

## 山梨県若手研究者奨励事業費 研究成果報告書

所属機関 山梨大学 大学院総合研究部

医学域 生理学講座 神経生理学教室

職名・氏名

真仁田 聡



### 1 研究テーマ

小脳回路による運動学習機構の解明

### 2 研究の目的

これまでに前庭動眼反射などの反射運動と小脳の関係は詳細に研究され、プルキンエ細胞へ入力する登上線維がエラー情報を運ぶことが示されているが、より複雑な運動については明らかでない。本研究は、

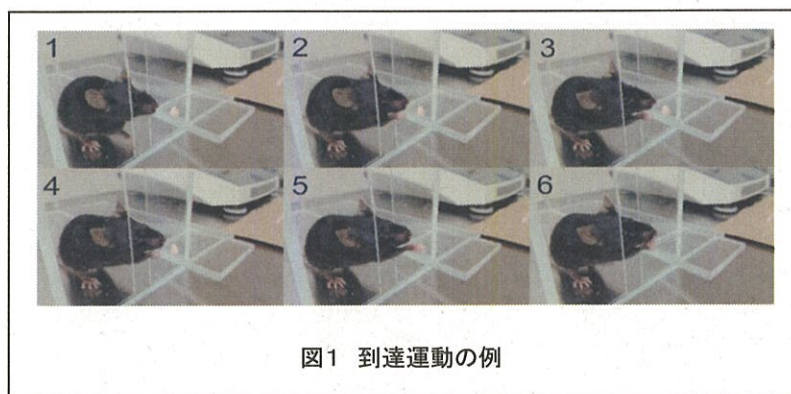


図1 到達運動の例

前肢到達運動中の神経活動を詳細に観察し、その神経回路メカニズムを明らかにするために必要な頭部固定下におけるマウスを用いた到達運動課題の開発を目的とした。

### 3 研究の方法

マウスは前肢を用いて目の前に配置してあるエサまで手を伸ばし、エサをつかみ、口まで運ぶことができる(図1)。この到達運動中の小脳の神経活動をホールセル記録法や二光子レーザー顕微鏡によるカルシウムイメージング法などによって観察するために、マウスの頭部固定下においてこの運動を遂行させるための実験系を確立する。まず、頭蓋骨に歯科用セメントを用いて頭部固定のための金属片を取り付ける。手術の回復を経た後、頭部固定下において訓練させることで、顕微鏡下での前肢到達運動を可能にする。

### 4 研究の成果

#### 1. 自動で報酬が提示される装置の開発とその性能評価

報酬提示装置(大きさ:幅50cm×奥行22cm×高さ40cm)を作製した。報酬は水に2%アガロスを溶かした溶液を固まらせたもの(5mm<sup>3</sup>アガーブロック)を用いた。このアガーブロックを作製するために、まず、アクリル板で作製された型にアガー溶液

を流し込み、棒状のアガーを作った。次にこの棒状のアガーを二つの押し出し器によってブロック状に切り出し、マウスの手前に提示できるよう配置した。押し出し器の動力にはステッピングモーターとサーボモーターを用いた。それぞれのモーターはマイクロコントローラー(Arduino)によって制御されるように設計した(図2 A)。また、マウスの行動をモニターするための2台のカメラの制御器もこのマイクロコントローラーによって制御できるようにした。これらによりアガースティックの提示とマウスの行動記録のタイミングを同期させることができる(図2 B)。

