

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06883

研究課題名(和文)小脳苔状線維で符号化される運動命令や感覚情報の解読：複数線維の同時観察による解明

研究課題名(英文) Decoding motor commands and sensory information encoded in cerebellar mossy fibers: investigation by simultaneous observation of multiple fibers.

研究代表者

真仁田 聡 (Manita, Satoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：80584135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、運動命令や感覚情報が小脳の苔状線維においてどのように表現されているかを明らかにすることである。まず小脳の苔状線維に特異的にカルシウムセンサーを発現するマウスを用いて苔状線維が運動に関連する活動を示すかを検討した。その結果、苔状線維は小脳の構造単位で同期して活動することが明らかになった。また苔状線維の活動は前肢やまばたきだけでなくそれ以外の運動や報酬の獲得とも相関があることが示唆された。次にマウスの到達把持運動システムの改良を行い、この装置の開発をまとめ論文として発表した。これらによって前肢による到達把持運動時における小脳の苔状線維活動を詳細に検討することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、頭部固定下におけるマウスの前肢による到達把持運動システムを改良・開発した。この装置は大脳皮質や小脳における神経活動の観察と同時にマウスの前肢の運動を詳細に観察できる。そのため、より詳細に到達把持運動を実現させる神経メカニズムの解明に貢献できる。また、数ヶ月間にわたりマウスの運動を観察できるので、運動の習熟過程に関与する神経活動の解明も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to characterize how motor commands and sensory information are represented in the mossy fibers of the cerebellum. In FY 2019, we examined whether cerebellar mossy fibers exhibit movement-related activity that express calcium sensors specifically in cerebellar mossy fibers (Thy1-G-CaMP7 mice). The results revealed that mossy fibers are synchronously active in structural units such as the V, VI, and VII lobes of the vermis and the simple lobule, crus I, and II of the hemisphere. The results also suggest that mossy fiber activity is correlated not only with forelimb and blinking but also with other locomotion and reward acquisition in mice. In FY2020, we improved and validated a mouse forelimb reaching and grasping movement system. In FY2021, the development of this device was summarized and published as a paper. These findings have enabled a detailed examination of cerebellar mossy fiber activity during reaching and grasping movements with the forelimb.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 カルシウムイメージング 運動

1. 研究開始当初の背景

小脳は複数の神経核から起始する苔状線維を受け取る。これら苔状線維は運動命令や感覚情報を運んでおり、小脳はこれらの情報を受け取りより精密な運動制御を実現させていると考えられている。実際に、苔状線維の活動や苔状線維の入力を受け取る顆粒細胞の活動は、四肢の運動や感覚刺激に相関する応答を示すことが報告されてきた(Tomatsu et al., *J. Neurophysiol.*, 2016; Arenz et al., *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2009; Rancz et al., *Nature*, 2007)。しかし、運動や感覚情報といった異なる情報はそれぞれ別々の苔状線維で符号化されているのか、それらの情報は同一の苔状線維で符号化されているのか、あるいは小脳内の部位ごとでその様式は異なるのかは明らかでない。また、同じ種類の情報においても、単一苔状線維の平均発火率による符号化なのか、あるいは複数の苔状線維の活動に分散して表現されているのかも明らかでない。これらを解明するには苔状線維活動を単一終末レベルの空間解像度で複数同時に観察する必要がある。これまでの研究では、単一神経細胞の電気的記録によって苔状線維の活動を記録し、苔状線維の活動が運動や感覚情報に関係があるかが検討されてきた。この方法では、複数の苔状線維の活動を同時に観察することは困難であり、苔状線維集団の符号化様式を詳細に検討することはできない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず広域カルシウムイメージング法を用いて苔状線維の集合活動を広範囲な小脳部位から測定する。そして、苔状線維が運動命令や感覚情報を符号化しているか検討する。次に二光子カルシウムイメージング法を用いて苔状線維活動を単一終末レベルの空間解像度で測定し、単一の苔状線維終末が運動命令や感覚情報をどのように符号化しているか詳細に検討する。さらに光遺伝学的手法を用いて運動学習と苔状線維活動とに因果関係があるか検討する。本研究の遂行によって、「小脳苔状線維が伝える情報は何か？」という古くからあるが未だ解明されていない問い(Albus, *Math. Biosci.*, 1971; Marr, *J. Physiol.*, 1969)を最新技術を用いて明らかにできると考える。

