

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560432

研究課題名(和文) 大脳 小脳連関の光マッピングによる解析

研究課題名(英文) Optical mapping of cerebrocerebellar communication loop

研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA, Kazuo)

山梨大学・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：運動制御・運動学習の基盤をなす、大脳-小脳の機能的結合を明らかにするために、大脳皮質連運動野、感覚野と小脳皮質との間の機能的結合を、光活性化チャネル(ChR2)を発現しているマウスにおいて光マッピングにより調べた。これにより、大脳 小脳の結合マップを解析し、苔状線維経由および登上線維経由で異なる情報を伝達していることを明らかにした。小脳皮質の部位ごとに大脳の異なる領域から情報を受け取っているが、特定の領域からは、小脳皮質の広い範囲へ情報を送っていることも明らかとなった。さらに、小脳皮質の部位ごとにスパイク潜時が大きく異なっており、小脳皮質での運動関連情報処理と関係していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Interplay between the cerebellum and the neocortex is crucial for the execution of skilled movement and motor learning. To elucidate comprehensive functional connections between the neocortex and the cerebellar cortex, here we perform cell-attached recordings from the cerebellar Purkinje cell while layer 5 pyramidal neurons located at various area of the cerebral cortex are optogenetically stimulated in Thy1-ChR2-EYFP mice. Photostimulation reliably evokes simple and complex spikes, which are respectively induced by parallel and climbing fiber inputs, in the Purkinje cell with distinct spike probabilities and different latencies. Accordingly, we identify spatial and temporal spike maps on the cerebral cortex including sensory and motor area. The results indicate that specific areas of cerebellum are closely associated with motor and sensory area, thus implying these information are integrated in the specific cerebellar regions so as to control accurate coordination of movement.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経科学 生理学 光遺伝学 運動

1. 研究開始当初の背景

小脳は入力としてすべての感覚情報を受け取り、様々な神経核を介して大脳の運動野、連合野と連携することで、速く滑らかに正確な運動の制御を行っている。本研究では、運動制御における小脳の役割とそのメカニズムの基盤をなす大脳-小脳の機能的結合を明らかにするために、光活性化チャネル (ChR2 や NpHR) を用いた大脳皮質および小脳皮質の機能的な光マッピングを行う。運動制御における大脳-小脳連関の研究は、古くから主にサルやネコを対象とした電気生理学によってなされてきた (Allen & Tsukahara, 1974)。また、大脳-小脳ループは運動学習にも深く関与しており、特に、熟練学習の段階で小脳から大脳への入力が増加していることが示されている (Sasaki & Gemba, 1982)。このように、大脳-小脳連関が円滑な運動の実現と運動学習に極めて重要な役割を果たしていることから、大脳皮質と小脳との間の結合について形態学や皮質内微小電極刺激法 (ICMS) により調べられている (Kelly & Strick, 2003; Schwarz & Welsh, 2001)。しかしながら、これらの従来法は皮質のごく一部の限られた領域間での結合を丹念に調べるといった方法であり、大脳-小脳間の機能的結合の全貌は未だ明らかとなっていない。一方、ChR2 や NpHR によって、光を用いて極めて高い自由度で神経細胞を活性化・不活性化することが可能となり、ChR2 マウスを用いた運動野の光マッピングなどが実現されている (Hira et al., 2009)。そこで、熟練運動に関係する大脳皮質連合野、運動野、感覚野と小脳皮質との間の機能的結合を、ChR2 や NpHR を発現しているマウスにおいて、光マッピングにより網羅的に調べることが可能であると考えるに至った。

2. 研究の目的

ChR2 や NpHR を発現するマウスの大脳皮質および小脳皮質において、レーザーを用いた光マッピングを行う。具体的には、小脳プルキンエ細胞から活動電位記録を行っている最中に大脳皮質の連合野、運動野、感覚野をレーザー刺激により賦活し、大脳-小脳結合の機能マッピングを行う。これにより、大脳-小脳間における機能的結合を網羅的に明らかにすることで、運動制御における大脳-小脳連関の全貌を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