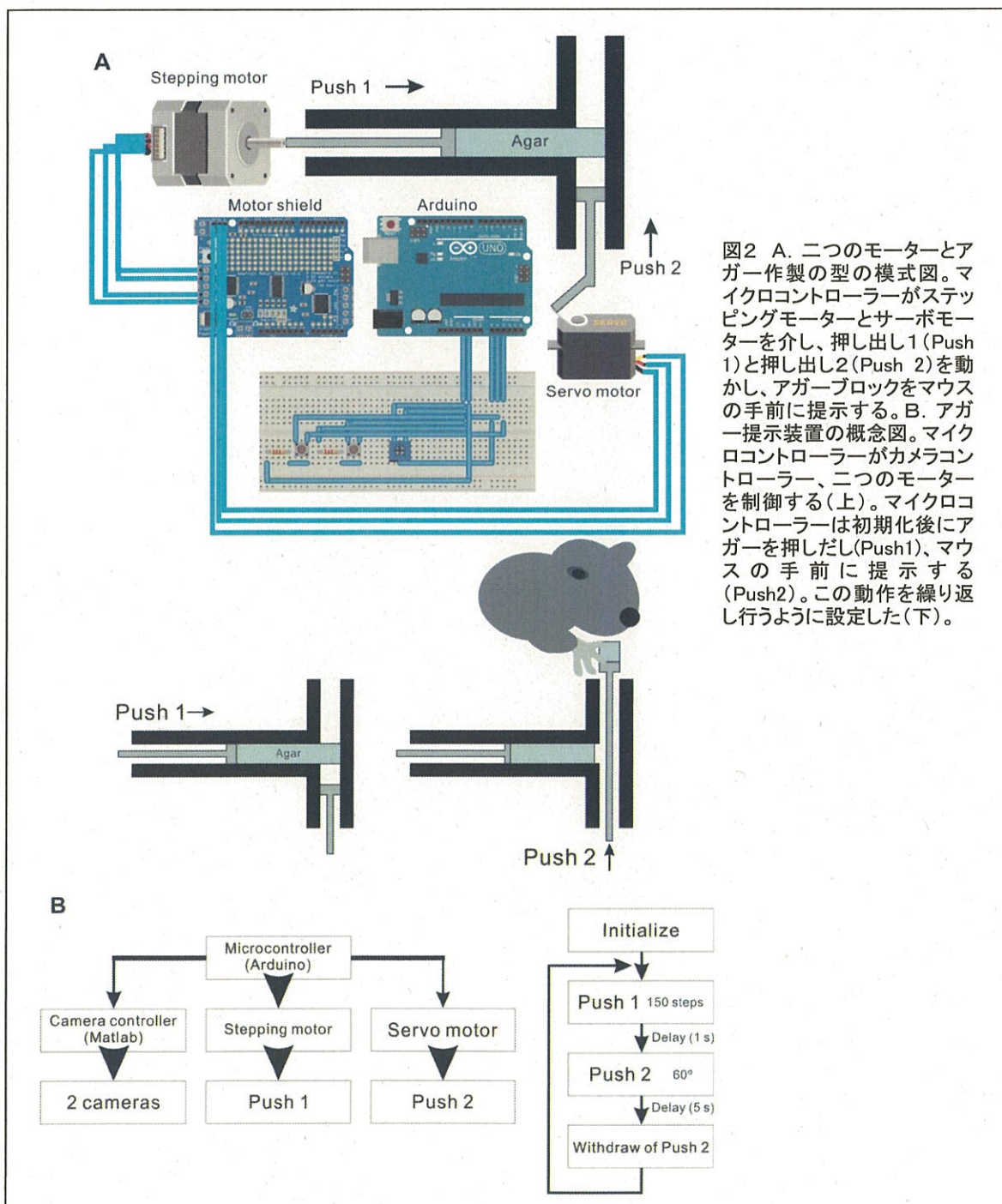


図2 A. 二つのモーターとアガー作製の型の模式図。マイクロコントローラーがステッピングモーターとサーボモーターを介し、押し出し1(Push 1)と押し出し2(Push 2)を動かす、アガースティックをマウスの手前に提示する。B. アガースティック提示装置の概念図。マイクロコントローラーがカメラコントローラー、二つのモーターを制御する(上)。マイクロコントローラーは初期化後にアガースティックを押しだし(Push1)、マウスの手前に提示する(Push2)。この動作を繰り返し行うように設定した(下)。

