HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス運動野における運動準備の神経メカニズムの研究
Author(s)	長谷川, 征史
Citation	北海道大学. 博士(文学) 乙第7042号
Issue Date	2018-03-22
DOI	10.14943/doctoral.r7042
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/73350
Type	theses (doctoral)
File Information	Masashi_Hasegawa.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

マウス運動野における
運動準備の神経メカニズムの研究

長谷川征史

目次

1 章　序論
1.　運動準備が続く動作に与える影響について　・・・・・・・・・・　1
2.　霊長類を対象とした運動準備の神経メカニズム研究　・・・・・　3
3.　運動準備の神経メカニズムに関する新しいモデル　・・・・・・　6
4.　これまでの研究の問題点と課題　・・・・・・・・・・・・・・・　7
5.　２光子カルシウムイメージング法　・・・・・・・・・・・・・・　8
6.　本研究の目的　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　13
7.　本研究の構成　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　13

2 章　運動準備課題の開発と実験妥当性の検証
第 2 章要約　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　14
実験 1　頭部固定下で運動準備を観察できる行動実験の開発
1.　序論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　15
2.　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17
　2.1　動物　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17
　2.2　ヘッドポスト設置手術　・・・・・・・・・・・・・・・・・　17
　2.3　装置　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　18
　2.4　Go/Nogo リーチング課題　・・・・・・・・・・・・・・・・　19
　　2.4.1　プレトレーニング　・・・・・・・・・・・・・・・・・　19
　　2.4.2　Go 試行のトレーニング　・・・・・・・・・・・・・・・　20
　　2.4.3　Nogo 試行のトレーニング　・・・・・・・・・・・・・・　22
　　2.4.4　ホワイトノイズ execution cue の導入　・・・・・・・・・　24
　　2.4.5　ホワイトノイズ waiting period の導入　・・・・・・・・・　24
3.　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　25
4.　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　26

実験 2　体内時計による課題遂行の検討
1.　序論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27
2.　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　28
　2.1　動物　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　28
　2.2　ヘッドポスト設置手術　・・・・・・・・・・・・・・・・・　28

2.3　装置　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　29
2.4　Go/Nogo リーチング課題　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　29
2.5　データ解析　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　29
3.　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　29
4.　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　30

実験 3　ムシモール注入が前腕運動に与える影響の検討
1.　序論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　30
2.　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　33
2.1　動物　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　33
2.2　ヘッドポスト設置手術　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34
2.3　ムシモール注入手術　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34
2.4　装置　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34
2.5　ムシモール注入実験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　35
2.6　データ解析　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　36
3.　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　36
4.　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　36
第 2 章まとめ　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　38

3 章　2 光子カルシウムイメージング法を用いた
運動準備の神経メカニズムの検討
第 3 章要約　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　49
実験 4　Go/Nogo リーチング課題遂行中の 2 光子カルシウムイメージング
1.　序論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　50
2.　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　50
2.1　動物　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　50
2.2　ヘッドポスト設置手術　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　50
2.3　観察用ウィンドウ設置手術　・・・・・・・・・・・・・・・・・　51
2.4　装置　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　51
2.5　*in vivo* 2 光子カルシウムイメージング　・・・・・・・・・・・　52
2.6　免疫染色　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　52
2.7　データ解析　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　53
2.7.1　解析前処理　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　53
2.7.2　Waiting period 中の活動パターンによる神経細胞の分類・　54

2.7.3　反応時間によるグループ化　・・・・・・・・・・・・・・・　55
2.7.4　試行間での神経活動パターンの相関関係　・・・・・・・　56
2.7.5　試行入れ替え後の神経活動パターンの相関関係　・・・　57
3.　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　58
3.1　Build-up neuron および instruction-responsive neuron の
活動パターン　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　59
3.2　介在神経細胞の活動　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　61
3.3　運動準備と神経細胞集団の活動パターンの関係　・・・・・・・　61
3.4　課題関連細胞の活動と神経細胞集団の活動パターンの関係　・　62
4.　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　63
4.1　介在神経細胞の活動について　・・・・・・・・・・・・・・・・　66
4.2　後肢運動野の神経細胞の活動について　・・・・・・・・・・・　66
4.3　皮質 2/3 層と 5a 層の活動の違いについて　・・・・・・・・・・　67
第 3 章まとめ　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　69

4 章　総合考察
1.　本研究のまとめ　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　81
2.　選択的な神経細胞の活動抑制が生じるメカニズムについて　・・　83
3.　今後の課題と展望　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　86
3.1　前肢運動野の皮質 5b 層の活動について　・・・・・・・・・・　86
3.2　各タイプの細胞の解剖学的・遺伝学的特徴について　・・・・　87
3.3　活動抑制の普遍性について　・・・・・・・・・・・・・・・・・　89

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　91

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　92

第 1 章

序論

何らかの動作を行う際、次に行う動作をあらかじめ準備することで、円滑に、素早くその動作を開始することができる。例えば徒競走では、「位置について」、「よーい」、「どん」という一連の号令で走り出すが、「よーい」で体を動かす準備をすることで、続く「どん」の合図に素早く反応して走り出すことができる。このように、何らかの動作を実行する前にその動作の準備期間が設けられることで、効果的に次の動作を開始することが可能となる。本稿では、このような身体動作の実行に先んじた動作の準備を運動準備と呼び、マウスをモデル動物として、その神経メカニズムについて検討する。

本章では、まず初めに運動準備とその神経メカニズムに関するこれまでの研究について概観し、現在得られている知見について整理する。次いで、これまでの研究の問題点およびそれに対する本研究のアプローチ方法を記述し、本研究の目的を述べる。

1. 運動準備が続く動作に与える影響について

事前に次の動作の準備をしておくと、準備をしないときよりも、より素早く意図した動作を開始することができる。このように、運動準備の効果は短い反応時間として行動に表出する。運動の心的プログラミング過程を調べた Rosenbaum の研究は、運動準備が反応時間に与える影響を明確に記している(Rosenbaum, 1980)。Rosenbaum の実験では、実験参加者は運動開始の合図にしたがい、右手あるいは左手を、前後のどちらかに、近くあるいは遠くに動かすよう教示された。運動の情報（どちらの手を動かすのか・どの方向に動かすのか・どのくらいの距離を動かすのか）の全部あるいは一部は運動開始前に参加者に呈示され、残りの情報は運動を実行する合図と同時に呈示された。実験の結果、運動開始前に全ての情報が呈示された条件で

は、運動を実行する合図から実際に運動を開始するまでの反応時間は短く、情報の事前呈示が少ない条件ほど反応時間は長くなった。この実験結果は、運動準備に応じて反応時間が変化することを実証している。Rosenbaum が利用した実験手続きは precuing 法と呼ばれ、運動情報の事前提示と運動開始の合図で構成された。運動情報の呈示と運動開始の合図はある程度時間的に離されており、この期間に実行すべき運動がプログラムされるのだと仮定されている。つまり、運動準備に関係する何らかの情報処理過程は、この期間に脳内で進行していると考えられる（以下本稿では、この運動準備が進行する期間を、ヒトを対象とした実験では先行期間、実験動物を対象とした実験では遅延期間と呼ぶ）。

先行期間中に生じる運動準備に関係した脳内情報処理を反映する現象としては、準備電位（Readiness potential）が挙げられる(Kornhuber & Deecke, 1965)。準備電位とは、運動に関係する大脳皮質領域（以下、運動野）の頭皮上から得られる脳波であり、次に実行する動作に応じて先行期間中にその振幅や分布が変化する(Coles, 1989; Gratton et al., 1990; Gratton, Coles, Sirevaag, Eriksen, & Donchin, 1988; Kutas & Donchin, 1974, 1980)。Kutas & Donchin（1974）は、運動開始の合図が提示される前に、次にどちらの手で、どれくらいの力で握力計を握るかという情報を実験参加者に呈示し、続く運動開始の合図で握力計を握るよう教示した。その結果、次にどちらの手を使うのか、どのくらいの力で運動するのか、といった運動情報に関連して、準備電位の振幅は変化した。また、Gratton ら（1988）は、モニタに呈示された文字に応じて右手あるいは左手で握力計を握るよう実験参加者に教示した際、次に実行する動作の反応時間が短い試行では、反応時間が長い試行に比べて、準備電位の振幅が運動開始の合図に向けて徐々に大きくなることを報告している。このように、次に行う運動の要素に関連して、準備電位の振幅と分布は動的に変化する。Coles（1989）は、上述した実験を含む準備電位に関する知見をとりまとめ、準備電位の変化は運動準備の進行と関係した現象であり、運動野の神経活動を反映していると考察している。

2. 霊長類を対象とした運動準備の神経メカニズム研究

準備電位の研究は、運動の実行に先立って何らかの情報処理過程が運動野で進行することにより、運動の準備状態が形成されることを示唆している。しかしながら、準備電位は大脳皮質の神経細胞の活動を集合的に捉えたものであり、個々の神経細胞の活動がどのように運動準備と関係しているのかを推測することはできない。では、運動野の神経細胞がどのように活動することで、運動準備は形成されるのだろうか。大脳皮質内の神経細胞の活動を直接測定するという目的から、神経細胞の活動と運動準備の関係は、霊長類を対象とした神経生理学研究によって検討されてきた。霊長類を対象とした神経生理学研究では、主に電気生理学的手法が用いられており、アカゲザル（*Macaca mulatta*）やカニクイザル（*Macaca fascicularis*）といったマカクザルの皮質運動野に電極を刺入し、運動の開始前後で、運動野の神経細胞の活動がどのように変化するのかを測定している。そして、これまでに行われた多くの研究では、次の運動を教示する情報が呈示されてから運動開始の合図が呈示されるまでの期間（遅延期間）に、ある種の神経細胞ではその活動が増加するという実験結果が得られている(Boussaoud & Wise, 1993a, 1993b; Crammond & Kalaska, 2000; Kurata & Wise, 1988; Riehle & Requin, 1989; Tanji & Evarts, 1976; Weinrich & Wise, 1982; Wise, 1985; Wise, Weinrich, & Mauritz, 1983)。

Tanji & Evarts （1976）は、計測装置と接続したロッドをサルに握らせ、赤いランプが事前に点灯したときは続く運動開始の合図で握ったロッドを引き、緑のランプが事前に点灯したときは続く運動開始の合図で握ったロッドを押すよう訓練した。この課題中に 1 次運動野（Primary motor cortex: M1）の神経細胞の活動を計測すると、Gratton ら（1990）の実験で観察された準備電位と類似した、運動を指示する視覚刺激（赤いランプ・緑のランプ）の提示に伴って活動が増加する神経細胞が見つかった。運動の種類に応じて神経細胞の活動は異なっており、ある細胞の活動は押す動作を指示する刺激（緑のランプ）が提示されることで増加し、別

の細胞の活動は引く動作を指示する刺激（赤いランプ）が提示されることで増加した。反応を記録した皮質脊髄投射神経細胞のうち、61%の神経細胞がこのような選択性を示した。神経細胞の活動と同時に筋電図も計測されたが、神経細胞の活動と関連するような筋電図の変化は運動前に生じなかった。このことから、運動の種類を指示する刺激が呈示された後に観察された神経細胞の活動増加は、何らかの体の動きの変化を反映しているわけではなく、次の運動の準備・計画を反映していると考えられる。Tanji & Evarts（1976）と類似した実験結果は、運動前野（Premotor area）でも得られている(Wise et al., 1983)。Wise らは、スクリーン上のある場所に呈示された光点が別の場所に移動し、そこで光点が減灯したときに、減灯した光点に向けて腕を動かすようアカゲザルを訓練した。この課題中に運動前野の神経細胞の活動を計測すると、光点が移動してから運動を開始するまでの間、持続的に活動している細胞が観察された。この実験では神経細胞の活動に加えて筋電図と眼電図が測定されたが、眼の動きや姿勢の調節といった要素は、運動開始まで持続的に続く神経細胞の活動とは関連していなかった。そのため、Wise らは、光点の移動から運動が開始されるまでに観察された持続的な神経細胞の活動は、続く運動の準備や計画に関係していると結論付けている。

運動開始前に生じる神経細胞の活動増加は、次に行う運動の準備や計画に関係しており、呈示された感覚刺激の情報処理そのものには強く関与していないと考えられる。例えば、Kurata & Wise（1988）は、異なる視覚刺激が提示されても同一の運動を行うようアカゲザルを訓練し、その課題中に運動前野の神経細胞の活動を記録した。この実験においても、運動開始に向けて活動が増加する神経細胞が見つかったが、この活動増加は呈示される視覚刺激が異なっていても同様に観察された。処理する視覚刺激が異なっていても、同一の運動を行う場合に同様の神経活動が観察されたという実験結果は、感覚刺激の呈示から運動開始までに見られる神経活動の増加が、運動の準備に関与しているという仮説を支持している。また、Boussaoud & Wise（1993）は、呈示される感覚刺激が同じでも、その刺激が次に行うべき運動に関する情報

を持つ場合と持たない場合を設定し、両者が呈示されたときに運動野の神経細胞がどのように活動するのかを比較した。その結果、物理的に同じ刺激が呈示されたとしても、刺激が運動情報を持つ場合に運動前野背側部の多くの神経細胞の活動は増加した。同一の感覚刺激であっても、次に行うべき運動の情報の有無によって神経活動が変化するというこの実験結果も、運動開始前に運動野で観察される神経活動の増加が、運動の準備・計画に関与しているという仮説を支持している。このように、多くの先行研究によって、運動に関する情報をもつ刺激の呈示から実際に運動を開始するまでの間に、運動野の神経細胞の活動が増加するという知見が得られている。また、そのような神経細胞の活動は、運動情報に選択的に反応していることから、運動の開始前から生じる神経細胞の活動増加は、運動準備の進行・形成を反映していると考えられる(Wise, 1985)。

先行研究で観察されている神経細胞の活動増加が運動準備を反映しているのであれば、神経細胞の活動が増加していき、どのような状態になったときに運動が開始されるのだろうか。Hanes & Schall（1996）は、実際に得られたデータとシミュレーションで生成されたデータを利用して、神経細胞の活動がある閾値に達したときに準備された運動が開始されるという仮説（Rise to threshold hypothesis）を検証している。彼らは運動を開始するタイミングと神経細胞の活動に着目し、両者の関係が variable rate model と variable threshold model のどちらのモデルでよりよく説明できるのかを検討した。Variable rate model と variable threshold model は、両者とも神経細胞の活動がある閾値に達することで準備された運動が開始されると仮定しているモデルである。Variable rate model では、運動が開始される神経活動の閾値は固定されており、神経細胞の活動が増加するペースによって反応時間が決まる。つまり、神経細胞の活動が増加するペースが速いほど、運動開始の閾値に到達する時間が短くなるため、結果として反応時間は短くなる。一方、variable threshold model では、神経細胞の活動が増加するペースはある程度固定されており、運動が開始される神経活動の閾値が変化することで反応時間が変化する。つまり、

運動開始の閾値はある程度分散しており、この閾値が低いときは、神経活動の増加が比較的早く閾値に達するため反応時間が短くなる。Hanes & Schall は、条件に応じてモニタに呈示された視覚刺激に向けて眼球運動をする、あるいは眼球運動をしない、といった課題をアカゲザルに訓練し、眼球運動に関係する運動領域（前頭眼野）の神経細胞の活動を課題中に測定した。そして、得られた神経データと眼球運動の反応時間データの関係を調べることで、variable rate model と variable threshold model のどちらのモデルが、眼球運動の開始をよりよく説明できるのかを比較した。前頭眼野の神経活動と反応時間の関係を調べると、反応時間が短いときも長いときも、前頭眼野の神経細胞の活動がある一定のレベルに到達したときに眼球運動は開始された。この結果は、準備電位がある一定の値に達したときに把持運動が開始されたというヒト準備電位の知見と一致している(Gratton et al., 1988)。また、神経細胞の活動が増加するペースと反応時間の関係を調べると、活動増加のペースが速いときほど反応時間が短くなることが示された。これらの結果は、variable rate model の予測と一致した実験結果である。そのため、Hanes & Schall の研究は、神経細胞の活動がある一定の閾値に達することで準備された運動が開始されること、神経細胞の活動がある一定の閾値に到達するまでの時間によって反応時間の違いが生み出されることを示唆している。

本節で言及した先行研究の知見をまとめると、運動準備の形成は、神経細胞の活動が運動開始前にある閾値まで増加していく過程に反映されると考えられる。

3. 運動準備の神経メカニズムに関する新しいモデル

前節で述べたように、多くの先行研究では、運動と関係する皮質領域において運動の開始前に活動が増加する神経細胞が見つかっている。また、神経細胞がある閾値に達することで運動が開始するという知見も得られているため(Hanes & Schall, 1996; Riehle & Requin, 1989)、運動の開始前に個々の神経細胞の活動が増加していく過程が運動準備を反映している可能性が示

唆されてきた。しかしながら近年の研究では、個々の神経細胞の活動ではなく、神経細胞集団あるいは神経回路の活動という新たな枠組みを用いて、運動準備の神経メカニズムを検討しようと試みられている(Afshar et al., 2011; Churchland, Yu, Ryu, Santhanam, & Shenoy, 2006; Michaels, Dann, Intveld, & Scherberger, 2015; Shenoy, Sahani, & Churchland, 2013)。

