

マウス大脳皮質運動野における領野間結合と運
動方向選択性の解析

大久保 文貴

博士（理学）

総合研究大学院大学
生命科学研究科
基礎生物学専攻

平成29（2017）年度

論文題目 マウス大脳皮質運動野における領野間結合と
運動方向選択性の解析

総合研究大学院大学

生命科学研究所 基礎生物学専攻

大久保 文貴

目次	
表紙	1
目次	2
概要	4
第 I 章 緒言 - 総論	7
第 II 章 マウス運動領野間の機能的結合の同定	12
1. 緒言	12
2. 方法	
2.1. 動物実験	14
2.2. 皮質内微小電気刺激法 (ICMS)	14
2.3. ウイルス注入	15
2.4. 光遺伝学的手法を用いた機能的投射の同定 (Optogenetic Tracing)	15
2.5. AAV-ChR2-EYFP 陽性神経細胞の免疫染色	17
2.6. コレラトキシンサブユニット B を用いた逆行性蛍光標識	17
2.7. データ解析	19
2.8. 統計	19
3. 結果	
3.1. 皮質内微小電気刺激による RFA と CFA の位置同定	20
3.2. 光遺伝学的手法による皮質神経細胞の光刺激	20
3.3. 光遺伝学的手法による RFA・CFA 間の機能的投射の同定	27
3.4. 順行性・逆行性標識による RFA・CFA 間の解剖学的投射の同定	31
4. 考察	
4.1. 光遺伝学を用いた機能的投射の同定 (Optogenetic tracing)	38
4.2. RFA と CFA の間の層特異的な投射様式	39
4.3. RFA・CFA 間の伝導遅延	41
4.4. まとめ	42
第 III 章 マウス運動野における運動方向選択性の解析	43
1. 緒言	43
2. 方法	

2.1. 動物実験	50
2.2. 開頭手術とアデノ随伴ウイルスの注入	50
2.3. レバー引き／押し運動課題	51
2.4. 2光子イメージング	55
2.5. 画像データ処理と方向選択性指標の定義	55
3. 結果	
3.1. レバー引き／押し運動課題の学習	57
3.2. レバー引き／押し運動課題遂行中の CFA 第 II/III 層における 2 光子カルシウムイメージング	60
4. 考察	65
第IV章 考察 - 総論	68
引用文献	72
謝辞	86

概要

随意運動は脳の多数の神経細胞の協調的な活動により生成される。個体が随意運動を行うとき、運動の準備・実行といった異なる段階で、脳の複数の領域において特異的に活動を変化させる神経細胞が見出されている。また随意運動は方向・力・速度など様々なパラメータを持ち、これらの情報もまた脳の複数の領域で神経細胞の活動と関連していることが知られている。個体が企図した運動を発現させるためには、運動開始前から実行時に、複数の脳領域が細胞レベルで協調して活動を維持しつつ、これからどのような運動を行うかという情報を領域間で適切に受け渡す必要があると考えられる。随意運動時のこれらの脳領域の協調については、主にサルを用いた電気生理学の実験によりこれまで調べられてきたが、そのような方法においては課題関連活動を示す細胞の入出力様式・大脳皮質層構造との関係・空間分布・細胞種を明らかにするといったことは、電気生理学的方法論の限界もあり殆ど顧みられてこなかった。

本研究では、これらのことを明らかにするため、近年神経科学にもたらされた、2光子励起顕微鏡を用いたイメージング・光遺伝学といった新しい方法論を用いることとした。随意運動中の動物の大脳皮質運動野で *in vivo* 2光子カルシウムイメージングを行い、多細胞の活動を同時に単一細胞レベルで記録することで、課題関連細胞の入出力様式・層構造との関係・空間分布・細胞種を明らかにすることが可能になると考えた。また、光遺伝学的方法論により層特異的・細胞種特異的に神経活動を制御して、その活動がどのように領野間の協調的活動に寄与するかを調べることを考えた。対象とする動物には、これまでのサルを用いた研究の知見と照らし合わせつつ、分子生物学的方法論を最大限に活用するために、遺伝子工学的操作の容易なマウス (*Mus musculus*) を用いることとした。

本研究では第一に、随意運動時の領野間協調に必要な2つの運動領域間の機能的投射を明らかにすることを目的とした。げっ歯類の脳皮質には2つの分離した前肢運動領野が存在し、吻側前肢領域 (rostral forelimb area; RFA) ・尾側前肢領域 (caudal forelimb area; CFA) と呼ばれている。げっ歯類が前肢を用いて到達・把持・レバー引きといった運動を行うとき、RFA と CFA は良く似た神経活動を示すことが知られている。このように領野間で活動が協調するためには、RFA と CFA の機能的結合が重要な役割を果たすと考えられるが、RFA ・ CFA 間の領野間結合が、生体において一方の領域からのシナプス入力他方の領域の活動（発火）に寄与する機能的結合であるかどうかは調べられてこなかった。そこで本研究では、Channelrhodopsin-2 (ChR2) をマウス脳皮質に発現させ脳皮質の広範囲を網羅的に光刺激して他領域で活動電位応答を記録することで機能的シナプス入力を調べるマッピング法 (Optogenetic Tracing) を開発し、RFA ・ CFA 間の機能的投射を同定した。これにより RFA と一致する領域の第 Vb 層から、活動電位応答を記録している CFA 第 V 層へ機能的シナプス入力があること、他方で CFA から RFA へは第 Vb 層からの機能的シナプス入力はなく上層の第 II/III 層・第 Va 層から機能的シナプス入力があることを見出した。これらの結果が、逆行性蛍光標識・順行性蛍光標識を用いて調べられた解剖学的結合様式と一致することを確かめた。

本研究では第二に、「どこへ前肢を動かすか」といった運動方向の選択性（運動情報）が複数の脳領域間の協調の中でどのように表現され実際の運動に結びつくのかを解明するために、2光子カルシウムイメージングで運動方向選択性活動を示す神経細胞を同定することを目的とした。まずマウスに頭部固定状態で引き方向（＝尾側方向）の前肢運動を学習させたのち、反対方向（押し＝吻側方向）の前肢運動と引き運動をセッション内で交互に行わせる課題に切り替

えることで、2方向の前肢随意運動課題を学習させることに成功した。2方向の運動を学習したマウスのCFAで2方向の前肢運動を遂行中に2光子多細胞カルシウムイメージングを行い、イメージングされた各細胞についてその活動の運動選択性指標を算出することを可能とした。

本研究により、マウス大脳皮質運動野において神経細胞の運動方向選択性活動を2光子イメージングで同定することが初めて可能となった。今後はこの方法論を用いて、運動方向選択性活動を示す細胞について、他領野からの入出力様式・細胞種・層・空間分布・学習過程との関連を明らかにしていくことが必要である。特に、RFA・CFAの方向選択性活動の分布・割合を明らかにしつつ、両領域の間で、他方に投射する神経細胞や、他方からの投射を受ける神経細胞での方向選択性を調べることで、領野間の協調が随意運動の企画・実行にどのように関わるかを明らかにしていくことが必要である。

第 I 章 緒言 - 総論

随意運動は脳の多数の神経細胞の協調的な活動により生成される。大脳運動皮質、大脳基底核などでは随意運動時に、運動の準備・実行といった異なる段階で特異的に活動を変化させる神経細胞が存在する。中でも運動準備時に発火する細胞は運動の開始より数百 msec 前あるいは1秒以上も前から活動を増大させるものもあることが、サルの電気生理学的研究によって明らかにされており、一次運動野で観察される (Tanji & Evarts, 1976; Okano & Tanji, 1987; Isomura et al., 2009) ほか、補足運動野 (Tanji et al., 1980; Kurata & Wise; 1988; Alexander & Crutcher, 1990)・運動前野 (Kubota & Hamada; 1978; Wise & Mauritz; 1985)・前頭前野 (Fuster, 1973; Kubota & Funahashi, 1982)・頭頂葉 (Crammond and Kalaska, 1989; Requin et al., 1990)・大脳基底核 (Alexander, 1987; Schultz & Romo, 1992) でも観察される。また随意運動は方向・力・速度など様々なパラメータを持ち、これらの情報もまた脳の複数の領域の神経活動と関連していることが知られている。特に前肢運動については電気生理学的研究において特定の方向に運動をするときに選択的に活動する神経細胞 (方向選択性細胞) が、サルの一次運動野 (Georgopoulos et al., 1982)・運動前野 (Caminiti et al., 1990; Fu et al., 1993; Stevenson et al., 2012)・補足運動野・体性感覚連合野 (Kalaska et al., 1983; Johnson et al., 1996)・視床 (Inase et al., 1996)・淡蒼球 (Turner & Anderson, 1997)・小脳 (Fortier et al., 1989) などで見出されている。個体が企図した運動を発現させるためには、運動開始前から実行時に、これらの脳領域が細胞レベルで協調して活動を維持しつつ、これからのような運動を行うかという情報を領域間で適切に受け渡す必要があると考えられる。随意運動時のこれらの脳領域の協調については、準備活動のタイミングを比較することで、準備活動は補足運動野、線条体の順に現れる (Schultz &

Romo, 1992)ことが示されたり、準備活動細胞を同定した上で他領域の電気刺激によりその細胞の入出力領域を調べることで、一次運動野の準備活動細胞の多くは補足運動野からの入力を受ける (Aizawa & Tanji, 1994)ことが示されたりしている。

しかしこれらのサルを用いた実験では技術的な制約が強く、細胞の課題関連活動と入出力様式との関係性を系統的に調べることはできない。また、準備活動などの課題関連性とその細胞の細胞種・層との関係や空間分布の様式にいたっては従来の電気生理学的方法論の限界もあり、殆ど顧みられてこなかった。

しかし近年、2光子励起顕微鏡を用いたイメージング・光遺伝学といった新しい方法論が神経科学にもたらされたことにより、上記の従来の方法論的限界は、解決しうる問題になりつつある。*in vivo* 2光子イメージングでは、カルシウム感受性蛍光色素またはカルシウム感受性蛍光タンパク質を用いた麻酔下小動物或いは覚醒行動下小動物で多細胞の活動を同時に単一細胞レベルで記録することが可能になっている (麻酔下 : Stosiek et al., 2003; Ohki et al., 2005; Kerr et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2010; Rothchild et al., 2010) (覚醒行動下 : Dombeck et al., 2007; Dombeck et al., 2009; O'Connor et al., 2010; Komiyama et al., 2010; Andermann et al., 2010)。これにより、細胞活動の三次元分布や層構造との対応を調べることが可能になった。また、投射様式については、逆行性蛍光標識と組み合わせることで同定可能であり (Sato & Svoboda, 2010; Jarosiewicz et al., 2012)、細胞種については分子生物学的標識と組み合わせることで同定可能になっている (Sohya et al., 2007; Runyan et al., 2010; Kerlin et al., 2010; Ma et al., 2010)。また蛍光タンパク質の発現によって、慢性的に同一の細胞の活動を記録し続けることができる (Andermann et al., 2010; Dombeck et al., 2010; Masamizu et al., 2014) ことは *in vivo* 2光子イメージン

グに特徴的な利点である。また緑色光照射によって陽イオンを細胞内外へ透過することができる Channelrhodopsin-2 (ChR2) の発見 (Nagel et al., 2003) とその神経細胞への応用 (Boyden et al., 2005) がなされて以来、この光遺伝学ツールは新たな光感受性タンパク質の開発・改良 (Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2008; Berndt et al., 2008; Airan et al., 2009; Gradinaru et al., 2010) のみならず、*in vivo* での神経活動操作に用いられることで、行動中の動物での層特異的な神経活動の操作 (Huber et al., 2008)、細胞種特異的な神経活動の操作 (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009) などを可能にしている。また、新皮質で ChR2 を主に第 V 層の錐体細胞に発現させたトランスジェニックマウス (Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007) を用いて新皮質を網羅的に光刺激し前肢運動の応答によりマッピングを行うことで、運動野の同定を行うことも可能になっている (Ayling et al., 2009; Hira et al., 2009)。

これらの技術的革新から、随意運動中の動物の大脳皮質運動野において 2 光子多細胞カルシウムイメージングを行うことで、運動関連細胞の空間分布・細胞種・投射様式を明らかにすることが可能と考えられる。これまでのサルを用いた研究の知見と照らし合わせつつ、分子生物学的方法論を最大限に活用するためには、遺伝子工学的操作の容易なマウス (*Mus musculus*) を用いることが最適と考えられる。またげっ歯類でも大脳運動野で前肢運動遂行時に神経活動が観察される (Hyland et al., 1998; Chapin et al., 1999; Laubach et al., 2000; Isomura et al., 2009) ことから、随意運動は前肢を用いた運動が最適と考えられる。げっ歯類の運動野は主にラットで皮質内微小電気刺激法 (intracortical microstimulation: ICMS) により各体部位の運動を誘発する皮質領域として同定されている。ラットでは前肢運動領域はブレグマ付近に存在する領域 (caudal forelimb area; CFA) (Settlage et al., 1949; Woolsey et al., 1952; Woolsey, 1958;

Donoghue & Wise, 1982) と、この前方にヒゲ又は首の運動領域をはさんで分離した領域 (rostral forelimb area; RFA) とが存在する (Neafsey & Sievert, 1982) ことが知られている。CFA は一次運動野に属し、RFA は二次前肢運動領域とも呼ばれ解剖学的な特徴 (Rouiller et al., 1993; Wang & Kurata, 1998) や機能における特徴 (Neafsey et al., 1986; Smith et al., 2010; Brinkman & Porter, 1979; Wise & Tanji, 1981) から霊長類の運動前野・補足運動野と相同であることが示唆されている。マウスでも ICMS により CFA (Li & Waters, 1991; Pronichev & Lenkov, 1998) と RFA (Tennant et al., 2011) が同定されている。マウス RFA が霊長類の補足運動野・運動前野と相同であるならば、霊長類で示唆されているように (Tanji et al., 1980; Aizawa & Tanji, 1994)、随意運動において RFA と CFA の機能的結合は重要な役割を果たすと考えられる。ラットにおいては RFA と CFA の解剖的投射様式は明らかにされているが (Rouiller et al., 1993)、生体において一方の領域からのシナプス入力他方の領域の活動 (発火) に寄与するかという機能的結合については調べられていなかった。

そこで本研究では、第一に、マウスの RFA と CFA との間の機能的・解剖的結合を明らかにすることを目的とした。機能的結合の同定のため、前述した ChR2 トランスジェニックマウスを用いた光刺激マッピングの手法 (Ayling et al., 2009; Hira et al., 2009) を応用し、大脳皮質の広範囲を網羅的に光刺激し、系統的・効率的に刺激された領域からの入力による活動電位応答を調べる手法 (Optogenetic Tracing) を開発し、これを用いた。これにより RFA と一致する領域の第 Vb 層から、活動電位応答を記録している CFA 第 V 層へ機能的シナプス入力があること、他方で CFA から RFA へは第 Vb 層からの機能的シナプス入力はなく上層の第 II/III 層・第 Va 層から機能的シナプス入力があることを見出した。これらの結果が、逆行性蛍光標識・順行性蛍光標識を用いて調べられた解剖学

的結合様式と一致することを確認した。

本研究では第二に、「どこへ前肢を動かすか」といった運動方向の選択性（運動情報）が複数の脳領域間の協調の中でどのように表現され実際の運動に結びつくのかを解明するために、前肢の運動方向選択性活動が一次運動野の局所回路でどのように生成されるのか、また他領域からの入力も運動方向選択性にどのように寄与するのかを明らかにする必要があると考え、それらを検討する新たな実験系の開発を行うことを目的とした。具体的には、マウスの頭部を固定した状態で2方向の前肢随意運動を行わせる課題を開発し、課題遂行中に2光子多細胞カルシウムイメージングを行うことで、運動方向選択性をもつ細胞を2光子イメージングで同定することを目的とした。私が所属していた研究室では既にマウスに1方向（引き＝尾側方向）の前肢運動を行わせる課題の開発に成功していたため（Hira et al., 2013）、まずマウスに引き方向の前肢運動を学習させたのち、反対方向（押し＝吻側方向）の前肢運動と引き運動をセッション内で交互に行わせる課題に切り替えることで、引き運動に加えて押し運動も学習させることに成功した。さらに、引き・押しの2方向の運動を学習したマウスのCFAで2方向の前肢運動を遂行中に2光子多細胞カルシウムイメージングを行い、イメージングされた各細胞についてその活動の運動選択性指標を算出することを可能とした。

第Ⅱ章 マウス運動領野間の機能的結合の同定

1. 緒言

運動野ネットワークの協調的な活動は精巧な動きの実現に不可欠であると考えられている。げっ歯類の脳皮質には、吻側前肢運動領域（RFA）と尾側前肢運動領域（CFA）という空間的に分離した2つの前肢運動領域があり、これは皮質内微小電気刺激（ICMS）またはChannelrhodopsin-2（ChR2）光刺激マッピング（Hira et al., 2013）によって同定することができる（Neafsey et al., 1986; Rouiller et al., 1993; Tennant et al., 2011）。げっ歯類が前肢を用いて到達、把持、およびレバー引きの運動を行うとき、RFAとCFAは良く似た神経活動を示す（Hyland, 1998; Hira et al., 2013）が、前肢運動中にRFAはCFAよりも早く神経活動を開始することが知られている（Hyland, 1998; Makino et al., 2017）。また、RFAおよびCFAをChR2光刺激する際の刺激時間を長くすることで、様々な前肢運動を誘発することが可能である（Hira et al., 2015）。このようなRFAとCFAの神経活動がどのように前肢運動中に協調しているのかを理解するためには、RFAとCFAとの間のシナプス結合の様式を明確にする必要がある。

Rouillerら（1993）は、順行性・逆行性の標識色素を用いることで、ラットの脳において、CFAの皮質脊髄ニューロンより上層に存在する神経細胞はRFAの第V層および第VI層に密に投射する一方、RFAの第V・VI層の神経細胞はCFAのすべての層に投射していることを明らかにした。脳皮質の領野間結合においてよく調べられている皮質領野においては、低次領野から高次領野への投射は主に第IV層および第II/III層の神経細胞からの投射であるが、高次領野から低次領野への投射は主に第V層の神経細胞から第一層の投射であることが知られている（van Essen and Maunsell, 1983; Coogan and Burkhalter, 1990; Shipp, 2005）。この

ことから、RFAはCFAよりも高次の運動領域であると考えられる (Neafsey et al., 1986; Rouiller et al., 1993; Smith et al., 2010; Tennant et al., 2011)。しかし、RFAの神経活動がこのような投射によってCFAの神経活動を誘発するかどうか、また逆に、CFAの神経活動によってRFAの神経活動が引き起こされるかどうかということは、これまで調べられてこなかった。近年、Channelrhodopsin-2 (ChR2) を主に第Vb層の錐体細胞に発現させたトランスジェニックマウスを用いて、脳表にレーザー光を投射し走査することで、光刺激された点の周辺で神経活動が誘発できることが報告されている (Ayling et al., 2009; Hira et al., 2009)。この光遺伝学的手法を用いることで、光刺激により四肢運動が誘発される運動領域を再現性高く迅速にマッピングすることができる。さらに、刺激されたそれぞれの皮質領域が出力する領域を明らかにするために、膜電位感受性色素による広域皮質イメージングをChR2光刺激マッピング法と組み合わせるという手法も報告されている (Lim et al., 2012)。しかしながら、RFAとCFAとの間の機能的接続についてはいずれの方法でもまだ調べられていない。また、第Vb層にChR2を発現するマウスでは、より浅層 (第II/III層および第Va層; Hooks et al., 2013) からの機能的結合の有無を調べるできない。

