

氏 名 長谷川 亮太

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第 265 号

学位授与の日付 2020 年9月 28日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学位論文題目 Structural dynamics and stability of corticocortical and thalamocortical axon terminals during motor learning

論文審査委員 主 査 教授 藤森 俊彦
教授 東島 眞一
准教授 渡辺 英治
教授 深澤 有吾
福井大学 学術研究院 医学領域
教授 松崎 政紀
東京大学 大学院医学系研究科

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full: Hasegawa, Ryota

Title: Structural dynamics and stability of corticocortical and thalamocortical axon terminals during motor learning

(運動学習過程における皮質間・視床皮質間投射軸索終末構造のダイナミクスと安定化)

Synapses consist of presynaptic and postsynaptic sites, and are indispensable prerequisites for communication between neurons. Functionally, synapses can change the strength of their chemical transmission by processes such as modification of the probability of transmitter release and varying the number of postsynaptic glutamate receptors. Anatomically, synapses can be newly formed, eliminated, or undergo a change in size. Such functional and/or structural changes are termed synaptic plasticity, and form the cellular basis of learning and memory. In the majority of excitatory synapses in the mammalian brain, axonal boutons contact with dendritic spines, and the size of the dendritic spines correlates strongly with the excitatory postsynaptic response. Many spines are maintained for a long period of time and probably play critical roles in lifelong memory storage and the stability of neural circuits. By contrast, a subset of spines are dynamic; they can be newly formed, eliminated, or changed in size, and such structural plasticity probably plays critical roles in memory formation and extinction, homeostasis, and reorganization of neural circuits. In fact, motor learning induces synaptic plasticity in M1. *In vivo* two-photon imaging studies in rodents revealed that dendritic spines in M1 dynamically change during motor learning, and that the stabilization of a subset of layer 1 (L1) spines of L5 pyramidal neurons, which are newly formed in the early stage of learning, is relevant to improvement in motor performance.

To understand motor-learning-induced circuit plasticity, it is important to describe the bouton plasticity of long-range projection axons; however, it is poorly understood how presynaptic axonal boutons are formed, eliminated, and maintained during motor learning, and whether long-range corticocortical and thalamocortical axonal boutons show distinct structural changes during

(Form 3)

learning. Therefore, the present study aims to unravel the axonal bouton dynamics occurring during motor learning. In particular, because previous studies have revealed that secondary motor cortex (M2) and motor thalamus are essential for motor learning, the current study focused on M2–M1, and thalamocortical connections and their plasticity.

Initially, I anatomically confirmed that L1 in M1 receives axonal projections from M2 and the thalamus. By using retrograde tracer, M2 and motor thalamus were identified as the major input sources. Next, long-range axons originating from M2 and the thalamus were separately labeled with adeno-associated virus (AAV) encoding different colors of fluorescent protein, and two-photon microscopy was used to pursue the structural plasticity of these boutons in M1 during learning of an accelerating rotarod task. Over seven consecutive days of motor training, M2 and thalamocortical boutons showed distinct dynamics: M2 boutons showed an increasing formation rate, whereas thalamocortical boutons showed a decreasing elimination rate and increasing survival fraction during learning. In addition, pre-existing thalamic boutons showed a slight increase in their sizes in the early stage of learning. This may reflect that a small subset of the pre-existing thalamic boutons, including the enlarged boutons, may make contact with newly formed spines during the early stage of learning. Taken together, these results suggest that the late stabilization of thalamic boutons in M1 contributes to motor skill learning.

Although the current study has described learning-related axonal bouton plasticity, there are some difficulties in interpreting the results of the experiment. One obstacle is that presynaptic bouton plasticity and postsynaptic dendritic spine plasticity do not occur in a one-to-one manner; for instance, previous electron microscopy studies have revealed that newly formed dendritic spines frequently make synapses with pre-existing axonal boutons. Therefore, to understand pathway-specific structural plasticity, presynaptic and postsynaptic sites should be simultaneously labeled. To achieve this goal, the present study took advantage of the mammalian green fluorescence protein reconstitution across synaptic partners (mGRASP) technique, which is known to label precisely the actual synaptic pairs. In this method, non-fluorescent split-GFP fragments are inserted into the synaptic membranes, and reconstituted GFP fluorescence can be detected in