運動の準備・実行を集団レベルの観点から検討した研究として、Churchland ら（2006）の研究が挙げられる。Churchland ら（2006）は、任意の運動を正確に行うにあたって、その運動の実行に最適な神経細胞集団の活動状態があり（optimal subspace）、運動準備とは、神経細胞集団の活動がその状態に到達する過程であるという optimal subspace hypothesis を提唱した。この仮説の最適な活動状態とは、rise to threshold hypothesis のように、個々の神経細胞の活動が閾値まで増加することを意味しない。それよりも、ある神経細胞の活動は強く増加する、別の細胞の活動はあまり増加しない、というような、多様な神経細胞の活動の組み合わせによって、神経細胞集団としての最適な活動状態が成立すると仮定している。そのため、ある神経細胞の活動が増加しすぎると、むしろ神経細胞集団の活動状態が最適状態から逸脱してしまうため、効果的な運動の実行が妨げられる。一方で、最適状態に至るためには活動が増加する神経細胞も必要であるため、optimal subspace hypothesis は、神経細胞の活動がある閾値まで増加することで運動が開始されるという rise to threshold hypothesis とも矛盾しない。このように、運動準備を神経細胞集団レベルの活動から捉えるという試みは、神経細胞の活動増加が運動準備を成立させるというこれまでの仮説を内包するとともに、今まで考慮されてこなかった神経データ（ある閾値まで到達しない神経細胞の活動はどのように運動準備と関係しているのか）がどのように運動準備と関係しているのかについても説明できることから、運動準備の神経メカニズムをよりよく捉えていると考えられる。

4. これまでの研究の問題点と課題

運動準備の神経メカニズムを神経細胞集団レベルの観点から検討している仮説の有用性を考慮すると、今後の研究では個々の神経細胞の活動増加だけに着目するのではなく、数十から数百個に及ぶ神経細胞の活動を同時に計測し、集団として神経細胞がどのように活動しているかを検討する必要がある。また、大脳皮質の神経細胞は、電気生理学的特徴、形態学的特徴、神経化学的特徴などで異なるグループに分類されており、多種多様な細胞が存在する(Kubota, Hatada, Kondo, Karube, & Kawaguchi, 2007; Tremblay, Lee, & Rudy, 2016)。このような特徴を可能な限り利用し、測定している神経細胞の種類を同定しながら神経細胞の活動を集団レベルで測定することができれば、細胞の種類とその活動を運動準備と関連付けることで、運動準備の神経メカニズムをより詳細に検討できるだろう。しかしながら、先行研究で使われていた実験技術では、上記の課題を解決することは困難だと考えられる。先行研究の多くでは、電気生理学的手法（単一ユニット記録）を用いて運動野の神経細胞の活動が測定されてきた。電気生理学的手法は時間分解能が高く、神経細胞がどのタイミングでどのように活動したのかを詳細に調べることができるものの、その一方で、広域にわたって数十から数百におよぶ大規模な神経細胞の活動を同時に測定することはできない。また、電気生理学的手法では、測定した神経細胞の種類をその活動パターンによっておおまかに同定することができるものの、測定した細胞を細かく分類することはできない。このように、電気生理学的手法は神経細胞の活動記録に有用であるものの、この手法で測定している神経細胞の種類を同定しながら、広域にわたって大規模にその活動を記録することは難しい。そのため、運動準備に関わる神経細胞集団の活動を調べるには、電気生理学的手法の問題点を補う新たな実験技術が必要だと考えられる。ここで述べた問題を解決しうる実験技術として、近年発展してきた実験技術である 2 光子カルシウムイメージング法が挙げられる。

5. 2 光子カルシウムイメージング法

2 光子カルシウムイメージング法とは、2 光子励起レーザー顕微鏡を使用して神経細胞の活動を計測する実験技術である。本節では、まず 2 光子励起レーザー顕微鏡について概説し、その後で 2 光子カルシウムイメージング法について説明する。

細胞の蛍光物質を顕微鏡で観察するときには、ある波長の光を蛍光物質にあてることで蛍光物質のエネルギー状態を高い状態にし（励起状態）、そのエネルギー状態がもとの状態（基底状態）に戻るときに発せられる光（蛍光）を観察する。例えば、緑色蛍光タンパク（Green fluorescent protein）ならば、青い光をあてることで励起されて緑の光を発し、赤色蛍光タンパク（Red fluorescent protein）ならば、緑の光をあてることで励起されて赤い光を発する。通常、蛍光物質は 1 つの光子を吸収することで励起されて蛍光を発するが（1 光子励起）、1 光子励起に必要なエネルギーより弱いエネルギーを持った 2 つの光子が蛍光物質を励起することでも、理論的には蛍光物質はエネルギー状態の遷移を経て蛍光を発する（2 光子励起）。Denk らによってこの 2 光子励起過程を利用した 2 光子励起レーザー顕微鏡が開発・発表されたことを契機に(Denk, Strickler, & Webb, 1990)、2 光子励起レーザー顕微鏡は生命科学・神経科学の研究に幅広く利用されるようになった。1 光子励起過程を利用して蛍光を観察する今までの顕微鏡と比べ、2 光子励起過程を利用して蛍光を観察する 2 光子励起レーザー顕微鏡には、限定された領域で蛍光物資を励起することができる、深部まで組織を観察できる、という利点が挙げられる。1 光子励起で蛍光物質を励起する場合、観察したい面（顕微鏡では焦点面）以外の光の通り道でも蛍光物質が励起され、不要な蛍光が生じてしまう。一方、2 光子励起は光子の密度が高まった場所でしか生じないため、非常に発生しにくい。そのため、2 光子励起レーザー顕微鏡では、観察したい領域の蛍光物質のみを励起し、その蛍光を観察することできる。また、2 光子励起では、1 光子励起に比べてエネルギーが弱い長波長の光（近赤外光）を励起に利用する。近赤外光は可視光よりも組織に対する透過性が高く、より深い組織まで到達する。そのため、2 光子励起過程を利用して蛍光を観察する場合、生体組織のより深い部分に光をあてて蛍

光物資を励起できるため、従来よりも深く組織を観察することができる。このように、2 光子励起レーザー顕微鏡は観察したい領域の蛍光のみをとらえ、より深部まで観察できるという点で、生体観察においてこれまでの顕微鏡技術よりも優れている(Helmchen & Denk, 2005; Svoboda & Yasuda, 2006)。

この 2 光子励起現象を利用して神経細胞の活動を測定する技術が、2 光子カルシウムイメージング法である。2 光子カルシウムイメージング法では、活動を観察したい神経細胞にあらかじめカルシウム蛍光指示薬やカルシウム感受性蛍光タンパク質といった蛍光物質を導入しておく。これらの蛍光物質はカルシウムと結合することでその立体構造が変化し、発する蛍光の強さが変化する（種類にもよるが、一般的にこれらの蛍光物質はカルシウムと結合することでより明るくなる）。この性質を利用して、2 光子カルシウムイメージング法では、神経細胞が活動したときに生じる細胞内のカルシウム濃度の上昇を、カルシウム蛍光指示薬やカルシウム感受性蛍光タンパク質の蛍光変化として捉えて神経細胞の活動を計測する(Grienberger & Konnerth, 2012)。特にカルシウム感受性蛍光タンパク質は、遺伝子工学的な手法によって特定の種類の神経細胞に発現させることが可能という点で非常に有用であり、盛んに開発が行われている(Akerboom et al., 2012; T. W. Chen et al., 2013; Dana et al., 2016)。

2 光子カルシウムイメージング法による脳機能研究では、大きく 2 つの理由から、マウスがモデル動物として用いられている。1 つ目の理由としては、様々な遺伝子工学技術がマウスでは確立されており、カルシウム感受性蛍光タンパク質を含む様々な蛍光タンパク質の発現を、マウスでは比較的容易に操作できるという理由が挙げられる。例えば、カルシウム感受性蛍光タンパク質を発現する遺伝子を持ったアデノ随伴ウィルス[1]（Adeno-associated virus: AAV）

[1] アデノ随伴ウィルス（Adeno-associated virus: AAV）: 生体の細胞に外来の遺伝子を運び込むために使われるウィルスの 1 種。神経科学の脳機能研究では、ある神経細胞に導入したい遺伝子をこのウィルスに組み込み、このウィルスを脳に注入することで、特定の神経細胞にその遺伝子を導入する。その遺伝子が

を観察したい脳領域に投与することで、その領域の特定の神経細胞にカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させることができる。また、カルシウム感受性蛍光タンパク質が特定の神経細胞に既に発現しているトランスジェニックマウスも既に多様な種類が作出されており(Q. Chen et al., 2012; Dana et al., 2014; Madisen et al., 2015; Zariwala et al., 2012)、実験に応じて必要なトランスジェニックマウスを選定して利用することができる。アカゲザルやコモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）においても、AAV を利用したカルシウム感受性蛍光タンパク質の導入による 2 光子カルシウムイメージングが実施されてきている(Li, Liu, Jiang, Lee, & Tang, 2017; Sadakane et al., 2015)。しかし、マウスと比較すると、遺伝子工学技術の観点から、霊長類で任意の神経細胞に特定の蛍光タンパク質を自由に発現させることは容易ではない。また、トランスジェニックマーモセットも作出されているものの(Park et al., 2016; Sasaki et al., 2009)、その種類はまだ限定されている。このため、遺伝子操作技術によって比較的簡便に、任意の神経細胞に特定の蛍光タンパク質を発現させることができるマウスは、2 光子カルシウムイメージングの利用に適した動物となっている。

2 つ目の理由としては、マウスがヒトと相同の感覚機能、運動技能や認知機能を持っており、マウスを実験に利用することで様々な脳機能の神経メカニズムを検証することができるという点が挙げられる。例えば、マウスは到達運動（リーチング）のような前肢を利用した巧緻な運動を行うことができるため、サルやヒトと相同の運動機能をマウスでも研究することが可能である(Azim, Jiang, Alstermark, & Jessell, 2014; Fink et al., 2014)。また、ワーキングメモリ、エピソード記憶、選択的注意といったヒトで研究されてきた認知機能をマウスは有しており(Webster, Bachstetter, Nelson, Schmitt, & Van Eldik, 2014)、認知機能の神経メカニズム研究にマウスが長年の間利用されてきたという実績がある。

細胞で読み込まれることにより、実験者が特定の神経細胞に発現させたい物質（例えば、蛍光タンパク質やカルシウム感受性蛍光タンパク質）が細胞に発現する。

このように、カルシウム感受性蛍光タンパク質を簡易に神経細胞に発現させられること、比較的高次な脳機能を持っているという理由から、2 光子カルシウムイメージング法を用いた脳機能研究にマウスを使用することで、感覚機能、運動機能、認知機能の神経メカニズムを細胞レベルで検証できる。実際に、近年では 2 光子励起レーザー顕微鏡下で頭部を固定された状態のマウスを対象とした運動課題や認知課題が開発され、これらの課題の遂行中に 2 光子カルシウムイメージングを行うことで、前腕の随意運動(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al., 2013; Masamizu et al., 2014; Peters, Chen, & Komiyama, 2014)やワーキングメモリ(Harvey, Coen, & Tank, 2012)の神経メカニズムの一端が明らかにされてきている。

このような知見を考慮すると、運動準備と運動実行を分離できる行動課題を頭部固定状態のマウスを対象として開発し、その課題の遂行中に運動野の神経活動を 2 光子カルシウムイメージング法で観察・記録することによって、運動野の神経細胞集団がどのように活動することで運動準備が形成されるのかを、より詳細に検証できるかもしれない。既に述べてきたように、運動準備に関係する多くの先行研究では、主に個々の神経細胞が運動の準備・実行に際してどのように活動するのかが調べられてきた。そのため、神経細胞集団あるいは局所神経回路のレベルで運動準備がどのように表現されているのかは明らかではない。また、近年になって、神経細胞集団の活動パターンで運動の準備･実行を捉えようとする試みがなされてきてはいるが、例えば、運動準備が神経細胞集団内で、どのような種類の神経細胞の、どのような活動によって形成されているのかという点については未だ不明瞭である。マウスを対象とした 2 光子カルシウムイメージング法は、遺伝子工学技術を利用することで、撮像している神経細胞の細胞タイプを同定しながら、数十から数百の神経細胞の活動を同時に測定することが可能となっている。そのため、マウスを対象とした 2 光子カルシウムイメージング法と運動準備を必要とする適切な行動課題を組み合わせることで、運動準備が神経細胞集団において、どのような神経細胞の、どのような活動によって形成されているのかを検討できると考えられる。

6. 本研究の目的

本研究の目的は、2 光子カルシウムイメージングで運動準備中の運動野の神経活動を記録することで、神経細胞集団レベルにおける運動準備の神経メカニズムを検討することである。この目的のため、本研究では、まず頭部固定下のマウスを対象とした運動準備を必要とする行動課題を開発した。次に、この課題の遂行中に運動野で 2 光子カルシウムイメージングを行い、運動準備中に神経細胞集団がどのように活動することで運動準備が形成されるのかを調べた。

7. 本研究の構成

本章の最後に、本稿の構成について述べる。1 章では， 運動準備の神経メカニズムに関する先行研究を概観し、先行研究の問題点と課題を指摘するとともに、それらを解決する技術として 2 光子カルシウムイメージング法を提案し、本研究の目的を述べた。第 2 章では、頭部固定下のマウスを対象とした運動準備を必要とする行動課題を開発する。また、開発した行動課題が本当に運動準備を必要とする課題であるのか、この課題の遂行に前肢運動野が必要であるのかについても重ねて検討し、開発した行動課題の実験妥当性を確立する。3 章では、2 章で開発した行動課題の遂行中に 2 光子カルシウムイメージングを行い、マウスの運動野の神経細胞集団がどのように活動することで運動準備が形成されるのかを実験的に検討する。最後に第 4 章では， 第 2 章および第 3 章の実験結果をまとめ、本研究の結論と今後の展望について述べる。

第 2 章

運動準備課題の開発と実験妥当性の検証

第 2 章要約

第 2 章では、頭部固定状態のマウスを対象とした運動準備を必要とする課題である、Go/Nogo リーチング課題（前腕到達運動課題）を開発した。数週間の訓練期間を経ることで、マウスはこの課題を高い精度で学習した（実験 1）。前腕運動の開始に関して、マウスは体内時計に強く依拠せず、呈示された音刺激に反応して運動を開始した（実験 2）。この課題の前腕運動の遂行には、前肢運動野が必要であることが確認された（実験 3）。以上のことから、Go/Nogo リーチング課題を利用することで、前肢運動野において、前腕運動の運動準備にかかわる神経活動を測定できると考えられる。

本章では、まず実験 1 で頭部固定状態のマウスを対象とした運動準備を必要とする行動課題を開発する。次に実験 2 で、この課題でマウスが運動準備を本当に必要としているのかどうかについて検討し、課題の実験妥当性を調べる。実験 3 では、開発した行動課題の遂行に皮質運動野（前肢運動野）の活動が必要であるのかどうかを検討する。

実験 1　頭部固定下で運動準備を観察できる行動実験の開発

1. 序論

マウスをモデル動物として感覚機能や運動機能の神経メカニズムを解明するため、2 光子カルシウムイメージングと組み合わせることができる、頭部固定下でのマウス行動課題がこれまでに開発されてきた。とりわけ、生態学的妥当性および学習の容易さという観点から、マウスのヒゲで刺激を感知させる課題やリッキング（舌でなめる動作）を利用した課題(Crochet & Petersen, 2006; Komiyama et al., 2010; O'Connor et al., 2010; Sachidhanandam, Sreenivasan, Kyriakatos, Kremer, & Petersen, 2013)がこれまでに開発されている。そのため、これらの課題構造を利用して、マウスにヒゲや舌を動かすよう訓練することで、運動準備の神経メカニズムを調べることができるかもしれない。しかしながら、ヒゲや舌は運動の準備と実行に際して、実験者がその動きを統制しにくいという問題がある。例えば、ヒゲを動かす課題をマウスに訓練して運動準備を調べようとするとき、特定のヒゲだけを動かさずに待ち続け、運動開始の合図でそのヒゲだけを動かすようにマウスを訓練することは困難である。またヒゲの刈り込みを行い、特定のヒゲだけを動かすようマウスを訓練したとしても、運動を指示したヒゲに加え、マウスが刈り込まれたヒゲも動かそうとしている可能性を実験者は排除できない。舌を利用した運動課題では、運動準備中に舌が静止しているのか、舌の運動の開始位置が毎試行同じかどうかといったことを実験者が観察し、その動きを統制することは難しい。

このような問題を考慮すると、運動準備を実験的に調べるためには、前肢や後肢などの実験者が容易に観察することができ、その動きを統制できる身体部位を利用した行動課題が望ましい。近年になって、頭部固定下のマウスを対象とした前肢の運動課題を開発し、2 光子カルシウムイメージングと組み合わせた研究が報告されている。Peters らは、音刺激の呈示に応じてマウスが前肢でレバーを押す課題を開発し、運動学習に伴う皮質運動野の活動変容過程を明らかにしている(Peters et al., 2014)。また Hira らは、マウスが自発的に前肢でレバーを引く課題を開発し、レバー引き運動を行うときに、前肢運動野の神経細胞がクラスターとして機能していることを報告している(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al., 2013)。これらの課題では、運動の実行前後で、マウスがいつ、どのように前肢を動かしたかの情報を得られるため、ウィスキング課題やリッキング課題に比べ、運動準備の神経メカニズムを検討するのに好ましいと考えられる。しかしながら、これらの課題では運動の準備と実行を分ける期間（遅延期間）が設けられていない。運動の準備は、運動を指示する合図とその運動を実行する合図の間に形成されると考えられる(Wise, 1985)。そのため、ここで挙げた前腕の運動課題では、運動実行の神経メカニズムを調べることはできるものの、運動準備の神経メカニズムを調べることはできない。しかしながら、これらの先行研究は、頭部を固定された状態でもマウスが前腕を動かす課題を適切に遂行できることを示している。そのため、ここで紹介したような頭部固定下で行われる前腕運動課題に、次の運動を指示する合図とその運動を実行する合図を組み込み、両者を時間的に離す期間を設けることで、運動準備を必要とする行動課題を開発することができるかもしれない。

そこで実験 1 では、運動の準備と実行を明確に分け、2 光子励起レーザー顕微鏡下で運動準備を観察することができる行動課題として、Go/Nogo リーチング課題の開発を試みた。第 1 章で紹介したヒトや霊長類の先行研究のように、この課題は運動の種類を指示する合図と運動の実行を指示する合図から構成されている。最初に呈示される運動の種類を指示する合図に応じて、マウスは前肢を前にのばして目標物を触る（Go 試行）、あるいは前肢を動かさない