本研究では、*in vivo* でChR2光刺激マッピングと神経細胞の活動電位記録とを組み合わせることでRFAとCFAとの間の機能的投射を明らかにした。光刺激マッピングでは、第Vb層の神経細胞にChR2を発現させたChR2トランスジェニックマウス (Wang et al., 2007)、またはChR2-EYFPをコードしたアデノ随伴ウイルス (AAV) (Yizhar et al., 2011) により全層にChR2を発現したマウスのいずれかを用いた。これにより、RFAの第V層の神経細胞はCFAの第II/III層と第Va層から機能的投射を受けるが第Vb層からはそのような投射がなく、その一方でCFA第V層の神経細胞はRFAの第Vb層からの機能的投射を受けることを見出した。

2. 方法

2.1. 動物実験

本研究では、4-6ヶ月齢のC57BL/6マウスおよびC57BL/6 (Thy1-ChR2-EYFP) マウス (line 9; Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007) を用いた。光刺激のために、ケタミン (74 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) の腹腔内注射によってマウスを麻酔したのちに新皮質を覆う皮膚を切開した。露出した頭蓋骨を清拭し、ヘッドプレートを歯科用セメント (フジリユート; GC, 東京, 日本) で頭蓋骨に取り付けた。マウスはこの取り付け手術後ただちに実験に用いるか、数日間かけて回復させた。マウスを回復させる場合、頭蓋骨の表面に乾燥を防ぐために歯科用の透明アクリルレジン (スーパーボンド; Sun Medical, 滋賀, 日本) を塗布した (Hira et al., 2009)。本研究における全ての実験は岡崎3機関動物実験委員会と東京大学医学部動物実験委員会により承認を受けた。

2.2. 皮質内微小電気刺激 (ICMS)

皮質内微小電気刺激をこれまで報告された方法 (Hira et al., 2009; Hira et al., 2013) と同様に行った。野生型マウスをケタミン (74 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) の腹腔内注射によって麻酔し、左半球または右半球の皮質上の頭蓋骨を除去した。タングステンまたはエルジロイ電極 (WPI, Sarasota, FL) を脳表から 0.6 mm 以上の深さまで刺入したのち、皮質を 0.4 ms の单相陰極パルス (30~200 μ A, 333 Hz) で 45 ms 間刺激した。

2.3. ウイルス注入

野生型マウスの脳で神経細胞に ChR2 を発現させるために、これまでに報告された方法 (Masamizu et al., 2011) と同様に rAAV2 / 9-Syn-hChR2 (H134R) -EYFP (AAV-ChR2-EYFP; 8.58×10^{12} vector genomes/ml; provided by the University of Pennsylvania Gene Therapy Program Vector core) を皮質内に注入した。マウスをイソフルラン (麻酔開始時および継続中において 0.8-1.1%) またはケタミン (74 mg / kg) とキシラジン (10 mg / kg) のいずれかで麻酔し、0.5-2.0 μ l のウイルス溶液を RFA (ブレグマから吻側 2.5 mm・左半球の外測 0.8 mm) または CFA (ブレグマから吻側 0.2 mm・左半球の外測 1.2 mm) の 1 ~ 3 カ所にガラスピペット (先端の開口部直径 20-30 μ m) を用いて 8-10 psi の圧力 (T25-15-900; Toohey Spritzer, Fairfield, NJ) で軟膜下 300~500 μ m に注入した。その後、マウスをケージに戻し、2 週間以上かけて回復させた。この回復期間ののち、ChR2 は十分な発現レベルに達していた。

2.4. 光遺伝学的手法を用いた機能的投射の同定 (Optogenetic tracings)

ヘッドプレートを取り付けた ChR2 トランスジェニックマウスおよび AAV-ChR2-EYFP 導入マウスを、イソフルラン (0.7-1.1%) で麻酔した。左または右半球を覆う頭蓋骨を取り除き、皮質上の刺激部位および記録部位を露出させた。光刺激は、直立顕微鏡 (BX61WI; Olympus, 東京, 日本) および FV1000-MPE レーザー走査顕微鏡システム (Olympus) を用いて、473nm の青色レーザーで行った。視野 (2倍対物レンズ (開口数[NA] 0.08, PlanApo, Olympus) を使用する場合は 6.4×6.4 mm。5倍対物レンズ (開口数0.10, MPLan, Olympus) を使用する場合は 2.6×2.6 mm) の全部または一部にあたる脳表面が2次元ピクセルアレイに分割された。各ピクセルは疑似ランダムにプログラムされた順序で独立にレーザ

一光を照射された (Hira et al., 2009)。脳組織の屈折率を1.38 (Binding et al., 2011) とし、レーザー光が $\arcsin(0.10 / 1.38)$ の半角で入射したと仮定すると、レーザー光の直径は深さ200 μm において29 μm ($= 2 \times 200 \mu\text{m} \tan[\arcsin[0.10/1.38]]$) であり、深さ600 μm において87 μm である ($= 2 \times 600 \mu\text{m} \tan[\arcsin[0.10/1.38]]$)。なおこれらは、光の散乱の影響を考慮せずに低く見積もった場合の値である。図4のマッピング領域の中心と記録電極との間の距離は、 $2.46 \pm 0.27 \text{ mm}$ であった(光刺激による応答活動電位が検出された $n = 5$ 部位)。この距離と、ChR2光刺激マッピングにより同定されたRFAとCFAの中心の距離との間には有意差はなかった (Hira et al., 2013; $2.39 \pm 0.19 \text{ mm}$, $n = 4$, $P = 0.67$; Student's t-test)。活動電位記録のために、1.5-2M Ω のタングステン微小電極 (TM33B20KT; WPI) をRFAまたはCFAに刺入した。電極を刺入していくと、およそ400-500 μm の深さで自発発火頻度は $3.3 \pm 2.4 \text{ Hz}$ から $12.0 \pm 7.3 \text{ Hz}$ ($n = 8$ 刺入) に急激に増加した。この深さは第II/III層と第V層の境界に相当すると考えられる。第V層で活動電位記録を行うさいには、この境界よりもおよそ50-150 μm 深い位置 (脳表から524-662 μm) で記録を行った。第II/III層で活動電位記録を行うときは、記録部位は自発発火頻度の低い、脳表から350 μm 未満の位置となるようにした。電極から得られた信号はプリアンプ (DAM-80 amplifier; WPI) で増幅し、300-1000 Hzでフィルタし (SIM900; Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA)、5 kHz (FV1000 system; Olympus) でサンプリングした。薬理学的実験においては、1 mMの6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン (CNQX; AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体阻害剤; Tocris, Bristol, UK) または3 μM テトロドトキシン (TTX; ナトリウムチャンネルの選択的阻害剤, Nacalai Tesque, 京都, 日本) を125 mMのNaCl・4 mMのKCl・5 mMのHEPESを含む溶液に溶解し、脳表に直接投与した。光刺激マッピングはCNQXまたはTTXを投与した30分後に行った。

2.5. AAV-ChR2-EYFP 陽性神経細胞の免疫染色

AAV-ChR2-EYFP (0.5 μ l) を注入して2週間以上経過後、マウスをケタミン (74 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) で麻酔したのち、40ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と 40 ml の 4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液 (Wako, 大阪, 日本) を心臓から灌流して固定した。脳を取り出し、同じ固定液に 4°C で 12 時間以上浸して後固定した。次いで、脳を 3%アガロース (PBS) で包埋し、矢状断に厚さ 50 μ m でスライスした。ウサギ由来 GFP 抗体 (Invitrogen, A6455, 1:500) を PBS-XD (0.3% Triton X-100 および 1%ロバ血清 (Millipore, S30-100ML) を含んだ PBS) で希釈し、これに切片を浸して室温で 9-12 時間インキュベーションした。次に切片を PBS-X (0.3% Triton X-100 を含む PBS) で 2 回洗浄 (それぞれ 10 分以上) したのち、二次抗体 (Invitrogen, A11034, ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体, Alexa Fluor 488 conjugate, 1:200) で、室温で 1 時間インキュベートした。PBS-X で 2 回洗浄した後、切片をニッスル染色 (ヨウ化プロピジウム 536/617, Invitrogen) し、スライドガラス上に載せ、カバーガラスで覆った。これを蛍光顕微鏡 (BX53F; Olympus) または共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) で蛍光観察した。大脳皮質の層構造の境界は、ニッスル染色像において細胞体の大きさまたは密度が顕著に変化した部位として決定した。GFP 陽性および GFP 陰性の神経細胞は、ニッスル染色において核小体が確認できた細胞体内の平均蛍光強度によって判別した。

2.6. コレラトキシンサブユニット B を用いた逆行性蛍光標識

Alexa Fluor 594 を結合したコレラトキシン B サブユニット (CTB; CTB-Alexa 594; Invitrogen) を逆行性標識色素として使用した。CTB-Alexa 594 の注入に関しては、これまで報告された方法 (Tanaka et al., 2011) に一部変更を加えて行った。PBS で希釈した CTB-Alexa 594 を入れたガラスピペットを RFA または CFA のいずれかに刺入し、およそ 0.5 μ l の溶液を直径約 40 μ m のピペット先端から 5-10 psi の圧力で注入した。CTB-Alexa 594 注入から 1-7 日後、マウスを深く麻酔して心臓経由で灌流固定し、脳を前述の方法でスライスした。切片を PBS-XD で希釈したヤギ由来抗 CTB 抗体 (List Biological Laboratories, #703, 1:60000) で室温にて一晩インキュベートした。次に切片を PBS-X で 2 回洗浄 (それぞれ 10 分以上) した後、PBS-XD で希釈した二次抗体 (Invitrogen, A11058, ロバ由来抗ヤギ IgG 抗体, Alexa Fluor 594 conjugate, 1:1000) で室温にて 1 時間インキュベートした。切片をニッスル染色 (NeuroTrace 500/525, Invitrogen) により緑色蛍光で対比染色し、スライドガラス上に載せ、カバーガラスで覆った。ChR2 トランスジェニックマウスについては、切片をウサギ由来抗 GFP 抗体 (PBS-XD で 1/500 に希釈) とヤギ由来抗 CTB 抗体 (PBS-XD で 1/60000 に希釈) の混合液で一晩インキュベートした。これを PBS-X で 2 回洗浄 (それぞれ 10 分以上) した後、ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, A21206, Alexa Fluor 488 conjugate, 1:200) とロバ由来抗ヤギ IgG 抗体 (Invitrogen, A11058, Alexa Fluor 594 conjugate, 1:1000) を PBS-XD で希釈した混合液で室温にて 1 時間インキュベートした。切片をニッスル染色 (TO-PRO-3 ヨウ化物 642/661, Invitrogen) により深赤色蛍光で対比染色し、スライドガラス上に載せ、カバーガラスで覆った。これを蛍光顕微鏡または共焦点レーザー走査顕微鏡で蛍光観察した。標識された神経細胞の数は、RFA または CFA の第 II/III 層・第 Va 層・第 Vb 層のそれぞれで標識された細胞の密度が最も高い場所で共焦点画像のスタックを用いて立体的に計数された

(Howard and Reed, 1998)。

2.7. データ解析

．全ての分析は Matlab (version 7; MathWorks, MA) を用いて行った。スパイク活動は、刺激後 0 ms-20 ms の間に連続する 2 つ以上のシグナルがベースラインから 4 SD 以上の変化を示した場合に発生したと判定された。反応潜時は、光刺激の開始から活動電位応答の開始までの時間として定義した。光刺激の前に複数の自発発火が起こった場合、そのデータは反応潜時の分析から除外された。

2.8. 統計

データは、平均値±SD として表示した。統計検定にはスチューデント t 検定を用いた。

3. 結果

3.1. 皮質内微小電気刺激による RFA と CFA の位置同定

ICMS により、微小電気刺激が対側の前肢運動を誘発した領域として RFA と CFA の位置を同定した。吻側の領域は、ブレグマからおよそ吻側 2.5 mm、外側 0.8 mm に位置し (RFA)、尾側の領域はブレグマからおよそ吻側に 0.2 mm、外側に 1.2 mm の位置にあった (CFA) (図 1A, B)。この位置は、第 Vb 層の錐体細胞に ChR2 を発現させたトランスジェニックマウス (図 2A; Wang et al., 2007) において光刺激マッピングにより同定された前肢領域 (Hira et al., 2009) と一致した。この報告では、RFA の中心はおよそ吻側 2.5 mm、外側 1 mm であり、CFA の中心はおよそ吻側 0.5 mm、外側 1.2 mm であった。本研究では、これらの座標に基づいて、活動電位記録および AAV-ChR2-EYFP 注入を行った。

3.2. 光遺伝学的手法による皮質神経細胞の光刺激

上層 (第 II/III 層および第 Va 層) と第 Vb 層からの機能的投射を明らかにするために、本研究では ChR2 の発現方法に関して 2 種類の方法を用いた。一つ目は ChR2 トランスジェニックマウスを使用する方法であり (図 2A)、二つ目の方法は、AAV-ChR2-EYFP を用いて、注入領域の上層と第 Vb 層の両方で ChR2 を発現させる方法であった (AAV-ChR2 マウス; 図 2B)。

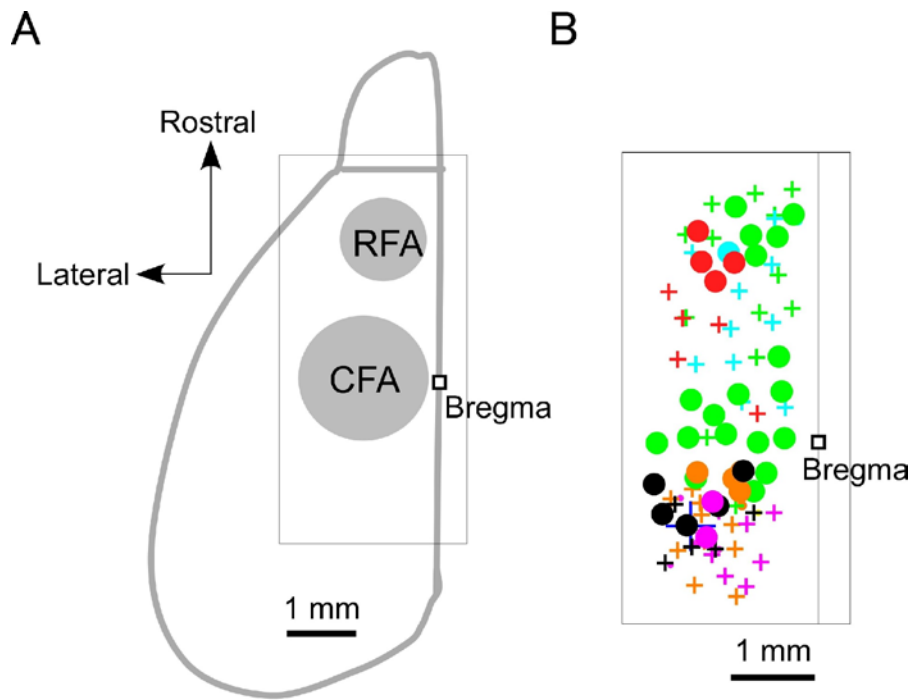


Figure 1: Locations of the RFA and the CFA

(A) 背側から見た左半球のマウス大脳皮質と嗅球の概略図。ブレグマの位置を四角で示し、RFA と CFA のおおよその位置を灰色で示している。長方形で囲まれた領域は、(B) の拡大領域を示す。(B) 丸点は ICMS により対側の前肢運動が誘発された部位。十字点は ICMS での最大電流 (200 μ A) で対側の前肢運動が誘発されなかった部位。点の色は実験に用いられた各マウス(n = 6 匹)に対応している。

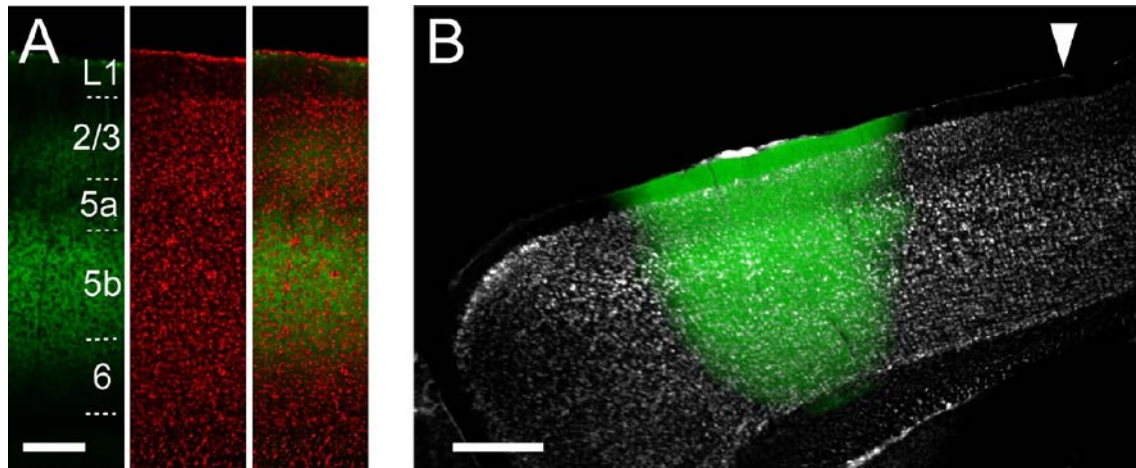


図 2： ChR2 トランスジェニックマウス・AAV-ChR2 マウスにおける ChR2 の発現

(A) ChR2 トランスジェニックマウス CFA の矢状断切片における抗 GFP 免疫染色 (左)、ニッスル染色 (中)、およびオーバーレイ (右)。スケールバーは 200 μ m。 (B) AAV-ChR2-EYFP を RFA に注入したマウスの矢状断脳切片における EYFP 蛍光 (緑) およびニッスル染色 (灰色) のオーバーレイ。矢印はブレグマから前方 0 mm、外側 0.8 mm の位置を示す。スケールバーは 500 μ m。

まず、脳表への青色レーザー光照射が、刺激部位の近傍（水平距離 300 μm 未満）の第 V 層において活動電位を誘発するかどうかを、ChR2 トランスジェニックマウスと AAV-ChR2 マウスで調べた（図 3A）。ChR2 トランスジェニックマウスと AAV-ChR2 マウスの両方において、2-10 ms 間の光刺激により光刺激点付近で活動電位が誘発された。また ChR2 トランスジェニックマウスおよび AAV-ChR2 マウスの両方において、光刺激強度が 1.5 mW 以上のとき毎回活動電位を誘発することができた（図 3B）。光刺激点付近で誘発された活動電位の平均反応潜時は、ChR2 トランスジェニックマウスでは 1.4 ± 1.6 ms（4 匹のマウスで $n=9$ 部位）であり、AAV-ChR2 マウスでは 2.2 ± 0.8 ms（3 匹のマウスで $n=5$ 部位）であった（図 3C, D）。この反応は、両方のマウスにおいて TTX の投与によって完全に阻害されたため、光電性アーチファクトではなく、活動電位を反映していると考えられる（図 3C, E）。さらに、反応潜時の短い活動電位は、ChR2 トランスジェニックマウスおよび AAV-ChR2 マウスの両方で、CNQX を投与した後も消失しなかった（図 3C, E）。したがって、光刺激点付近で記録された活動電位応答は、近傍の神経細胞が直接光刺激されたことによる反応であると考えられる。