図3に実際の装置の写真を示す。

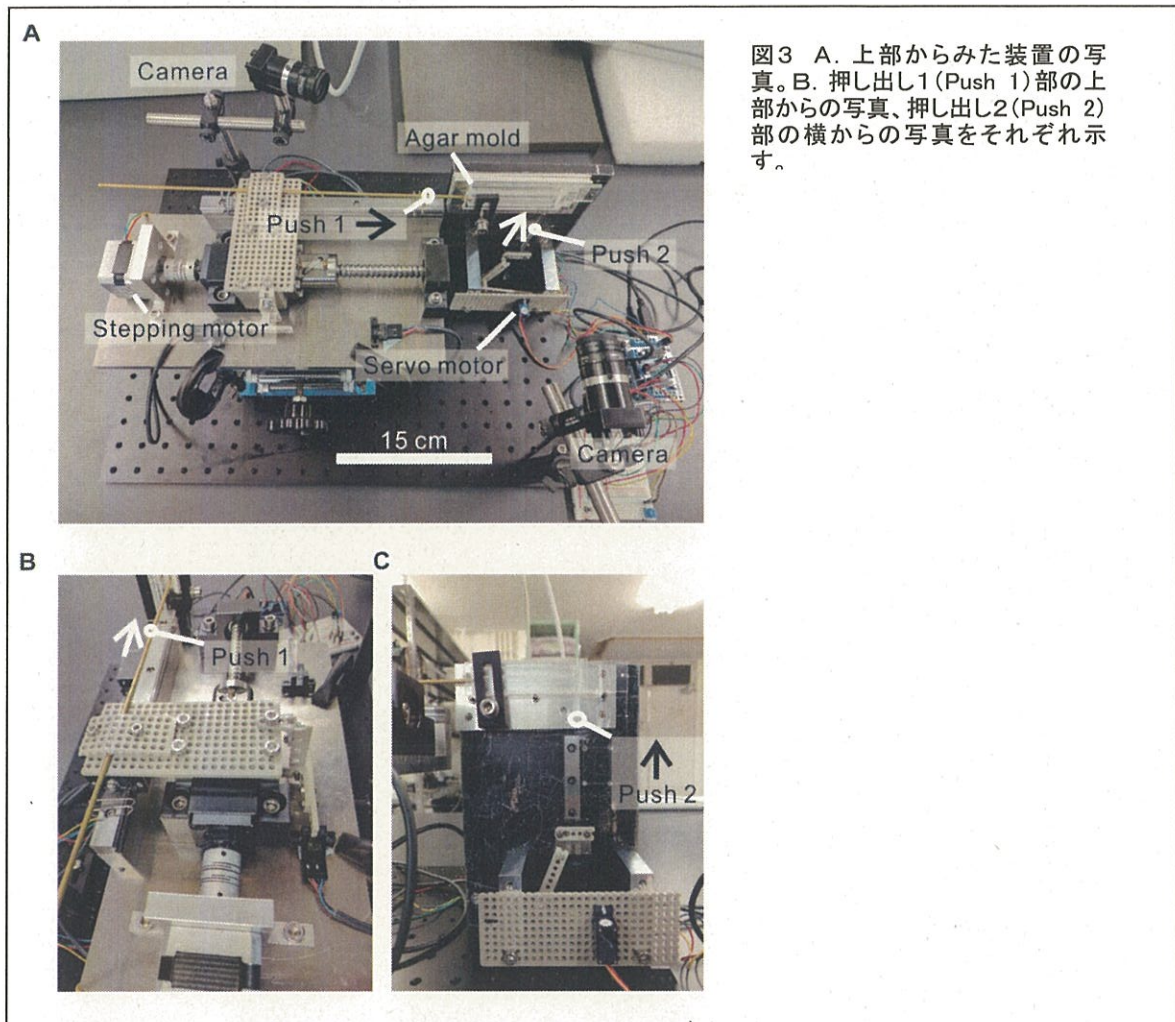


図3 A. 上部からみた装置の写真。B. 押し出し1(Push 1)部の上部からの写真、押し出し2(Push 2)部の横からの写真をそれぞれ示す。

次に、アガー作製・提示装置によって作製されるアガーブロックの重さや提示位置のばらつきを検討した。アガーを作製する型ひとつにつき、連続的に16-18個のアガーブロックを作ることができた(図4A)。この型を使って一度に連続的に作られるアガーブロック群を以下「セット」と呼ぶ。この装置によって作製されるアガーブロックの重さは、平均59.23mg、標準偏差5.83mgとなった(N=6セット、102個のアガーブロック、図4B)。データの中には平均からかけ離れている重さのアガーブロックが含まれていたが、これはアガー作製時に泡が入ってしまったために重さが軽くなったためであった。