（Nogo 試行）、といった動作を準備し、運動開始の合図で準備された動作を実行する。運動の種類を指示する合図と運動の実行を指示する合図は時間的に離されており、この期間（遅延期間）に、マウスは次の動作の準備をすると想定される。もし、マウスがこの課題を高い精度で遂行することができれば、それは、マウスが運動の種類を指示する合図の意味を理解し、遅延期間中に指示された運動を準備し、運動開始の合図によって準備された動作を実行しているものと考えられる。

以上のことをかんがみ、実験 1 では頭部固定下のマウスを対象として Go/Nogo リーチング課題を開発し、マウスがこの課題を高い精度で遂行できるかを調べることで、Go/Nogo リーチング課題が運動準備を実験的に観察できる課題であるのかを検証した。

2. 方法

2.1. 動物

C57BL/6、PV-Cre[2] (Jax #008069)、 SOM-Cre[3] (Jax #013044) の、8 週齢以上のオスマウス計 16 匹を実験に用いた。マウスは明暗 12 時間サイクルで集団飼育（最大 1 ケージ 5 匹）し、暗期に実験を行った。なお本実験は University of Tuebingen、Local institutes in charge of animal experiments （Germany）の認可を受けて行われた。

2.2. ヘッドポスト設置手術

[2] PV-Cre: トランスジェニックマウスの 1 種。脳内の Parvalbumin (PV) 陽性神経細胞に組み替え酵素 Cre が発現している。

[3] SOM-Cre: トランスジェニックマウスの 1 種。脳内の Somatostatin (SOM) 陽性神経細胞に組み替え酵素 Cre が発現している。

*Cre: 遺伝子組み換え酵素の 1 つ。DNA 配列中の特定の配列（loxP 配列）に反応し、その配列に囲まれた DNA 部位を切り取る。Cre を利用することで、loxP 配列に囲まれた DNA を切り取るだけでなく、loxP 配列に囲まれた DNA を逆さまにして再度つなげることもできる。

ケタミン（0.1 mg/g）およびキシラジン（0.008mg/g ）の混合麻酔溶液を腹腔に投与した後、1.0-1.5% のイソフルラン吸入麻酔下で頭部固定用ヘッドポスト（図 2.1）をマウスに取り付けた。手術はマウスを頭部固定装置 （Model 1900 Stereotaxic Alignment Instrument, Kopf）に固定して行った。手術中、マウスの体温はヒーティングパッド（507221F, Harvard Apparatus）によって 36.5 C に維持した。頭皮を Braunol（386454, B|Braun）で消毒した後、頭皮と骨膜を切り取った。頭皮を切り取る際、局所麻酔のために lidocaine を頭皮下に注入した。ヘッドポストを頭骸骨に接着剤で固定し、続いて歯科用レジン （1230PNK, Lang Dental）で補強した。必要に応じて、組織の膨張を防ぐために dexamethasone（0.08 mg/kg）を腹腔投与した。全ての手術手続きは、無菌処置を施して行われた。

2.3. 装置

本研究の Go/Nogo リーチング課題のための行動実験装置を設計した。Guo らの行動実験装置を参考にし(Guo et al., 2014)、本実験での行動実験装置は以下のように配置、構成した。1 対のヘッドポストホルダーを設置し、その中央に V-clamp system （VC3C/M, Thorlab）を設置した。マウスの体を保持するプラスチックチューブは V-clamp の上に固定した。 マウスの右前肢の位置をモニターするためのタッチセンサーを、マウス右前肢の足元に 2 つ設置した。マウス右前肢の直下に設置したタッチセンサーを ‘ホールドバー’ 、マウスから遠ざかった位置にあるタッチセンサーを ‘ターゲットバー’とした。これらのセンサーにマウスの前肢が接触しているときには、それぞれ 5V の電圧が計測装置に出力された。また、マウスがこれらのセンサーに触っていないときは、0V の電圧が常に計測装置に出力された。この 5V の電圧を検出することで、マウスがホールドバーあるいはターゲットバーに触っているのかをモニターした。リックポート（給水のための飲み口）は、マウスの口元に設置した。リックポートから、1 試行あたり 1 ul – 4 ul の水が報酬として与えられた。リックポートには、先端を鈍化させた 21 ゲージの

注射針を用いた。報酬の量は、電磁バルブ （LE065A001V 12V/DC, ASCO）の開閉時間によって調節した。音刺激呈示のためのスピーカーは、マウスから約 20-30 cm 離れた位置に設置した。右前肢の動きを CMOS カメラ（DCC1240M, Thorlabs）で撮像した。動画撮像のため、実験中はマウスの右前肢を近赤外 LED （M850L3, Thorlabs）で照らした。Visual C++ で記載したプログラムを利用して、右前肢の動画を約 100 Hz で各フレーム毎に保存した。行動実験装置は遮光と遮音のため、防音ケースに設置した。

実験制御とデータ収集には、パーソナルコンピュータ（HP Compaq 8200 Elite CMT PC, Hewlett-Packart）、PCI ボード（NI PCI-6221, National instruments）および BNC 端子台（NI BNC-2110 または NI BNC-2090A, National instruments）を用いた。

2.4. Go/Nogo リーチング課題

ヘッドポスト設置手術から数日後に給水制限を開始した。給水制限下では、体重が給水制限前の 85%以下にならないようマウスに水を与えた。給水制限下で体重が安定した後、Go/Nogo リーチング課題のトレーニングを開始した。実験は 1 日 1 セッション実施し、1 セッションあたりの試行数は 250-500 試行であった。matlab で記載した実験用プログラムで行動実験を制御した。Go/Nogo リーチング課題は主に 5 つのトレーニングステップからなり、それぞれの学習基準を満たしてから次のステップに移行した。以下、各トレーニングステップについて記述する。

2.4.1. プレトレーニング

ヘッドポスト設置手術の数日後、Go/Nogo リーチング課題のトレーニングを開始する前にプレトレーニングを行った(Guo et al., 2014)。これは、プレトレーニングを行うことでマウスを実験者および実験装置に慣らし、行動実験の際にマウスにかかるストレスを軽減するためで

ある。 まず、マウスはケージの中で実験者のハンドリングを受け、実験者に慣らされた。マウスが実験者に慣れた後は、実験者がマウスを手のひらにのせ、そこで水を与えた。水を与える際は、先端を鈍化させた注射針を使用して水を与えた。次にマウスを胴部固定用のチューブに入れ、チューブ内で水を与えた。最後に、実験装置内で水を与え、マウスを実験装置に慣らした。以上の手順を経て、マウスが実験者と実験装置に慣れたところで Go/Nogo リーチング課題のトレーニングを開始した。

2.4.2. Go 試行のトレーニング

Go 試行の学習からトレーニングを開始した。図 2.2 に Go 試行の手続きをフローチャートで示した。本実験では、約 1 kHz-100 kHz のマウスの可聴域から(Koay, Heffner, & Heffner, 2002; Reynolds, Kinard, Degraff, Leverage, & Norton, 2010)、6 kHz および 14 kHz の純音を条件に応じてマウスに呈示した。Go 試行では、マウスがホールドバーに触れた際、14 kHz の純音（60 dB)を instruction cue として呈示した。マウスがホールドバーを触っている間、instruction cue は呈示され続けた。Instruction cue の呈示中にマウスがホールドバーを離したら、instruction cue の呈示は中断され、マウスは再度ホールドバーを触らなければならなかった。また、マウスが instruction cue 呈示後 500 ms 以降にホールドバーを離した場合、その反応を'Hold break error'と定義した。マウスが一定時間ホールドバーを触り続けると、 execution cue が続いて呈示された（14 kHz, 70 dB）。以後、マウスがホールドバーを触り続けなければならないこの一定期間を waiting period と呼ぶ。 Instruction cue と execution cue の周波数は同じだが、instruction cue の音圧よりも execution cue の音圧は大きい。この音圧の差を手がかりとして、マウスがホールドバーから前肢を離し、ターゲットバーを触るようトレーニングを行った。また、このトレーニングステップ以降、14 kHz の純音は Go 試行と関連付けられた。Execution cue の呈示中にマウスがターゲットバーを触ると、リックポートから報酬が与えれ、その試行は終了した。Execution

cue の呈示中にマウスがターゲットバーを触らなかった場合、報酬が与えられないまま試行が終了した。トレーニング開始時は execution cue の呈示時間を長く設定し（40-50 秒間）、マウスがターゲットバーを触る行動を促した。Execution cue の呈示時間は、トレーニングの進行に伴って短縮した。なお、本実験では、execution cue が 呈示された後、マウスがホールドバーから前肢を離すまでの時間を反応時間と定義した。なお、ホールドバーから計測装置に出力される電圧が 5V ではなくなった瞬間を、マウスがホールドバーから前肢を離したタイミングとして扱い、反応時間を算出した。以後の実験でも、反応時間は同様の基準で定義した。

Go 試行では、反応時間 1 秒未満の反応を'Success'と定義した。反応時間が 1 秒以上、あるいは execution cue の呈示中にマウスがターゲットバーを触らない場合、その反応は'Miss'と定義した。なお、マウスの課題に対するやる気を維持するため、反応時間が 1 秒以上でもターゲットバーを触った Miss 反応に対しては、少量の報酬を与えた。また、反応時間が 50 – 65 ms 以下の場合、execution cue を聞かずに前肢をホールドバーから離した可能性が高いため、waiting period 中にホールドバーを離した場合と同様のエラーとみなし、この反応も hold break error とした。Success、Miss に関わらず、試行が終了すると、inter-trial interval （ITI） （3.0 - 5.0 秒） が開始された。ITI の間は、マウスがホールドバー あるいはターゲットバー を触っても、音刺激や報酬は呈示されなかった。ITI が終了すると、次の試行が開始された。

Go 試行のトレーニングの過程で waiting period を徐々に延ばした。Waiting period が 500 ms に到達した後、waiting period にランダム成分を導入した。例えば、waiting period が 500 ms の固定成分と 1000 ms のランダム成分から構成される場合、waiting period は最短 500 ms 、最長 1500 ms の幅で生成された。このランダム成分は、マウスが体内時計を利用してリーチングを行うことを避けるために導入した。Waiting period はトレーニングの過程で徐々に延長され、最終的には 800 ms -2000 ms の幅で生成された。

このトレーニングステップでは、課題成績を以下のように算出した。

$$\text{Go 試行成功率 (\%)} = \frac{\text{Success 試行数}}{\text{Success 試行数} + \text{Miss 試行数} + \text{Hold break 数}} * 100$$

$$\text{Miss 率 (\%)} = \frac{\text{Miss 試行数}}{\text{Success 試行数} + \text{Miss 試行数}} * 100$$

$$\text{Hold break 率 (\%)} = \frac{\text{Hold break 数}}{\text{Success 試行数} + \text{Miss 試行数} + \text{Hold break 数}} * 100$$

課題成功率が 70% 以上に到達することをマウスが Go 試行を学習したと定義し、この基準を満たした後、Nogo 試行の導入を開始した。

2.4.3. Nogo 試行のトレーニング

Go 試行のトレーニングに続き、Nogo 試行のトレーニングを行った。Go 試行と Nogo 試行は、1 セッション内に擬似ランダムな系列で導入された。Go 試行と Nogo 試行の割合は、約 3:1 であった。しかし、マウスの課題成績に応じてこの比率を変更した。図 2.3 に、本トレーニングステップにおける 1 試行の手続きをフローチャートで示した。

Go 試行の手続きは上述したものと同様であった。Nogo 試行の手続きは、execution cue の呈示中にマウスがホールドバーを触り続けなければならない点、呈示される音刺激の周波数が 6 kHz である点を除き、Go 試行と同様であった。Nogo 試行では、execution cue の呈示が終了するまでマウスがホールドバーを触り続けていた場合、報酬が与えられた。この反応を Nogo success と定義した。 もしマウスが execution cue 呈示中にホールドバーから前肢を離した場合、この反応を'False alarm （Nogo error）'と定義した。Nogo 試行における execution cue の呈示時間は、200 ms 前後 から 1000 ms へと徐々に延ばした。Nogo 試行では、6 kHz の純音を instruction

および execution cues として呈示した。Go 試行と同様に、execution cue の音圧（70 dB）は instruction cue（60 dB）よりも大きくなるよう設定してあるため、音圧の変化で execution cue の呈示をマウスに教示した。以降、6 kHz の純音は Nogo 試行と関連付けられた。このトレーニングステップでは、Go 試行および Nogo 試行の課題成績を以下のように算出した。 なお、Go 試行の Miss 率と Hold break 率は前節と同様の式で算出した。

$$\text{Go 試行成功率（\%）} = \frac{\text{Go 試行での Success 試行数}}{\text{Go 試行での Success 試行 数} + \text{Go 試行での Miss 試行数} + \text{Go 試行での Hold break 数}} * 100$$

$$\text{Nogo 試行 成功率（\%）} = \frac{\text{Nogo 試行での Success 試行数}}{\text{Nogo 試行での Success 試行数} + \text{False alarm 試行数} + \text{Nogo 試行での Hold break 数}} * 100$$

$$\text{False alarm 率 (\%)} = \frac{\text{False alarm 試行数}}{\text{Nogo 試行での Success 試行数} + \text{False alarm 試行数}} * 100$$

$$\text{Nogo 試行の Hold break 率 (\%)} = \frac{\text{Nogo 試行の Hold break 数}}{\text{Nogo 試行数} + \text{Nogo 試行の Hold break 数}} * 100$$

$$\text{総成功率（\%）} = \frac{\text{Go 試行での Success 試行数} + \text{Nogo 試行での Success 試行数}}{\text{Go 試行での Success 試行数} + \text{Miss 試行数} + \text{Nogo 試行での Success 試行数} + \text{False alarm 試行数} + \text{総 Hold break 数}} * 100$$

Go 試行の成功率、Nogo 試行の成功率、および総成功率が 70% 以上に到達することをマウスが Go/Nogo 試行を学習したと定義した。この基準を満たした後、execution cue を純音からホワイトノイズに入れ替えるトレーニングステップに移行した。

2.4.4. ホワイトノイズ execution cue の導入

このトレーニングステップでは、今まで純音で構成されていた Go 試行および Nogo 試行の execution cue をホワイトノイズに入れ替えた。これは、マウスが instruction cue で呈示される試行情報（14 kHz および 6 kHz の純音情報）を利用しないことで waiting period 中に次の運動の準備をせず、execution cue の純音情報だけを使って課題を行うことを避けるためである。その他の課題手続きは、前節の Go/Nogo 試行トレーニングと同様であった。図 2.4 に、本トレーニングステップにおける 1 試行の続きをフローチャートで示した。

トレーニング開始時は、純音 100%、ホワイトノイズ 0%で構成された execution cue を呈示した。トレーニングの進行に伴い、純音とホワイトノイズの比率を徐々に変化させ、最終的には純音 0%、ホワイトノイズ 100%で構成された execution cue を呈示した。ホワイトノイズの比率上昇に伴ってマウスの課題成績が低下した場合、純音の比率を上げ、ホワイトノイズの比率を下げた。最終的に 65-70 dB のホワイトノイズを execution cue として呈示した。

課題成績の算出方法は前節と同様であった。Go 試行の成功率、Nogo 試行の成功率、および総成功率が 70% 以上に到達することを、マウスがホワイトノイズ execution cue を学習したことと定義した。この基準を満たした後、waiting period を純音からホワイトノイズに入れ替えるトレーニングステップに移行した。

2.4.5. ホワイトノイズ waiting period の導入

このトレーニングステップが Go/Nogo リーチング課題の最終ステップであり、実験 1 を含む、本研究で行われた Go/Nogo リーチング課題の行動データは全てこのステップで取得した。このトレーニングステップでは、今まで純音で構成されていた Go 試行および Nogo 試行の waiting period を、最初の 200 ms を除いてホワイトノイズに入れ替えた。試行開始時 200 ms の

み純音が呈示されるため、waiting period の途中ではなく、マウスは試行開始直後に次の動作を決定する必要が生じた。そのため、この手続きによって、次の動作の選択およびその動作の準備の開始地点を、試行開始後 200 ms に限定した。その他の課題手続きは、前節までと同様であった。図 2.5 に、本トレーニングステップにおける 1 試行の手続きをフローチャートで示した。また、実際にマウスが Go 試行、Nogo 試行を行っている様子を図にまとめ、Go/Nogo リーチング課題の構造を図 2.6 に示した。

トレーニング開始時は、14 kHz（Go 試行）あるいは 6 kHz（Nogo 試行）の純音が waiting period のあいだ呈示された。トレーニングの進行に伴い、waiting period に呈示される純音の比率を下げ、ホワイトノイズの比率を上げた。最終的には、最初の 200 ms を除き、waiting period の期間はホワイトノイズのみを呈示した。ホワイトノイズの比率上昇に伴ってマウスの課題成績が低下した場合、純音の比率を上げ、ホワイトノイズの比率を下げた。最終的に 40 dB のホワイトノイズが waiting period のあいだ呈示された。Waiting period のあいだ呈示されるホワイトノイズの音圧よりも、execution cue のホワイトノイズの音圧は大きい。この音圧の差を手がかりとして、Go 試行では execution cue が呈示されたときにマウスがホールドバーから前肢を離し、ターゲットバーを触るようトレーニングを行った。課題成績は、前節と同様の方法で算出した。

3. 結果

自発的な動作の運動準備を頭部固定下のマウスで調べるため、本実験では Go/NoGo リーチング課題を開発した。上記した各トレーニングステップを経て、マウスは Go/NoGo リーチング課題を学習し、高い精度の学習成績を示した。Go 試行では、Hold break 率は 4.9 %、 Miss 率は 1.8 %であった。 Nogo 試行では、Hold break 率は 3.3 %、 False alarm 率は 6.5 %であった（図 2.7A）。また Go 試行における平均反応時間は 150.5 ms ± 90.8 ms (S.D.)であり、反応時間