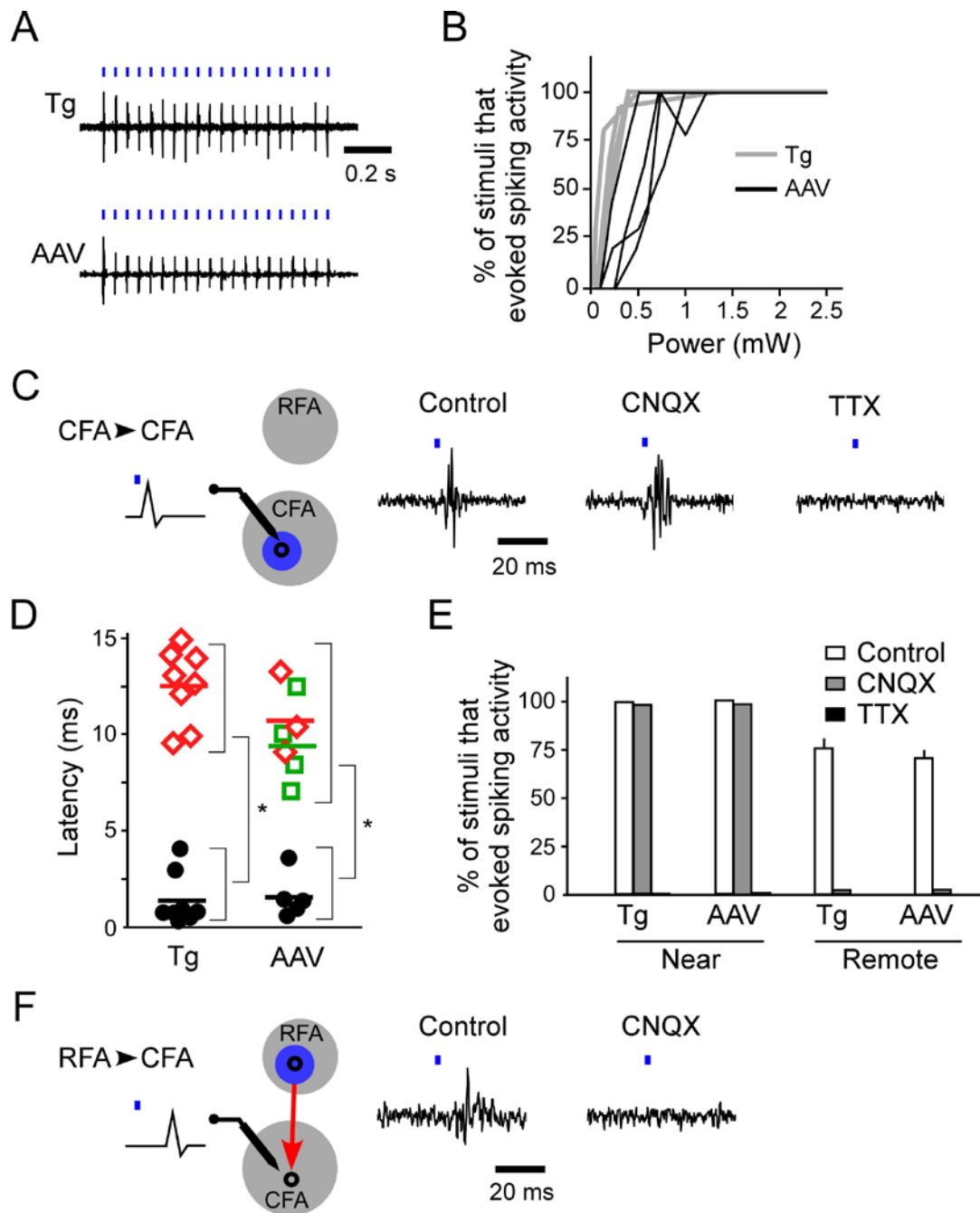


図 3： RFA・CFA への光刺激により誘発された活動電位

(A) ChR2 トランスジェニックマウス (Tg)・AAV-ChR2 マウス (AAV) の CFA への光刺激による活動電位応答の代表例。CFA の光刺激によって誘導される代表的なスパイク活動。いずれも CFA の第 V 層での記録。光刺激点と記録部位と

の間の水平距離は約 200 μm 。青色のバーは、光刺激（周波数 20 Hz、持続時間 10 ms）を表す。レーザー強度は 2.5 mW。 **(B)** 記録部位付近への光刺激で活動電位応答が誘発される割合とレーザーパワーとの関係（灰色：4 匹の ChR2 トランスジェニックマウスにおける 6 記録部位，黒色：3 匹の AAV-ChR2 マウスで 4 記録部位）。光刺激の持続時間は 10 ms。 **(C)** 左：CFA 光刺激（青色）における CFA（灰色）での活動電位応答記録の概略図。CFA 光刺激により CFA 神経細胞の発火が誘発された。右：CFA 光刺激時の CFA での応答記録の代表データ。左からコントロール、CNQX 投与時、TTX 投与時のデータ。1 匹の ChR2 トランスジェニックマウスで同一部位を光刺激して同一の電極部位で記録したデータである。光刺激の持続時間は 2 ms。 **(D)** 活動電位応答の反応潜時。黒丸は、RFA・CFA で記録された光刺激点近傍（水平距離約 200 μm ）での活動電位を示す。赤いダイヤモンド点は RFA 光刺激に対する CFA での活動電位応答を示す。緑色の四角は、CFA 光刺激に対する RFA での活動電位応答を示す。赤色と緑色のバーは、対応する色で示された条件での平均反応潜時を示す（スチューデント t 検定, $P < 10^{-4}$ ）。 **(E)** コントロール・CNQX 投与時・TTX 投与時における活動電位を誘発する割合。ChR2 トランスジェニックマウスにおいて、近傍への光刺激時と（コントロール： $n = 6$, CNQX： $n = 2$, TTX： $n = 2$ ）と遠隔領域への光刺激時（コントロール： $n = 4$, CNQX： $n = 2$ ）を比較した。AAV-ChR2 マウスにおいても、同様に近傍への光刺激時（コントロール： $n = 4$, CNQX 投与時： $n = 2$, TTX 投与時： $n = 2$ ）と遠隔領域への光刺激時（コントロール： $n = 4$, CNQX 投与時： $n = 2$ ）とを比較した。エラーバーは SEM を示す。 **(F)** 左：RFA 光刺激（青色）における CFA（灰色）での活動電位応答記録の概略図。RFA への光刺激はシナプスを介した投射により（赤矢印）、後シナプスの神経細胞の活動電位を CFA で誘発した。右：RFA 光刺激時の CFA での応答記録の代表データ。左から

コントロール、CNQX 投与時のデータ。1 匹の ChR2 トランスジェニックマウスで同一部位を光刺激して同一の電極部位で記録したデータである。光刺激の持続時間は 2 ms。

3.3. 光遺伝学的手法による RFA・CFA 間の機能的投射の同定

光刺激点付近で活動電位を誘発された神経細胞が遠隔領域に十分なシナプス投射をもつ場合、その遠隔領域のシナプス後ニューロンも発火するはずである (図 3F)。そのため、RFA または CFA の一方への光刺激が、他方の領域で活動電位を誘発するかどうかを次に調べた。RFA または CFA の一方とその周辺の複数個所を光刺激し同時に他方の領域で活動電位を記録することで、各々の光刺激点からの投射を評価した (図 4A、B)。その結果、ChR2 トランスジェニックマウスでは、RFA への光刺激により CFA の第 V 層で、再現性高く活動電位が誘発された (図 4A-D)。RFA 光刺激から CFA での活動電位応答までの平均反応潜時は、 12.6 ± 1.9 ms (4 匹のマウスで $n = 8$ 部位; 図 3D、F) であった。対照的に、CFA 光刺激では RFA の第 V 層での活動電位応答はまったく観察されなかった (ChR2 トランスジェニックマウス, $n = 4$ 匹) (図 4B)。このことから、RFA と CFA の神経細胞間の機能的投射には非対称性があることが示唆された。また、RFA (2 匹のマウス) または CFA (3 匹のマウス) の第 II/III 層においてはもう一方の領域を光刺激した際に活動電位応答は検出されなかった。

一方、AAV-ChR2 マウスでは、RFA 刺激時に CFA 第 V 層で活動電位が誘発されるだけでなく、CFA 光刺激にも RFA 第 V 層で活動電位が誘発された (図 4B)。活動電位応答の平均反応潜時は、RFA 光刺激から CFA での応答まで 11.0 ± 2.4 ms (2 匹のマウスで $n = 3$ 部位) であり、CFA 光刺激から RFA での応答まで 9.6 ± 3.1 ms (2 匹のマウスで $n = 4$ 部位) だった (図 3D)。これらの、遠隔領域への光刺激に対する活動電位応答の反応潜時は、光刺激点付近で誘発された活動電位の反応潜時よりも有意に大きかった [ChR2 トランスジェニックマウス: $P = 1.1 \times$

10^{-9} ; Student's t-test; 近傍刺激（4匹のマウスで $n = 9$ 箇所）と遠隔領域刺激（4匹のマウスで $n = 8$ 箇所）との間に有意差あり][AAV-ChR2 マウス: $P = 8.6 \times 10^{-5}$; 近傍刺激（3匹のマウスで $n = 5$ 箇所）と遠隔領域刺激（4匹のマウスで $n = 7$ 箇所）との間に有意差あり]。また、AAV-ChR2 マウスでは、第 II/III 層の活動電位は近傍刺激により誘発された（2匹のマウスで $n = 4$ 箇所）一方、遠隔領域の光刺激では RFA（2匹のマウス）または CFA（2匹のマウス）の第 II/III 層で活動電位は誘発されなかった。

遠隔領域への光刺激で誘発された活動電位は CNQX の投与により完全に消失した（図 3E）ことから、この応答は直接光刺激を受けた（軸索を光刺激された）神経細胞による活動電位ではないことが示された。なお、光刺激点付近で誘発された活動電位は CNQX の投与により消失しなかった。また、CFA 光刺激時の RFA での活動電位応答の反応潜時は、神経伝導とシナプス伝達による遅延（およそ 10 ms）と同程度だった。また RFA 光刺激時の活動電位応答の反応潜時を RFA と CFA とで比較した結果、同様の遅延が見出された。上記の結果から、CFA 上層の神経細胞の発火は、RFA 第 V 層で顕著な後シナプス応答を誘発するが、CFA 第 Vb 層の神経細胞によってはそのような応答は誘発されないこと、また RFA 第 Vb 層の神経細胞の発火は CFA 第 V 層で顕著な後シナプス応答を誘発することが示された。

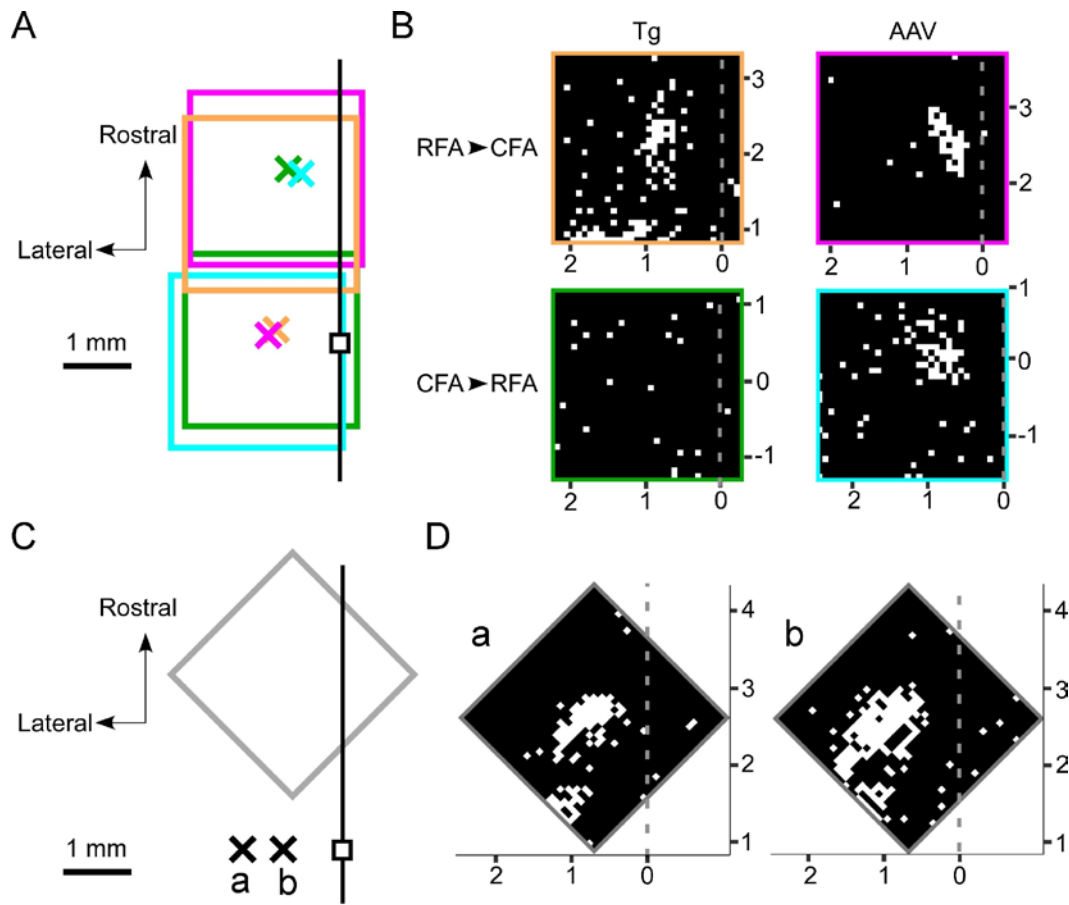


図 4： RFA・CFA 間の機能的投射の光刺激マッピング

(A) 4つの四角形は、光刺激マッピングにおいて光刺激された領域を示している。各領域において、 32×32 点が青色レーザー光で擬似ランダムに刺激された。レーザー強度は 2.5 mW 、光刺激時間は 10 ms であった。×印は記録電極の位置を示す。同色の×印と四角形は、同一の実験における記録電極の位置と光刺激領域のセットを表している。小さな黒い四角はブレグマ、黒い線は正中線を示している。(B) レーザーを用いて、RFA・CFAを含む領域をピクセルに分割した 32×32 点を光刺激した。白いピクセルは、光刺激が活動電位を誘発した点を示し、黒いピクセルは活動電位を誘発しなかった点を示す。灰色の点線は正中線を示す。マッピングは4匹の異なるマウスで行った。上段のパネルは、RFAへ

の光刺激時に CFA で活動電位記録を行った結果を示し、下段のパネルは、CFA への光刺激時に RFA で活動電位記録を行った結果を示している。パネルの左側は ChR2 トランスジェニックマウスでの実験結果、右側は AAV-ChR2 マウスの実験結果を示す。(C) マッピングされた 4 つの領域は、(A)の各色の長方形に対応する。灰色の四角は(D)でのマッピング領域を示す。×印 (a, b) はそれぞれ、(D)のマッピング (a, b) における記録電極位置を示す。(D) RFA の光刺激マップは、記録電極の位置が CFA 内で変更された場合でも同様のパターンを示した。記録電極位置 a・b の間の水平距離は 600 μm であった。

3.4. 順行性・逆行性標識による RFA・CFA 間の解剖学的投射の同定

次に、RFA と CFA との間で見出された非対称的な機能的投射が、2 領域間の解剖学的投射様式と一致するかどうかを調べた。ChR2 に結合した EYFP を抗 GFP 抗体で検出することで、AAV により ChR2-EYFP を発現させた細胞の順行性標識を行った。RFA に AAV-ChR2-EYFP を注入したマウス (図 2B) では、CFA の第 I 層・第 Vb 層・第 VI 層上部で軸索が高密度に標識された (図 5A-C)。この結果はラットにおけるこれまでの報告と一致した (Smith et al., 2010)。CFA に AAV-ChR2-EYFP を注入したマウスでは、RFA の第 Va 層で軸索が高密度に標識された (図 6A-D)。順行性標識で得られた結果は、遠隔領域が刺激されたときに第 V 層では応答活動電位が検出されるが第 II/III 層では検出されないという結果と一致していた。

RFA・CFA において投射神経細胞がどの層に存在するかを解剖学的に確かめるために、コレラトキシンサブユニット B (CTB) を逆行性標識として用いた。RFA に CTB を注入したマウスでは、CFA の上層において第 Vb 層よりも高密度に CTB 陽性神経細胞が見出された (ニッスル染色された神経細胞のうち CTB 陽性細胞の割合は第 II/III 層では $24.1 \pm 6.2\%$ 、第 Va 層では $13.5 \pm 2.9\%$ 、第 Vb 層では $3.1 \pm 1.1\%$ だった。n = 3 匹) (図 7A-D)。さらに、ChR2 トランスジェニックマウスの RFA に CTB を注入したところ、CFA の第 Vb 層において ChR2-EYFP 陽性神経細胞の 4.3% (3/70) および ChR2-EYFP 陰性神経細胞の 5.1% (3/59) が CTB によって標識された (図 7E)。したがって、CFA の第 Vb 層において「ChR2-EYFP 陰性神経細胞が、ChR2-EYFP 陽性神経細胞と異なり、顕著に RFA に投射している」というわけではないことが示唆された。したがって、CFA か

ら RFA への投射は主に上層からの投射であることが示された。

対照的に、CFA に CTB を注入したマウスでは、ニッスル染色神経細胞に対する CTB 陽性細胞の割合は、RFA の上層よりも第 Vb 層で高かった（第 II/III 層では $6.5 \pm 1.0\%$ ，第 Va 層では $4.4 \pm 1.4\%$ ，第 Vb 層では $15.8 \pm 1.4\%$ だった。 $n = 3$ 匹）（図 8A-C）。このことから、CFA に直接投射する神経細胞は主に RFA の第 Vb 層に存在することが示された。上記の順行性・逆行性標識の結果から、RFA と CFA の神経細胞は互いに異なる非対称な投射様式を介して作用しあっていることが示された。

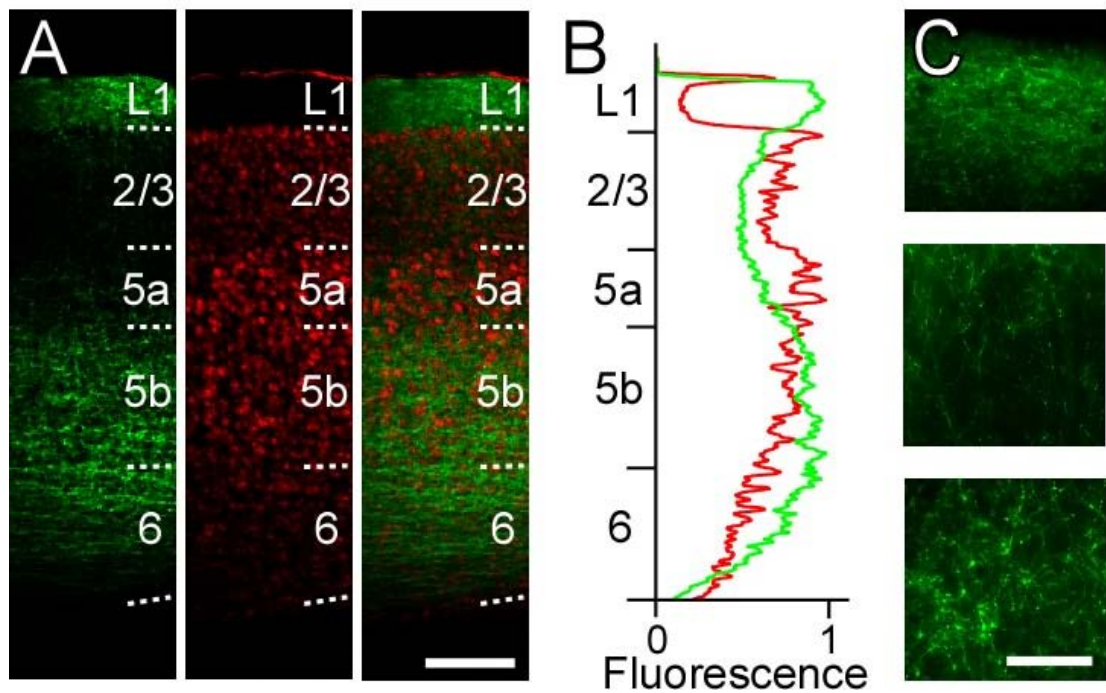


図 5： RFA 神経細胞による CFA 投射の順行性標識

(A) RFA に AAV-ChR2-EYFP を注入したマウスの矢状断脳切片 (図 2B) において CFA を拡大して示した。左から抗 GFP 免疫染色、ニッスル染色、オーバーレイ。スケールバーは 200 μm 。(B) 抗 GFP 免疫染色 (緑色) およびニッスル染色 (赤色) の蛍光強度を脳表からの深さによりグラフ化した。蛍光強度はバックグラウンドを差し引いて標準化した値である。(C) (A) に示した抗 GFP 免疫染色の高倍率像。上段は第 I 層、中段は第 II/III 層、下段は第 Vb 層。スケールバーは 50 μm 。