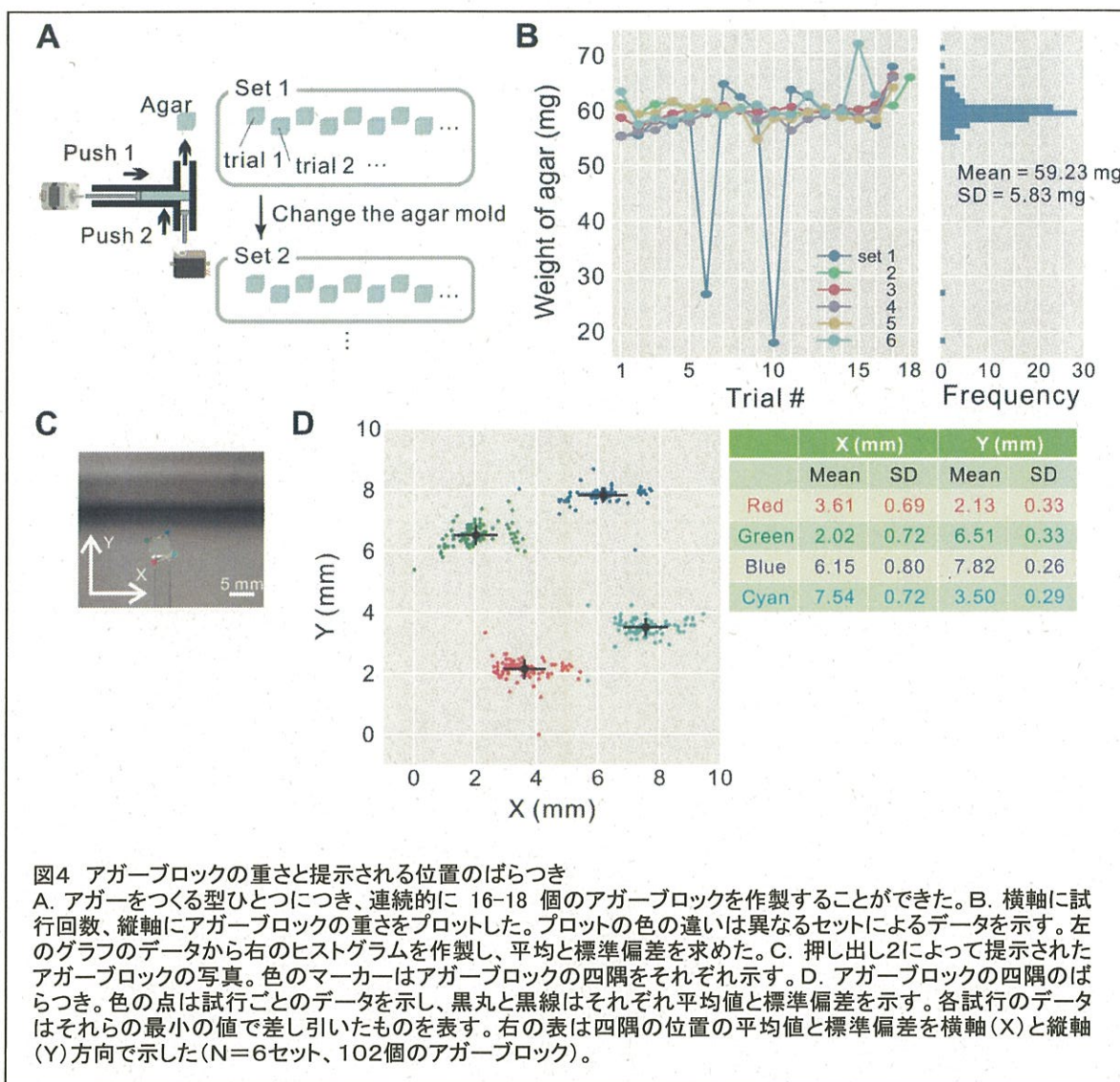


図4 アガーブロックの重さと提示される位置のばらつき

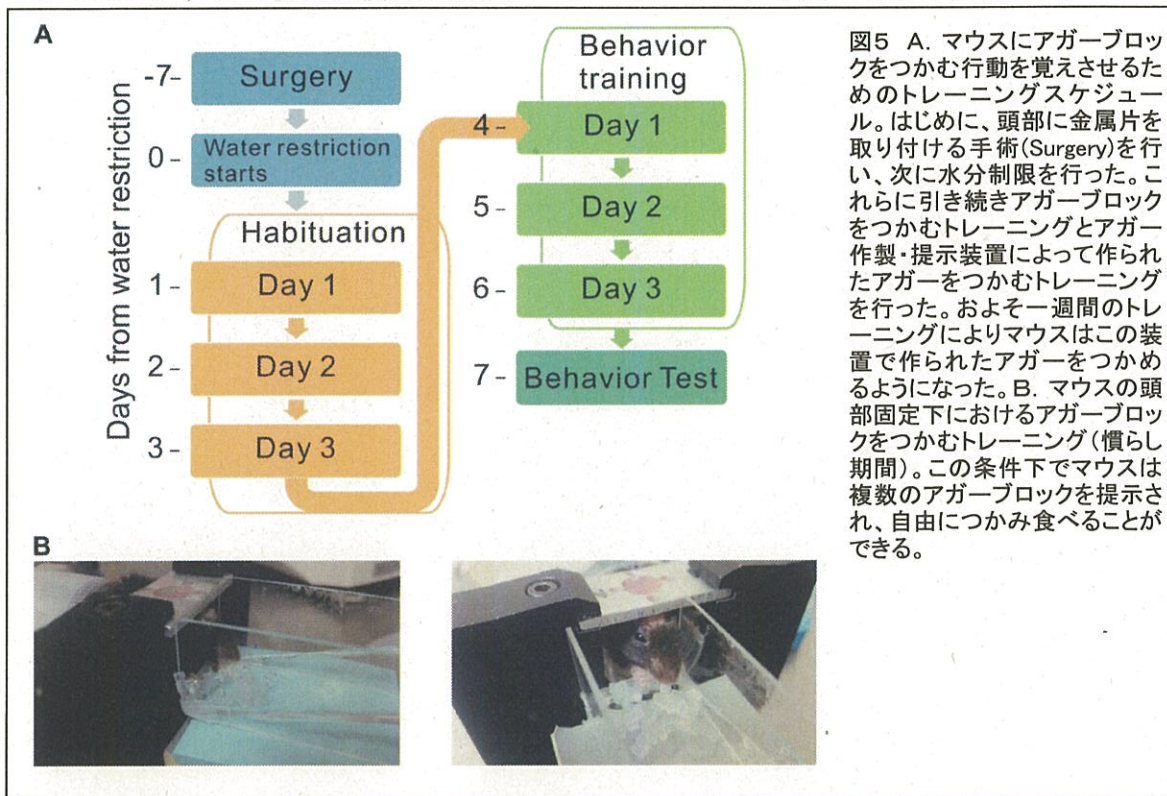
A. アガーをつくる型ひとつにつき、連続的に 16-18 個のアガーブロックを作製することができた。B. 横軸に試行回数、縦軸にアガーブロックの重さをプロットした。プロットの色の違いは異なるセットによるデータを示す。左のグラフのデータから右のヒストグラムを作製し、平均と標準偏差を求めた。C. 押し出し2によって提示されたアガーブロックの写真。色のマーカーはアガーブロックの四隅をそれぞれ示す。D. アガーブロックの四隅のばらつき。色の点は試行ごとのデータを示し、黒丸と黒線はそれぞれ平均値と標準偏差を示す。各試行のデータはそれらの最小の値で差し引いたものを表す。右の表は四隅の位置の平均値と標準偏差を横軸(X)と縦軸(Y)方向で示した(N=6セット、102個のアガーブロック)。

次に、提示されるアガーブロックの位置のばらつきを検討するために、固定カメラで提示されたアガーブロックを撮影し、その四隅の位置を測定した (図 4 C)。四隅の位置の標準偏差は最大 0.80mm であった (図 4 D)。これらの結果より、本研究で作製したアガー作製・提示装置によって作られるアガーブロックは重さ 6mg (標準偏差) の精度で、また 1mm 以下 (標準偏差) の精度で提示できることが分かった。

## 2. マウスに到達運動を行わせるためのトレーニング法の検討

上記のアガー作製・提示装置を用いてマウスに到達運動を行わせるために、マウスの到達運動トレーニング法を検討した。まず、マウスの頭部を固定するための手術を行った。麻酔下で皮膚を取り除き、頭蓋骨を露出させアルミニウムの金属片を歯科用セメントで頭蓋骨に接着させた。この金属片を金属製の治具で固定することでマウスの頭部を固定することができる。次に、この手術より一週間の回復期を設け、その後マウスが摂取す

