

191. 滑らかな運動を実現する大脳 - 小脳連関の神経回路基盤

喜多村 和郎

*山梨大学 医学部 生理学講座 第2教室

Key words : 小脳, プルキンエ細胞, 運動学習, 2光子イメージング

緒言

大脳と小脳は、様々な神経核を介して連携してはたらくことで、速くて滑らかで正確な運動の制御を実現している。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や形態学によってなされてきた。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。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はたらきをしていることはよく知られており、これらの実験結果を基にした神経回路モデルについてもすでに多くの研究がなされている。しかしながら、古典的な単一細胞記録や形態学の結果を基にした理解では、それぞれの脳領域における神経活動と脳領域間の情報伝達についての知見は得られるものの、機能局在論から脱却することができず行き詰まっております。大脳 - 小脳間の動的な連関の結果として実現される運動表出および運動学習のメカニズムを局所神経回路レベルで完全に描出するまでには至っていない。本研究では、運動制御および運動学習における大脳 - 小脳連関の役割とそのメカニズムを明らかにするために、運動課題学習中のマウスにおける *in vivo* 2光子イメージングによる小脳活動の観察によって大脳と小脳の連携を明らかにし、滑らかな運動を実現する神経回路メカニズムを解明する。

方法

1. 行動課題遂行中のマウス小脳におけるプルキンエ細胞活動の2光子イメージングによる解析

2光子顕微鏡下でマウスの頭部を固定した状態で、音弁別 Go/No-go リッキング課題を可能にする課題装置を使用した (図 1a, b)。高周波 (10 kHz) の Go キューに対してリックを行うと報酬であるサッカリン水が与えられる (Hit)。低周波 (4 kHz) の No-go キューに対してリックした場合は、罰として 4.5 秒間の遅延時間が追加された (FA)。いずれのキューに対しても無反応の場合は報酬も罰も与えられない (Miss, CR)。これらの課題を行っているマウス小脳において 2光子カルシウムイメージングを行った。小脳皮質上で大脳および末梢との連関を解析するために、これらの実験は、小脳帯域を可視化できるマウス (Aldoc-tdTomato) を用い、小脳皮質における部位を厳密に同定した上で行った [1]。小脳皮質には、aldolase C (zebrinII) の発現によって同定される帯域 (ゾーン) が半球あたり 14 あり、これまでの解剖学的な研究によって、各ゾーンが大脳皮質や末梢を含むどの脳領域から入力を受け取っているかについて明らかになっている [2]。したがって、Aldoc-tdTomato マウスを用いることで、生きたマウスでゾーンを可視化することでその入力元を推定することが可能となる。

Aldoc-tdTomato マウスの小脳半球 CrusII に、カルシウムセンサーGCaMP6 をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) をあらかじめ注入し発現させた (図 1d)。この方法で観察できるプルキンエ細胞のカルシウム反応は、登上線維由来であることが我々の研究を含めた過去の研究でわかっている [3, 4]。

以上の方法を用いてプルキンエ細胞集団の登上線維応答を記録し、学習過程で登上線維シグナルがマウスの行動およびその変化に応じてどのように変化するかを解析した。特に、登上線維シグナルが運動および課題のどのような情報を表現しているのかに着目して解析を行った。