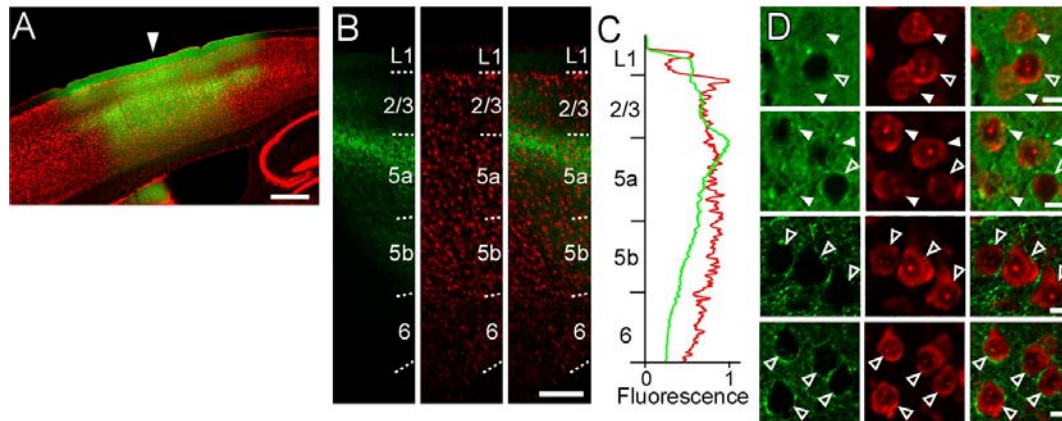


図 6： CFA 神経細胞による RFA 投射の順行性標識

(A) AAV-ChR2-EYFP を CFA に注入したマウスの矢状断脳切片における EYFP 蛍光（緑色）とニッスル染色（赤色）のオーバーレイ。矢印はブレグマから前方 0 mm、外側 1.2 mm の位置を示す。スケールバーは 500 μ m。 (B) CFA に AAV-ChR2-EYFP を注入したマウス（注入部位は(A)に示した）の矢状断脳切片において RFA を拡大した。左から抗 GFP 免疫蛍光染色、ニッスル染色、オーバーレイ。 (C) 抗 GFP 免疫染色（緑）とニッスル染色（赤）の標準化された蛍光強度を脳表からの深さによりグラフ化した。 (D) (A)に示した蛍光染色の高倍率像。最上段は注入部位の第 II/III 層、2 段目は注入部位の第 Va 層、3 段目は注入部位から前方に 1.2 mm 離れた領域の第 II/III 層、最下段は注入部位から前方に 1.2 mm 離れた領域の第 Va 層。閉じた矢印は ChR2-EYFP 陽性神経細胞を示す。中抜き矢印は ChR2-EYFP 陰性神経細胞を示す。スケールバーは 10 μ m。

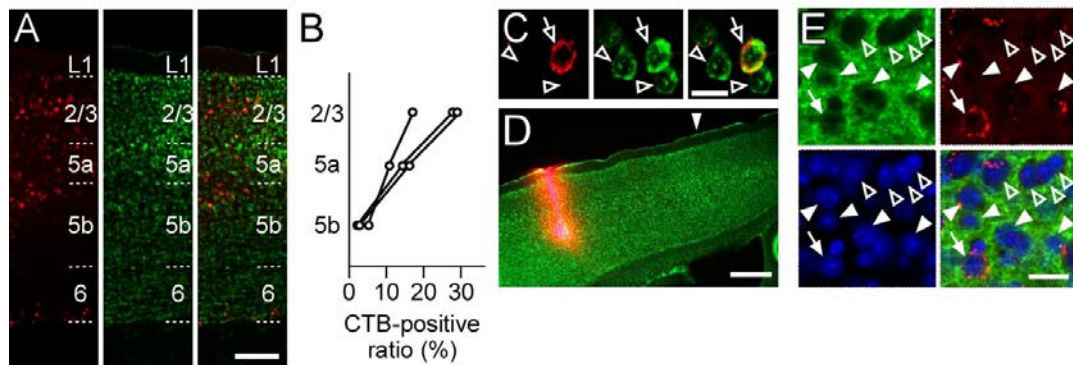


図 7： RFA に投射する CFA 神経細胞の逆行性標識

(A) RFA に CTB-Alexa 594 を注入したマウス（注入部位は(D)に示した）の CFA における抗 CTB 免疫蛍光（左）、ニッスル染色（中）、およびオーバーレイ（右）。スケールバーは 200 μm 。(B) RFA に CTB-Alexa 594 を注入したマウス CFA の第 II/III 層・第 Va 層・第 Vb 層において、ニッスル染色された神経細胞のうち CTB 陽性細胞が占める割合を示した。各線は同一のマウスを示す。(C) (A)で示した第 Va 層の高倍率像。中抜き矢印は CTB 陽性細胞、中抜き矢頭印は CTB 陰性細胞を示す。スケールバーは 20 μm 。(D) RFA に CTB-Alexa 594 を注入したマウスの矢状断脳切片の抗 CTB 免疫染色・ニッスル染色像（オーバーレイ）。矢印はブレグマから吻側 0 mm、外側 0.9 mm の位置を示す。スケールバーは 500 μm 。(E) RFA に CTB-Alexa 594 を注入した ChR2 トランスジェニックマウスにおける CFA 第 Vb 層の抗 GFP 免疫染色（緑色）・抗 CTB 免疫染色（赤色）・ニッスル染色（青色）の高倍率像（オーバーレイ）。閉じた矢印は、ChR2-EYFP 陽性かつ CTB 陽性の神経細胞を示す。閉じた矢頭は、ChR2-EYFP 陽性かつ CTB 陰性の神経細胞を示す。白抜き矢印は ChR2-EYFP 陰性かつ CTB 陰性の神経細胞を示す。スケールバーは 20 μm 。

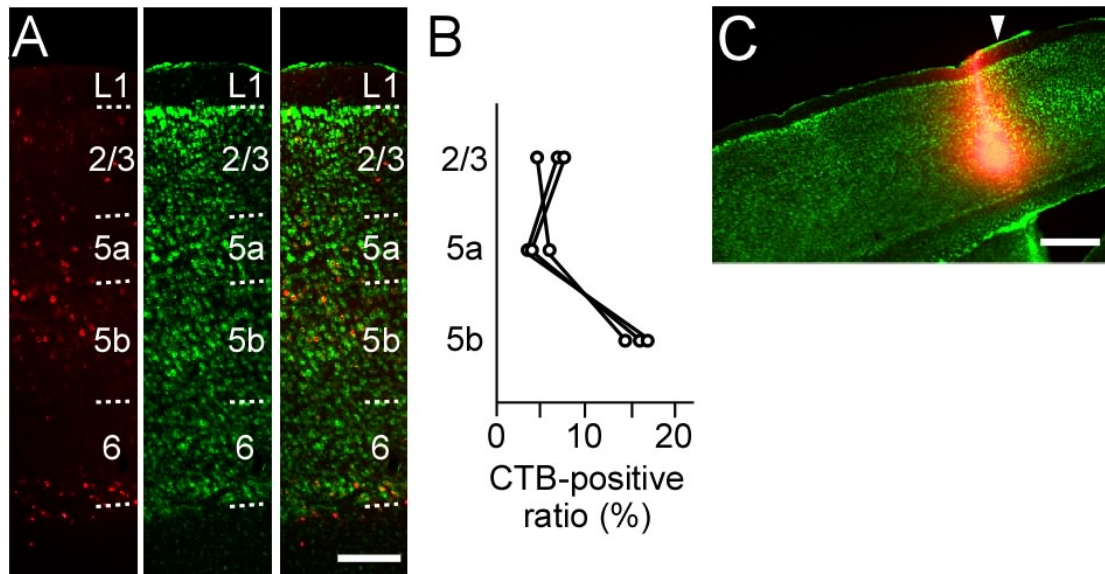


図 8: CFA に投射する RFA 神経細胞の逆行性標識

(A) CFA に CTB-Alexa 594 を注入したマウス（注入部位は(C)に示した）の RFA における抗 CTB 免疫染色（左）、ニッスル染色（中）、オーバーレイ（右）。スケールバーは 200 μm 。 (B) CFA に CTB-Alexa 594 を注入したマウス RFA の第 II/III 層・第 Va 層・第 Vb 層において、ニッスル染色された神経細胞のうち CTB 陽性細胞が占める割合を示した。各線は同一のマウスを示す。 (C) CFA に CTB-Alexa 594 を注入したマウスの矢状断脳切片の抗 CTB 免疫染色・ニッスル染色像（オーバーレイ）。矢印はブレグマから吻側 0 mm、外側 1.0 mm の位置を示す。スケールバーは 500 μm 。

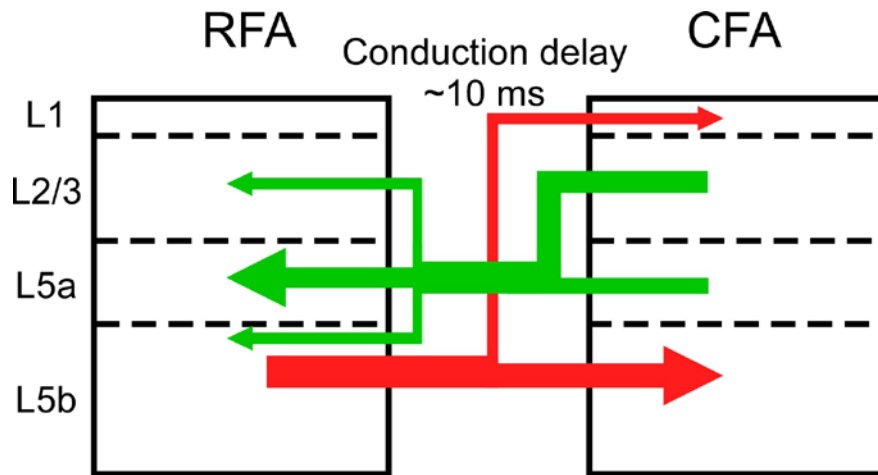


図 9： RFA・CFA 間の非対称なシナプス結合

RFA は、CFA の第 II/III 層または第 Va 層から強い機能的投射を受けるが(緑色)、第 Vb 層からの機能的投射は比較的弱い。 CFA は、RFA の第 Vb 層から強い機能的投射を受けるが (赤色)、第 II/III 層・第 Va 層からの機能的投射は比較的弱い。

4. 考察

4.1. 光遺伝学を用いた機能的投射の同定 (Optogenetic tracing)

本研究では、マウスにおいて RFA と CFA との間の投射様式を調べるために、光遺伝学を応用した光刺激マッピング法を用いた。薬理学的実験と反応潜時の分析から、これらの一方の領域において他方の領域への光刺激時に誘発された活動電位はシナプスを介した反応であり、記録細胞への直接の光刺激や軸索刺激による反応ではないことが示された。本研究では、第 Vb 層の錐体細胞に ChR2 を発現したトランスジェニックマウスと、AAV により注入領域の上層（第 II/III 層および第 Va 層）と第 Vb 層の両方の神経細胞に ChR2 を発現させたマウスを用いた。この 2 つの実験を組み合わせることで、第 Vb 層からの投射と、上層および第 Vb 層からの投射とを 2 領域間で比較することが可能となった。今後の研究では、Wfs1 (Wolfram 症候群 1) または Etv1 (ETS-ドメイン転写因子) のような他のプロモーターを用いて ChR2 の発現を第 II/III 層または第 Va 層に限定することが必要であろう (O'Connor et al., 2009)。さらに、ChR2 の発現を非常に少数の神経細胞のみに限局したり (Ako et al., 2011)、ChR2 の 2 光子刺激法 (Rickgauer and Tank, 2009; Andrasfalvy et al., 2010; Papagiakoumou et al., 2010) を用いたりすることで、光刺激する神経細胞をより限局することも可能である。またシナプスを介するウイルス性の順行性・逆行性標識手法を用いることで、より特異的な光刺激が可能となることが期待される (Miyamichi et al., 2010; Lo and Anderson, 2011; Zingg et al., 2017)。In vivo の活動電位記録においては、記録している神経細胞が第 Va 層と第 Vb 層のいずれに存在するのかを確かめることは困難であった。第 Va 層と第 Vb 層の神経細胞へのシナプス入力がどのように

異なるのかは、新皮質脳スライスにおいてそれぞれの神経細胞をホールセル記録し、ChR2 を発現した他領域からの投射軸索を光刺激することで明らかにすることができると考えられる (Petreanu et al., 2007; Hooks et al., 2013; Biane et al., 2016)。

4.2. RFA と CFA の間の層特異的な投射様式

ChR2 トランスジェニックマウスにおいて RFA の第 Vb 層の神経細胞を光刺激すると、CFA において活動電位応答が記録された。この結果のみでは RFA の上層から CFA への投射があるかどうかは不明だったが、逆行性標識を用いることで、RFA 第 Vb 層の神経細胞は CFA に強く投射していることが示された。

CFA を光刺激した時に、ChR2 トランスジェニックマウスでは RFA での活動電位応答は見られなかったが、AAV-ChR2 マウスでは RFA で活動電位応答が観察された。このことから、CFA 第 Vb 層の神経細胞は RFA への強い投射を持たず、CFA の第 II/III 層または第 Va 層の神経細胞が RFA に強い投射を持つことが確かめられた。これらの結果は順行性・逆行性標識を用いた解剖学的実験とも一致した。

第 II/III 層神経細胞からは、主に第 V 層の深層にシナプス結合があり、第 V 層では神経細胞は出力先により皮質線条体ニューロンと皮質脊髄ニューロンとに分かれることが知られている (Morishima and Kawaguchi, 2006; Brown and Hestrin, 2009; Anderson et al., 2010)。運動皮質回路の最終出力である第 Vb 層の皮質脊髄ニューロンは、皮質線条体ニューロンから興奮性入力を受けるが、皮質線条体ニューロンは、皮質脊髄ニューロンからの入力を受けないということが明らか

にされている (Kiritani et al., 2012)。したがって、情報は RFA および CFA 内において、第 II/III 層の神経細胞および第 Va 層の皮質線条体神経細胞から第 Vb 層の皮質脊髄神経細胞に一方向に伝達されている。本研究の結果は、CFA の第 Vb 層は RFA の第 Vb 層に強く投射しないが、RFA の第 Vb 層は CFA の第 Vb 層に強い投射を持つことを示している。したがって、CFA の上層で処理される情報は RFA に送られ、CFA 第 Vb 層の最終出力は、RFA の第 Vb 層と CFA の上層からの信号を統合することで決定されている可能性がある。これらのことから、本研究の結果は RFA が CFA よりも高次の運動領域であるという考えを支持するものといえる (Neafsey et al., 1986; Rouiller et al., 1993; Smith et al., 2010; Tennant et al., 2011; Makino et al., 2017)。

本研究結果が、マウス運動野の階層性を示唆するのに対し、霊長類の補足運動野 (SMA)、運動前野 (PM)、一次運動野 (M1) 間では層投射パターンに階層性はみられないとされている (Dum and Strick, 2005)。また、霊長類において M1 のみならず PM も脊髄へ投射しているように (Dum and Strick, 1991)、ラットもまた RFA・CFA とともに皮質脊髄投射細胞を有している (Rouiller et al., 1993; Umeda and Isa, 2011; Kamiyama et al., 2015)。このようなことから、げっ歯類と霊長類の運動皮質回路が同等なものとして比較可能かどうかということは依然として不明である。今後の研究においては RFA と CFA との間でどのような情報が伝達されているのかを明らかにすることがまず必要である。他領域に投射する神経細胞は、逆行性に標識することが可能である (Sato and Svoboda, 2010)。また、他領域への ChR2 光刺激に対して活動電位応答する神経細胞は、カルシウム感受性蛍光分子を発現することによって 2 光子イメージング上で同定することも可能である。これらのことから、そのような神経細胞をレバー引き運動課題

(Hira et al., 2013; Masamizu et al., 2014) などの運動課題中に 2 光子カルシウムイメージングすることで、運動中の活動の特性を明らかにすることができると考えられる。具体的には、次章で扱うように、マウスに前肢運動を一方向（引き運動）だけでなく二方向の運動（引き／押し運動）を行わせることができれば、個々の神経細胞で方向選択性の強さを同定し、選択性の強さと入出力様式の関係調べられるだろう。このような方法により、精巧な運動を遂行するさいに異なる皮質間で神経細胞活動がどのようにして協調しているのかということが明らかになっていくと考えられる。

4.3. RFA・CFA 間の伝導遅延

領野間で RFA から CFA へ、あるいは CFA から RFA へ情報を伝達するのにおよそ 10 ms を要することが確かめられた。RFA と CFA との間で見られた密な解剖学的投射様式を考慮すると、これらの領野間での入力直接的な単シナプス結合である可能性は十分ある。しかし、観察された反応潜時は、直接的な単シナプス結合で想定される潜時よりもやや長かった。例えば、運動野の神経細胞は、体性感覚野のバレル皮質よりおよそ 8 ms 遅れてヒゲ刺激に応答するが、この運動野における応答は、体性感覚野から直接単シナプスを介した投射によるものと考えられている (Ferezou et al., 2007)。これらの領野間の距離は約 4 mm であり、RFA と CFA との間の約 2 mm よりも長い。したがって、皮質－視床－皮質投射のような間接的な入力、RFA と CFA との間の情報伝達を担っているという可能性もまた考えられる。RFA と CFA との間で観察された 10 ms の遅延が、単シナプスの結合によるものか多シナプスの結合によるものかということでは現時点では明らかではない。

この遅延がどのような投射様式によるものであれ、活動電位の時間的順序は情報処理 (Izhikevich, 2006) とスパイクタイミング依存性可塑性 (Froemke and Dan, 2002; Wolters et al., 2003) にとって重要であるため、考慮していく必要がある。このような遅延の下で運動遂行中の RFA と CFA の活動がどのように時間的に協調しているのかについては、両領野で同時に多電極記録を行う (Saiki et al., 2017) ことで明らかにしていくことができると考えられる。