る水分を制限した (Water restriction starts、図 5 A)。これによりマウスは水分が  
 足らず水分を欲する状態になる。極度に水分が減らないようにマウスの体重を毎日測定  
 し、必要に応じて水分を与えた。次に、覚醒下のマウスを頭部固定し、2%アガーブロッ  
 クを複数個同時に与えた (図 5 B)。マウスは節水により水分を欲しているため、2%ア  
 ガーブロックを前肢でつかみ、食べるようになる。この作業を慣らし (Habituation)  
 期間とし、3日間繰り返した。これによりマウスは頭部固定状態になると報酬としてア  
 ガーブロックを得ることができると学習する。実際に慣らし期間当初はなかなか食べな  
 かったのが、3日後には積極的にアガーブロックをつかみ食べるようになった。

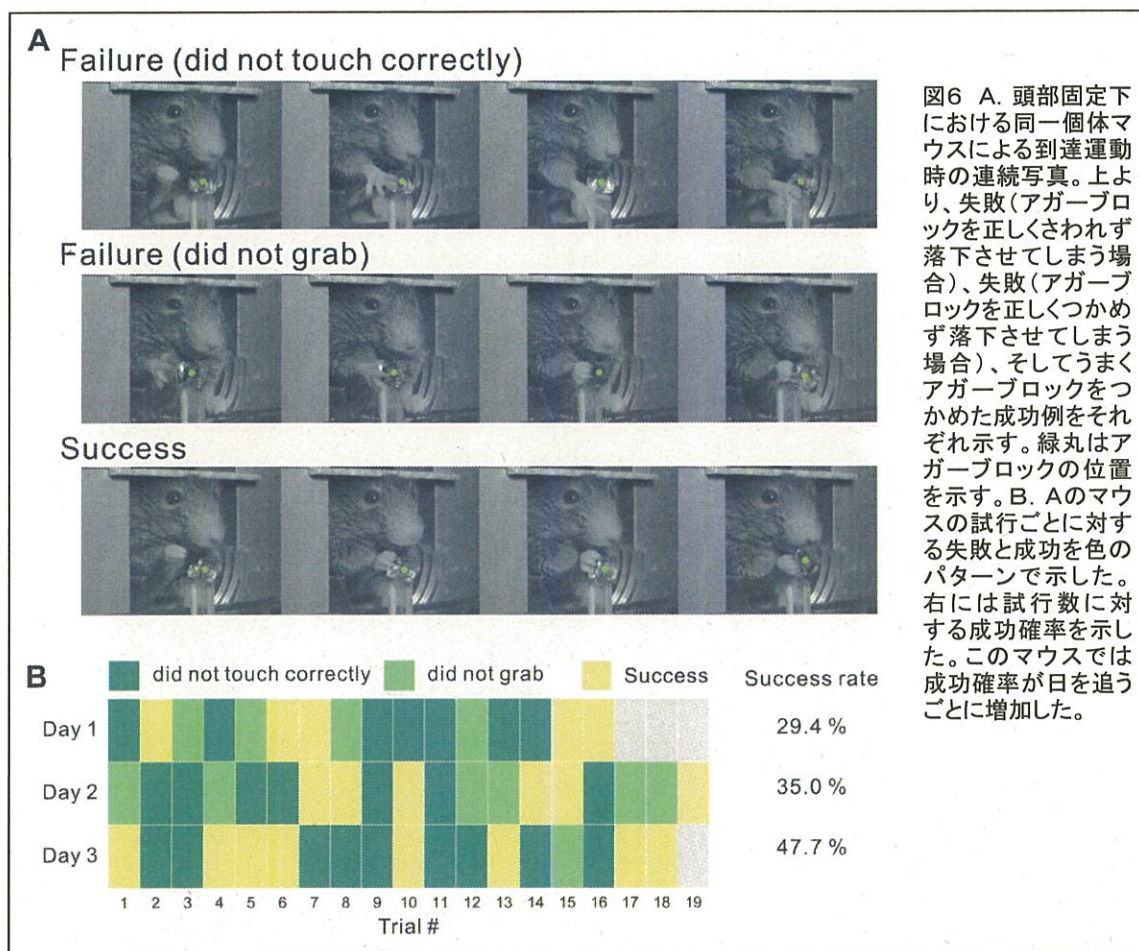


慣らし期間の次に、行動トレーニング期間を設定した。この期間では上記で記述したア  
 ガー作製・提示装置を用いて一個のアガーブロックをマウスに提示し、それをつかむよ  
 うに訓練した。およそ3日間の訓練によってマウスは前肢でアガーブロックをつかむよ  
 うになった。これら一連のトレーニングによりおよそ一週間でマウスは頭部固定下にお  
 いてもアガー作製・提示装置で作られたアガーをつかめるようになった。