(Form 3)

synaptic pairs. Optimization of the vector constructs allowed mGRASP signals to be detected with *in vivo* two-photon microscopy. Although, this study is a preliminary attempt at the methodology, the technique may be useful to describe learning-induced synaptic remodeling in specific synaptic pairs *in vivo*.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 長谷川 亮太

Title
論文題目 Structural dynamics and stability of corticocortical and thalamocortical axon terminals during motor learning

博士論文審査結果

申請者は、動物個体の学習に関わるシナプス可塑性に興味を持ち、マウスの運動学習課題のひとつであるロータロッド課題を行った際の、高次運動野(M2)から一次運動野(M1)への投射軸索のシナプス前終末(M2軸索ブトン)と、運動視床からM1への投射軸索のシナプス前終末(視床軸索ブトン)を蛍光ラベルし、これらを2光子イメージング法によって経時的に計測する方法を確立し、その構造変化(新生率や除去率など)の解析を行った。イメージングの前にまず、逆行性トレーサーを用いて、M1の1層がM2と運動視床から強い軸索投射を受けていることを解剖学的に確認した。次に、M2と運動視床に、異なる色の蛍光タンパク質をコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)で別々に注入することでそれぞれの領域からの投射軸索を異なる蛍光色で標識し、2光子イメージングを行った。7日間連続して運動訓練を行ったところ、M2と視床からの軸索ブトンは、それぞれ異なるダイナミクスを示した。運動学習中にM2軸索ブトンは新生率の増加を示したのに対し、視床ブトンは学習中に除去率の減少と生存率の増加を示した。また、学習初期には、既存の視床ブトンの大きさがわずかに増加した。訓練4~7日目の間の視床軸索ブトンの除去率は、非訓練マウスに比べ有意に低く、また訓練開始直前に存在していた視床軸索ブトンが7日目まで生存する率も、非訓練マウスに比べ有意に高かった。この結果は、学習の初期段階に大きくなったブトンを含む既存の視床ブトン群の一部が、新たに形成された樹状突起スパインと結合する可能性があることを反映していると考えられる。これらの結果は、M2と視床からM1への投射軸索のブトンは運動学習中に異なるダイナミクスを示すものであり、特に、M1での視床軸索ブトンの安定化が運動学習の熟練に貢献していることを示唆するものである。

一方、経路特異的な構造可塑性の理解を推し進めるためには、特定の神経細胞間に形成されるシナプス結合を同定した上で、これらシナプスの形態や機能の変化を長期間観察する必要があり、この解析は単一シナプス結合のシナプス前構造とシナプス後構造を同時に標識する技術を確立することで可能となる。申請者は、上記学習過程においてどの細胞種由来のシナプス前終末とシナプス後部が新生、除去されるのかを明らかにするための第一段階として、実際のシナプス対を正確に標識することが知られている哺乳類の緑色蛍光タンパク質再構成(mGRASP)技術を2光子顕微鏡を用いたin vivoイメージングに最適化するための技術開発を行った。その結果、M2軸索ブトンとM1脊髄投射細胞の樹状突起スパインからなるシナプス、および、視床軸索ブトンとM1脊髄投射細胞の樹状突起スパ

インからなるシナプスをマウス個体で経時的に追跡できることを示した。

本論文は、生きた動物の脳内で起こる運動学習過程におけるシナプス前終末の構造変化を初めて報告したものであり、また、その時間的且つ構造変化のダイナミクスが皮質領野からの入力軸索ブトンと視床領野からの入力軸索ブトンで異なることも初めて示したものであり、これまでのシナプス後スパイン構造の可塑性に焦点を当てた運動学習研究に新しい視点を提供したものである。また、特定の神経細胞間に形成されたシナプスのシナプス前部と後部構造を選択的に可視化する mGRASP を *in vivo* 観察に適用可能にした技術は新規性が高い。

これらの博士論文の内容は、運動学習の脳内回路可塑性機構の解明に重要な貢献をするものと認め、審査員全員一致で本論文が学位の授与に値すると判断した。