4.4. まとめ

本研究は、*in vivo* の活動電位記録と *in vivo* ChR2 光刺激マッピングを組み合わせることで、マウス運動野の RFA・CFA 間で約 10 ms の遅延をもった機能的投射が存在することを明らかにした。また、CFA は RFA の第 Vb 層から強力な機能的投射を受けること、RFA は第 II/III 層または第 Va 層から強い機能的投射を受けるが第 Vb 層からはそのような投射がないことが示された。これらの結果は、運動中に RFA と CFA で起こる神経活動が、非対称的な相互の投射を介して生成されることを示唆している。本研究で用いた *in vivo* の光遺伝学的マッピング法は、皮質間の機能的投射を明らかにしていくうえで今後非常に有用である。

第Ⅲ章 マウス運動野における運動方向選択性の解析

1. 緒言

随意運動は方向・力・速度など様々なパラメータを持ち、それらの情報は脳の多数の神経細胞の活動と関連していることが知られている。特に前肢運動についてはサルを用いた電気生理学的研究において特定の方向に運動をするときに選択的に活動する神経細胞（方向選択性細胞）が、一次運動野・運動前野・補足運動野・体性感覚連合野などで見出されている。運動方向選択性活動は運動の実行時だけでなく運動の開始前から現れ（Georgopoulos et al., 1982）、運動開始前の時点で正確に実際の運動方向を予測できる（Georgopoulos et al., 1984; Georgopoulos et al., 1988）ことから、脳の複数の運動・感覚領域を協調させながら具体的な運動を企画し実現するために必要な処理過程を反映していると推測される。したがって、運動方向選択性を有する細胞活動の空間分布・細胞種・投射様式を知ることは随意運動の制御機構を知るうえで重要である。

第Ⅰ章で述べたとおり、細胞活動と空間分布・細胞種・投射様式との関係を明らかにすることは、近年発展した *in vivo* の2光子多細胞カルシウムイメージングと分子生物学的標識を組み合わせることで可能である。細胞活動の運動方向選択性を同定するためには、動物が複数の方向の運動を行っている際にそれぞれの細胞活動を比較する必要がある。サルを用いた研究では、そのような課題が構築されており、実際に電気生理記録によって方向選択性をマップすることができる。一方、マウスを用いた実験では、前肢を複数の方向に運動させて細胞活動の方向選択性を同定する研究は行われてこなかった。

私が所属していた研究室ではマウスが前肢を用いてレバーを1方向（引き＝尾側方向）に動かす課題を遂行中に2光子多細胞カルシウムイメージングを行

う手法を開発している (Hira et al., 2013) (図 10, 11)。これを受けて本研究ではこの手法を発展させレバーを引き方向と押し方向 (吻側方向) の 2 方向に動かす課題を開発して、2 光子多細胞カルシウムイメージングで運動野神経細胞の運動方向選択性を同定することを目的とした (図 12)。頭部を固定したマウスに引き方向の前肢運動を学習させたのち、押し方向の前肢運動と引き運動をセッション内で交互に行わせる課題に切り替えることで、引き運動に加えて押し運動も学習させることに成功した。このようにして引き・押しの 2 方向の運動を学習したマウスの CFA で 2 方向の前肢運動を遂行中に 2 光子多細胞カルシウムイメージングを行い、イメージングされた各細胞についてその活動の運動選択性指標を算出することができた。

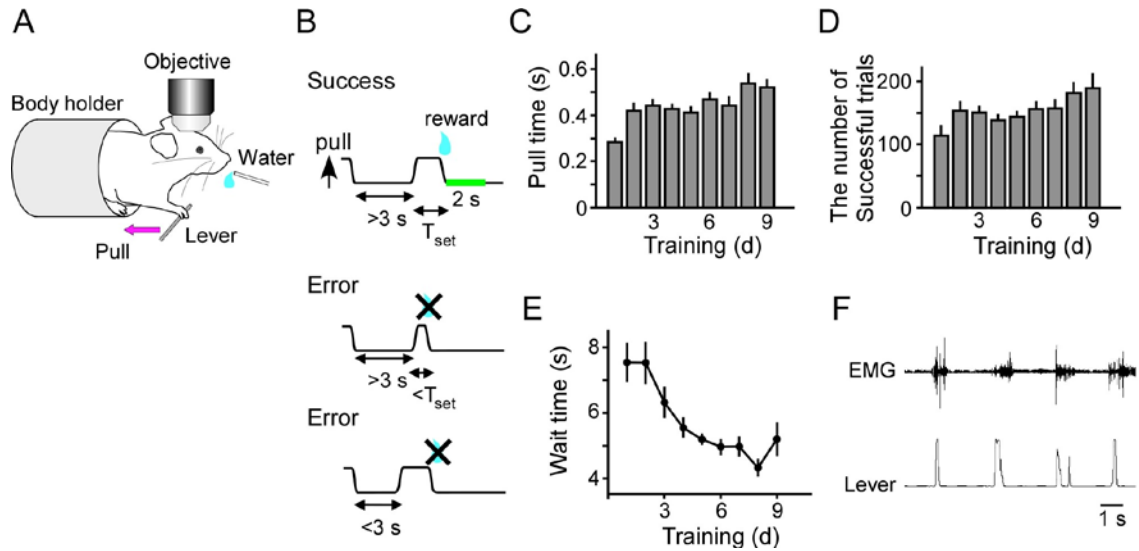


図 10. 頭部固定マウスレバー引き運動課題

(A) 頭部固定マウスでのレバー引き運動課題の概略図。マウスは、体をホルダーに入れて頭部を対物レンズの下に固定した状態で、右前肢を利用して可動レバーを握って引いた。報酬（水）を与えるためのスパウトはマウスの口吻付近に設置された。(B) レバー引き運動課題の模式図。レバーを引く前に、マウスは3秒以上待たなければならなかった。レバーを引いたままの状態を T_{set} で定められた時間だけ継続できた場合、水滴が吐出され、同時にレバーはソレノイドによってただちに初期位置に戻された。その後レバーは初期位置で2秒間不動化された（緑線）。動物が T_{set} の時間レバー引きを継続できない場合、またはレバー引きの前に3秒間待つことが出来なかった場合は、報酬は与えられず、レバーが機械的に初期位置に戻されることもなかった。(C) 平均引き時間は9日間の訓練セッション ($n = 35$ 匹) にわたって増加した。(D) 9日間の訓練セッションにおける成功試行数。(E) 成功試行における平均待ち時間は訓練セッション中に減少した。(F) 課題遂行中の右前肢の筋電活動の代表データ（上）およびレ

バー軌道（下）。図は、Hira et al（2013）をもとに作成。

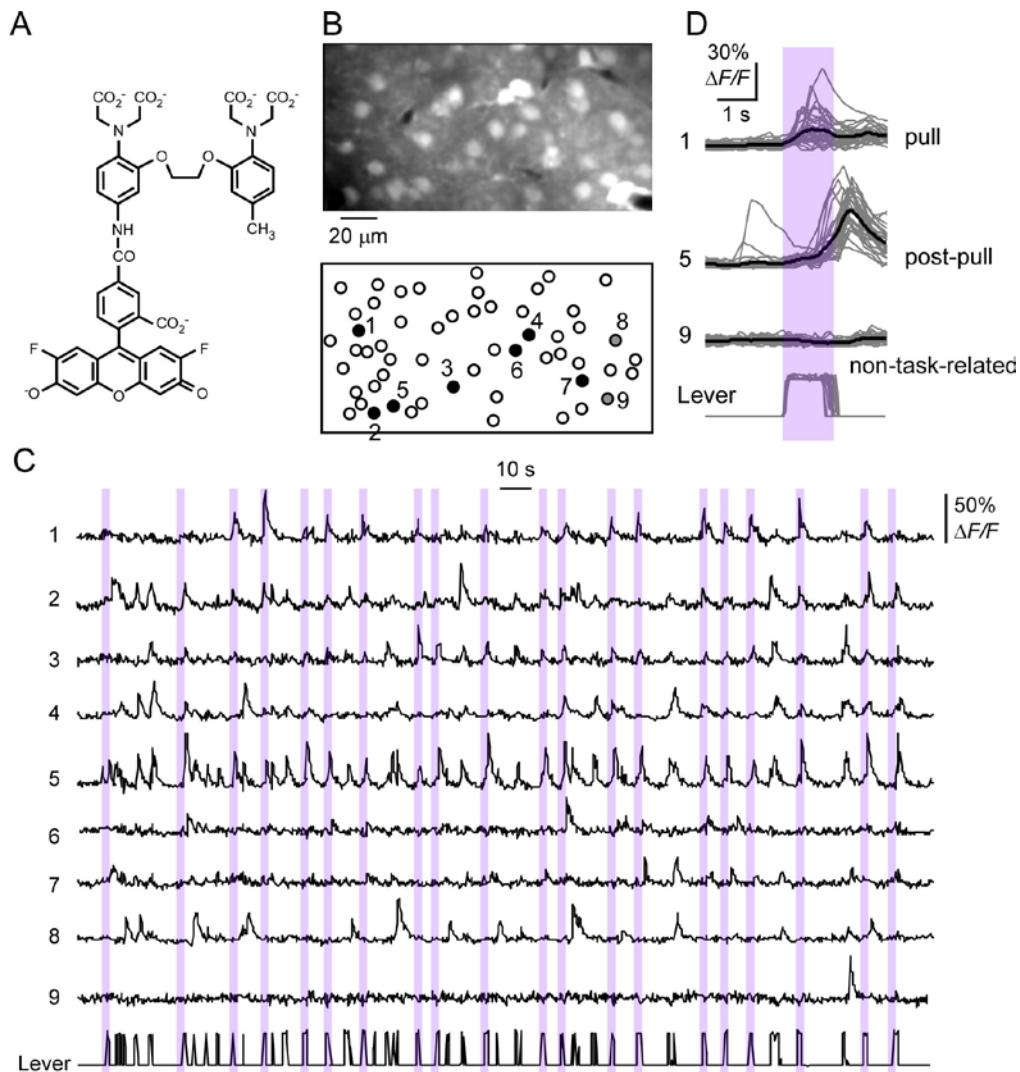


図 11. レバー引き運動課題中の RFA 第 II/III 層神経細胞の 2 光子カルシウムイメージング (OGB-1 を使用)

(A) OGB-1 BAPTA の化学構造式。 (B) RFA における 2 光子イメージング像の代表例。脳表からの深さは 188 μm 。円は蛍光強度を測定した細胞を示す。閉じた円の蛍光強度変化が (C) に示されている。 (C) (B) に示された番号の細胞における 270 秒間のカルシウム蛍光強度変化波形 (ゆれ補正後)。レバーと記載された波形は、レバーの軌跡を示す。図中の影付き部分は成功試行のレバー引き継続時間を示す。 (D) 細胞 1、5 および 9 の細胞での成功試行 (30 回) における蛍

光強度変化を、レバー引き開始時点が一致するように重ね合わせた。黒い太線は平均波形を示す。最下段で、各試行のレバー軌跡を重ねて表示した。図は、Hira et al (2013) をもとに作成。

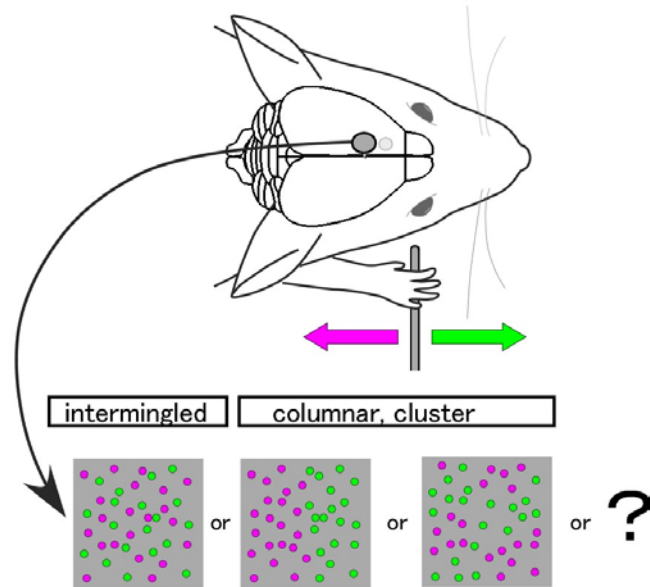


図 12. レバー引き／押し運動に選択性を持つ神経細胞の分布に関する仮説
 マウスがレバー引き／押し運動を行っているときに、運動野の2光子カルシウムイメージングができるようになれば、異なる運動で活動する細胞群が空間的に混在しているのか（左）、コラム状に大きく分離しているのか（中央）、または大きく分離していなくても同じ運動で活動する細胞群がクラスター分布をしているのか（右）を明らかにできる可能性が拓ける。

2. 方法

2.1. 動物実験

本研究における全ての実験は岡崎3機関動物実験委員会と東京大学医学部動物実験委員会により承認を受けた。実験には、2-6ヶ月齢のC57BL/6系統(野生型)のオスマウスを用いた。

2.2. 開頭手術と AAV の注入

手術処置は、Hira et al (2013) およびMasamizu et al (2014) と同様に行った。ケタミン/キシラジン (74/10 mg / kg) の腹腔内注射によりマウスを麻酔した。新皮質上の頭皮を切開し、露出した頭蓋骨を清拭した後、歯科用セメント (Fuji lute; GC, 東京, 日本) を用いてヘッドプレートを開頭骨に取り付けた。次いで、頭蓋骨表面の乾燥を防ぐために透明なアクリル系歯科用樹脂 (Super bond; Sun Medical, 滋賀, 日本) を塗布した。同日または翌日に、開頭手術およびAAV注入を行った。手術の一時間前に、デキサメタゾンリン酸ナトリウム (1.32 mg / kg)、スルファジアジン (24 mg / kg) およびトリメトプリム (4.8 mg / kg) の抗生物質および抗炎症剤としてカルプロフェン (6 mg / kg) を腹腔内に投与した (Holtmaat et al., 2009)。手術中は麻酔としてイソフルラン (1%) を使用し、左CFA上の頭蓋骨を直径2 mmの円形に開頭した (開頭部の中心はブレグマから吻側に約0.2 mm外側に約1.2 mm) (Hira et al., 2013; Tennant et al., 2011)。硬膜は、2匹のマウスで除去し、4匹のマウスで除去しなかった。プラー (Sutter Instruments, CA, USA) により作成したガラスピペット (外径25-30 μm) と5 μl ハミルトンシリンジに鉱物油 (ナカライテスク, 京都, 日本) を充填したのち先端からウイルス溶液 (rAAV2/1-Syn-GCaMP3, 2.76×10^{13} vector genomes/ml) を充填した。ピペットを

脳表からおよそ300~400 μm 腹側の位置に垂直に刺入した。左CFA 内の2-6箇所
にウイルス溶液 (0.2-1 μl) をシリンジポンプ (KDS310; KD Scientific, MA, USA)
を用いて0.05-0.1 μl の速度で注入した。注入後、ピペットは10分間動かさずその
ままの位置に置いた。その後ピペットをゆっくり引き抜き 4% (w/v) のアガロー
スL (ニッポンジーン, 東京, 日本) を開頭部上へのせ、アガロースの表面を直
径4.5 mm のカバーガラス (number 0 thickness; 松浪硝子, 大阪, 日本) でおさえ
たのち、歯科用セメントおよび歯科用接着性樹脂セメントでガラスの縁を密閉
した。手術後、スルファジアジン (24 mg/kg) およびトリメトプリム (4.8 mg/kg)
の抗生物質を含んだ飲料水を与え、カルプロフェン (6 mg/kg) を毎日腹腔内投
与した (Holtmaat et al., 2009)。

2.3. レバー引き／押し運動課題

ケージ内で、マウスはヘッドプレートを取り付けた状態で絶水され、実験中
体重は通常時の80~85%となるように維持された。課題装置は、Hira et al (2013)
で用いられたものと同様だった。課題開始前に、マウスを筒状のホルダー内に
導入し、ステージに固定されたヘッドホルダーの間にヘッドプレートを挟むこ
とでマウスの頭部を固定した (図13A, B)。マウスは1日に1時間、課題装置内に
おいて頭部を固定された状態で自発的な前肢運動課題を遂行するように訓練さ
れた。実験は明暗サイクルの明期に行われた。各訓練セッションの後、ケージ
に戻される前に、マウスは1 mlの水を自由に飲むことができた。

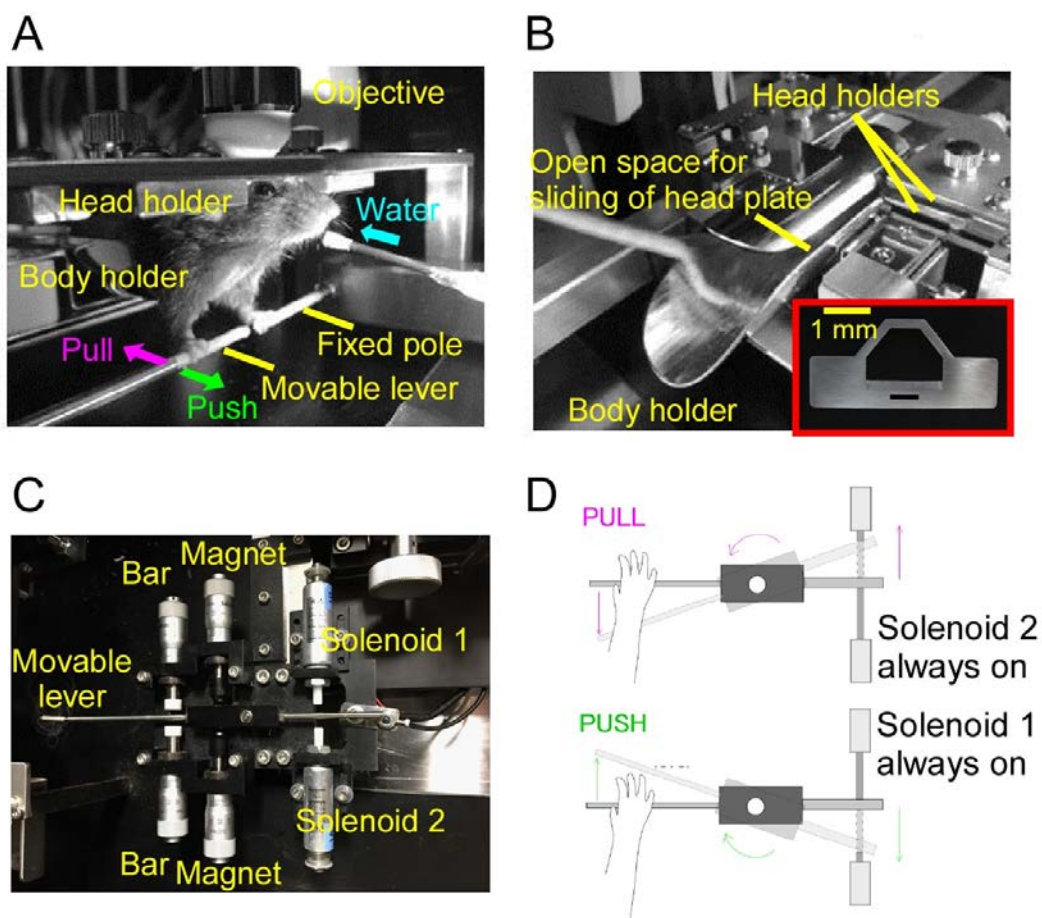


図 13. 頭部固定マウスレバー引き／押し運動課題

(A) 課題遂行時のマウスと課題装置。マウスは、頭部に取り付けられたヘッドプレート（図 B 右下）を対物レンズ下に（イメージング時のみ）ヘッドホルダーで固定された状態で、右前肢で可動レバーを握り引きまたは押し運動を行った。左前肢は姿勢をゆったりと保持するために固定されたバーをつかんでいた。報酬を与えるためのスパウトはマウスの口吻付近に設置されていた。(B) ヘッドプレート（右下）を取り付けられたマウスは体保持用のホルダー内にスムーズに導入された。マウスの頭部はヘッドホルダーの間にヘッドプレートを挟むことで固定された。ヘッドプレートはホルダー側面の開いたスペース内に挿し入れてスライドすることができた。図 13(A)、(B) は、Hira et al (2013) をもとに作成。(C) レバーの動きは 3 つの部品によって調整された：2 つのバーがレバ