3. 研究の方法

小脳の苔状線維に特異的にカルシウムセンサーを発現するマウス(Thy1-G-CaMP7 マウス)を用いて小脳の苔状線維が運動に関連する活動を示すかを検討した。このマウスに前肢を用いた行動課題、あるいは瞬目反射条件づけを頭部固定下で行わせ、同時に 14 mm × 9 mm の範囲を観察できる 1 光子広域カルシウムイメージングを行った。

マウスの前肢を使った到達・把持運動システムの改良を行い検証した。頭部固定下のマウスにアガーキューブを提示する際の提示方法を改良した。

4. 研究成果

マウスの小脳の頭蓋骨は大脳皮質と比べて厚い。そのため大脳皮質で行われているような皮膚の除去だけでは小脳の各部位を同定できない。そこで小脳の頭蓋骨を広範囲に薄くする手術を行った。これにより血管や形態から小脳の各部位が同定できるので、それぞれの部位とそれらの活動の関係を長期間(3週間以上)観察可能になった。この処置をした Thy1-G-CaMP7 マウスを用いて運動時における苔状線維の活動を観察すると、苔状線維は虫部第 V、VI、VII 小葉や半球の simple lobule、crus I、II といった構造単位で同期して活動することが明らかになった。また苔状線維の活動はマウスの前肢やまばたきだけでなくそれ以外の運動や報酬の獲得とも相関があることが示唆された。これを検証するために、マウスの全身の運動を 2 台のカメラを使って定量できるシステムを構築し、多くの運動パラメータの測定が可能になった。

到達・把持運動システムの改良においては、2 台のカメラでより正確に 100Hz のサンプリングレートで画像を取得可能になった。アガーキューブの重さ、大きさの再現性を検討し、それぞれ 55 +/- 3mg (range: 45-60mg), 15.7 +/- 0.8mm² (range: 10.2-17.8mm²)となり、再現性高くアガーキューブを提示できるようになった。到達・把持運動課題をマウスに実施させ、マウスは 1 週間の訓練で 50%以上の成功確率で課題を遂行できるようになった。マウスのこの運動動画よりマーカーを使わない 3 次元ポーズ推定法(deeplabcut)を用いてマウスの前肢の動きを定量可能にした。また、カイクルタンパクであるフィブリンを用いたアデノ随伴ウイルス塗布法により小脳皮質の広範囲にカルシウムセンサー(XCaMP-G)を発現させる方法を確立した。これにより、通常のアデノ随伴ウイルス注入による方法より効率的に実験が実施できるようになった。

また、食品用ラップを用いた広域(6x3mm)窓の作製法を開発した。大きな窓にもかかわらず、激しい脳振動は観察されなかった。また、1 ヶ月以上、脳表面の状態が悪くなることはなかった。カルシウムセンサーのひとつである GCaMP6f をアストロサイトに特異的に発現させたマウスの広視野イメージングでは、数ミリの範囲で同期した応答が見られた。同じマウスの 2 光子

イメージングでは、個々のアストロサイトで数秒間に渡って顕著なカルシウム応答が確認された。さらに、食品ラップ上にアデノ随伴ウイルスを薄く塗布し、頭蓋窓全域の脳皮質のニューロンにカルシウムセンサーを発現させることに成功した。本手法は、大きな頭蓋窓を作ることができる効率的で簡便・低価格な方法であり、行動時の神経とグリアの動態とその相互作用を巨視的、微視的に調べることが容易となる。これらの成果を論文としてまとめ投稿した。これらの研究成果によって前肢による到達・把持運動時における小脳の苔状線維活動を詳細に検討することが可能になった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Manita, S., Ikezoe, K. & Kitamura, K. A Novel Device of Reaching, Grasping, and Retrieving Task for Head-Fixed Mice. *Front Neural Circuits*. 16 842748, doi:10.3389/fncir.2022.842748, (2022).

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Manita Satoshi, Ikezoe Koji, Kitamura Kazuo	4. 巻 16
2. 論文標題 A Novel Device of Reaching, Grasping, and Retrieving Task for Head-Fixed Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 842748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2022.842748	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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