### 3. 到達運動の観察

本研究で作製したアガー作製・提示装置を用いてマウスの到達運動を観察した (図 6)。  
 マウスはトレーニングにより頭部固定下で提示されたアガーをつかむことができるも  
 のを用いた。マウスの行動には、アガーブロックをうまくつかめず、アガーブロックを  
 落下させてしまう場合 (失敗 : Failure) とうまくつかめた場合 (成功 : Success) が観

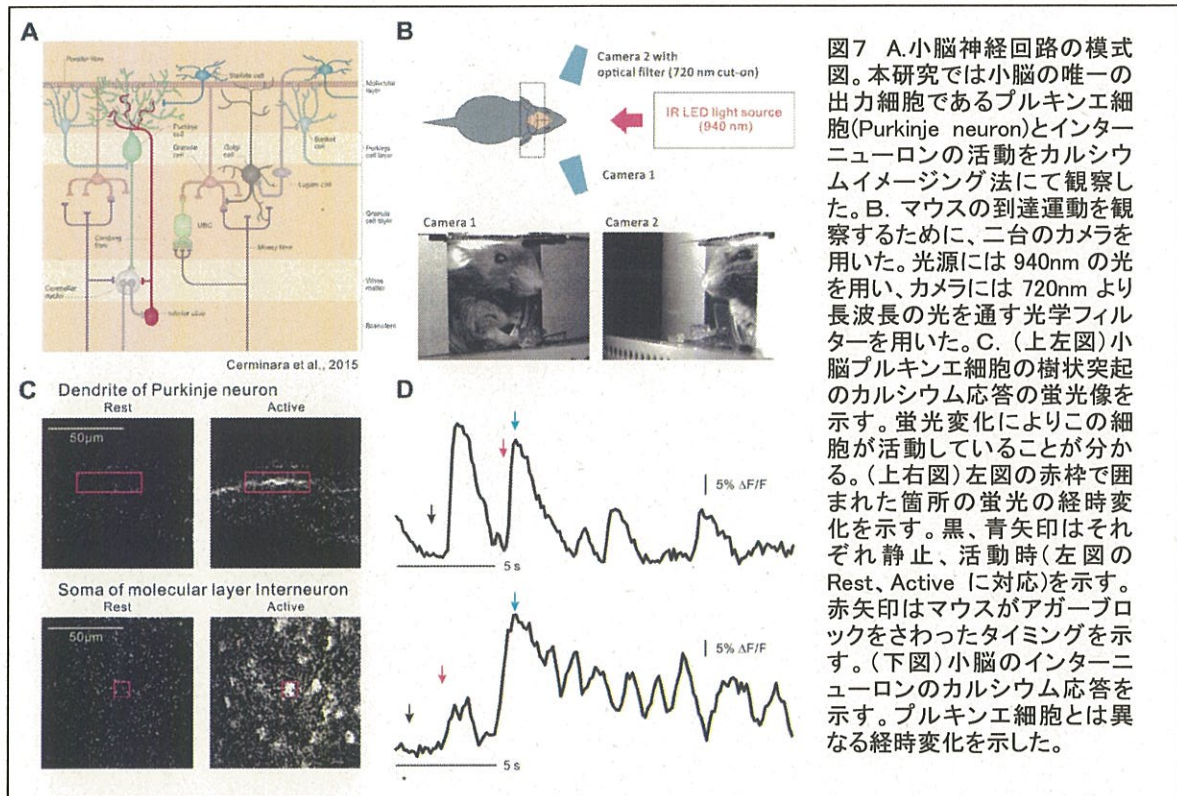
察された。失敗の場合にはさらに①アガーブロックを正しくさわれず、落下させてしまう場合と②アガーブロックを正しくさわれたが、その後アガーブロックを正しくつかめず落下させてしまう場合の2種類の場合が観察された (図6 A)。1マウスにおける到達運動の失敗・成功をもとに、試行数に対する成功確率を1日あたりで求めると、1日目：29.4%、二日目：35.0%、三日目：47.7%であった (図6 B)。今後、この成功確率の増加に再現性があるかを検討するために、さらにマウスの数を増やして検討を行う。