一引き・押しの可動域を決め、2つの磁石がレバーを初期位置に戻す復元力を負荷し、2つのソレノイドが運動成功後にレバーを初期位置に戻した。(D)レバー引き／押し運動遂行時の概略図。ソレノイド2がオンのとき、レバーは前方に動かす(押す)ことができず、ソレノイド1がオンのとき、レバーは後方に動かす(引く)ことができなかつた。試行成功後は、もう一方のソレノイドを1秒間オンにしてレバーを初期位置に戻し不働化した。レバー位置は常に引き方向と押し方向の2つの閾値によって、引き、押し、中間、の3つの状態のいずれかに判定された。

6-14回のセッション中に、マウスはレバー引き運動課題 (Hira et al., 2013; Masamizu et al., 2014) を行うように訓練された。この課題では、マウスが右前肢を用いてレバーを 5 mm 引いてその状態を 700 ms 間維持すると、スパウトから 4 μ l の水滴が与えられ、それと同時にソレノイド 1 によってレバーが直ちに初期位置に戻された (図 13C, D)。このときレバーは前方に動かすことができないよう、バーにより可動域を制限されていた (図 13C, D)。レバーはソレノイド 1 によって初期位置に戻された後、1 秒間不動化された。その後、マウスは再びレバーを引くことができた。マウスがレバーを十分に引けなかった場合、レバーは弱い磁力 (約 0.03 N) によって初期位置に戻された。マウスは報酬を得るために 700 ms 間レバーを引いた状態を維持しなければならなかった。レバー引きを失敗した試行 (レバー引き継続時間が 700 ms 未満の試行) の後、レバーは不動化されず、マウスはいつでもレバーを引くことができた。リッキングのタイミング・継続時間は制限されていなかった。マウスの行動は赤外線ビデオカメラ (30 Hz) により記録された。レバーの位置は、レバー (マウスに提示された側) の反対側の先端に取り付けた直径 1 mm の磁気ビーズ (NeoMag; Seiko Sangyo, 千葉, 日本) の変位として、連続的に記録された。磁気ビーズの変位を検出するために、磁気抵抗センサ (HA-12; MACOME, 長野, 日本) を用いた。報酬のタイミングおよびレバーを初期位置に戻し不動化するタイミングは、LabVIEW (National Instruments, TX, USA) のプログラムにより制御した。

レバー引き運動課題の最終セッションの後、マウスはレバー引き／押し運動課題を 6-11 セッション訓練された。この課題においては、レバー引き期間とレバー押し期間はそれぞれの運動が 30 回成功するごとに切り替えられた。レバー引き期間では、レバーはソレノイド 2 によって押すことができない状態にされ、

マウスは報酬を得るためにレバー引きを 700 ms 間継続しなければならなかった (図 13D)。レバー押し期間では、レバーはソレノイド 1 によって引くことができないうちにされ、マウスは報酬を得るためにレバー押しを 700 ms 間継続しなければならなかった (図 13D)。成功試行の後、レバーは初期位置に戻され 1 秒間不動化された。レバー引きを 700 ms 間継続できず失敗となった試行では報酬は与えられなかった。

2.4. 2 光子イメージング

5 匹のマウスを用いて、1-7 セッション目のレバー引き/押し運動課題中に顕微鏡下に頭部を固定して 2 光子カルシウムイメージングを行った。2 光子画像は、20 倍対物レンズ (XLPlan, NA 1.0, Zeiss) または 25 倍対物レンズ (XLPLN25XWMP, NA 1.05, Olympus, 東京) およびモードロックされたチタン : サファイアカメレオンウルトラ II レーザー (Coherent, Santa Clara, CA) (波長 : 920 nm) を用い、LSM 7 MP システム (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) によって取得した。4-7 Hz のフレームレートで、連続した 1000 フレームまたは 3000 フレームの画像を各視野で 1-4 回取得した。ゆっくりとした光軸方向の焦点位置の変化が目視によって確認された場合は、イメージングセッション前に得られた基準画像と一致するように、手動で 1000 フレーム毎にイメージング面の位置 (深さ) を調整した。

2.5. 画像データ処理と方向選択性指標の定義

画像データの処理は、Hira et al (2013) と同様に行った。解析は、ImageJ プラグイン (1.37v; NIH, USA) および MATLAB (version 7; MathWorks, MA, USA) のカスタムメイドのスクリプトを使用して行った。イメージング動画は

TurboReg (Thevenaz et al., 1998) を用いて撮像面内の変位 (XY 変位および回転変位) について補正された。しかし、この手順は、フレーム内の歪みを補正するには必ずしも十分ではなかったため、X 変位および Y 変位を補正するため、隠れマルコフモデル (HMM) のアルゴリズムに基づくラインごとの補正

(Dombeck et al., 2007) を行った。イメージングセッション中のゆっくりとした深部方向の焦点位置の変化については、1000 フレーム毎に目視により確認した。深部方向の焦点位置の変化が確認された場合、撮像面はイメージングセッション前に取得された基準画像と一致するように手動で調整されたため、次の 1000 フレームは Z シフト前の同一の撮像面でイメージングされた。

細胞ごとにカルシウム濃度蛍光を計測するための関心領域 (ROI) は手動で設定した。血管での蛍光強度をバックグラウンドとして、各 ROI 内の全ピクセルの平均シグナルから差し引いた。蛍光強度変化におけるゆっくりとした時間スケールでの変化 (Dombeck et al., 2007) を除くために、蛍光強度変化データを 30 秒毎のセグメントに分割し、各セグメント内の蛍光強度分布の 8 パーセンタイル値を各セグメント内で差し引いた。蛍光強度分布の歪度 (標準偏差の二乗により標準化された中心 3 次モーメント) を用いて、各細胞の蛍光強度変化の統計的特性を調べた。この方法により 0.3 以上の歪度を示した ROI が単一神経細胞を含む ROI として採用された。

3.結果

3.1. レバー引き／押し運動課題の学習

本研究では Hira et al (2013) で開発されたレバー引き運動課題装置を改良して用いた。装置は主に以下の5つの部分から構成された：マウスの頭蓋骨に取り付けられたヘッドプレートを固定するためのヘッドホルダー、マウスの体を保持するホルダー、右前肢で操作するレバー、左前肢が把持する棒(図 13A, B)、および報酬(水)を与えるためのスパウトである。レバーは、初期位置から引き(押し)きった位置までの間の距離(約 5 mm)を設定するための2つのバー・レバーに初期位置に戻るための弱い力(約 0.03N)をかける2つの磁石・レバーを初期位置に戻すための2つの電磁制御ソレノイドによって動きを設定された(図 13C)。まずこのレバー引き運動課題を遂行するようにマウスを訓練した。レバー引き運動課題では、レバーは前方に動かすことができないよう(すなわち、押すことができないように)、バーにより可動域を制限されていた(図 13D)。マウスが右前肢を用いてレバーを 5 mm 引き 700 ms 間その状態を継続すると、口吻付近のスパウトから 4 μ l の水を与えられ、同時にレバーがソレノイド 1 によって直ちに初期位置に戻された。レバー引き運動が十分でない場合、レバーは弱い磁力により初期位置に戻された。つまり、本課題においてはマウスは報酬を得るために 700 ms 間レバーを継続的に引かなければならなかった。6-11 回のレバー引き課題セッションを通じて、マウスはレバー引き運動を非常に高い精度で行うことができるようになった(図 14A)。引き運動学習後、レバー引き／押し運動課題を開始した。この課題では、レバーがソレノイド 2 により押すことが制限されて引くことのみ可能な「レバー引き期間」と、ソレノイド 1

によって引くことが制限されて押すことのみ可能な「レバー押し期間」の二つの期間があった。(図 14A)。それぞれの期間は 30 回の成功試行後に切り替えられた。訓練が進むにつれ、押し運動において成功率と成功回数が徐々に増加した(図 14A-C)。一方、この期間に引き運動の成功率の上昇は見られなかった。したがって、マウスは前半のレバー引き運動のみの課題でレバー引き運動を学習し、後半のレバー引き／押し運動課題ではレバー押し運動を主に学習した。こうして、二つの課題を学習したマウスは、同一セッション内に 2 方向の運動を行うことが可能となり、運動方向選択性を調べる課題を構築することに成功した。

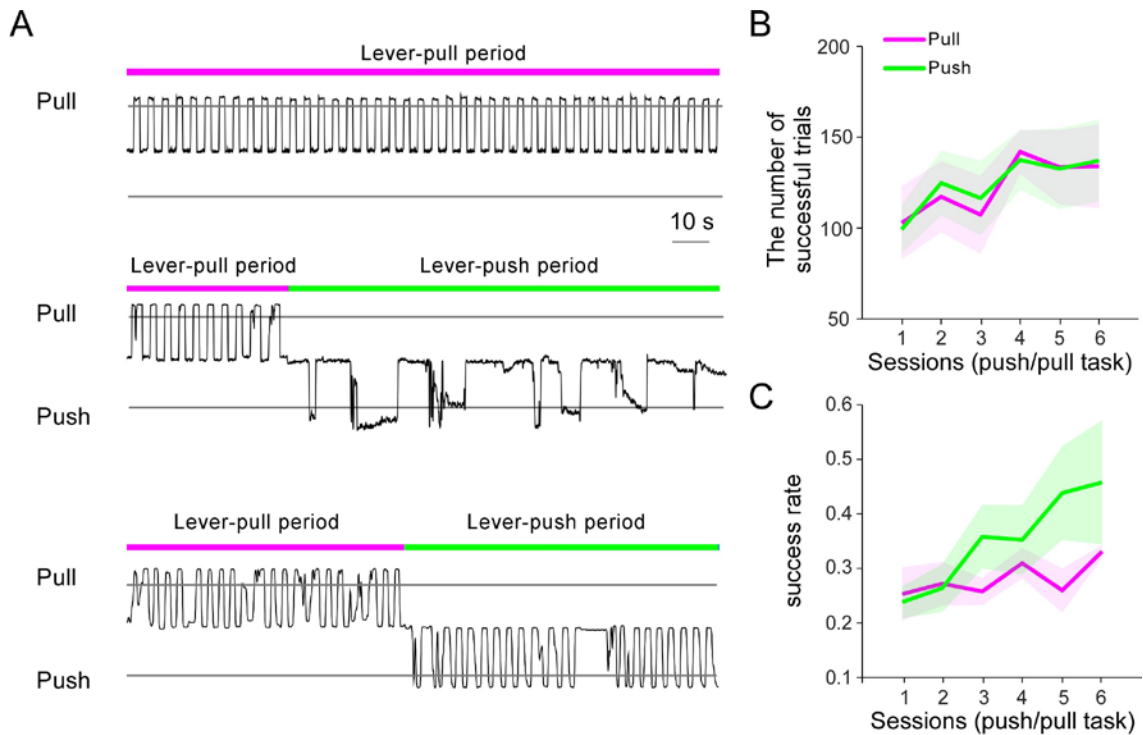


図 14. レバー引き／押し運動課題の学習

(A) レバー引き運動課題の最終セッション（上段）、レバー引き／押し運動課題の第1セッション（中間）、レバー引き／押し運動課題の第6セッション（下段）における、レバー軌跡の代表例。マゼンタの線はレバー引き期間を示し、緑線はレバー押し期間を示す。いずれも同一マウスでのデータ。成功試行となるためにはレバーが灰色線を超えることが必要だった。(B, C) レバー引き／押し運動課題の最初から6セッションにおける、レバー引き（マゼンタ）・レバー押し（緑）試行の成功数 (B) と平均成功率 (C) (n=6 匹)。図の影付き部分は±SEMを示す。

3.2. レバー引き／押し運動課題遂行中の CFA 第 II/III 層における 2 光子カルシウムイメージング

レバー引き運動時またはレバー押し運動時に活動する運動野神経細胞を同定するために、レバー引き／押し運動課題を遂行中のマウスで 2 光子カルシウムイメージングを行い、左尾側前肢領域 (CFA) の第 II/III 層神経細胞の活動を記録した。レバー引き運動課題の訓練を開始する 7-10 日前に、カルシウム感受性蛍光タンパクである GCaMP3 の遺伝子を導入するため AAV を左 CFA に注入した。5 匹のマウスにおいて、レバー引き／押し運動課題中の 2 光子イメージングを 1-7 セッション行った。本論文では、2 匹のマウスにおける 3 つのイメージングデータを解析した。図 15A は 1 回のイメージングセッションで取得されたフレームの平均画像である。いくつかのニューロンは、レバー引き運動時またはレバー押し運動時に選択的に活動する傾向を示した (図 15B)。各細胞のレバー引きまたはレバー押しへの選択性の強さを評価するために、以下の指標を算出した。まず相対蛍光強度 ($\Delta F/F$) について、運動終了前 500 ms 間の値から運動開始の 1500 ms 秒前~500 ms 前の値を引いた値を算出し、成功レバー引き試行で平均し (R_{pull})、同様にレバー押し試行についても平均した (R_{push})。この R_{pull} 、 R_{push} の値を用いて運動選択性指標 (Direction Selectivity Index: DSI) を $(R_{pull} - R_{push}) / (R_{pull} + R_{push})$ として定義した。この指標は、神経細胞がレバー引き運動中にカルシウム蛍光強度上昇を示し、レバー押し中には示さなかった場合、1 であり、逆の場合は -1 となる。例えば、図 15 における細胞 1 は、レバー押し運動時よりもレバー引き運動時においてより強い活動を示し、DSI は 0.6 であった。図 15 の細胞 2 は、レバー引き運動時よりもレバー押し運動時においてより強い活動を示し、DSI は -0.1 であった。

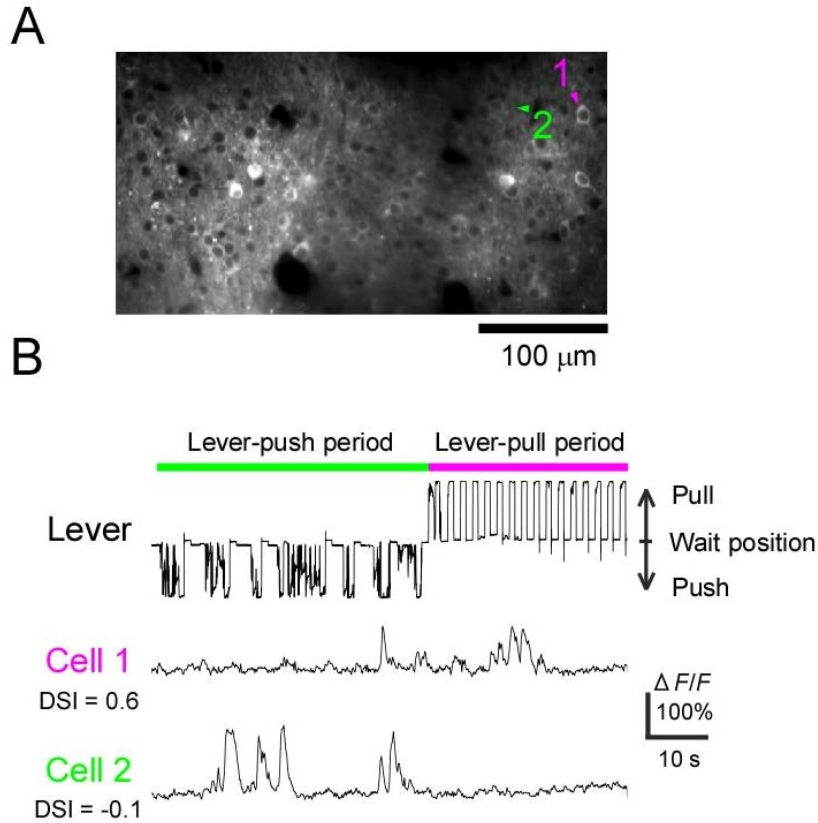


図 15. レバー引き／押し運動課題中の左 CFA 第 II/III 層神経細胞の 2 光子カルシウムイメージング

(A) イメージング画像の代表例（フレーム平均画像）。多くの GCaMP3 発現神経細胞が CFA 第 II/III 層において観察された。脳表からの深さは 154 μm 。本イメージングは、レバー引き／押し運動課題の第 2 セッションで行われた。(B) A で示された代表的な 2 つの細胞の $\Delta F/F$ 値の変化（ゆれ補正後）。レバーの軌跡は上段に示した。細胞 1 は、レバー押し運動時よりもレバー引き運動時においてより強い活動を示した。細胞 2 は、レバー引き運動時よりもレバー押し運動時により強い活動を示した。

DSI の空間分布を調べるために、図 15 で示したイメージング部位より広い範囲（約 $500 \times 500 \mu\text{m}$ ）をイメージングした（図 16A、上）。さらに、DSI の分布が脳表からの深さごとに類似しているかどうかを調べるために、次のセッションで同じ水平位置のより深い平面（図 16A、下）においてイメージングを行った。DSI 分布は異なる深さの間で類似しており、2 平面ともに、尾側ではレバー引きで活動を上昇させる細胞が支配的に存在しており、吻側ではレバー押し時に活動を上昇させる細胞が支配的に存在していた（図 16B）。これを客観的に示すために、DSI の分布を前後軸に沿って評価した。DSI > 0 （レバー押し運動時よりもレバー引き運動時に活動が大きい）の細胞について、前後軸に $100 \mu\text{m}$ 毎に DSI 値を合計し、同様に、DSI < 0 （レバー引き運動時よりもレバー押し運動時に活動が大きい）の細胞についても DSI 値の合計を前後軸にそって $100 \mu\text{m}$ 毎に算出した。図 16C に示すように、深さの異なる 2 平面において、レバー引き運動への選択性は、後方から前方へ徐々に減少する傾向にあったが、レバー押し運動への選択性は、後方から前方へ徐々に増加する傾向にあった。本実験は 1 匹のマウスのみ結果であるため、今後は CFA と RFA の両方を含むより広い領域で複数回実験を行うべきではあるが、上記の結果からマウス運動野において前肢運動の方向選択性は、両者が入り混じった分布ではなく、運動方向により異なるコラム状に分布している可能性が示唆された。