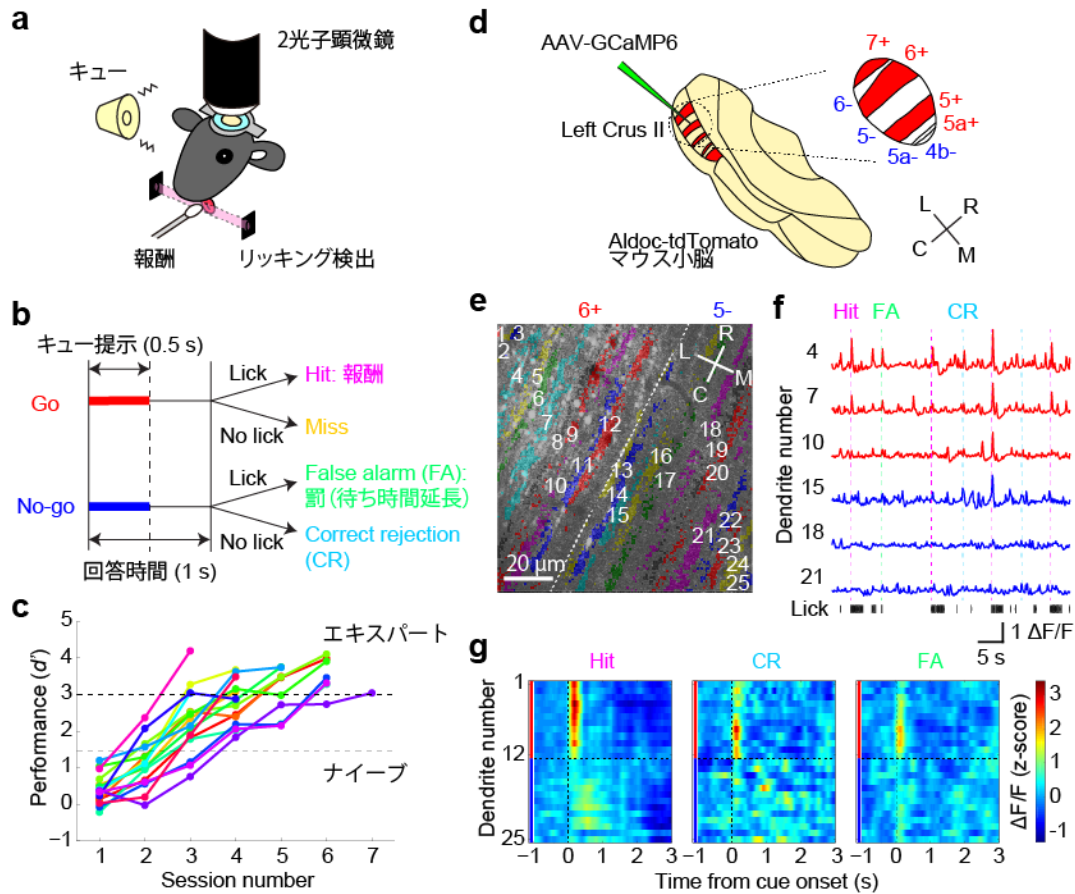


図 1. 音弁別 Go/No-go 課題学習中のマウスにおける小脳プルキンエ細胞の 2 光子イメージング
 a) 実験の模式図。b) Go/No-go 課題の流れ図。c) 学習曲線。d) イメージングした小脳部位。小脳半球 CrusII に AAV を用いて GCaMP6 を発現させた。Inset : CrusII における小脳帯域。e~g) 課題遂行中のカルシウムイメージングの例。Aldolase C 帯域の境界でイメージングを行い、反応の起こった細胞を同定した (e)。Aldolase C 発現陽性および陰性のプルキンエ細胞からのカルシウムシグナルと同時に、課題 (Hit、FA、CR) および行動 (Lick) をモニターする (f)。同一視野における試行ごとの反応を分類して平均し、各細胞の反応と課題、行動の関係を解析した (g)。

結果および考察

1. 音弁別 Go/No-go 課題の学習

まず、2 光子顕微鏡下で音弁別 Go/No-go 課題をマウスに学習させた。高域音 (10 kHz) および低域音 (4 kHz) をそれぞれ、Go キューおよび No-go キューとして提示し、Go キューに対するリッキングによる反応で報酬である水を与えた。一方、No-go キューに対する反応は、誤答に対する罰として待ち時間の延長 (4.5 秒) を課した。この課題を 1 日 1 セッション (約 300 試行) 行うことで、1 週間以内に感度指数 (d') が 3 以上 (Hit rate > 98%、Correct rejection rate > 85%) の熟練レベルに達することがわかった (図 1c)。また、課題の正答率に応じてリッキングの行動がどのように変化するかを調べたところ、正答率の向上に伴って、1) Go キュー直後にリッキングが集中し無駄なリッキングが抑制される、2) キューからリッキング開始までのタイミングのばらつきが小さくなることが観察され、正答率向上と行動の効率化が並行して起こっていることが明らかとなった。