大脳皮質の出力ニューロンである、第 5 層錐体細胞に ChR2 を発現する、Thy1-ChR2 マウスを使用した。光刺激として青色レーザー (473 nm) をガルバノミラーを用いて走査することで、マッピングを行った (Hira et al.,

2009)。前肢の運動および運動のプランニングに関わるとされる小脳傍虫部および小脳半球において、小脳の単一プルキンエ細胞からセルアタッチ記録法により活動電位を記録し、第一次運動野および高次運動野を光刺激した時に、プルキンエ細胞でどのような発火が記録されるかをマッピングした。プルキンエ細胞は平行線維および登上線維から入力を受けた時にそれぞれ単純スパイク、複雑スパイクを発生するので、運動野のどの部分を刺激した時にどちらのスパイクが発生するかを詳細に調べることで、各運動野が橋核、下オリーブ核のどちらを介して小脳に出力を送っているのかを調べる。提唱されている

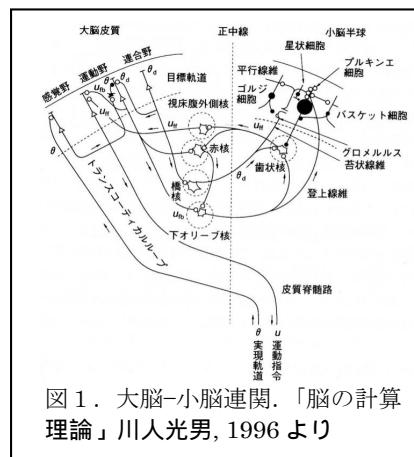


図 1. 大脳-小脳連関。「脳の計算理論」川人光男, 1996 より

大脳-小脳連関モデル (図 1) では、運動野からのフィードバック信号は、下オリーブ核を介して登上線維入力として小脳半球に入力しており、このモデルが正しければ複雑スパイクが観察されるはずであるが、他に単純スパイクを発生するような領域があるかどうか、すなわち橋核を介して苔状線維入力として入力する経路がないかどうかを調べた。また、光刺激からスパイク発生までの潜時を記録し、各運動野からの情報が、どのようなタイミングで小脳に入力してくるかを調べる。これは、運動制御における小脳の役割を知る上で重要な情報である。次に、空間情報を処理する頭頂連合野および行動計画・実行を担う前頭連合野を光刺激した時の、小脳傍虫部および小脳半球でのプルキンエ細胞の活動を調べた。モデルでは、連合野は運動の目標軌道の生成に関係しており、これらの領野からの目標軌道に関する信号は、橋核を介して苔状線維入力として小脳に入力するため、単純スパイクが観察されるはずである。この場合も、苔状線維入力だけでなく、下オリーブ核を介して登上線維として入力する経路が無いかどうかを調べた。さらに、体性感覚野のうち前肢に対応する部分を光刺激した際に、小脳傍虫部および小脳半球でプルキンエ細胞の活動を記録した。これらの実験を通して、大脳-小脳結合の網羅的なマッピングを行い、運動計画、目標軌道、運動指令、フィードバック運動指令、感覚フィードバックに関する情報がどのようなタイミングで

小脳に入力し、統合されるのかを明らかにする。

4. 研究成果

大脳の様々な部位を光刺激し、小脳プルキンエ細胞でスパイク記録を行った。その結果、光刺激の位置に応じて、複雑スパイクおよび単純スパイクが発生した(図2)。複雑スパイクと単純スパイクはともに刺激に対する反応以外に自発的に発生する活動であるため、それぞれのスパイクの刺激前後時間ヒストグラム(PSTH)を求め、光刺激によって有為に反応が上昇することを確認した。また、光刺激による反応が検出された刺激位置をマップ状に表示することで、これらの活動が大脳皮質のどこからの入力により賦活されているのかを確認することができた。すなわち、本方法により、大脳皮質から小脳皮質への機能的結合マップを得ることが可能であることがわかった。