に試行ごとのばらつきはあるものの（図 2.7B 左図）、マウスは execution cue 呈示から 500 ms 以内に素早くリーチングを開始した（図 2.7B 右図）。

4. 考察

数週間のトレーニング期間を要するものの、各ステップごとにトレーニングを行うことで、マウスは Go/NoGo リーチング課題を学習し、高い精度の成績を示した。Go 試行では、ほぼ全ての試行でマウスは execution cue の呈示から 1 秒以内でリーチングを開始した。Nogo 試行においても、90%以上の成功率でマウスは execution cue の呈示中（1 秒間）に前肢をホールドバーに待機させ続けることができた。これらの結果は、マウスが 14 kHz と 6 kHz の純音を、Go 試行および Nogo 試行と正確に関連付けていたこと、試行開始時 200 ms のみ呈示された純音情報で次の動作を決定し、execution cue の呈示によって準備していた動作を実行していたことを示している。

Go、Nogo 試行のいずれにおいても Hold break 率は 5%以下であった。Hold break error は、waiting period 中に右前肢をホールドバーから離してしまうことで生じるエラーである。そのため、この hold break error の頻度が高いということは、運動準備期間中にマウスがホールドバー上で前肢を大きく動かしていたことを意味する。Hold break 率が高い場合、すなわち、運動準備期間中に頻繁に前肢を動かすことが常態化していた場合、hold break error を起こさなかった試行においても、運動準備中にマウスが前肢を小さく動かし、運動準備の神経活動にノイズが入ることが懸念される。しかしながら、本実験では Hold break 率は 5%以下であり、非常に低い値であった。この結果は、Go/Nogo リーチング課題において、マウスは運動準備期間中に前肢の不必要な動きを制限し、静止した状態で次の動作を準備していたことを示している。

Go 試行の平均反応間は 150.5 ms ± 90.8 ms （S.D）であり、マウスは execution cue に対して非常に素早く反応した。一方で、Go 試行における Hold break 率は 5%以下であり、

execution cue を聞かずにホールドバーから前肢を離し、リーチングを開始してしまう試行は非常に少なかった。この結果は、Go 試行において、マウスが execution cue を利用して準備していた動作（リーチング）を実行していたことを示唆している。

以上のことから、本実験では、マウスは Go/NoGo リーチング課題の構造を理解し、instruction cue の呈示によって次の動作を決め、waiting period のあいだに動作の準備をし、execution cue の呈示によって準備された動作を実行していたと考えられる。そのため、本実験で開発した Go/Nogo リーチング課題は、頭部固定下のマウスを対象として運動準備を実験的に観察できる行動課題であるといえる。

実験 2　体内時計による課題遂行の検討

1, 序論

実験 1 から、Go/Nogo リーチング課題ではマウスが instruction cue の呈示に応じて次の運動を準備し、execution cue の呈示によって準備された動作を実行していることが示された。しかしながら Go 試行では、execution cue を利用しなくても、マウスが体内時計を利用して課題を行っていた可能性が考えられる。マウスやラットなどのげっ歯類は優れた時間弁別能力を有しており、数秒から数十秒のスパンにかけて、高い精度で時間を弁別することができる(Gouvea et al., 2015; Mello, Soares, & Paton, 2015; Soares, Atallah, & Paton, 2016)。例えば、ある一定時間経過後初めてのレバー押し反応に報酬が与えられる課題（固定間隔課題）では、報酬がもらえる時間が近づくにつれ、レバー押し反応の回数が増加する。この課題を行っている際、線条体では報酬がもらえる時間が近づくにつれて活動が変化する神経細胞が見つかっており、これらの細胞が時間情報のコーディングに寄与している可能性が示唆されている(Mello et al., 2015)。呈示

される音刺激（数秒）の長短を弁別させる課題においても、ラットは高い精度で音の長短を弁別することができ、時間の長短の判断に応じて線条体や腹側被蓋野の神経細胞の活動が変化することが報告されている(Gouvea et al., 2015; Soares et al., 2016)。このような先行研究の結果を考慮すると、Go/Nogo リーチング課題では waiting period の長さをランダマイズしていたものの、Go 試行ではマウスが自身の体内時計に強く依拠してリーチングを開始していた可能性を否定できない。

そこで実験 2 では、突然長い waiting period が導入されても、マウスが高い精度で Go 試行を遂行できるかどうかを検討した。もしマウスが体内時計に強く依拠せず、execution cue の呈示を待つことで Go 試行を行っているとすれば、突然長い waiting period が導入されたとしても、Go 試行の課題成績は変化しないと予想される。一方、マウスが体内時計に強く依拠して Go 試行を行っているとすれば、突然長い waiting period が導入されると、マウスは execution cue が呈示される前にリーチングを開始してしまうため、Go 試行において Hold break 率が増加し、結果として Go 試行成功率も低下すると予想される。以上の仮説を検討するため、実験 2 では低頻度で 3 秒の waiting period を Go 試行に導入し、マウスの課題成績がどのように影響を受けるのかを検討した。

2. 方法

2.1. 動物

8 週齢以上のオスの PV-Cre マウス 3 匹を実験に用いた。マウスは明暗 12 時間サイクルで集団飼育（最大 1 ケージ 5 匹）し、暗期に実験を行った。

2.2. ヘッドポスト設置手術

実験 1 と同様の手続きでヘッドポストをマウスに設置した。

2.3. 装置

実験 1 と同様の行動実験装置を用いた。

2.4. Go/Nogo リーチング課題

実験 1 と同様の手続きでマウスをトレーニングした。実験は 1 日 1 セッション実施し、1 セッションあたりの試行数は 250-500 試行であった。また、Go 試行と Nogo 試行はランダマイズされて導入した。Go 試行の成功率、Nogo 試行の成功率、および総成功率が 80% 以上で安定した後、3 秒の waiting period が Go 試行のうち 5-10%導入される条件で実験を 2-3 セッション行った。

2.5. データ解析

Go 試行のデータを通常の waiting period および 3 秒の waiting period が導入された試行に分け、両条件の成功率および Hold break 率をピアソンカイ 2 乗検定で分析した。検定の統計的有意水準は 0.05 とした。

3. 結果

実験 2 では、Go/Nogo リーチング課題の学習が完成した後、事前のトレーニング無しで 3 秒の waiting period を Go 試行に突然導入し、その試行で課題成績がどのように変化するのかを検討した。実験の結果、全てのマウスは 突然長い waiting period を導入されても、成績が乱れることなく課題を遂行した（図 2.8）。いずれのマウスにおいても、通常の waiting period における Go 試行成功率（97.9%, 96.7%, 98.4%、367, 365, 237 試行）と 3 秒条件の waiting period の Go 試行成功率（94.6%, 96.6%, 100.0%、34, 36, 9 試行）の間には、有意な差は認められなかった

（全てのマウス: $p > 0.85$）。また、Hold break 率に関しても、通常の waiting period の Hold break 率（0.6 %, 3.0 %, 0.8 %）と 3 秒条件の Hold break 率（2.9 %, 5.6 %, 0.0 %）の間に有意な差は認められなかった（各マウス: $p > 0.15$, $p > 0.4$, $p > 0.7$)。

4. 考察

実験 2 では、3 秒の waiting period 条件を 5-10%の割合で突然 Go 試行に導入し、課題成績の変化を調べることで、マウスが体内時計に強く依拠して Go 試行を行っている可能性を検討した。仮にマウスが体内時計を利用して Go 試行を行っているのならば、waiting period が通常よりも長い場合、マウスは execution cue の呈示を待たずにリーチングを始めてしまう。そのため、マウスが体内時計に依拠して Go 試行を行っているのであれば、hold break error が増加し、Go 試行の成功率が低下すると予想された。

実験の結果、通常の waiting period と 3 秒の waiting period で課題成績に差はなく、成功率にも Hold break 率にも条件間で有意な差は生じなかった。また、3 秒の waiting period を初めて経験した試行でも、全てのマウスは hold break error を生じなかった。これらの結果は、Go/Nogo リーチング課題の Go 試行において、マウスは体内時計に依拠せず、execution cue を利用して準備した動作を実行していたことを示している。よって、前腕運動の運動準備を実験的に観察するという本研究の目的を考慮すると、Go/Nogo リーチング課題はその目的にとって実験妥当性の高い課題であると考えられる。

実験 3　ムシモール注入が前腕運動に与える影響

1. 序論

実験 1 および実験 2 から、Go/Nogo リーチング課題では、マウスは体内時計ではなく、execution cue を利用して準備された運動を実行していることが示された。このことは、前腕運動の運動準備を実験的に観察するという本研究の目的にとって、Go/Nogo リーチング課題が妥当性の高い課題であることを意味している。しかしながら、運動準備を実験的に検討する課題としての妥当性が高いとしても、Go/Nogo リーチング課題の遂行に、前肢と関係する皮質運動領域（前肢運動野）がどれだけ重要であるかは不明瞭である。

前腕の運動に関与する複数の領域が脳内には存在するが、皮質内では前肢運動野が前肢の運動の制御・実行に関与している。皮質に電気刺激を与える実験によってげっ歯類の前肢運動野の場所は同定されており(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al., 2013; Hira, Ohkubo, Tanaka, et al., 2013; Neafsey et al., 1986; Neafsey & Sievert, 1982; Tennant et al., 2011)、この領域を刺激すると、刺激した脳半球とは反対側の指、手首、肘などの動きが惹起される。マウスやラットでは、尾側（後ろ側）と吻側（前側）の 2 つの領域に前肢運動野は存在しており、尾側の前肢運動野は尾側前肢運動野（Caudal forelimb area, CFA）、吻側の前肢運動野は吻側前肢運動野（Rostral forelimb area, RFA）と呼ばれる。マウス脳アトラス(Paxinos & Franklin, 2004)を参考にすると、CFA は 1 次運動野に、RFA は 2 次運動野に位置している。CFA と RFA の領野面積を比較すると、CFA の領野面積は RFA より数倍大きく、電気刺激で前腕の動きが惹起される頻度も高い(Tennant et al., 2011)。このような特徴を CFA が持っていることから、皮質における前腕運動の神経メカニズムを検討する実験では、CFA が主な観察対象に選択されて実験が行われる。

先行研究から、前肢運動野の正常な活動が妨げられると、学習された前腕運動の実行に影響が出ることが明らかにされている。自発的にレバーを引く課題中に、CFA あるいは RFA に神経活動が抑制される薬剤が注入されると、マウスは前腕を動かすことはできるものの、適切にレバーを引けなくなった(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al., 2013)。同様に、事前に神経活動を妨げる薬剤を CFA に注入した状態でマウスにレバー押し課題を行わせると、マウスはレバーを押すこ

とができるものの、学習により獲得されたレバー押し動作の再現性は低下した(Peters et al., 2014)。また、オプトジェネティクス[4]を利用した実験では、運動開始前から、あるいは運動開始直後に CFA の活動を抑制すると、マウスは前腕運動を実行することができなくなった。これらの知見は、前腕を利用する行動課題の遂行において、CFA の活動が必要であることを示している。

しかしながら、前腕を利用する運動の実行において、前肢運動野が必ずしも必要でないケースが報告されている(Kawai et al., 2015)。Kawai らは、一度レバーを押してから一定間隔後（数百 ms 後）にもう一度レバーを押すことで報酬がもらえる運動課題を開発し、ラットに訓練した。ラットにこの課題を学習させた後、前肢運動野を含む大脳皮質を除去し、大脳皮質の除去が課題成績に与える影響を検討した。その結果、課題を学習したラットは前肢運動野を含む大脳質を除去されても、除去前と同様の課題成績を示した。一方、課題を学習する前に大脳皮質を除去されたラットは、正常なラットのように課題を学習することはできなかった。以上の結果から、Kawai らは、皮質運動野は運動学習には必要であるものの、学習された運動技能の実行には必ずしも必要ではないことを指摘している。Kawai らの実験結果が全ての運動技能に当てはまるかどうかは不明である。しかしながらこの実験結果は、運動の種類によっては、学習された運動技能の実行に前肢運動野が必ずしも必要ではない可能性を示唆している。もし本実験においても、前肢運動野の活動が学習された運動技能の遂行に必ずしも必要でないのならば、前肢運動野を 2 光子カルシウムイメージングの対象にする必然性は低下する。そのため、Go/Nogo リーチング課題の遂行に前肢運動野が必要であるかを検討することは、この脳領域で 2 光子カルシウムイメージングを行う妥当性を確立するために重要だと考えられる。

[4] オプトジェネティクス（光遺伝学）: 神経細胞に光活性化イオンチャネルを発現させた後、特定の波長の光を照射してその細胞の活動をコントロールする技術。

そこで、実験 3 では、前肢運動野が Go/Nogo リーチング課題の遂行に重要であるかどうかを、ムシモール注入実験で検討した。ムシモールは GABA 受容体のアゴニストであり、GABA の効果を模す。GABA は脳内において抑制性の神経伝達物質として機能するため、ムシモールが注入された脳領域では神経細胞の活動が抑制される。この特性を利用して、脳の特定領域の機能を可逆的に脱落させる実験にムシモールを利用することができる。もし前肢運動野が Go/Nogo リーチング課題の遂行に必要であれば、ムシモールを前肢運動野に注入することで前肢の正常な動作が妨げられ、課題成績は低下すると予想される。一方、前肢運動野が Go/Nogo リーチング課題の遂行に必要でなければ、ムシモールが前肢運動野に注入されても、課題成績は変化しないと予測される。本実験では、ムシモールを注入する領域に CFA を選択した。これは上述したように、CFA が 1 次運動野に位置すること、領野面積が RFA よりも広いこと、電気刺激によって前腕の動きが惹起される確率が RFA より高いこと、といった理由から、CFA が前腕運動の主たる皮質領域だと考えられるためである。

以上の仮説を検討するため、実験 3 ではムシモールを CFA に注入し、課題成績がどのように影響を受けるのかを検討した。また、ムシモールを脳内に注入する手続き自体が課題成績に何らかの影響を与える可能性が考えられるため、統制実験として、cortex buffer[5]を脳内に注入し、注入手続きそのものが課題成績に与える影響も検討した。

2. 方法

2.1. 動物

8 週齢以上のオスの PV-Cre マウス 2 匹および SOM-Cre マウス 1 匹、計 3 匹を実験に用いた。

[5] Cortex buffer: 脳内の環境（PH など）を乱さない溶液。微量注入しても、この液自体が脳に損傷を与えることはない。

2.2. ヘッドポスト設置手術

実験 1 と同様の手続きでヘッドポストをマウスに設置した。

2.3. ムシモール注入手術

イソフルラン吸入麻酔下（1.5%）で、約 70 nl (nanoliter)[6] のムシモール （muscimol hydrobromide, 5 μg (microgram)[7]/μl (microliter)[8] in cortex buffer; M1523, Sigma Aldrich）を、約 20 nl/min の速度で 3 分から 5 分かけて CFA に注入した。ムシモール注入後、注入部位はシリコン（Kwik-Cast, World Precision Instruments）で覆って保護した。ムシモール注入後、1 時間の回復期間をおいて Go/Nogo リーチング課題を実施した。Cortex buffer もムシモールと同量 70 nl を同様の手続きで注入した。

2.4. 装置

Go/Nogo リーチング課題には、実験 1 と同様の行動実験装置を用いた。ムシモールおよび cortex buffer の注入には、グラスキャピラリー（Wiretrol II, Drummond Scientific）から作製したインジェクションピペットを利用した。縦引き型プラー（PC-10, Narishige）でグラスキャピラリーからピペットを作製し、その先端を削って 15-30 um に調節した。MicroFil （MF-34G-5, World Precision Instrument）でミネラルオイル（M5904, Sigmal Aldrich）をピペットにバックフィルした後、ピペット後方からプランジャーを挿入した。プランジャーが挿入された状態で、ピペットを一次元油圧マイクロマニピュレーター（MO-10, Narishige）に取り付けた。次に、油圧マイクロマニピュレーターを利用してプランジャーを後方に引くことでピペット先端に陰圧をかけ、ムシモールあるいは cortex buffer をピペット先端に充填した。油圧マイクロマニュピ

[6] nl (nanoliter) : ナノリットル。10 の-9 乗リットルを示す。
[7] μg (microgram): マイクログラム。10 の-6 乗グラムを示す。
[8] μl (microliter): マイクロリットル。10 の-6 乗リットルを示す。

ュレーターをモーター式マニピュレーター（MP-285, Sutter Instrument）に設置し、ピペットを注入部位に移動させた。ムシモールおよび cortex buffer を脳内に注入する際は、油圧マイクロマニュピュレーターを利用してプランジャーをピペット前方に押し出し、ピペット先端に陽圧をかけることでムシモールおよび cortex buffer を脳内に注入した。

2.5. ムシモール注入実験

実験 1 と同様の手続きでマウスをトレーニングした。実験は 1 日 1 セッション実施し、1 セッションあたりの試行数は 250-500 試行であった。また、Go 試行と Nogo 試行はランダマイズして導入した。Go 試行の成功率、Nogo 試行の成功率、および総成功率が 80% 以上で安定した後、一連のムシモール注入実験を開始した。ムシモール注入実験は、2 日間の統制実験、1 日のムシモール注入実験、2 日間の統制実験、1 日の cortex buffer 注入実験の計 6 日の実験で構成された（図 2.9A）。一連のムシモール注入実験では、いずれの条件であっても、実験は 1 日 1 セッション実施した。ムシモールを注入した条件では、マウスが前腕の運動を行う様子が見られなくなった場合、その時点で課題を終了した。