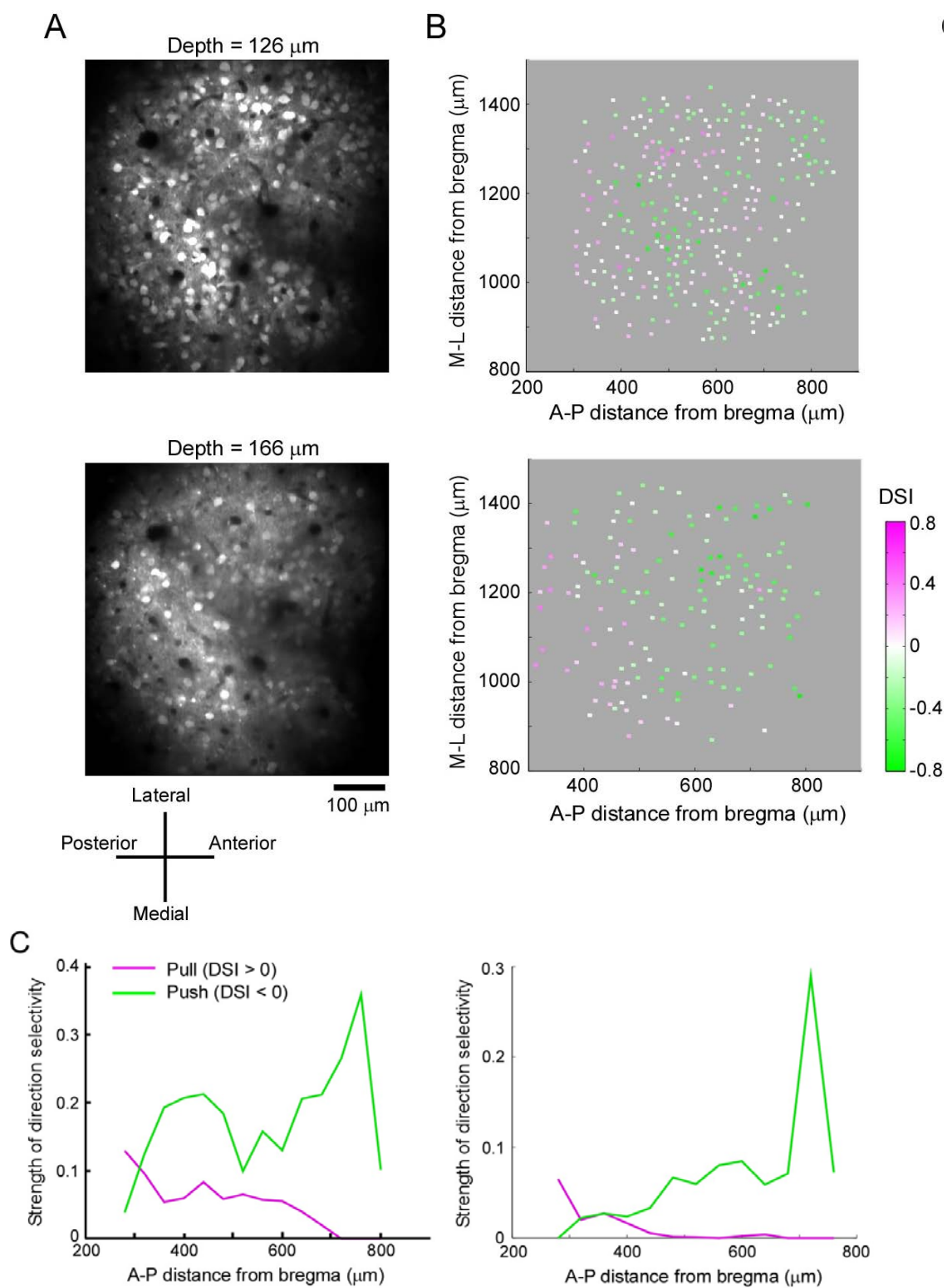


図 16. CFA 第 II/III 層の異なる深さにおける DSI の分布

(A) 脳表からの深さ 126 μm (上) および 166 μm (下) における CFA 第 II/III 層

のイメージング画像（フレーム平均）。上段・下段の画像はそれぞれ、レバー引き／押し運動課題の第9・第10セッションで取得された。(B) Aで示されたイメージング画像における各細胞のDSI値の分布。脳表からの深さは上段:126 μm 、下段:166 μm 。各細胞のDSI値は擬似カラーで示した。(C) 前後方向における方向選択性の強さの分布。緑色線およびマゼンタの線は、それぞれ押し方向選択性・引き方向選択性の強さを示す。細胞を前後方向に沿って100 μm ごとに分類しDSI値を合計した。脳表からの深さは上段:126 μm 、下段:166 μm 。

4. 考察

本研究では、マウスが頭部固定状態で前肢を用いてレバーを2方向に動かす課題を開発し、これをマウスに学習させることに成功した。さらに、この課題を遂行中のマウス CFA で2光子多細胞カルシウムイメージングを行うことで、細胞活動の運動方向選択性を算出することを可能とした。これにより今後は、マウス大脳皮質運動野の神経細胞で運動方向選択性を2光子イメージングで同定することが可能となった。

本課題の訓練においては、マウスにレバー引き運動を学習させたのち、レバー押し運動と引き運動をセッション内で交互に行わせる課題に切り替えることで、引き運動に加えて押し運動も学習させた。押し運動導入後は6セッションのトレーニングを行い、押し運動の成功率は上昇する傾向にあった。また、図16ではレバー押し引き運動課題のトレーニングを9・10セッション行ったマウスを用いて2光子多細胞カルシウムイメージングを行ったが、課題パフォーマンスが十分に飽和していない時点では細胞活動は学習過程による変化を受ける可能性もある。方向選択性細胞のクラスター様の分布が異なる個体でも見られるか、また、異なる学習段階で生成消滅するか、またコラム状の分布が変化するかを明らかにするため、さらなる実験が必要である。

運動方向選択性細胞の空間分布については、本研究でレバー押し引き運動を学習させたマウス ($n=1$) の CFA で2光子多細胞カルシウムイメージングを行ったところ、イメージング領域内で、押し選択性を示す細胞は吻側に、引き選択性を示す細胞は尾側に位置する傾向がみられた。サンプル数が十分でないため断定はできないが、CFA の神経細胞は運動方向選択性の近いものどうしで固まり、選択性の異なるクラスターどうしは水平方向に分離して存在する傾向が

あるのかもしれない。麻酔下で ChR2 トランスジェニックマウスの新皮質を網羅的に光刺激し、誘発される前肢運動の応答を皮質上にマッピングすると、前肢運動領域内で外転が誘発される領域と内転が誘発される領域とに分かれることが示されており (Harrison et al., 2012)、本研究でみられた随意運動の運動方向選択性細胞の分布と関連するかもしれない。

今後は本研究で開発した 2 方向前肢運動課題中に 2 光子多細胞カルシウムイメージングを行う手法を用いて、運動方向選択性活動と細胞種・層・空間分布・他領野からの入出力様式との関連を明らかにすることが可能である。特に、運動方向選択性活動の生成において抑制性入力果たす機能が重要であることが示唆されている (Merchant et al., 2008) ことから、分子生物学的標識方法を用いて抑制性細胞を同定し、抑制性細胞の運動方向選択性の分布が錐体細胞の選択性の分布に対してどのような配置になっているかを明らかにすることで、抑制性細胞が果たす役割についての示唆が得られるのではないかと考えている。また、逆行性蛍光標識を 2 光子多細胞カルシウムイメージングと組み合わせることで、CFA に投射する RFA の細胞や RFA に投射する CFA の細胞の運動方向選択性を調べ、領野間の結合と運動方向選択性との関係について調べることが可能である。

また今後、上記のような神経細胞間の入出力様式と運動方向選択性との関係を明らかにしていく上で、方向選択性活動が学習前からもともと神経回路に組み込まれている入出力の様式を反映したものなのか、あるいは学習により獲得された (または強められた) ものなのかを明らかにすることが必要である。2 光子多細胞カルシウムイメージングはカルシウム濃度感受性の蛍光タンパク質を運動野神経細胞に発現させることで、学習過程において同一の細胞群を慢性的に記録することが可能である (Andermann et al., 2010; Dombek et al., 2010;

Masamizu et al., 2014) ことから、この方法を用いて方向選択性活動と学習との関係を明らかにすることができると考えられる。マウス運動野ではレバー引き運動学習過程で、第 Va 層の細胞活動パターンから算出されるレバー軌跡の予測精度が向上することが明らかにされており (Masamizu et al., 2014)、本研究のレバー押し引き運動課題においても学習により細胞活動パターンの変化が起こっていると考えられる。そのような細胞活動パターンの変化は方向選択性の変化を伴うものであるのかについて、レバー引き／押し運動課題を学習中のマウスにおいて、カルシウム濃度感受性の蛍光タンパク質を運動野神経細胞に発現させ、同一細胞群を慢性記録し、明らかにしていく必要がある。

第IV章 考察 - 総論

本研究では、複数の脳領域間で多数の神経細胞が協調して随意運動を実現する機構を調べるため、第一に、光遺伝学を用いた新たな方法論(Optogenetic Tracing)を開発し、*in vivo*における大脳皮質領域間の機能的結合を明らかにした。

げっ歯類の2つの前肢運動領域(RFA と CFA)間の投射様式は、ラットでは解剖学的に同定されていたが、実際の運動遂行時の領域間協調にとって重要と考えられる機能的シナプス結合についてはこれまで調べられてこなかった。そこで本研究では ChR2 を発現させたマウスの大脳皮質を網羅的に光刺激し、RFA または CFA の活動電位応答を記録して刺激領域上にマッピングすることで、記録部位への機能的結合をもつ領域を同定した(Optogenetic Tracing)。光刺激を行うマウスとして、ChR2 を皮質の第 Vb 層錐体細胞に発現した ChR2 トランスジェニックマウス、またはアデノ随伴ウイルスによりある領域の全層に ChR2 を発現させたマウスを用い、両者の結果を比較することで入力元の層を明らかにすることを可能にした。

上記の手法を用いてマウスの RFA と CFA に入力する機能的結合を調べた結果、RFA 第 Vb 層から CFA 第 V 層細胞に、また CFA 第 II/III 層及び第 Va 層から RFA の第 V 層細胞に、機能的シナプス入力があることを明らかにした。これは逆行性・順行性の蛍光標識色素を用いることで解剖学的にも確かめられた。マウスにおけるこのような RFA と CFA の間の投射様式は、ラットでの知見 (Rouiller et al., 1993) と一致する。視覚野などの感覚野では、低次感覚野から高次感覚野へのフィードフォワード投射は主に前者の浅層から後者の第IV層へ終止し、高次感覚野から低次感覚野へのフィードバック投射は主に前者の深層から後者の第IV層以外へ投射するという様式 (van Essen & Maunsell, 1983) が知られている。運動野においては、低次運動野・高次運動野間ではどちらからの投射も

第 III・V 層の細胞から起こるが、第 III 層細胞数に対する第 V 層細胞数の比率は、高次から低次への投射でより高くなることが知られている(Shipp 2005)。運動野には第 IV 層は存在せず、感覚野におけるフィードバック・フィードフォワードの様式を運動野に厳密に適応することはできないが、入力元の層の特異性から CFA から RFA への投射は感覚野におけるフィードフォワード投射に、RFA から CFA への投射は感覚野におけるフィードバック投射に類似しており、RFA は CFA より階層的に上位である可能性が示唆される。本研究の結果では、RFA 第 Vb 層と CFA 第 Vb 層とでは前者から後者に対して一方的な強い入力があり、逆方向には同様の入力がなかった。運動野第 Vb 層の多くは運動皮質の最終出力である皮質脊髄細胞であり(Anderson et al., 2010)、最終出力に関して RFA 第 Vb 層は CFA 第 Vb 層に対し一方的に調節の働きをもち、より高次の機能をもつ可能性が示唆される。

また本研究では第二に、具体的な運動を企画し実現する過程を反映していると推測される運動方向選択性活動が、多数の神経細胞の協調の中でどのように生成されるのか、またそのような運動の企画に関わる情報は複数の脳領域間でどのように受け渡されていくのかを調べるため、マウス用の前肢 2 方向運動課題を新しく開発し、これにより 2 光子多細胞カルシウムイメージングによって運動方向選択性活動を同定することを可能にした。マウスに頭部固定状態で前肢を用いてレバーを前方または後方に動かす課題を訓練したのち、同課題を遂行中のマウス CFA において 2 光子多細胞カルシウムイメージングを行い、CFA の第 II/III 層で運動方向選択性活動を同定することができた。今後は、前肢 2 方向運動課題においてマウスが十分に飽和したパフォーマンスに達した状況でイメージングを行うため、訓練期間を本実験時よりも延ばした場合にパフォーマンスが飽和する時期を確かめる必要がある。そのうえで、「2 光子イメージング

で運動方向選択性活動細胞が同定できる」という本実験系に特有の利点を生かし、運動方向選択性活動細胞の空間分布・細胞種・投射様式を明らかにすることで、多数の神経細胞が協調して運動方向選択性を生成する機構を明らかにすることができると考えている。

空間分布については、サルの運動野前肢領域で観察されるような、同一の運動方向選択性のミニコラムや、水平方向の繰り返し構造（Amirikian & Georgopoulos, 2003; Georgopoulos et al., 2007）がマウスの前肢運動野にも存在するのかを、本実験系を用いて1細胞レベルの解像度で検証することが可能である。

本研究では、まずCFA第II/III層の運動方向選択性細胞の空間分布を調べたが、方向選択性のコラム状構造が存在するのかを明らかにするためには、第II/III層とともに同位置での第Va層、第Vb層での分布を調べることが必須である。本研究では1匹のマウスについて、水平位置が同一の異なる深さの第II/III層内で方向選択性の水平分布に類似性がある傾向を見いだしたが、サンプル数が十分ではないため、今後はこのような傾向を第Va層と第Vb層の観察も行いながらほかのマウスでも確かめていく必要がある。また、そのようにしてCFAで観察される分布様式は、RFAにも同様に存在するであろうか。さらに、投射様式が非対称的であるRFAとCFAでは、運動の遂行において果たす役割も異なる可能性があるが、それぞれの領域において、運動方向選択性細胞の存在比率や選択性の強さに差はあるだろうか。まずこのような点を、レバー引き／押し運動課題中にRFAでも2光子カルシウムイメージングを行うことで明らかにする必要がある。

また、RFAとCFAとの間でどのような情報が伝達されているのかを明らかにするために、一方の領域において他方の領域に投射する神経細胞や他方の領域

から投射を受ける神経細胞での方向選択性を調べる必要がある。前者については、2光子カルシウムイメージングとともに逆行性標識色素を用いることで可能であり、後者については、他方の領域を光刺激した際に活動応答のある細胞を2光子カルシウムイメージングで同定することで可能である。RFA と CFA において方向選択性の異なるクラスター構造が存在した場合、一方の領域のクラスターが他方の領域の、選択性が同じクラスターと異なるクラスターに対してどのような投射関係を持つのかも検討する必要がある。たとえば、選択性が同じクラスターに対しては興奮性細胞への入力の高く、選択性の異なるクラスターに対しては抑制性細胞への入力の高く、といった回路機構があるかを明らかにする必要がある。

CFA では、学習過程において第 II/III 層と第 Va 層とで細胞活動パターンの変化が異なることが示されている (Masamizu et al., 2014) が、引き運動学習後に押し運動を学習する場合、引き運動学習時に引き選択性を獲得した細胞は押し運動学習時に押し選択性へ変化していくだろうか。あるいは一度引き学習中に獲得された引き選択性は押し学習中にも固定され、押し選択性への活動変化は異なるクラスターに起こるだろうか。このような選択性の入れ替わり (の有無) は第 II/III 層と第 Va 層とで異なるだろうか。本研究によって、運動回路の本質的な問題にアプローチすることが可能になってきている。

今後はこれらの点について、大脳皮質における神経細胞の層・空間分布・投射様式・学習変化に着目し本研究で開発された2光子カルシウムイメージングでの運動方向選択性という方法論を用いて明らかにしていくことが必要と考えられる。

引用文献

- Airan, R.D., Thompson, K.R., Fenno, L.E., Bernstein, H., and Deisseroth, K. (2009). Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458, 1025-1029.
- Aizawa, H., and Tanji, J. (1994). Corticocortical and thalamocortical responses of neurons in the monkey primary motor cortex and their relation to a trained motor task. *J. Neurophysiol.* 71, 550-560.
- Aizawa, H., and Tanji, J. (1994). Corticocortical and thalamocortical responses of neurons in the monkey primary motor cortex and their relation to a trained motor task. *J. Neurophysiol.* 71, 550-560.
- Ako, R., Wakimoto, M., Ebisu, H., Tanno, K., Hira, R., Kasai, H., Matsuzaki, M., and Kawasaki, H. (2011). Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 48, 246-257.
- Alexander, G.E. (1987). Selective neuronal discharge in monkey putamen reflects intended direction of planned limb movements. *Exp. Brain Res.* 67, 623-634.
- Alexander, G.E., and Crutcher, M.D. (1990). Preparation for movement: neural representations of intended direction in three motor areas of the monkey. *J. Neurophysiol.* 64, 133-150.
- Amirikian, B., and Georgopoulos, A.P. (2003). Modular organization of directionally tuned cells in the motor cortex: is there a short-range order? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12474-12479.
- Anderson, C.T., Sheets, P.L., Kiritani, T., and Shepherd, G.M.G. (2010). Sublayer-specific microcircuits of corticospinal and corticostriatal neurons in motor cortex. *Nat. Neurosci.* 13, 739-744.
- Andrasfalvy, B.K., Zemelman, B.V., Tang, J., and Vaziri, A. (2010). Two-photon single-cell

- optogenetic control of neuronal activity by sculpted light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11981-11986.
- Arenkiel, B.R., Peca, J., Davison, I.G., Feliciano, C., Deisseroth, K., Augustine, G.J., Ehlers, M.D., and Feng, G. (2007). In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54, 205-218.
- Ayling, O.G.S., Harrison, T.C., Boyd, J.D., Goroshkov, A., and Murphy, T.H. (2009). Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat. Methods* 6, 219-224.
- Bandyopadhyay, S., Shamma, S.A., and Kanold, P.O. (2010). Dichotomy of functional organization in the mouse auditory cortex. *Nat. Neurosci.* 13, 361-368.
- Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L.A., Hegemann, P., and Deisseroth, K. (2009). Bi-stable neural state switches. *Nat. Neurosci.* 12, 229-234.
- Biane, J.S., Takashima, Y., Scanziani, M., Conner, J.M., and Tuszynski, M.H. (2016). Thalamocortical projections onto behaviorally relevant neurons exhibit plasticity during adult motor learning. *Neuron* 89, 1173-1179.
- Binding, J., Ben Arous, J., Léger, J.F., Gigan, S., Boccard, C., and Bourdieu, L. (2011). Brain refractive index measured in vivo with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy. *Opt. Express* 19, 4833-4847.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-1268.
- Brown, S.P., and Hestrin, S. (2009). Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* 457, 1133-1136.
- Calford, M.B., and Semple, M.N. (1995). Monaural inhibition in cat auditory cortex. *J. Neurophysiol.* 73, 1876-1891.

- Caminiti, R., Johnson, P.B., Burnod, Y., Galli, C., and Ferraina, S. (1990). Shift of preferred directions of premotor cortical cells with arm movements performed across the workspace. *Exp. Brain Res.* 83, 228-232.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L., and Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663-667.
- Chapin, J.K., Moxon, K.A., Markowitz, R.S., and Nicolelis, M.A. (1999). Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nat. Neurosci.* 2, 664-670.
- Connors, B.W., and Gutnick, M.J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13, 99-104.
- Coogan, T.A., and Burkhalter, A. (1990). Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex. *Exp. Brain Res.* 80, 49-53.
- Crammond, D.J., and Kalaska, J.F. (1989). Neuronal activity in primate parietal cortex area 5 varies with intended movement direction during an instructed-delay period. *Exp. Brain Res.* 76, 458-462.
- Dombeck, D.A., Harvey, C.D., Tian, L., Looger, L.L., and Tank, D.W. (2010). Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat. Neurosci.* 13, 1433-1440.
- Dombeck, D.A., Graziano, M.S., and Tank, D.W. (2009). Functional clustering of neurons in motor cortex determined by cellular resolution imaging in awake behaving mice. *J. Neurosci.* 29, 13751-13760.
- Donoghue, J.P., and Wise, S.P. (1982). The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J. Comp. Neurol.* 212, 76-88.