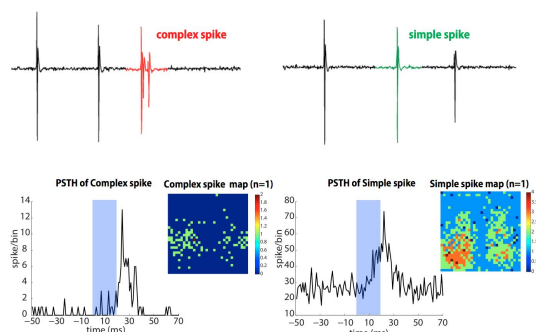


図2. 大脳光刺激による小脳プルキンエ細胞のスパイク活動と入力マップ

同様の実験を、様々な小脳部位で繰り返し行うことで、各小脳皮質への大脳の入力マップを得た(図3)。複雑スパイクと単純スパイクのマップの比較では、大脳からの入力部位に重なりがあり、同じ情報が苔状線維および登上線維として入力しているものの、詳細に見てみると、それぞれ異なる部位から入力を受けている事がわかる。特に、複雑スパイクマップは、単純スパイクマップに比べてより限局した部位からの入力を強く受けていることがわかった。これは、登上線維入力として特異的な情報が伝えられている一方で、より広い領域から多種の情報が苔状線維入力として伝えられていることを示唆し、現在

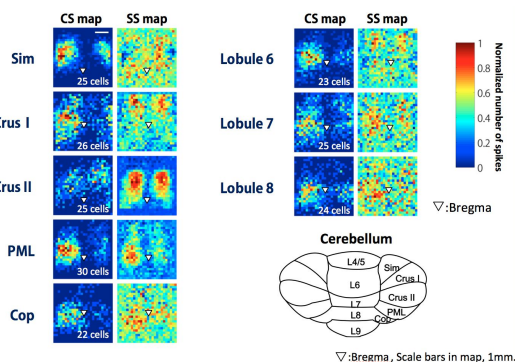


図3. 大脳入力マップの詳細

の大脳 小脳関連モデルと小脳学習理論(図1)を強く支持する結果である。

今回記録を行った、小脳虫部外側および小脳半球へ入力する大脳領域は、前肢運動野(RFA, CFA)、口周囲運動野(vM1, ALM)、高次運動野(M2)、体性感覚野(SFA, vS1)などからであり、運動に関する情報が小脳皮質の広い領域にわたって伝達されていることを意味している。今後、それぞれの領域ごとにどのような情報が送られているかを詳細に解析することで、小脳皮質の部位毎の運動情報処理の内容を明らかにしていく予定である。

次に、光刺激からスパイク発生までの潜時を小脳皮質の記録部位ごとに計測した(図4)。まず、すべての記録部位において、単純スパイクの潜時は複雑スパイクの潜時よりも短いことがわかった。これは、瞬目反射条件付けなどの研究で分かっている入力順序(平行線維入力 登上線維入力)と矛盾しない。反射運動系ではこの順序が小脳長期抑制の誘発に必須であることから、随意運動系においても同様の順序が担保される回路構成となっており、運動学習と小脳皮質可塑性との関係を強く示唆するものである。また、興味深い点として、小脳皮質の部位ごとに潜時が大きく(最大10ms)異なることが明らかとなった。この傾向は単純スパイクと複雑スパイクで同様であり、小脳皮質の各部位が行っている情報処理との関係が示唆されることから、今後、何の情報かどのタイミングで小脳のどこへ入力しているのかを詳細に解析し、運動制御との関係を明らかにしたい。

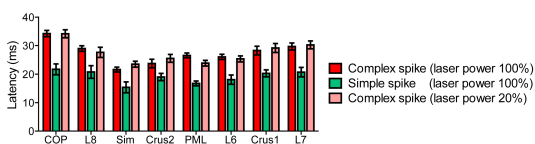


図4. 小脳皮質毎のスパイク潜時の違い

本研究において、大脳 小脳関連の基盤となる大脳 小脳間の機能的結合を網羅的に解析する実験系を開発した。これにより、大脳 小脳の結合マップを解析し、苔状線維経路および登上線維経路で異なる情報を伝達していることを明らかにした。小脳皮質の部位ごとに大脳の異なる領域から異なる情報を受け取っているが、特定の大脳領域からは、小脳皮質の広い範囲へ情報を送っていることも明らかとなった。さらに、小脳皮質の部位ごとにスパイク潜時が大きく異なっており、小脳皮質での運動関連情報処理と関係していると考えられる。今後は、小脳皮質にChr2を発現するマウスを用いて、小脳 大脳の機能結合マップを求めることで、大脳 小脳関連の双方向的なマップを完成させることを目標とする。