音弁別 Go/No-go 課題における登上線維シグナルの役割を明らかにするために、リッキング運動に関わる小脳半球第 2 脚 (Crus II) において、2 光子カルシウムイメージングを行った (図 1d~g)。小脳帯域ごとの機能を調べるために、帯域構造の指標であるアルドラーゼ C の発現を生体内で可視化することのできる Aldoc-tdTomato マウス [1] を用い

た。Aldoc-tdTomato マウスの小脳プルキンエ細胞にカルシウムセンサータンパク質の GCaMP6f を AAV により発現させ、課題学習中の登上線維シグナルの変化をモニターした。麻酔下動物において観察した我々の先行研究 [1] と同様に、覚醒行動中のマウスにおいても、登上線維シグナル構造の境界が帯域構造の境界と一致していたことから、アルドラーゼ C による帯域構造が、課題実行に関する機能的構造を示していると考えられた (図 1g)。

次に、帯域毎の登上線維シグナルが課題の学習とともにどのように変化するかを解析した (図 2)。主に大脳とのループを形成していることが分かっている半球外側部の帯域のうち、アルドラーゼ C 陽性の帯域 (Lat+) においては、Hit 試行において Go キューに対して顕著な反応が観察され、学習の進行とともにこれらの反応は増強された。一方、False alarm (FA) 試行においては、学習初期にアルドラーゼ陽性および陰性 (Lat-) 帯域の両方において強い反応が観察されたが、これらの反応は学習に伴って減弱した。また、主に末梢からの感覚入力を受けていると考えられる内側部 (Med) では、リッキングに対応した反応が観察された。これら内側部の反応は反応時間が遅く、感覚フィードバック情報を表していると考えられた。

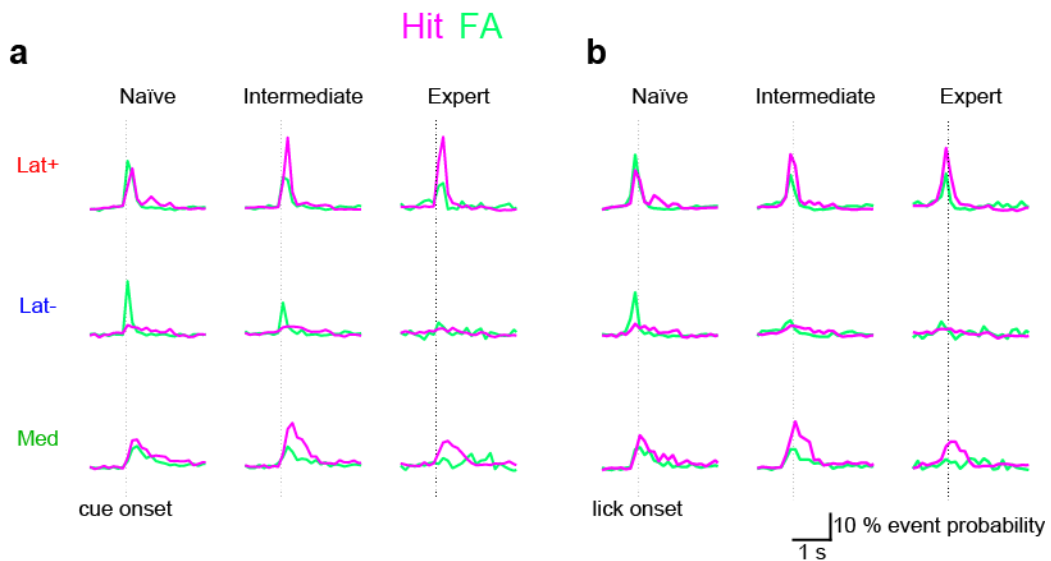


図 2. 学習過程による小脳帯域ごとの登上線維シグナルの変化

a) キューおよび b) リック開始にそって平均した登上線維シグナルの変化。Hit 試行のときは、Aldolase C 陽性の帯域 (b) において、学習に伴ってシグナルが増強する。FA 試行では、学習初期 (Naive) において強い反応が見られるが学習の進行とともに反応は減弱する。内側部 (Med) ではおもにリッキングに相当する反応が見られた。