一連の実験では、Miss 率、Target miss 率、False alarm 率、Hold break 率を算出した。Miss と false alarm の定義およびそのエラー率の算出方法は実験 1 と同様である。Miss 試行の中でも、ホールドバー を離したにも関わらず Success にならなかった Miss 試行は'Target miss'と定義し、以下の式で算出した。また、本実験では Go 試行と Nogo 試行の Hold break 率をまとめ、以下の式で Hold break 率を算出した。

$$\text{Target miss 率}(\%) = \frac{\text{Target miss 試行数}}{\text{Miss 試行数}} * 100$$

$$\text{Hold break error 率 (\%)} = \frac{\text{総 Hold break error 試行数}}{\text{Go 試行数} + \text{Nogo 試行数} + \text{総 Hold break error 試行数}} * 100$$

2.6. データ解析

ムシモール注入の効果は、統制実験（2 日目）とムシモール注入実験（3 日目）、統制実験（5 日目）と cortex buffer 注入実験（6 日目）の Miss 率をピアソンカイ 2 乗検定で分析することで検討した。検定の有意水準は 0.05 とした。

3. 結果

CFA に対するムシモールの注入は、Go/Nogo リーチング課題の課題成績、とりわけ Go 試行の課題成績を著しく低下させた。ムシモールの注入により、Miss 試行数は有意に増加した（全てのマウス: $p < 0.02$ ）。通常の Go 試行では Miss 率は 0%に近い値だったが、ムシモールが注入されると Miss 率は 90%以上まで増加した（図 2.9.B1）。Miss 試行の中でも、約 80%の Miss 試行でマウスはホールドバーから前肢を離さないまま試行が終了した（図 2.9.B1-B2）。False alarm 率はムシモールの注入による影響を受けなかった（図 2.9.B3）。Hold break 率はムシモールの注入により増加したものの（図 2.9.B4）、その影響は Miss 率に比べると大きくはなかった。また、cortex buffer の注入は課題成績にどのような影響も及ぼさなかった。

4. 考察

実験 3 では、前肢運動野（CFA）が Go/Nogo リーチング課題の遂行に必要であるかどうかを、ムシモール注入実験で検討した。もし CFA の活動が Go/Nogo リーチング課題の前腕運動に必要であれば、ムシモールを CFA に注入すると前肢の正常な動きが妨げられ、課題成績が低下すると予想された。一方、CFA が Go/Nogo リーチング課題の遂行に必要でなければ、ムシ

モールが CFA に注入されても前腕運動の制御・実行には何の影響も無いため、課題成績は変化しないと予想された。

実験の結果、ムシモールの注入によって、Go 試行の課題成績は大きく低下した。ムシモールを注入することで Miss 試行が大幅に上昇したが、約 80%の Miss 試行でマウスはホールドバーから前肢を離さないまま試行が終了していた。この結果は、ムシモール注入によって CFA の活動が抑制され、大部分の試行でマウスがリーチングを開始できなくなったことを意味している。本実験の結果は、CFA へのムシモール注入が前腕運動の実行を妨げるという先行研究の結果と一致しており(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al., 2013; Peters et al., 2014)、CFA が本実験の前腕運動の実行に必要であることを示している。一方、Nogo 試行の課題成績は、ムシモール注入によって影響を受けなかった。Nogo 試行では前肢を動かさないことが要求されているため、CFA へのムシモール注入によって前肢が動かなくなっても、Nogo 試行の遂行には問題が生じない。そのため、Nogo 試行では、ムシモール注入によって課題成績は変化しなかったのだと推測される。また、cortex buffer の注入が課題成績に何の影響も与えなかったことから、ムシモール注入手続きそのものが課題成績に干渉した可能性は低いと推察される。

以上のことから、CFA の活動は、Go/Nogo リーチング課題の遂行、とりわけ Go 試行における前腕運動に関して重要であると考えられる。このことは、前腕運動に関する運動準備の神経活動を 2 光子カルシウムイメージングで観察する脳領域として、CFA を選択することが実験的に妥当であることを示している。

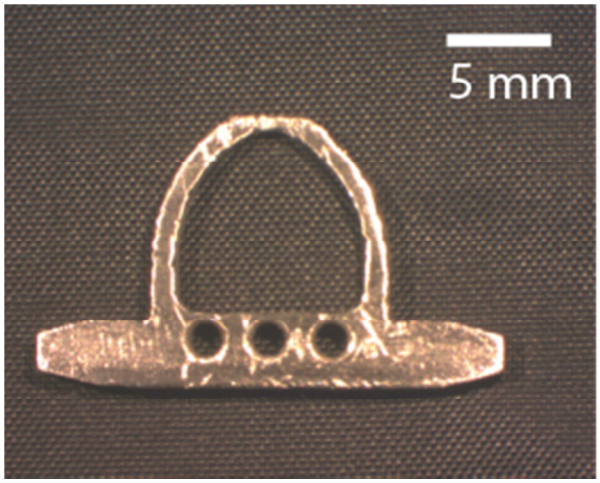
第 2 章まとめ

本章では、頭部固定下のマウスを対象とした運動準備課題を開発し、その課題が前腕運動の運動準備を必要とする課題であるのか、また、この課題の遂行に前肢運動野が必要であるのかを検討した。実験 1 では、複数のトレーニングステップを設定することで、運動準備を必要とする課題である Go/Nogo リーチング課題をマウスが学習し、高い精度でこの課題を遂行できることを確認した。実験 2 では、マウスが Go 試行を遂行するときに体内時計に強く依拠せず、execution cue を利用して準備した動作を実行していることを明らかにした。実験 3 では、ムシモール注入実験を通じて、前肢運動野（CFA）の活動が Go 試行の遂行に必要であることを明らかにした。以上の実験結果から、Go/Nogo リーチング課題は前腕運動（Go 試行のリーチング）に関係する運動準備をマウスに生起させる課題であり、2 光子カルシウムイメージングで課題遂行中の前肢運動野（CFA）の活動を観察・測定することで、運動準備の神経メカニズムを検討することができると考えられる。

そこで次章（3 章）では、Go/Nogo リーチング課題の遂行中に前肢運動野で 2 光子カルシウムイメージングを行い、前肢運動野の神経細胞集団がどのように活動することで運動準備が形成されるのかを検討する。また、先行研究と同様に(Churchland et al., 2006)、本研究においても反応時間のばらつきが運動準備の進行を反映すると仮定する。つまり、Go 試行での反応時間が短い試行は運動準備が十分であり、反応時間が長い試行は運動準備が不十分であったと仮定する。反応時間は Go 試行でのみ定義されている行動測度であるため、第 3 章のカルシウムイメージングデータの解析には、Go 試行のデータに着目して解析を行う。

また本章の実験 3 では、Go/Nogo リーチング課題の遂行に CFA が必要かどうかを検討したが、RFA が課題の遂行に必要かどうかは検討しなかった。しかしながら、CFA と同様に、RFA への電気刺激や光刺激によっても前肢の動きが惹起されること(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al.,

2013; Hira, Ohkubo, Tanaka, et al., 2013; Tennant et al., 2011)、RFA の活動を抑制することで前腕を利用する行動課題の成績が低下すること(Hira, Ohkubo, Ozawa, et al., 2013)、RFA が運動の準備に関与していること(Murakami, Vicente, Costa, & Mainen, 2014; Smith, Horst, Liu, Caetano, & Laubach, 2010)が、先行研究によって報告されている。これらの知見を考慮すると、RFA も前腕運動の運動準備にとって何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。そのため、第 3 章での 2 光子カルシウムイメージングでは、CFA に加え、RFA も 2 光子カルシウムイメージングの観察対象として実験を行なうこととする。



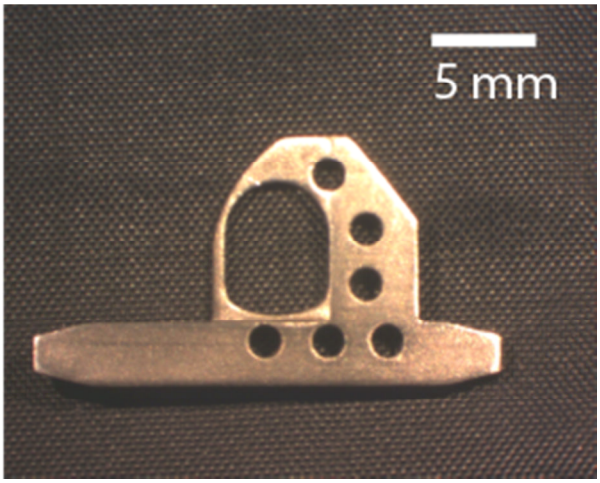


図 2.1. 本研究で使用したヘッドポストの写真

ここに掲載した 2 種類のヘッドポストのいずれかをマウス頭部に取り付けて実験を行った。ヘッドポストは接着剤でマウスの頭骸骨に固定した後、さらにデンタルセメントを塗布して補強した。