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 10 件)

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. 査読有

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. 査読有

Masamizu Y, Tanaka YR, Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, *Matsuzaki M. Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci*. 2014 Jul;17(7):987-94. 査読有

Tada M, Takeuchi A, Hashizume M, *Kitamura K, *Kano M. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci*. 2014 Jun;39(11):1720-8. 査読有

Kawamura Y, Nakayama H, Hashimoto K, Sakimura K, *Kitamura K, *Kano M. Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fibre inputs to Purkinje cells during cerebellar development. *Nat Commun*. 2013;4:2732. 査読有

Hashizume M, Miyazaki T, Sakimura K, Watanabe M, *Kitamura K, *Kano M. Disruption of cerebellar microzonal organization in GluD2 (GluR 2) knockout mouse. *Front Neural Circuits*. 2013 Aug 20;7:130. 査読有

Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Okuno H, Ohki K, *Bito H. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nat Methods*. 2013 Sep;10(9):889-95. 査読有

Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, *Bito H. Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII and calcineurin. *Cell Rep*. 2013 Apr 25;3(4):978-87. 査読有

*Kano M, Nakayama H, Hashimoto K, Kitamura K, Sakimura K, Watanabe M. Calcium-dependent regulation of climbing fibre synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J Physiol*. 2013 Jul 1;591(Pt 13):3151-8. 査読有

*Kitamura K, Kano M. Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. *Neural Netw*. 2013 Nov;47:11-7. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Kazuo Kitamura, Masanobu Kano. Experience-dependent clustering of sensory synaptic inputs in the somatosensory cortex. 第92回日本生化学大会 2015年3月13日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Kazuo Kitamura. Two-photon imaging of neural activity at single neuron and single synapses: Optical physiology in vivo. 第37回日本神経科学学会 2014年9月11日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Atsuya Takeuchi, Mayumi Tada, Miki Hashizume, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano. Highly sensitive calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo with a new fluorescent calcium indicator, Cal-520. 第37回日本神経科学学会 2014年9月11日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

喜多村和郎. 光で探る脳のはたらき～シナプスから回路へ～. 量子エレクトロニクス研究会 2013年12月20日. 上智大学軽井沢セミナーハウス(長野県・北佐久郡)

喜多村和郎. 小脳皮質回路の機能構築と運動制御・運動記憶. 第2回記憶回路研究会 2013年12月11日. 生理学研究所(愛知県・岡崎市)

Miki Hashizume, Taisuke Miyazaki, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano. Impairment of cerebellar microzonal organization by aberrant climbing fiber to Purkinje cell wiring in GluR2(GluD2) knockout mouse. *Neuroscience* 2013 2013年11月9日～13日. San Diego, USA

Shinichiro Tsutsumi, Maya Yamazaki, Taisuke Miyazaki, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano. Fine scale correspondence between the cerebellar microzones and the aldolase C compartments in mice. Neuroscience 2013 2013年11月9日～13日 San Diego, USA

Jean-Marc Good, Taisuke Miyazaki, Kazuo Kitamura, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Masanobu Kano. Postnatal desynchronization of climbing fiber responses in Purkinje cell populations of the developing cerebellum. Neuroscience 2013 2013年11月9日～13日 San Diego, USA

喜多村和郎 . 光で探る脳の活動～シナプスからニューロンまで～. 第22回日本バイオイメーキング学会学術集会公開講座 2013年9月14日 . 東京大学(東京都・文京区)(招待講演)

Shinichiro Tsutsumi, Mayumi Tada, Kenji Sakimura, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano. Synchronous climbing fiber responses correlated with the aldolase C compartments in mouse cerebellar cortex. Neuro2013 2013年6月20日～23日 . 京都国際会館(京都府・京都市)

Kazuo Kitamura, Masanobu Kano. Sparse and heterogeneous organization of sensory inputs in layer 2/3 of mouse barrel cortex. Neuro2013 Neuro2013 2013年6月20日～23日 . 京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 和郎 (KITAMURA, Kazuo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号 : 60423159

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし