害する



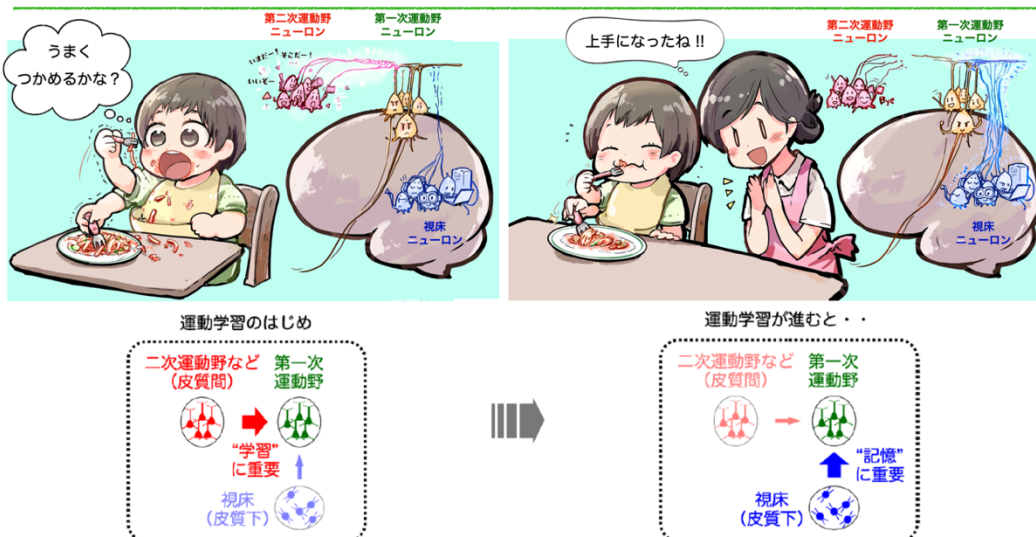
皮質-皮質間連絡を抑制すると、学習が阻害されました。一方で、視床から運動  
野へのシナプス入力を抑制してもマウスは運動技能を上達させました。このこ  
とから、皮質-皮質間シナプス (Cortico-cortical synapse) は学習にとって重要で  
あることが示されました。

図 5 “学習”と“記憶”における 2 種類の神経回路の役割分担



今回の研究で、皮質-皮質間シナプス (Cortico-cortical synapse) は、特に学習の  
早期における運動技能の獲得に、視床から運動野へのシナプス入力 (Thalamo-  
cortical synapse) は、獲得した運動技能の定着に重要であることが示唆されまし  
た。

### 熟練運動を自分のものにするためには練習が欠かせない



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Battulga B, Shiizaki K, Miura Y, Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, Kubota Y, Hara T, Kuro-o M, Ohno N	4. 巻 13
2. 論文標題 Correlative light and electron microscopic observation of calcium phosphate particles in a mouse kidney formed under a high-phosphate diet.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28103-3	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 Sohn J, Suzuki M, Youssef M, Hatada S, Larkum ME, Kawaguchi Y, Kubota Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Presynaptic supervision of cortical spine dynamics in motor learning.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabm0531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abm0531	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 該当する
1. 著者名 Aghvami SS, Kubota Y and Egger V	4. 巻 16
2. 論文標題 Anatomical and Functional Connectivity at the Dendrodendritic Reciprocal Mitral Cell-Granule Cell Synapse: Impact on Recurrent and Lateral Inhibition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 933201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2022.933201	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 該当する
1. 著者名 Fang I, Monroe F, Novak SW, Kirk L, Schiavon CR, Yu SB, Zhang T, Wu M, Kastner K, Kubota Y, Zhang Z, Pekkurnaz G, Mendenhall J, Harris K, Howard J, Manor U	4. 巻 18
2. 論文標題 Deep Learning-Based Point-Scanning Super-Resolution Imaging.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 406-416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41592-021-01080-z	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 該当する

1. 著者名 Urakubo H, Yagishita S, Kasai H, Kubota Y, Ishii S	4. 巻 17
2. 論文標題 The critical balance between dopamine D2 receptor and RGS for the sensitive detection of a transient decay in dopamine signal.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Comput Biol	6. 最初と最後の頁 e1009364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1009364	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 Urakubo H, Bullmann T, Kubota Y, Oba S, Ishii S	4. 巻 9
2. 論文標題 UNI-EM: An Environment for Deep Neural Network-Based Automated Segmentation of Neuronal Electron Microscopic Images.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55431-0	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14件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoshiyuki Kubota
2. 発表標題 Cortical Spine Dynamics and Microcircuit Remodeling during Motor Learning
3. 学会等名 The Dendrites: Molecules, Structure and Function GRC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田芳之、川口泰雄
2. 発表標題 大容量電子顕微鏡画像データとコネクトミクス
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 一次運動野運動野神経回路で運動学習時に生じるリモデリング
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 2光子・共焦点顕微鏡・大容量電顕画像によるCLEMとAI assisted dense segmentationの試み
3. 学会等名 クラスタ/ハブダイナミズムの決定剛軟因子ハブ決定剛軟因子領域シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 大容量電顕画像撮影と深層学習アプリによるdense segmentationの試み
3. 学会等名 日本顕微鏡学会生体ボリュームイメージング 第6回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiyuki Kubota, Jaerin Sohn, Yasuo Kawaguchi
2. 発表標題 学習に伴う大脳皮質一次運動野の神経回路構築のリモデリング
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 「大容量電顕画像撮影と深層学習アプリによるdense segmentationの試み」
3. 学会等名 第2回 中部大学 基礎生物学研究所 生理学研究所連携セミナー「AIと生命システム」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jaerin Sohn, Mototaka Suzuki, Sayuri Hatada, Mohammed Youssef, Matthew E Larkum, Yasuo Kawaguchi, Yoshiyuki Kubota
2. 発表標題 Presynaptic control of spine dynamics for learning and memory in neocortex
3. 学会等名 EMBO   EMBL Symposium: Seeing is Believing - Imaging the Molecular Processes of Life (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 大規模電顕画像データによる脳マイクロコネクトーム
3. 学会等名 諸科学における大規模データと統計数理モデリング & 諸科学における大規模・多様なデータを基盤としたデータ駆動型研究の萌芽・推進のためのワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之、畑田小百合、山口登、Alsayed A Mohamed, 田中康裕、川口泰雄
2. 発表標題 ラットの大脳皮質細胞へのシナプス入力特性
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / 第1回CJK国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之
2. 発表標題 ラット大脳皮質の大容量電顕画像データセット撮影と自動セグメンテーション
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第77回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田芳之、川口泰雄
2. 発表標題 非錐体細胞の樹状突起へのシナプス入力特性
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 孫在隣、川口泰雄、窪田芳之
2. 発表標題 運動学習時の皮質 - 皮質間連絡・視床 - 皮質投射の神経回路再編成
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 孫在隣、窪田芳之、川口泰雄
2. 発表標題 皮質 - 皮質間連絡・視床 - 皮質投射の入力依存的な運動学習時回路動態
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kubota Y	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 30
3. 書名 Receptor and Ion Channel Detection in the Brain	

〔産業財産権〕

〔その他〕

「学んだ」ことが「身につく」ときの脳の変化, 運動学習で大脳皮質神経回路が変化し学習記憶が進む <a href="https://www.nips.ac.jp/release/2022/07/post_486.html">https://www.nips.ac.jp/release/2022/07/post_486.html</a>
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	Charitie Universitätsmedizin Berlin	Humboldt University of Berlin	Regensburg University