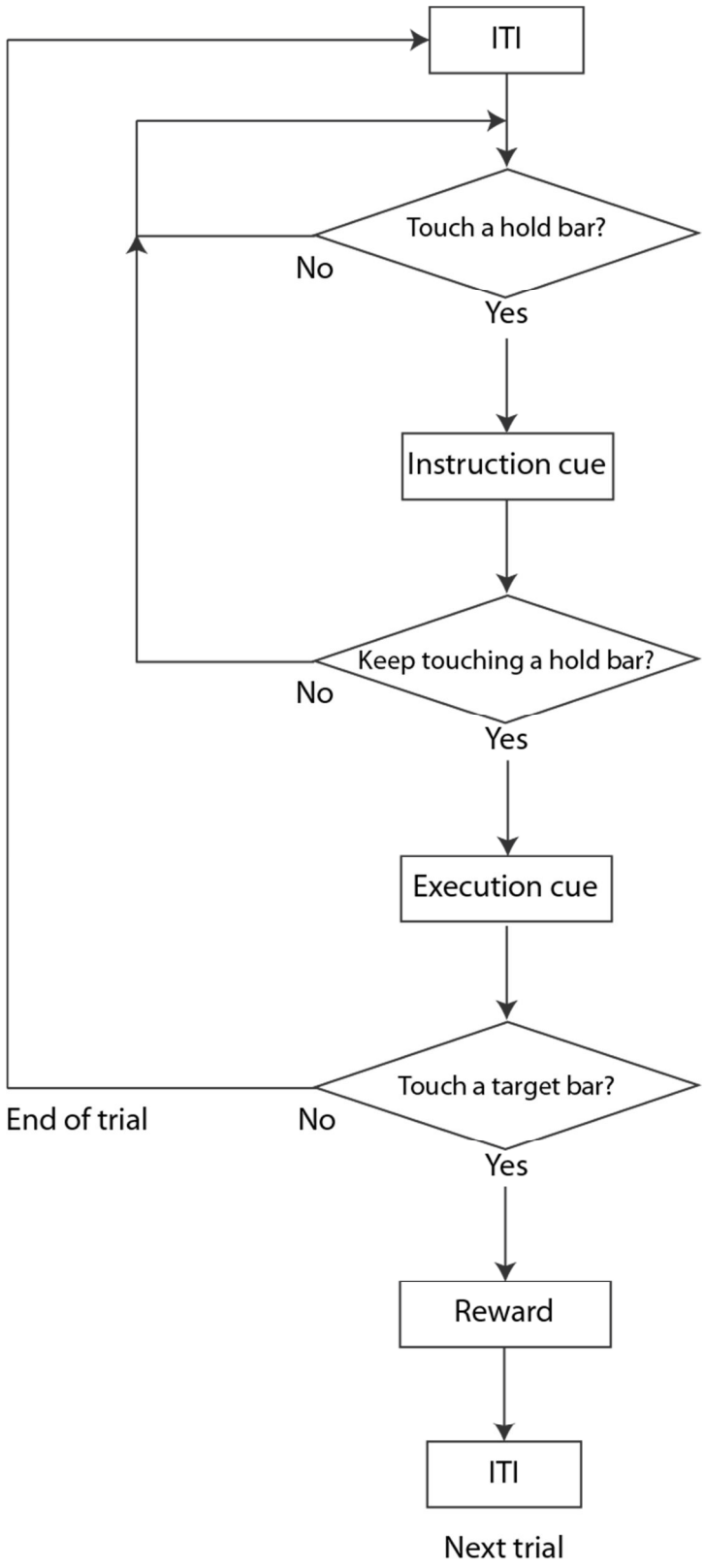


図 2.2. Go 試行のフローチャート

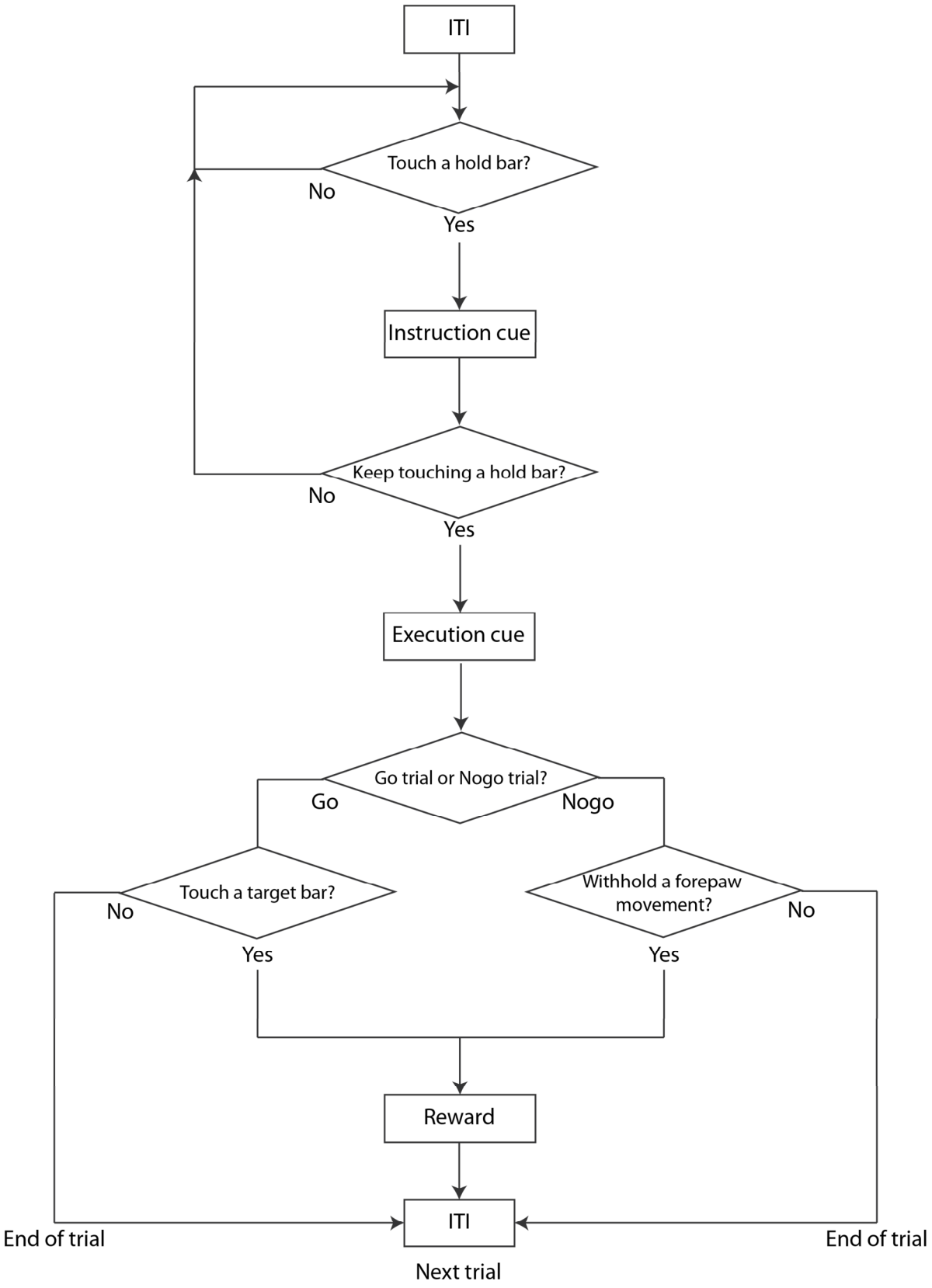


図 2.3. Go および Nogo 試行のフローチャート

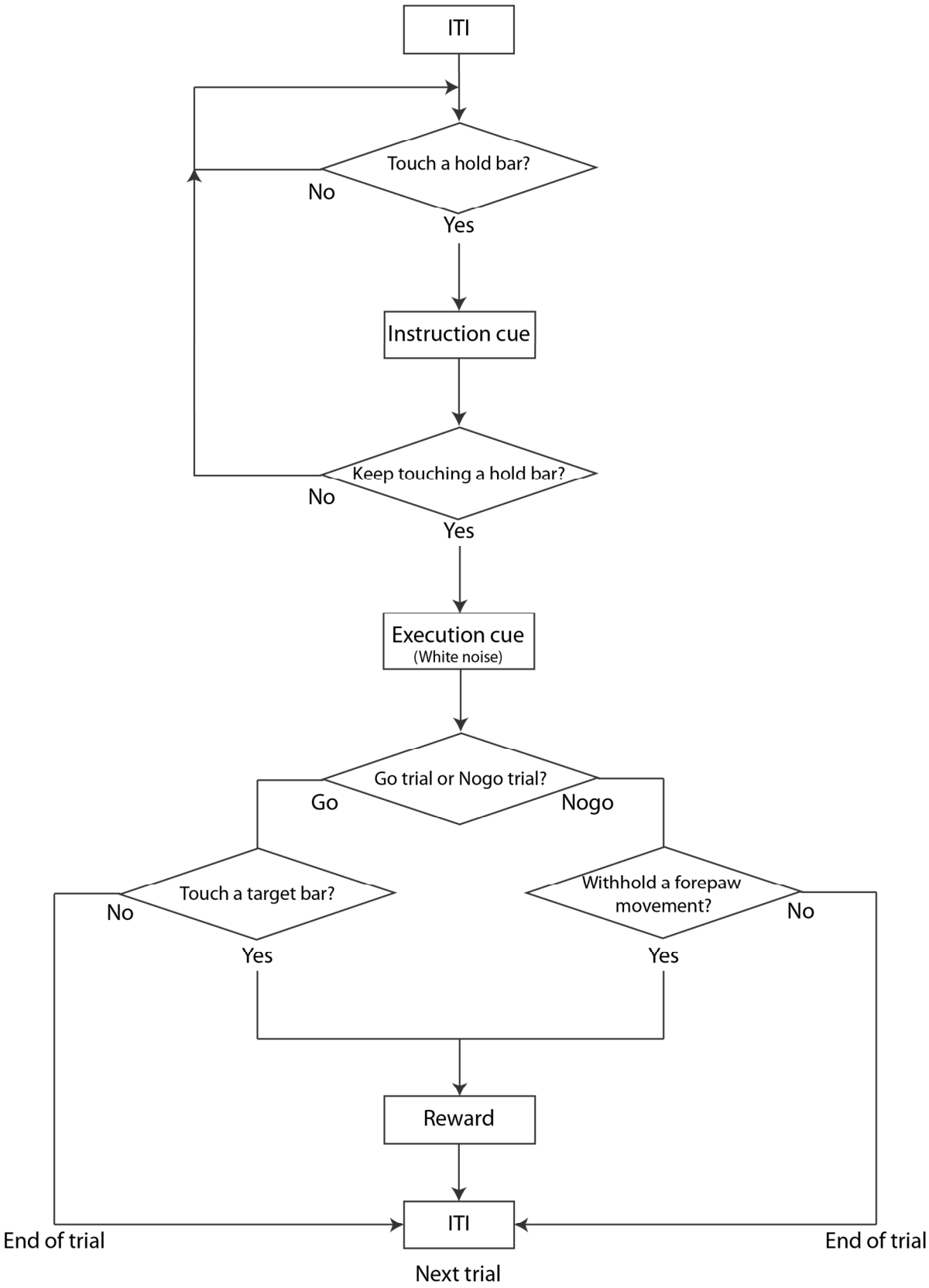


図 2.4. ホワイトノイズ **execution cue** 導入後の **Go** および **Nogo** 試行のフローチャート

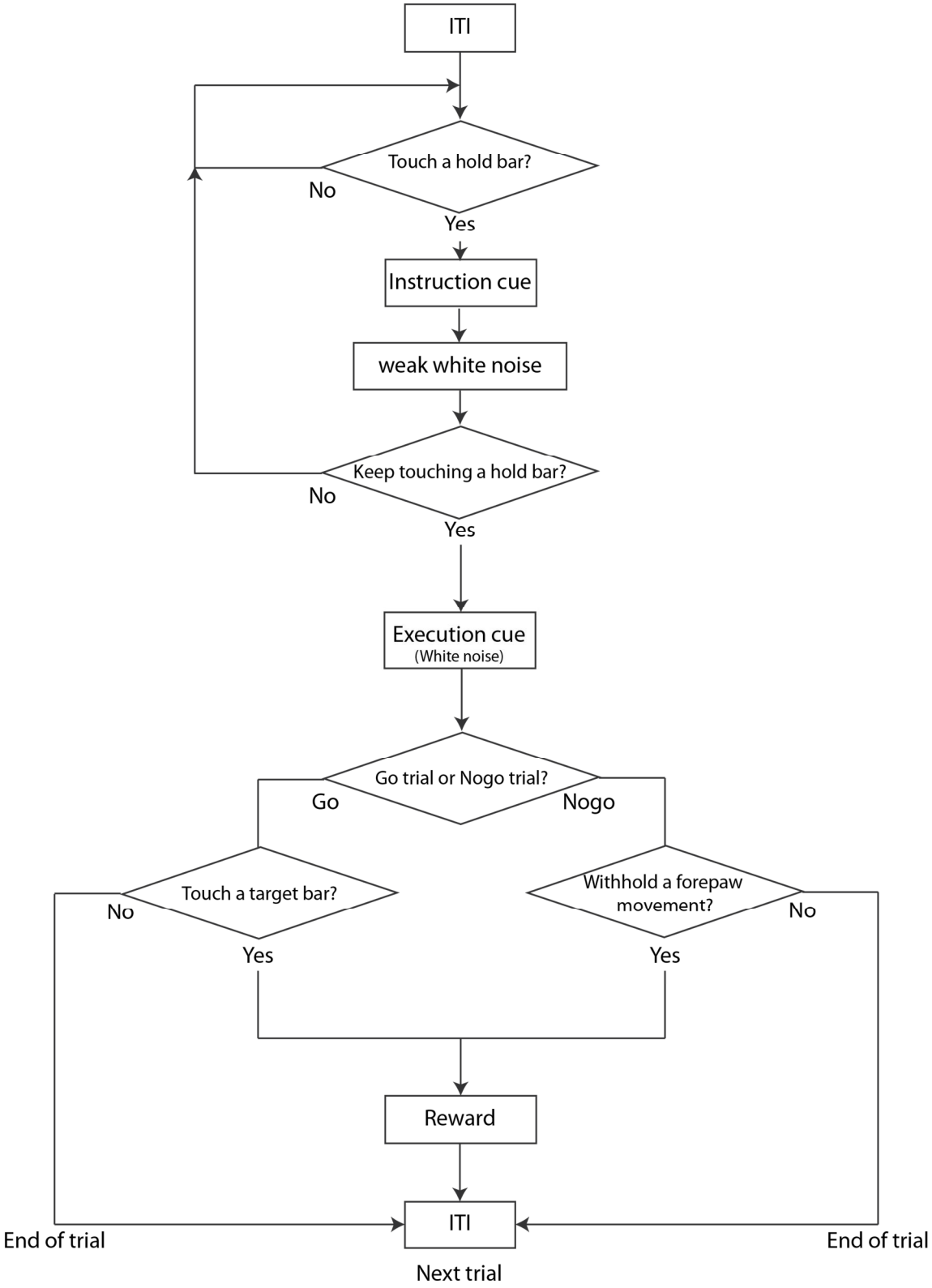


図 2.5. ホワイトノイズ **waiting period** 導入後の **Go** および **Nogo** 試行のフローチャート

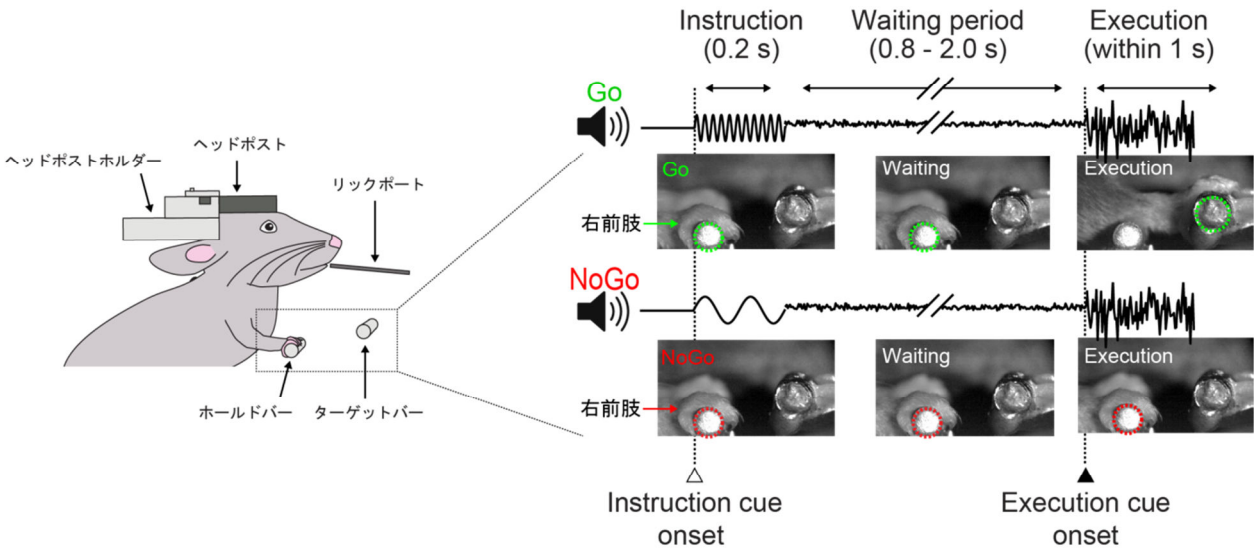


図 2.6. マウス全体図および Go/Nogo リーチング課題の手続き

左図にマウスとホールドバー、ターゲットバーの位置関係を示した。右図に Go 試行（上段）および Nogo 試行（下段）の音刺激のトレースおよび課題中の様子を示した。右図の各写真は、左図の点線内部（右前肢、ホールドバー、ターゲットバー）を拡大したものである。Go 試行では、ホールドバーを触ることで instruction cue が呈示され、waiting period が続き、execution cue の呈示に伴い、マウスはターゲットバーに右前肢を動かした。Nogo 試行では、ホールドバーを触ることで instruction cue が呈示され、waiting period が続き、execution cue の呈示（1 秒）が終了するまでマウスはホールドバーに右前肢を置き続けた。各タイムポイントにおいて、マウスが右前肢を置いておかなければならない場所（ホールドバーあるいはターゲットバー）を、図中に破線で示した（Go 試行では緑の破線。Nogo 試行では赤の破線）。

図 2.7. Go/Nogo リーチング課題の成績

(A) Go 試行および Nogo 試行における各エラー率。Go 試行では、Hold break 率は 4.9% で Miss 率は 1.8% であった（左 2 つのコラム）。一方 Nogo 試行では、Hold break 率は 3.3% 、False alarm 率は 6.5% であった（右 2 つのコラム）。

(B) 反応時間の分布。左図：Go 試行 10 試行分のホールドバー およびターゲットバー のシグナルトレース。黒い実線はホールドバー からのシグナルであり、低位置の状態はマウスがホールドバーを触れていることを、 高位置はマウスがホールドバーを離していることを示す。灰色の実線はターゲットバーのシグナルであり、低位置の状態はマウスがターゲットバーを触れていることを、 高位置はマウスがターゲットバーを離していることを示す。右図上部: Execution cue の呈示からホールドバーを離すまでの時間の分布。右図下部: Execution cue の呈示からターゲットバーを触るまでの時間の分布。

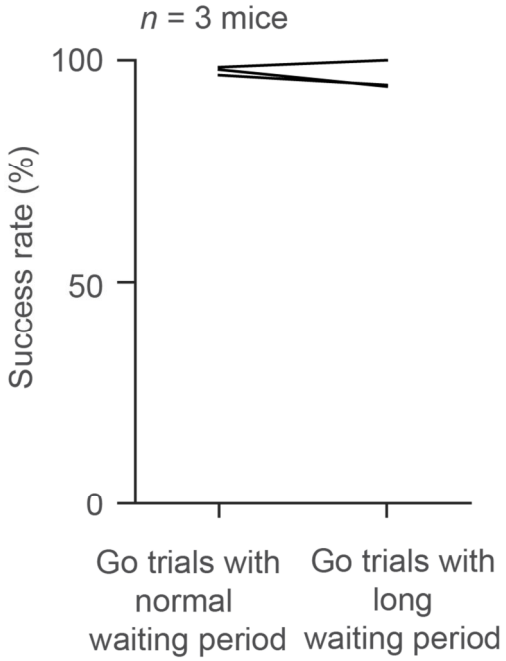


図 2.8. 3 秒条件 waiting period の課題成績

通常の waiting period と 3 秒条件の waiting period における Go 試行成功率。通常の waiting period 条件（0.8 – 2.0 秒）で十分にトレーニングを受けたマウスに、突然いつもより長い waiting period 条件（3 秒）を、5-10%の割合で Go 試行に導入した。 いずれの条件でもマウスは高い成功率で課題を遂行しており、条件間で成功率に有意な差は生じなかった。

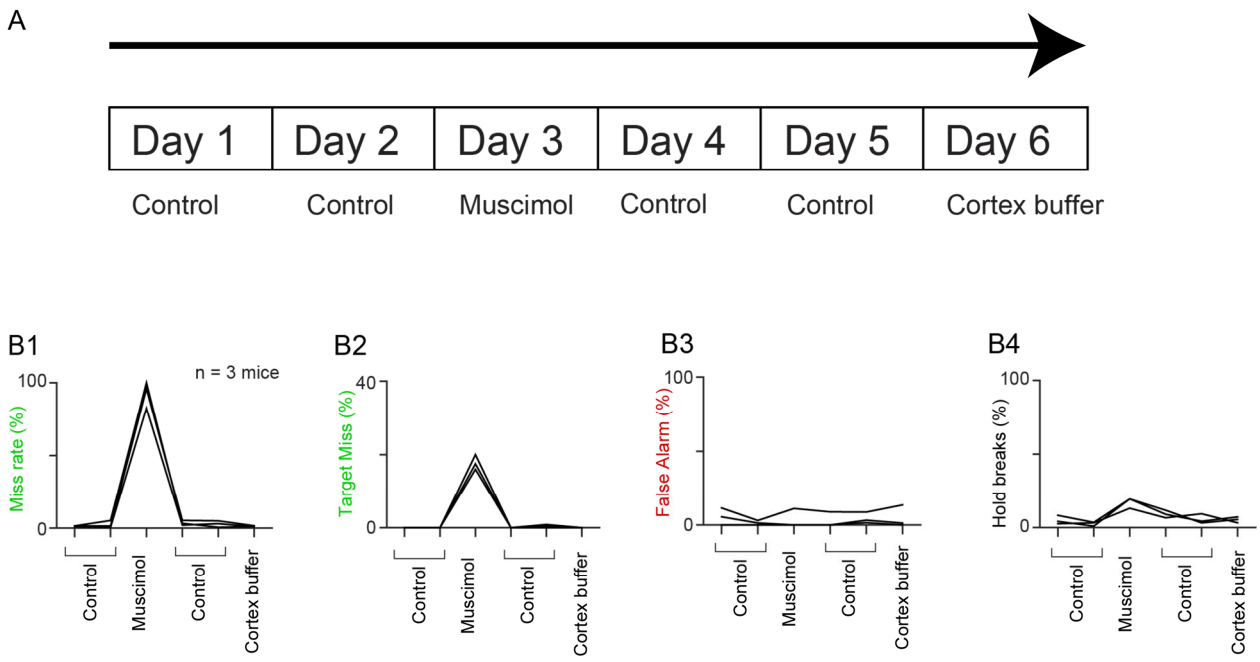


図 2.9 ムシモール注入実験

(A) ムシモール注入実験の実験スケジュール。一連の実験は、統制実験（1 日目、2 日目）、ムシモール注入実験（3 日目）、統制実験（4 日目、5 日目）、cortex buffer 注入実験（6 日目）から構成された。

(B) ムシモール注入実験における各種エラー。B1 は一連の実験における Miss 率を示す。Miss 率はムシモールの注入によって著しく上昇した。B2 は一連の実験における Target miss 率を示す。Miss 率同様、Target miss 率はムシモールの注入により上昇した。B3 は Nogo 試行における False alarm 率を示す。False alarm 率はムシモールの注入によって影響を受けなかった。B4 は一連の実験における Hold break 率を示す。Hold break 率はムシモール注入によって増加したものの、Miss 率ほど大きな影響は受けなかった。

第 3 章

2 光子カルシウムイメージング法を用いた

運動準備の神経メカニズムの検討

第 3 章要約

第 3 章では、Go/Nogo リーチング課題中に *in vivo* 2 光子カルシウムイメージングを行い、運動準備中に前肢運動野の神経細胞がどのように活動することで運動準備が形成されるのかを検討した。まず、運動準備中の活動パターンをもとに、神経細胞を 3 種類（build-up neuron, instruction-responsive neuron, other neuron）に分類した。運動準備が十分な状態でも不十分な状態でも、build-up neuron の活動は運動準備中に増加した。残りの 2 種（instruction-responsive neuron と other neuron）では、運動の準備が十分な状態ではその活動が抑制された。この活動抑制により、運動準備が十分な状態では、前肢運動野の神経細胞集団で再現性の高い活動パターンが形成された。以上のことから、運動準備が最適化されるためには、build-up neuron の活動が増加するだけではなく、insttruction-resposive neuron と other neuron の活動が適切に抑制されることが重要だと考えられる。

実験 4　Go/Nogo リーチング課題遂行中の 2 光子カルシウムイメージング

1. 序論

第 2 章では、頭部固定下のマウスを対象とした運動準備を必要とする行動課題（Go/Nogo リーチング課題）を開発し、前肢運動野が課題の遂行に必要であることを確かめた。本章では、Go/Nogo リーチング課題の遂行中に前肢運動野で 2 光子カルシウムイメージングを行い、前肢運動野の神経細胞集団の活動と運動準備の関係について検討した。また、PV-Cre マウスの PV 陽性神経細胞および SOM-Cre マウスの SOM 陽性神経細胞を、カルシウム感受性蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質（赤色蛍光タンパク質）でラベリングすることで他の神経細胞と区別し、これらの介在神経細胞[9]が運動準備の進行に特別な役割を担っているのかについても検討した。加えて、課題遂行中に前肢運動野で得られる神経データが本当に前腕運動と関係しているのかを明らかにするため、統制実験として、前腕運動に関与しない領域である後肢運動野においても 2 光子カルシウムイメージングを行った。

2. 方法

2.1. 動物

実験1に用いた16匹のマウスを前肢運動野の2光子カルシウムイメージングに用いた。後肢運動野の2光子カルシウムイメージングには、8週齢以上のオスのPV-Creマウス4匹を用いた。

2.2. ヘッドポスト設置手術

実験 1 と同様の手続きでヘッドポストをマウスに設置した。

[9] 介在神経細胞: 抑制性の神経伝達物質を放出することで、周囲の細胞の活動を調節する神経細胞。大脳皮質では PV 陽性神経細胞、SOM 陽性神経細胞が主要な介在神経細胞として挙げられる。