#### 4. 到達運動中の神経活動の観察

神経細胞が活動すると、細胞内のカルシウム濃度が変化し様々な生化学的な応答が誘導される。そのため、このカルシウム濃度変化を測定することで神経活動を観察できる。これまでに神経細胞内のカルシウム変化を測定するために、カルシウム蛍光タンパク質を用いたカルシウムイメージング法が確立されてきた。そこで、到達運動中の脳活動を観察するために、GCaMP3というカルシウム蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスと二光子レーザー顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを行った。二光子レーザー顕微鏡を用いることで脳深部の神経細胞の蛍光変化を測定することができる。観察する脳部位は到達運動のような精密な運動制御に関連すると言われている小脳とした。小脳

は解剖学的構造が比較的単純であるため、観察される神経活動がどの神経細胞由来であるかを特定しやすい。トレーニングにより到達運動を行うことができる GCaMP3 マウスの頭蓋骨を手術により除去することで小脳を露出させた。このマウスの小脳のプルキンエ細胞の樹状突起からカルシウム変化に伴う蛍光変化を測定した。3次元空間における前肢の動きを定量するために、2台のカメラによって前肢の動きを記録した(図7B)。画像は1秒間に100-200枚取得する条件で行った。マウスが到達運動を行っている際にプルキンエ細胞のカルシウム応答が観察された。さらに小脳の分子層とよばれる部位に存在するインターニューロンの活動も到達運動中に変化することが明らかになった(図7C、D)。今後、前肢の動きとこれらの神経活動とのより詳細な相関関係を検討し、到達運動の実現に必要な小脳神経回路を特定する。



## 5 まとめ・今後の展望

本研究では、① アガーブロックを作製・提示する装置を開発した。② その装置を用いて重さ6mg(標準偏差)、1mm以下(標準偏差)の精度でアガーブロックを提示することができるようになった。③ マウスが1週間でアガーブロックを前肢でつかめるトレーニングを確立した。④ マウスの到達運動をカメラで測定し、アガーブロックをつかめなかった場合や、つかめた場合の行動を解析できるようになった。⑤ 到達運動中のマウスの小脳活動を測定できるようになった。

今後、以下の内容で本研究を発展させる。

- ① より詳細に到達運動中の前肢の動きを定量する。2台のカメラによって測定された前肢の連続画像から、腕や手のひらの位置、速度、加速度を求める。これらのパラメータが到達運動の成功、失敗時に規則的な違いがあるか検討する。例えば失敗時には手の速度が成功時と比べて速いといったことが予想される。また、同じ条件で到達運動を練習させ、十分成功率が高くなった後、アガブロックの大きさや固さ、提示される場所を変えると到達運動の成功率やこれらのパラメータに変化が見られるか検討する。
- ② 前肢の動きのパラメータと神経活動の相関を検討する。本研究でも示したように、到達運動中にカルシウムイメージング法により神経活動を観察することができるので、その神経活動から前肢の動きを予測できるか検討する。観察対象の神経細胞もプルキンエ細胞やインターニューロンだけでなく、小脳回路を構成する他の神経細胞にも注目する。
- ③ 大脳皮質運動野の神経活動を抑制すると運動ができなくなり、また活動を促進すると運動が誘起されることから、運動野はより直接的に筋肉へ運動情報を送っていると考えられている。さらに精密な運動には運動野や小脳との相互的な情報のやりとりが重要であると考えられている。そこで到達運動中に小脳と運動皮質の活動を同時に観察し、前肢の動きのパラメータと小脳・運動皮質の活動との相関も検討する。すでに予備的実験により同時にこれらの脳部位から神経活動を観察することに成功している。今後の研究により到達運動における小脳・運動野の神経回路メカニズムを明らかにできるよう挑戦したい。

## 6 研究成果の発信方法（予定を含む）

本研究は、2017年3月28日～30日に開催された第94回日本生理学会大会（アクトシティ浜松、静岡）にて発表された。

タイトル「頭部固定下におけるマウスを用いた到達把持運動課題の開発」

著者：真仁田 聡，池添 貢司，喜多村 和郎

所属：山梨大・神経生理

発表形式：ポスター発表

また、本研究は2017年7月20日～23日に開催予定の第40回日本神経科学大会（幕張メッセ、千葉）にて発表される。

タイトル：「マウス到達把持運動における小脳活動の観察」

著者：真仁田 聡，池添 貢司，河口 大洋，喜多村 和郎

所属：山梨大・神経生理

発表形式：ポスター発表