登上線維入力の同期性が、運動開始や運動学習に重要であることから、我々は次に、学習過程における登上線維シグナルの同期性の変化を解析した。まず、外側部のアルドラーゼ C 陽性帯域では、Hit 試行および FA 試行においてリッキングの直前に同期性がピークとなることから、リッキング開始に関係していることが考えられた。学習初期においては、同期的な登上線維シグナルとリッキング開始のタイミングには相関が見られたことから、学習過程で同期的な登上線維シグナルが運動開始に必要であると考えられた。しかしながら、学習後期ですでに運動に熟練した段階では、このような相関は見られなかったことから、外側部アルドラーゼ C 陽性帯域における登上線維シグナルは、Go キューに反応して運動を開始するタイミングの学習に重要であることが示唆された。

帯域ごとの登上線維シグナルが、課題学習におけるどのような情報を表現しているのかを明らかにするために、集団活動の機械学習によるデコーディング解析を行った。外側部アルドラーゼ C 陽性帯域においては、学習に伴って Go キューの表現が上昇するのに対して、リッキングに関する表現は高いままあまり変化しなかった。また、外側部アルドラーゼ C 陰性帯域では、学習初期における FA 試行の表現が学習の進行とともに減少した。一方、内側部の帯域では学習過程を通してリッキングに関する表現が高く、課題やキューに関する情報表現は、ほとんど見られなかった。次に、単一プルキンエ細胞における登上線維シグナルの学習過程における変化を調べるために、単一細胞によるデコーディング解析を行った。その結果、外側部アルドラーゼ C 陽性帯域にあるプルキンエ細胞への登上線維シグナルは、学習初期

においてリッキングやNo-go キューの情報を表現しているが、学習の進行に伴い徐々にGo キューの表現に変わること、外側部アルドラーゼ C 陰性帯域では、初期の No-go キューに対する表現が徐々に消失すること、内側部の帯域では一貫してリッキングの情報を表現していることが明らかとなった。

本研究により、アルドラーゼ C の発現によって規定される小脳帯域が、高度な認知運動課題の学習において異なる役割を果たしていることが明らかとなった。外側部アルドラーゼ C 陽性帯域は、ターゲットとなる行動の開始に重要であることが示唆される。これらの帯域における登上線維入力の頻度および同期性はリック開始直前にピークとなり、特に学習初期において同期性とリッキング開始の相関が高くなることから、Go キューに対して運動を開始するタイミングの学習に必要であると考えられる。また、これらの帯域では、学習の進行に伴ってGo キューの表現が増加する一方でNo-go キューの表現が減少することから、音刺激に対する選択的注意または判断のシグナルを伝えているとも解釈できる。一方で、外側部アルドラーゼ C 陰性帯域においては、学習初期におけるEA 試行つまり目標外のキューに対するエラー行動のときのみ登上線維が入力し、学習の進行に伴ってこれらのシグナルは消失する。従って、これらの帯域においては、登上線維シグナルは誤った行動を抑制するために必要なフィードバック誤差情報を表現していると考えられる。内側部の帯域においては、学習の過程で一貫してリッキング行動後の遅いタイミングで登上線維シグナルが入力しており、これらのシグナルは感覚フィードバック情報を表現していると考えられる。これらの結果を総合すると、小脳においては認知・運動・感覚の情報が脳皮質および末梢から異なる帯域に入力して同時に処理されることで、高度に統合された行動学習が実現されていると言える。今回開発した方法を用いることで、小脳皮質における運動および高次機能を系統的に解析できると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科神経生理学研究室の堤新一郎博士(当時)および狩野方伸教授である。

文 献

- 1) 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.
- 2) Sugihara I, Quy PN. Identification of aldolase C compartments in the mouse cerebellar cortex by olivocerebellar labeling. *J Comp Neurol.* 2007 Feb 20;500(6):1076-92. PMID:17183552
- 3) Miyakawa H, Lev-Ram V, Lasser-Ross N, Ross WN. Calcium transients evoked by climbing fiber and parallel fiber synaptic inputs in guinea pig cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol.* 1992 Oct;68(4):1178-89. PMID:1359027
- 4) Kitamura K, Häusser M. Dendritic calcium signaling triggered by spontaneous and sensory-evoked climbing fiber input to cerebellar Purkinje cells in vivo. *J Neurosci.* 2011 Jul 27;31(30):10847-58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2525-10.2011. PMID:21795537