2.3. 観察用ウィンドウ設置手術

Go 試行の成功率、Nogo 試行の成功率、および総成功率が 80% 以上で安定した後、観察用ウィンドウ設置手術を行った。イソフルラン吸入麻酔下（1.0-1.5%）で、マウスを頭部固定装置に固定し、左脳半球の CFA、RFA あるいは後肢運動野に開頭手術行った。CFA には、ブレグマから前方 0 mm、 側方 1.5 mm を中心に、RFA には、ブレグマから前方 2.5 mm、側方 1.0 mm を中心に、後肢運動野には、ブレグマから後方 1.5 mm、側方 1.5 mm を中心に円形 1.5-2.0 mm の頭開手術を行った。実験 3 のムシモール注入と同様の手続きで、開頭部位の脳表から深さ 200-300 µm (micrometer)[10]（皮質 2/3 層）、あるいは 400-500 µm（皮質 5a 層、CFA のみ）の位置に、20-40 nl の AAV2/1-syn-GCaMP6m[11]を 3 分から 5 分かけて注入した（皮質 2/3 層および皮質 5a 層の位置関係については図 4.1A-D 参照）。ウィルスは開頭部位に複数箇所注入した。PV-Cre および SOM-Cre マウスにウィルスを注入する際は、PV 陽性神経細胞と SOM 陽性神経細胞を標識するため、AAV2/1-syn-GCaMP6m に AAV2/1-CAG-Flex-tdTomato[12]を混ぜてウィルスを注入した。ウィルス注入後、カバーガラスを開頭部位に設置した（脳観察用ウィンドウ、図 4.1E）。カバーガラスと頭骸骨の隙間は 1.5-2.0 %アガロース（A9793, Sigma Aldrich）で充填し、カバーガラスはデンタルセメントで頭骸骨に固定した。

2.4. 装置

Go/Nogo リーチング課題には、実験 1 と同様の行動実験装置を用いた。2 光子カルシウムイメージングには、レゾナントスキャニングシステム（MPM-SCAN4, Thorlabs）、チタン･サ

---

[10]µm (micrometer): マイクロメートル。10 の-6 乗メートルを示す。
[11] AAV2/1-syn-GCaMP6m: Synapsin プロモーターを起点として、GCaMP6m という緑色のカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させるアデノ随伴ウィルス。
[12] AAV2/1-CAG-Flex-tdTomato: 組み替え酵素 Cre が存在している神経細胞で、GAG プロモーターを起点として、tdTomato という赤色蛍光タンパク質を発現させるアデノ随伴ウィルス。

ファイアレーザー （波長 980 nm, MaiTai, Newport）、対物レンズ稼動型システム（MOM, Sutter）で構成された 2 光子励起レーザー顕微鏡を用いた。2 光子励起レーザー顕微鏡システムは、ScanImage software(Pologruto, Sabatini, & Svoboda, 2003)で制御した。赤および緑の蛍光は対物レンズ （N16XLWD-PF, 16x, 0.80 NA, Nikon）を利用して集め、565 nm のダイクロイックミラー（565dcxr, Chroma）とバリアフィルター（緑: ET525/70m-2p, 赤: ET605/70m-2p, Chroma）によって両者を分けた後、光電子倍増管（Hamamatsu Photonics, H10770PA-40）でその強度を計測した。イメージングフレームは 512 x 512 ピクセルで構成され、約 30 Hz のフレームレートで画像を撮像した。

2.5. *in vivo* 2 光子カルシウムイメージング

観察用ウィンドウ設置手術から数日後に行動実験を再開した。ウィルス注入の 1-2 週間後、カルシウム感受性蛍光タンパク質の GCaMP が十分に神経細胞に発現したところで 2 光子カルシウムイメージングを開始した。カルシウムイメージングの際、Go/Nogo リーチング課題を行っているマウスの観察用ウィンドウ真上に対物レンズを移動させ、GCaMP のシグナルをモニタした。対物レンズと観察用ウィンドウの隙間は、純水で充填した（図 4.1F）。

2.6. 免疫染色

AAV2/1-CAG-Flex-tdTomato は、組み換え酵素 Cre が発現している神経細胞で赤色蛍光タンパクである tdtomato を発現させる。そのため、このウィルスを PV-Cre マウスと SOM-Cre マウスの大脳皮質に注入すると、理論的には PV 陽性神経細胞あるいは SOM 陽性神経細胞のみに tdtomato が発現する。このことを確認するため、PV 陽性神経細胞および SOM 陽性神経細胞に対して免疫染色を行った。ケタミン（0.3 mg/g）およびキシラジン（0.024mg/g ）の混合麻酔溶液を腹腔に投与することでマウスを深い麻酔状態にした後、左心室から 4% パラホルムアル

デヒドを流し、還流固定を行った。抜脳後、脳を 4%パラホルムアルデヒド溶液に 4°C で一晩浸して後固定した。後固定の後、30% スクロース溶液に脳を浸して 4°C で保存した。厚さ 20 μm の冠状断の脳切片を作製し、PBS（phosphate buffer saline）で洗浄した後、切片をブロッキング溶液（5% bovine serum albumin/0.3% Triton X-100/PBS）に移した。1 時間後、切片を 1 次抗体溶液に移し、4°C で 1 晩インキュベートした。1 次抗体には Rabbit anti-PV antibody （1:500, Immunostar, 24428） および rabbit anti-SOM antibody （1:250, Peninsula Laboratories, T-4103） を使用した。切片を PBS で洗浄した後、次は切片を 2 次抗体溶液に移して常温で 1 時間インキュベートした。2 次抗体には donkey anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 647 （1:500, Thermo Fisher Scientific）を使用した。

2.7. データ解析

特に明記しない限り、本実験ではデータの値を平均± s.e.m で示した。下記に各解析手続きを述べる。

2.7.1. 解析前処理

画像処理ソフト Image J のプラグインである TurboReg を利用して、マウスの体の動きに伴う各フレームの揺れを補正した(Thevenaz, Ruttimann, & Unser, 1998)。次に、各神経細胞の活動の変化を算出するため、matlab で記載したプログラムで、GCaMP を発現している神経細胞を対象として ROI（Region of Interest）を手動で描いた。1 イメージングセッションあたりの ROI（神経細胞）の数は、80.0 ± 41.6 (s.d.) 個であった。神経細胞のカルシウムシグナルは 、各 ROI 内のピクセル強度を平均することで算出した。ある 1 試行における神経細胞のカルシウムシグナルの変化（F）は、前後 15 試行内の全てのフレームの 30 パーセンタイル値をベースライン（F_0）とし、信号変化率（ $(F- F_0) /F_0$）として算出した。また、先行する 3 フレームのカルシウ

ムシグナル信号変化率を平均することで、各フレームにおける神経細胞のカルシウムシグナル信号変化率を平滑化した。

各神経細胞が 2 光子励起レーザー顕微鏡によっていつ撮像されたか、その正確なタイミングを算出した。撮像のタイミングは、神経細胞が 512 x 512 ピクセルの画像のどこに位置するかに依存している。そのため、画像内で神経細胞がどこにあるのか（上から n 番目のラインにあるのか）を求め、（33 × n/512）ms をフレーム取得開始時刻に加えることで撮像の正確なタイミングを算出した。 ここで算出された撮像のタイミングを利用して、Go/Nogo リーチング課題の各種イベント時に（instruction cue の呈示や execution cue の呈示など）、各神経細胞がどのように活動しているのかを解析した。

2.7.2. Waiting period 中の活動パターンによる神経細胞の分類

運動準備の形成がどのような細胞の活動パターンと関係しているのか調べるため、2 光子カルシウムイメージングで得られた神経細胞は、waiting period 中の活動パターンによって instruction-responsive neuron、build-up neuron あるいは other neuron に分類した（ウィルコクソン符号順位検定）。Instruction cue 呈示後 200 ms のカルシウムシグナル変化率（前後±2 フレームの平均）が、instruction cue 呈示時点のカルシウムシグナル変化率（instruction cue 呈示の前後±2 フレームの平均）よりも増加していた場合、その細胞を instruction-responsive neuron と定義した（図 4.2A 右図、4.2B-D 上図）。Execution cue 呈示時点のカルシウムシグナル変化率（Execution cue 呈示の前後±2 フレームの平均）が、instruction cue 呈示後 700 ms 時点のカルシウムシグナル変化率（前後±2 フレームの平均）よりも増加していた場合、その細胞を build-up neuron と定義した（図 4.2A 右図、4.2B-D 下図）。Instruction-responsive neuron と build-up neuron のいずれにもあてはまる活動パターンを示した神経細胞は、build-up neuron と定義した。特徴的な活動パ

ターンを示さなかったその他の神経細胞は、other neuron と定義した。検定の有意水準は 0.05 に設定した。

神経細胞を上記の基準で分類した後、ピアソンカイ 2 乗検定で 3 つの領域（CFA 皮質 2/3 層、RFA および CFA 皮質 5a 層）における各タイプの神経細胞の存在比率を比較した。検定の有意水準は 0.05 に設定した。

2.7.3. 反応時間によるグループ化

先行研究から、反応時間が運動の準備状態を反映することが示唆されている（反応時間が短いときほど運動準備が十分なされている）(Churchland et al., 2006; Riehle & Requin, 1989)。そこで、Go success 試行を反応時間で 3 つのグループ（反応時間が短い試行、反応時間が長い試行、その中間の試行、それぞれ全 Go success 試行の 33.3%ずつ）に分類し、反応の時間のばらつきのもとになる神経活動パターンを検討した(T. Sato, Murthy, Thompson, & Schall, 2001; T. R. Sato & Schall, 2003)（図 4.3A）。反応時間のばらつきと神経活動パターンの関係に着目するため、反応時間の差が大きい、反応時間が短い試行と反応時間が長い試行における神経活動を以後の解析対象とした。まず、イメージングセッションごとに、反応時間が短い試行と反応時間が長い試行における各神経細胞のカルシウムシグナル変化率の平均値を算出した。次に、各神経細胞ごとに、反応時間が短い試行と長い試行のカルシウムシグナル変化率の平均値の差（normalized difference）を以下の式で算出した。

Normalized difference

$$= (\textit{反応時間が長い試行のカルシウムシグナル変化率の平均値} - \textit{反応時間が短い試行のカルシウムシグナル変化率の平均値})$$

/Go 全試行のカルシウムシグナル変化率の平均値

反応時間が長い試行のカルシウムシグナル変化率が正に大きい場合（反応時間が長い試行で神経細胞の活動が強い場合）、normalized difference は大きい値（正の値）となる。一方、反応時間が短い試行のカルシウムシグナル変化率が正に大きい場合（反応時間が短い試行で神経細胞の活動が強い場合）、normalized difference は小さい値（負の値）となる。Execution cue 呈示時点における build-up neuron、instruction-responsive neuron、other neuron の normalized difference を算出した後、同じデータの繰り返し抽出を許す復元抽出を 10000 回行うことで、各タイプの神経細胞の平均値の分布および各タイプの神経細胞間の平均値の差の分布を作り出した。この抽出過程について build-up neuron を例にとって説明する。Build-up neuron の normalized difference データが 100 個（100 個の細胞の normalized difference データ）あると仮定したとき、この 100 個のデータから 1 つのデータを取り出す。次に、先ほど取り出したデータが再度取り出されることを許した上で、新たなデータをまた 1 つ取り出す。このデータ抽出を 10000 回繰り返すことで、各タイプの神経細胞の normalized difference の平均値を算出した。また、同様の抽出過程によって、各タイプの細胞間で normalized diffenrence の差を計算し、細胞間の差の分布の平均値を算出した。最終的に、これらの平均値の分布および差の分布が統計的に 0 より大きい（あるいは小さい）かどうかをブートストラップ法で検討した。

2.7.4. 試行間での神経活動パターンの相関関係

運動準備の状態によって、神経細胞集団の活動が類似したパターンになるのかを調べるため、異なる試行間での神経活動パターンの類似性を相関係数で定量化した（図 4.6.B-E）。まず各神経細胞のカルシウムシグナル変化率を試行毎に z 得点で標準化した。次に同一イメージングセッションの任意の 2 試行間で、各神経細胞の活動（z 得点化されたカルシウムシグナル信号変化率）の相関係数を求めた(Kiani, Esteky, Mirpour, & Tanaka, 2007)。神経活動の相関係数

は、instruction cue 呈示前後（呈示 0.1 秒前から呈示 0.8 秒後まで、計 28 フレーム）および execution cue 呈示前後（呈示 0.1 秒前から呈示 0.8 秒後まで、計 28 フレーム）で算出した（Instruction cue および execution cue 呈示前後で、ともに 28 フレーム x 28 フレームの相関係数マトリックスを算出。図 4.6B および C 参照）。反応時間が短い試行のペアあるいは反応時間が長い試行のペアから算出された相関係数マトリックスは、それぞれの反応時間のグループ毎に平均した。同一イメージングセッション内で反応時間のグループ毎に平均した相関係数マトリックスを、さらに全てのイメージングセッションを通じて反応時間のグループ毎に平均した（図 4.6B および C 参照）。また、ウィルコクソン符号順位検定を用いて、各イメージングセッションで得られた instruction cue および execution cue 呈示時点の相関係数を、反応時間が短い試行と反応時間が長い試行とで比較した（図 4.6D および E）。検定の有意水準は 0.05 に設定した。

2.7.5. 試行入れ替え後の神経活動パターンの相関関係

反応時間が短い試行と長い試行の間で任意のタイプの神経細胞のデータを入れ替え、各タイプの神経細胞の活動が、試行間における神経活動パターンの類似性にどのように寄与しているのかを検討した。あるタイプの細胞の活動が試行間における神経活動パターンの類似性に寄与しているのであれば、そのタイプの細胞のデータを入れ替えることで、活動パターンの類似性（相関係数）が低下すると予測される。以下、build-up neuron を例にとって説明する（図 4.6F 参照）。同一イメージングセッション内で、反応時間が長い試行の build-up neuron のデータをランダムに抽出し、反応時間が短い試行の build-up neuron のデータと入れ替えた後、前節と同様の方法で、反応時間が短い試行間における神経活動パターンの相関係数を算出した。また、反応時間が長い試行間の相関係数マトリックスを算出するときは、反応時間が短い試行の build-up neuron のデータをランダムに抽出し、反応時間が長い試行の build-up neuron のデータと入れ替えて、反応時間が長い試行間における神経活動パターンの相関係数を算出した。その他

のタイプの神経細胞に関しても、同様の手続きで入れ替えを行い、相関係数マトリックスを算出した。

以上の手続きの後、ウィルコクソン符号順位検定を用いて、execution cue 呈示時点の相関係数を反応時間が短い試行と反応時間が長い試行とで比較した（図 4.6G）。検定の有意水準は 0.05 に設定した。

3. 結果

本実験では、*in vivo* 2 光子カルシウムイメージングによって、前肢運動野（CFA と RFA）における神経活動と運動準備の関係を検討した。カルシウム感受性蛍光タンパク質である GCaMP6m は、AAV ベクター（AAV2/1-syn-GCaMP6m）を通じて、前肢運動野の多数の神経細胞に発現した （図 4.2A 左図）。イメージングサイトの多くは CFA および RFA の皮質 2/3 層であった。CFA では 11 匹のマウスから 48 イメージングサイトで、RFA では 3 匹のマウスから 14 イメージングサイトで 2 光子カルシウムイメージングを行った。また、皮質 5a 層からのイメージングは CFA で行い、5 匹のマウスから 19 イメージングサイトで皮質 5a 層のカルシウムイメージングを行った。 CFA と RFA において、各神経細胞は waiting period 中に様々な活動パターンを示した （図 4.2A 右図）。これらの神経細胞を、その活動パターンに応じて 3 つのグループに分類した。Instruction cue の呈示によって活動が増加する神経細胞は “instruction-responsive neuron” に分類した（図 4.2B-D 上図）。Execution cue の呈示に向けて、waiting period 中に活動が増加する細胞は “build-up neuron”に分類した（図 4.2B-D 下図）。一貫した活動パターンを示さない、その他の神経細胞は “other neuron”に分類した。各タイプの神経細胞の存在比率を領域間で比較すると、RFA では CFA 皮質 2/3 層および CFA 皮質 5a 層よりも多くの instruction-responsive neurons が見られた（CFA 皮質 2/3 層:17.0%, RFA:29.7%, CFA 皮質 5a 層:18.3% ; $p < 0.001$, CFA 皮質 2/3 層 vs. RFA; $p < 0.001$, CFA 皮質 5a 層 vs. RFA、カイ 2 乗検定、図 4.2E）。

Build-up neuron の比率には、CFA と RFA で有意な差は認められなかった（CFA 皮質 2/3 層: 13.7%、RFA: 16.1%、CFA 皮質 5a 層: 17.3%; $p > 0.05$, CFA 皮質 2/3 層 vs. RFA; $p > 0.05$, CFA 皮質 5a 層 vs. RFA, カイ 2 乗検定, 図 4.2E）。後肢運動野においても、前肢運動野と同様のタイプの神経細胞が確認された（Instruction-responsive neuron: 13.1%, build-up neuron: 3.7%）。しかし、後肢運動野の instruction-responsive neuron、build-up neuron の存在比率は。前肢運動野のいずれの領域と比較しても有意に低かった（Instruction-responsive neuron: $p < 0.01$, Build-up neuron: $p < 0.001$、カイ 2 乗検定）。