- Dum, R.P., and Strick, P.L. (1991). The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. *J. Neurosci.* 11, 667– 689.
- Dum, R.P., and Strick, P.L. (2005). Frontal lobe inputs to the digit representations of the motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J. Neurosci.* 25, 1375-86.
- Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L.J., Aronoff, R., Weber, B., and Petersen, C.C.H. (2007). Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 56, 907-923.
- Fortier, P.A., Kalaska, J.F., and Smith, A.M. (1989). Cerebellar neuronal activity related to whole-arm reaching movements in the monkey. *J. Neurophysiol.* 62, 198-211.
- Froemke, R.C., and Dan, Y. (2002). Spike-timing-dependent synaptic modification induced by natural spike trains. *Nature* 416, 433-438.
- Fu, Q.G., Suarez, J.I., and Ebner, T.J. (1993). Neuronal specification of direction and distance during reaching movements in the superior precentral premotor area and primary motor cortex of monkeys. *J. Neurophysiol.* 70, 2097-2116.
- Fuster, J.M. (1973). Unit activity in prefrontal cortex during delayed-response performance: neuronal correlates of transient memory. *J. Neurophysiol.* 36, 61-78.
- Georgopoulos, A.P., Kalaska, J.F., Caminiti, R., and Massey, J.T. (1982). On the relations between the direction of two-dimensional arm movements and cell discharge in primate motor cortex. *J. Neurosci.* 2, 1527-1537.
- Georgopoulos, A.P., Kettner, R.E., and Schwartz, A.B. (1988). Primate motor cortex and free arm movements to visual targets in three-dimensional space. II. Coding of the direction of movement by a neuronal population. *J. Neurosci.* 8, 2928-2937.
- Georgopoulos, A.P., Merchant, H., Naselaris, T., and Amirkian, B. (2007). Mapping of the preferred direction in the motor cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11068-11072.

- Georgopoulos, A. (1984). The representation of movement direction in the motor cortex: Single cell and population studies. *Dynamic Aspects of Neocortical Function* 501-524.
- Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K.R., and Deisseroth, K. (2010). Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154-165.
- Harrison, T.C., Ayling, O.G., and Murphy, T.H. (2012). Distinct cortical circuit mechanisms for complex forelimb movement and motor map topography. *Neuron* 74, 397-409.
- Hira, R., Honkura, N., Noguchi, J., Maruyama, Y., Augustine, G.J., Kasai, H., and Matsuzaki, M. (2009). Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J. Neurosci. Methods* 179, 258-263.
- Hira, R., Ohkubo F., Ozawa K., Isomura Y., Kitamura K., Kano M., Kasai H., and Matsuzaki M. (2013). Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. *J. Neurosci.* 33, 1377-1390.
- Hira R., Terada S., Kondo M., and Matsuzaki M. (2015). Distinct functional modules for discrete and rhythmic forelimb movements in the mouse motor cortex. *J. Neurosci.* 35, 13311-13322.
- Holtmaat A., Bonhoeffer T., Chow DK., Chuckowree J., De Paola V., Hofer SB., Hübener M., Keck T., Knott G., Lee WC., Mostany R., Morsic-Flogel TD., Nedivi E., Portera-Cailliau C., Svoboda K., Trachtenberg JT., Wilbrecht L. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat. Protoc.* 4, 1128-1144
- Hooks, B.M., Mao, T., Gutnisky, D.A., Yamawaki, N., Svoboda, K., and Shepherd, G.M.G. (2013). Organization of cortical and thalamic input to pyramidal neurons in mouse motor cortex. *J. Neurosci.* 33, 748-760.
- Howard, C.V., and Reed, M.G. (1998). *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in*

microscopy. Oxford: Bios Scientific Publishers.

Huber, D., Petreanu, L., Ghitani, N., Ranade, S., Hromádka, T., Mainen, Z., and Svoboda, K. (2008).

Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451, 61.

Hyland, B. (1998). Neural activity related to reaching and grasping in rostral and caudal regions of

rat motor cortex. *Behav. Brain Res.* 94, 255-269.

Inase, M., Buford, J.A., and Anderson, M.E. (1996). Changes in the control of arm position,

movement, and thalamic discharge during local inactivation in the globus pallidus of the monkey. *J. Neurophysiol.* 75, 1087-1104.

Isomura, Y., Harukuni, R., Takekawa, T., Aizawa, H., and Fukai, T. (2009). Microcircuitry

coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. *Nat. Neurosci.* 12, 1586-1593.

Izhikevich, E.M. (2006). Polychronization: Computation with spikes. *Neural Comput.* 18, 245-282.

Jarosiewicz, B., Schummers, J., Malik, W.Q., Brown, E.N., and Sur, M. (2012). Functional biases in

visual cortex neurons with identified projections to higher cortical targets. *Current Biology* 22, 269-277.

Jarosiewicz, B., Schummers, J., Malik, W.Q., Brown, E.N., and Sur, M. (2012). Functional biases in

visual cortex neurons with identified projections to higher cortical targets. *Current Biology* 22, 269-277.

Johnson, P.B., Ferraina, S., Bianchi, L., and Caminiti, R. (1996). Cortical networks for visual

reaching: physiological and anatomical organization of frontal and parietal lobe arm regions. *Cerebral Cortex* 6, 102-119.

Kalaska, J., Caminiti, R., and Georgopoulos, A. (1983). Cortical mechanisms related to the direction

of two-dimensional arm movements: relations in parietal area 5 and comparison with motor

- cortex. *Experimental Brain Research* 51, 247-260.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476-486.
- Kerlin, A.M., Andermann, M.L., Berezovskii, V.K., and Reid, R.C. (2010). Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex. *Neuron* 67, 858-871.
- Kerr, J.N., Greenberg, D., and Helmchen, F. (2005). Imaging input and output of neocortical networks in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14063-14068.
- Kerr, J.N., Greenberg, D., and Helmchen, F. (2005). Imaging input and output of neocortical networks in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14063-14068.
- Kiritani, T., Wickersham, I.R., Seung, H.S., and Shepherd, G.M.G. (2012). Hierarchical connectivity and connection-specific dynamics in the corticospinal–corticostriatal microcircuit in mouse motor cortex. *J. Neurosci.* 32, 4992-5001.
- Komiyama, T., Sato, T.R., O'Connor, D.H., Zhang, Y., Huber, D., Hooks, B.M., Gabbito, M., and Svoboda, K. (2012). Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature* 464, 1182.
- Kubota, K., and Funahashi, S. (1982). Direction-specific activities of dorsolateral prefrontal and motor cortex pyramidal tract neurons during visual tracking. *J. Neurophysiol.* 47, 362-376.
- Kubota, K., and Hamada, I. (1978). Visual tracking and neuron activity in the post-arcuate area in monkeys. *J. Physiol. (Paris)* 74, 297-312.
- Kurata, K., and Wise, S.P. (1988). Premotor and supplementary motor cortex in rhesus monkeys: neuronal activity during externally- and internally-instructed motor tasks. *Exp. Brain Res.* 72, 237-248.
- Laubach, M., Wessberg, J., and Nicolelis, M.A. (2000). Cortical ensemble activity increasingly

- predicts behaviour outcomes during learning of a motor task. *Nature* 405, 567-571.
- Li, C., and Waters, R.S. (1991). Organization of the mouse motor cortex studied by retrograde tracing and intracortical microstimulation (ICMS) mapping. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 18, 28-38.
- Lim, D.H., Mohajerani, M.H., Ledue, J., Boyd, J., Chen, S., and Murphy, T.H. (2012). In vivo large-scale cortical mapping using channelrhodopsin-2 stimulation in transgenic mice reveals asymmetric and reciprocal relationships between cortical areas. *Front. Neural Circuits* 6, 11.
- Lo, L., and Anderson, D.J. (2011). A cre-dependent, anterograde transsynaptic viral tracer for mapping output pathways of genetically marked neurons. *Neuron* 72, 938-950.
- Ma, W.P., Liu, B.H., Li, Y.T., Huang, Z.J., Zhang, L.I., and Tao, H.W. (2010). Visual representations by cortical somatostatin inhibitory neurons--selective but with weak and delayed responses. *J. Neurosci.* 30, 14371-14379.
- Makino, H., Ren, C., Liu, H., Kim, A.N., Kondapaneni, N., Liu, X., Kuzum, D., and Komiyama, T. (2017). Transformation of cortex-wide emergent properties during motor learning. *Neuron* 94, 880-890.
- Marshall, J.H., Mori, T., Nielsen, K.J., and Callaway, E.M. (2010). Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron* 67, 562-574.
- Masamizu, Y., Okada, T., Kawasaki, K., Ishibashi, H., Yuasa, S., Takeda, S., Hasegawa, I., and Nakahara, K. (2011). Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience* 193, 249-258.
- Masamizu, Y., Tanaka, Y.R., Tanaka, Y.H., Hira, R., Ohkubo, F., Kitamura, K., Isomura, Y., Okada, T., and Matsuzaki, M. (2014). Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat. Neurosci.* 17, 987-994.

- Matsumura, M., Sawaguchi, T., and Kubota, K. (1992). GABAergic inhibition of neuronal activity in the primate motor and premotor cortex during voluntary movement. *J. Neurophysiol.* 68, 692-702.
- Merchant, H., Naselaris, T., and Georgopoulos, A.P. (2008). Dynamic sculpting of directional tuning in the primate motor cortex during three-dimensional reaching. *J. Neurosci.* 28, 9164-9172.
- Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., and He, Z. (2010). Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472, 191-196.
- Monier, C., Chavane, F., Baudot, P., Graham, L.J., and Frégnac, Y. (2003). Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron* 37, 663-680.
- Moore, C.I., and Nelson, S.B. (1998). Spatio-temporal subthreshold receptive fields in the vibrissa representation of rat primary somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* 80, 2882-2892.
- Morishima, M., and Kawaguchi, Y. (2006). Recurrent connection patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. *J. Neurosci.* 26, 4394-4405.
- Neafsey, E., Bold, E., Haas, G., Hurley-Gius, K., Quirk, G., Sievert, C., and Terreberry, R. (1986). The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res. Rev.* 11, 77-96.
- Neafsey, E., and Sievert, C. (1982). A second forelimb motor area exists in rat frontal cortex. *Brain Res.* 232, 151-156.
- O'Connor, D.H., Huber, D., and Svoboda, K. (2009). Reverse engineering the mouse brain. *Nature* 461, 923-929.
- O'Connor, D.H., Peron, S.P., Huber, D., and Svoboda, K. (2010). Neural activity in barrel cortex underlying vibrissa-based object localization in mice. *Neuron* 67, 1048-1061.

- Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., and Reid, R.C. (2005). Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433, 597-603.
- Okano, K., and Tanji, J. (1987). Neuronal activities in the primate motor fields of the agranular frontal cortex preceding visually triggered and self-paced movement. *Exp. Brain Res.* 66, 155-166.
- Papagiakoumou, E., Anselmi, F., Bègue, A., de Sars, V., Glückstad, J., Isacoff, E.Y., and Emiliani, V. (2010). Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2. *Nat Methods* 7, 848-54.
- Petreaunu, L., Mao, T.Y., Sternson, S.M., and Svoboda, K. (2009). The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 457, 1142-1145.
- Pronichev, I., and Lenkov, D. (1998). Functional mapping of the motor cortex of the white mouse by a microstimulation method. *Neurosci. Behav. Physiol.* 28, 80-85.
- Requin, J., Lecas, J.C., and Vitton, N. (1990). A comparison of preparation-related neuronal activity changes in the prefrontal, premotor, primary motor and posterior parietal areas of the monkey cortex: preliminary results. *Neurosci. Lett.* 111, 151-156.
- Rickgauer, J.P., and Tank, D.W. (2009). Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15025-30.
- Romo, R., and Schultz, W. (1992). Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. III. Neuronal activity in the supplementary motor area. *Exp. Brain Res.* 91, 396-407.
- Rouiller, E.M., Moret, V., and Liang, F. (1993). Comparison of the connectional properties of the two forelimb areas of the rat sensorimotor cortex: support for the presence of a premotor or supplementary motor cortical area. *Somatosens. Mot. Res.* 10, 269-289.
- Runyan, C.A., Schummers, J., Van Wart, A., Kuhlman, S.J., Wilson, N.R., Huang, Z.J., and Sur, M. (2010). Response features of parvalbumin-expressing interneurons suggest precise roles for

- subtypes of inhibition in visual cortex. *Neuron* 67, 847-857.
- Saiki, A., Sakai, Y., Fukabori, R., Soma, S., Yoshida, J., Kawabata, M., Yawo, H., Kobayashi, K., Kimura, M., and Isomura, Y. (2017). In vivo spiking dynamics of intra-and extratelencephalic projection neurons in rat motor cortex. *Cerebral Cortex* 1-15.
- Sato, T.R., and Svoboda, K. (2010). The functional properties of barrel cortex neurons projecting to the primary motor cortex. *J. Neurosci.* 30, 4256-4260.
- Schreiner, C., Mendelson, J., Raggio, M., Brosch, M., and Krueger, K. (1997). Temporal processing in cat primary auditory cortex. *Acta Otolaryngol.* 117, 54-60.
- Schultz, W., and Romo, R. (1992). Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. I. Preparatory activity in the anterior striatum. *Exp. Brain Res.* 91, 363-384.
- Settlage, P., Bingham, W., Suckle, H., Borge, A., and Woolsey, C. Paper presented at Federation Proceedings.
- Shipp, S. (2005). The importance of being agranular: a comparative account of visual and motor cortex. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 797-814.
- Smith, N.J., Horst, N.K., Liu, B., Caetano, M.S., and Laubach, M. (2010). Reversible inactivation of rat premotor cortex impairs temporal preparation, but not inhibitory control, during simple reaction-time performance. *Front. Integr. Neurosci.* 4, 124.
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702.
- Sohya, K., Kameyama, K., Yanagawa, Y., Obata, K., and Tsumoto, T. (2007). GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca²⁺ imaging in transgenic mice. *J. Neurosci.* 27, 2145-2149.

- Stevenson, I.H., London, B.M., Oby, E.R., Sachs, N.A., Reimer, J., Englitz, B., David, S.V., Shamma, S.A., Blanche, T.J., and Mizuseki, K. (2012). Functional connectivity and tuning curves in populations of simultaneously recorded neurons. *PLoS Computational Biology* 8, e1002775.
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., and Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7319-7324.
- Tanaka, Y.R., Tanaka, Y.H., Konno, M., Fujiyama, F., Sonomura, T., Okamoto-Furuta, K., Kameda, H., Hioki, H., Furuta, T., Nakamura, K.C., and Kaneko, T. (2011). Local connections of excitatory neurons to corticothalamic neurons in the rat barrel cortex. *J. Neurosci.* 31, 18223–36.
- Tanji, J., and Evarts, E.V. (1976). Anticipatory activity of motor cortex neurons in relation to direction of an intended movement. *J. Neurophysiol.* 39, 1062-1068.
- Tanji, J., Taniguchi, K., and Saga, T. (1980). Supplementary motor area: neuronal response to motor instructions. *J. Neurophysiol.* 43, 60-68.
- Tanji, J., Taniguchi, K., and Saga, T. (1980). Supplementary motor area: neuronal response to motor instructions. *J. Neurophysiol.* 43, 60-68.
- Tennant, K.A., Adkins, D.L., Donlan, N.A., Asay, A.L., Thomas, N., Kleim, J.A., and Jones, T.A. (2011). The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb. Cortex* 21, 865-876.
- Turner, R.S., and Anderson, M.E. (1997). Pallidal discharge related to the kinematics of reaching movements in two dimensions. *J. Neurophysiol.* 77, 1051-1074.
- Umeda, T., and Isa, T. (2011). Differential contributions of rostral and caudal frontal forelimb areas to compensatory process after neonatal hemidecortication in rats. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1453-60.

- Vandenbeuch, A., Pillias, A., and Faurion, A. (2004). Modulation of taste peripheral signal through interpapillar inhibition in hamsters. *Neurosci. Lett.* 358, 137-141.
- Van Essen, D.C., and Maunsell, J.H.R. (1983). Hierarchical organization and functional streams in the visual cortex. *Trends Neurosci.* 6, 370-375.
- Wang, Y., and Kurata, K. (1998). Quantitative analyses of thalamic and cortical origins of neurons projecting to the rostral and caudal forelimb motor areas in the cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 781, 137-147.
- Wang, H., Peca, J., Matsuzaki, M., Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., Wang, D., Zhang, F., Boyden, E., and Deisseroth, K. (2007). High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8143-8148.
- Wilson, R.I., and Mainen, Z.F. (2006). Early events in olfactory processing. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 163-201.
- Wise, S., and Tanji, J. (1981). Supplementary and precentral motor cortex: contrast in responsiveness to peripheral input in the hindlimb area of the unanesthetized monkey. *J. Comp. Neurol.* 195, 433-451.
- Wise, S.P., and Mauritz, K.H. (1985). Set-related neuronal activity in the premotor cortex of rhesus monkeys: effects of changes in motor set. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 223, 331-354.
- Wolters, A., Sandbrink, F., Schlottmann, A., Kunesch, E., Stefan, K., Cohen, L.G., Benecke, R., and Classen, J. (2003). A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J. Neurophysiol.* 89, 2339-2345.
- Woolsey, C.N. (1958). Organization of somatic sensory and motor areas of the cerebral cortex. *Biol Biochem Behav* 1, 63-81.
- Woolsey, C.N. (1952). Patterns of localization in sensory and motor areas of the cerebral cortex. *The*

Biology of Mental Health and Disease 193, 206.

Yizhar, O., Fenno, L.E., Davidson, T.J., Mogri, M., and Deisseroth, K. (2011). Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71, 9-34.

Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S.P., Mattis, J., Yizhar, O., Hegemann, P., and Deisseroth, K. (2008). Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 11, 631-633.

Zhang, F., Wang, L., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., and Gottschalk, A. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639.

Zhu, J.J., and Connors, B.W. (1999). Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex. *J. Neurophysiol.* 81, 1171-1183.

Zingg, B., Chou, X.L., Zhang, Z.G., Mesik, L., Liang, F., Tao, H.W., and Zhang, L.I. (2017). AAV-mediated anterograde transsynaptic tagging: Mapping corticocollicular input-defined neural pathways for defense behaviors. *Neuron* 93, 33-47.

謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただきました松崎政紀教授に深く感謝申し上げます。また大学院入学時よりご指導を頂きともに研究を行ってきた平理一郎博士に心より感謝申し上げます。また研究生活にあたり様々な面でご支援をいただきました基礎生物学研究所光脳回路部門の皆様に感謝申し上げます。技術指導を頂きました田中康裕博士、正水芳人博士、技術補佐のサポートを頂きました姫野美貴様、齋藤順子様、杉山朋美様に厚くお礼申し上げます。基礎生物学研究所光学解析室においては機器使用の許諾を頂き、お礼申し上げます。また pAAV-Syn-hChR2 (H134R)-EYFP-WPRE を提供頂きましたスタンフォード大学 K. Deisseroth 博士と pAAV2-9 のヘルパープラスミドを提供頂きましたペンシルベニア大学の J.M. Wilson 博士に感謝申し上げます。