3.1. Build-up neuron および instruction-responsive neuron の活動パターン

Waiting period 中の神経活動の増加は運動準備の状態を反映していると考えられているが (Dorris, Pare, & Munoz, 1997; Riehle & Requin, 1989; Wise, 1985)、本実験ではそのような神経活動の増加が build-up neuron で観察された。そこで、本実験でも build-up neuron の活動が運動準備の進行に重要であると仮定し、build-up neuron の活動を中心として、神経細胞集団の活動がどのように運動準備と関係するのかを分析した。本実験では、2 つの仮説を立てて、build-up neuron の活動が前肢運動野内でどのように強調されることで運動準備に寄与するのか検討した。1 つ目の仮説として、build-up neuron の活動の増加が、直接運動準備の状態を反映するという仮説を立てた(Dorris et al., 1997; Hanes & Schall, 1996)。この仮説では、build-up neuron の活動が増加すればするほど、神経回路内における build-up neuron の活動のシグナルノイズ比が上がり、運動準備が進行すると仮定した。この仮説が正しければ、反応時間が短い試行と長い試行で build-up neuron の活動を比較すると、反応時間が短い試行で build-up neuron の活動がより強くなっていると推測される。2 つ目の仮説として、build-up neuron 以外の細胞の活動が変化することで、build-up neuron の活動が前肢運動野内で強調されるという仮説を立てた。この仮説では、build-up neuron の活動は運動準備の進行によって変化しないが、運動準備によってその他の細

胞（例えば instruction responsive neurons および other neurons）の活動が抑制されることで、神経回路内における build-up neuron の活動のシグナルノイズ比が上昇し、運動準備が進行すると仮定した。この仮説が正しければ、build-up neuron の活動は反応時間によって大きく変化しないが、instruction-responsive neuron や other neuron の活動は、反応時間が短い試行で抑制されると推測される。

この 2 つの可能性を検討するため、反応時間が長い試行（運動準備が不十分な試行）と反応時間が短い試行（運動準備が十分になされている試行）の神経活動の差（normalized difference）を算出し、build-up neuron、instruction-responsive neuron および other neuron の活動を分析した。Execution cue の呈示時点において、build-up neuron の活動レベルは、反応時間が短い試行で僅かに減少していた（CFA 皮質 2/3 層, 5.2 ± 1.6%, $p < 0.001$; RFA, 1.0 ± 2.7%, $p > 0.3$, ブートストラップ検定、図 4.3B および E-F）。一方、instruction-responsive neuron および other neuron では、build-up neuron と比較して、反応時間が短い試行でその活動は強く抑制された（CFA 皮質 2/3 層: instruction-responsive neuron, 51.2 ± 4.1%, $p < 0.001$, other neuron, 20.0 ± 1.4%, $p < 0.001$; RFA: instruction-responsive neuron, 18.2 ± 3.4%, $p < 0.002$, other neuron, 11.4 ± 2.3%, $p < 0.02$, ブートストラップ検定, 図 4.3C-F）。また、神経細胞の選択的な活動抑制は、皮質 2/3 層でのみ観察され、CFA 皮質 5a 層では観察されなかった（CFA 皮質 5a 層: build up neuron, 3.8 ± 2.5%, instruction-responsive neuron, 3.6 ± 3.0%, other neuron, 2.4 ± 1.7%; $p > 0.3$, ブートストラップ検定）。後肢運動野でも同様の分析を行ったところ、前肢運動野で見られた反応時間が短い試行における instruction responsive neurons および other neuron の活動抑制は、後肢運動野では観察されなかった（instruction responsive neuron, -2.2 ± 3.4 %, $p > 0.2$, other neuron, 3.9 ± 2.6 %, $p > 0.05$, ブートストラップ検定, 図 4.4）。

以上の実験結果は、前肢運動野皮質 2/3 層において、build-up neuron の活動のシグナルノイズ比は、他の神経細胞の活動が抑制されることで上昇するという仮説を支持している。

3.2. 介在神経細胞の活動

PV-Cre マウスおよび SOM-Cre マウスには、カルシウム感受性緑色蛍光タンパク質を発現させるアデノ随伴ウィルス（AAV2/1-syn-GCaMP6m）に加えて、組み替え酵素 Cre が存在している神経細胞に赤色蛍光タンパク質である tdtomato を発現させる AAV2/1-CAG-Flex-tdTomato を投与した。AAV ベクター投与の結果、PV 陽性神経細胞および SOM 陽性神経細胞には選択的に tdtomato が発現した（図 4.5A）。

tdtomato でラベルされた PV 陽性神経細胞（n = 81、4 匹のマウスから記録）および SOM 陽性神経細胞（n = 59、3 匹のマウスから記録）に関しても、反応時間が長い試行（運動準備が不十分な試行）と反応時間が短い試行（運動準備が十分になされている試行）の神経活動の差（normalized difference）を算出し、これらの神経細胞の活動が運動準備の状態によってどのように変化しているのかを分析した。その結果、これらの介在神経細胞の活動も、反応時間が短い試行で抑制されているという結果が得られた（PV 陽性神経細胞, $11.6 \pm 8.3\%$, $p < 0.05$; SOM 陽性細胞, $20.3 \pm 7.0\%$, $p < 0.05$、ブートストラップ検定、図 4.5B）。また、CFA 皮質 2/3 層の全ての神経細胞から算出された normalized difference と PV 陽性神経細胞あるいは SOM 陽性神経細胞の normalized difference を比較したところ、いずれの組み合わせにも有意な差は認められなかった（PV 陽性神経細胞, $p > 0.1$; SOM 陽性神経細胞, $p > 0.2$、ウィルコクソン順位検定）。

3.3. 運動準備と神経細胞集団の活動パターンの関係

異なる試行間における集団レベルでの神経細胞の活動パターンの類似性を相関係数で定量化し(Peters et al., 2014) 、運動準備の状態（反応時間の長短）によって、活動パターンの類似性がどのように変化するのか検討した（図 4.6B-E）。神経細胞集団の活動の相関係数は、反応時間にかかわらず、execution cue の呈示が近づくにつれて増加した （図 4.6B および C）。この

結果は、waiting period が終わりに近づくにつれて、神経細胞集団が類似性の高い活動パターンを示すことを意味している。Execution cue の呈示時点では、CFA および RFA の皮質 2/3 層の神経細胞集団の活動の相関係数は、反応時間が長い試行よりも、反応時間が短い試行でより高い値を示した （CFA 皮質 2/3 層: 反応時間が短い試行, $r = 0.069 \pm 0.004$, 反応時間が長い試行, $r = 0.047 \pm 0.003$, $n = 48$, $p < 0.001$, RFA: 反応時間が短い試行, $r = 0.097 \pm 0.016$, 反応時間が長い試行 $r = 0.064 \pm 0.014$, $n = 14$, $p < 0.001$, ウィルコクソン符号順位検定**,** 図 4.6D および図 4.6E）。この結果は、反応時間が短い試行の方が、神経細胞集団によって再現性の高い活動パターンが形成されることを示している。一方、皮質 5a 層では、execution cue 呈示時点の神経細胞集団の活動パターンの相関係数に反応時間による差はなく（CFA 皮質 5a 層: 反応時間が短い試行, $r = 0.025 \pm 0.008$, 反応時間が長い試行, $r = 0.020 \pm 0.007$, $p > 0.08$, ウィルコクソン符号順位検定）、反応時間が短い試行でも長い試行でも、皮質 5a 層の相関係数は皮質 2/3 層と比較して有意に低いことが示された（CFA 皮質 5a 層 vs CFA 皮質 2/3 層および RFA, $p < 0.001$, ウィルコクソン順位検定）。つまり、皮質 5a 層の神経細胞集団の活動パターンは、反応時間にかかわらず、皮質 2/3 層よりもばらつきが大きいといえる。以上のことから、前肢運動野（CFA および RFA）皮質 2/3 層の神経細胞集団の活動パターンは、運動準備が十分なされているときに（反応時間が短いと）、再現性の高い活動パターンが形成されているといえる。

3.4. 課題関連細胞の活動と神経細胞集団の活動パターンの関係

次に、どのタイプの神経細胞の活動が、前肢運動野皮質 2/3 層における再現性の高い活動パターンの形成に寄与するのかを検討した。具体的には、特定タイプの神経細胞の活動を反応時間が短い試行と長い試行とで入れ替えた後、神経細胞集団の活動パターンの相関係数を再度算出することでこの問題を検討した（図 4.6F 参照）。 もし、あるタイプの神経細胞の活動が集団レベルでの活動パターンの再現性に寄与しているのならば、そのタイプの神経細胞の活動

を反応時間が短い試行と長い試行で入れ替えることによって、神経細胞集団の活動の相関係数は減少すると仮定される。Build-up neuron の活動を反応時間が短い試行と長い試行で入れ替えた場合、反応時間が短い試行の相関係数は依然高いままだった（CFA 皮質 2/3 層: 反応時間が短い試行, $r = 0.066 \pm 0.004$, 反応時間が長い試行, $r = 0.050 \pm 0.003$, $n = 44$, $p < 0.001$, 図 4.6G 上図; RFA: 反応時間が短い試行, $r = 0.089 \pm 0.016$, 反応時間が長い試行, $r = 0.070 \pm 0.014$, $n = 14$, $p < 0.001$, ウィルコクソン符号順位検定）。つまり、build-up neuron の活動だけでは、反応時間が短い試行間における神経細胞集団の活動パターンの再現性を説明できない。次に、instruction-responsive neuron の活動を反応時間が短い試行と長い試行とで入れ替えた。その結果、反応時間が短い試行で見られていた相関係数の高さは見られなくなった（CFA 皮質 2/3 層: 反応時間が短い試行, $r = 0.061 \pm 0.004$, 反応時間が長い試行, $r = 0.057 \pm 0.004$, $n = 47$, $p > 0.20$, 図 4.6G 下図; RFA: 反応時間が短い試行 0.085 ± 0.015, 反応時間が長い試行, $r = 0.076 \pm 0.016$, $n = 13$, $p > 0.15$, ウィルコクソン符号順位検定）。また、instruction-responsive neuron と同様の結果が、other neuron を入れ替えた場合にも確認された。これらの結果は、反応時間が短い試行間で見られた神経細胞集団の活動パターンの再現性は、build-up neuron の活動ではなく、instruction-responsive neuron および other neuron の活動が選択的に抑制されることで形成されることを示唆している。

4. 考察

本実験では、前肢運動野の神経細胞集団がどのように活動することで運動準備が形成されるのかを、2 光子カルシウムイメージングを用いて検討した。先行研究から、運動の種類を指示する合図が呈示されてから運動を開始する合図が呈示されるまでの期間（先行期間あるいは遅延期間）に、運動準備が進行することが報告されている。そこで、本実験ではこの期間の神経細胞の活動に着目して解析を行った。

先行研究で報告されているように、運動の種類を指示する刺激が呈示されてから運動を実行するまでの間に、神経細胞は様々なパターンで活動した（図 4.3B-D）(Crammond & Kalaska, 2000; Kurata & Wise, 1988; Wise et al., 1983)。本実験では、運動の種類を指示する刺激（instruction cue）の呈示に対して一過性に活動が増加する細胞（instruction-responsive neuron）、運動開始の刺激（execution cue）に向けて活動が増加する細胞（build-up neuron）、特定のパターンにあてはまらない活動パターンを示す細胞（other neuron）が見られた。その中でも、本実験では build-up neuron の活動を主軸として、神経細胞集団の活動と運動準備の関係について分析を行った。これは、遅延期間中における神経細胞の活動増加が運動準備の状態を反映していると考えられるためである(Dorris, Pare, & Munoz, 1997; Riehle & Requin, 1989; Wise, 1985)。そこで、前肢運動野の神経細胞集団内で、build-up neuron の活動がどのように強調されるのかという観点でデータを解析した（結果 3.1.参照）。Execution cue が呈示される時点での各細胞の活動を分析すると、反応時間が短い（運動準備が十分な状態）ときも反応時間が長いとき（運動準備が不十分な状態）も、build-up neuron の活動の強さは大きくは変わらなかった。一方、build-up neuron 以外の神経細胞では、反応時間が短い（運動準備が十分な状態）ときは、反応時間が長いとき（運動準備が不十分な状態）に比べて、神経細胞の活動が減少しているという結果が得られた。この結果は、前腕運動の運動準備状態が形成されるには、build-up neuron の活動が増加することが重要であるものの、それに加えて、build-up neuron 以外の神経細胞の活動が選択的に抑制されることが必要であることを示唆している。また、反応時間のグループごとに、異なる試行間における神経細胞集団の活動パターンの類似性を相関係数で定量化したところ、運動準備が十分なされている状態（反応時間が短い試行）では、再現性の高い活動パターンが神経細胞集団によって形成されることが明らかとなった（図 4.6B および C）。この結果は、反応時間が短い試行（運動準備が十分な状態）では、試行間における神経細胞集団の活動の分散が減少することを示している。この再現性の高い活動パターンがどのタイプの神経細胞

によって形成されているかを調べたところ、このパターン形成に関しても、build-up neuron 以外の神経細胞の活動が選択的に抑制されることが重要であることが示された。この相関係数解析の結果は、build-up neuron 以外の神経細胞の活動が選択的に抑制されることで、運動準備が進行したときに再現性の高い活動パターンが形成されることを示唆している。

本実験の結果は、ある動作を準備してその動作を効果的に実行するときには、特定の神経細胞の活動が増加する必要があるものの、その他の神経細胞の活動は適切に抑制された方が好ましいことを示唆している。本実験と類似した結果は、マウスの運動学習過程を前肢運動野で観察した実験でも報告されている。Peters らは、2 光子カルシウムイメージング法を用いて、マウスが前肢でレバーを押す動作を学習する過程を 2 週間にわたって経時観察した(Peters et al., 2014)。学習初期ではマウスのレバー押し動作の運動パターンはばらついており、また、多くの神経細胞が活動していた。しかし学習が進行するにつれて、レバー押し動作の活動パターンの再現性が増加すると、少数の神経細胞がレバー押しに関連して活動するようになった。この実験結果は、運動学習が進むことで学習している動作が最適化されると、少数の神経細胞の活動で学習された動作が実行されることを示している。本実験では、運動準備が十分なされた状態（反応時間が短い試行）では、Peters らの実験の運動学習が進んだ状態のように、少数の神経細胞が活動した。その一方で、運動準備が不十分な状態（反応時間が長い試行）では、Peters らの実験の運動学習が初期の状態のように、多くの神経細胞が活動した。Peters らの実験結果を参考に本実験の結果を解釈すると、学習された動作を正確にかつ効果的に実行するときには、少数の神経細胞が活動することが重要なのかもしれない。また、少数の神経細胞の活動によって学習された動作を効果的に実行するのであれば、不必要に多くの神経細胞が活動するとその活動自体がノイズになり、最終的には末梢の筋肉の動きに影響して、正確な運動の実行が妨げられるのかもしれない。

4.1. 介在神経細胞の活動について

PV-Cre マウスおよび SOM-Cre マウスに関しては、カルシウム感受性緑色蛍光タンパク質を発現させるアデノ随伴ウィルス（AAV2/1-syn-GCaMP6m）に加えて、組み替え酵素 Cre が存在している神経細胞に赤色蛍光タンパク質である tdtomato を発現させる AAV2/1-CAG-Flex-tdTomato を投与することで、Cre 特異的に介在神経細胞（PV 陽性神経細胞あるいは SOM 陽性神経細胞）を tdtomato でラベルし、これらの介在神経細胞が運動準備の進行・形成にどのように関与しているのかを検討した。分析の結果、PV および SOM 陽性神経細胞のいずれも、反応時間が短い試行（運動準備が十分）ではその活動が抑制されていることが示された。

PV 陽性神経細胞や SOM 陽性神経細胞は、抑制性の神経伝達物質を放出することで、周囲の神経細胞の活動を抑制し、大脳皮質の局所神経回路の機能を調節している(Isaacson & Scanziani, 2011)。Instruction-responsive neuron や other neuron の活動は反応時間が短い試行で抑制されていたため、介在神経細胞がこの活動抑制に関与している可能性が予想された。もし PV あるいは SOM 陽性介在神経細胞が instruction-responsive neuron や other neuron の活動抑制に関与しているならば、介在神経細胞の活動は反応時間が短い試行で増加し、周囲の細胞の活動を抑制していると仮定される。しかしながら本実験では、instruction-responsive neuron や other neuron と同様に、介在神経細胞の活動も反応時間が短い試行で減少する（抑制されている）という結果が得られた。また、どちらの介在神経細胞の normalized difference も、CFA 皮質 2/3 層の神経細胞の normalized difference と同等の値を示したことから、反応時間が短い試行では、介在神経細胞と CFA 皮質 2/3 層の細胞は同様のレベルで活動が抑制されていたといえる。以上のことから、本実験の instruction-responsive neuron および other neuron で見られた活動抑制は、前肢運動野内の介在神経細胞の活動によるものではないと推察される。

4.2. 後肢運動野の神経細胞の活動について

実験 4 では前肢運動野に加えて、統制実験として後肢運動野でも 2 光子カルシウムイメージングを行った。これは、前肢運動野で観察された神経活動が前肢運動野に限局された現象なのか、あるいはその他の脳領域でも観察される現象なのかを確かめるためである。もし、選択的な神経細胞の活動抑制が前肢運動野に限局していれば、この現象は前腕運動の運動準備の進行を反映している可能性が高い。一方、選択的な神経細胞の活動抑制が前肢運動野に限定されていなければ、この現象は前腕の運動準備とは必ずしも関係せず、課題遂行中に大脳皮質全体で生じている何らかの情報処理過程を反映するのかもしれない。

以上の仮説を検討するため、Go/Nogo リーチング課題遂行中に後肢運動野でも 2 光子カルシウムイメージングを行い、前肢運動野で観察された選択的な神経細胞の活動抑制が、前肢運動野に限局するのかどうかを調べた。後肢運動野で 2 光子カルシウムイメージングを行ったところ、前肢運動野と同様のタイプの神経細胞が見つかったが、後肢運動野では instruction-responsive neuron、build-up neuron の存在比率は前肢運動野よりも少なかった。また、後肢運動野では、反応時間が短い試行で instruction-responsive neuron や other neuron の活動抑制は見られなかった。以上の結果から、Go/Nogo リーチング課題（Go 試行）遂行中の後肢運動野の活動は前肢運動野の活動と質的に異なっており、前肢運動野で観察された選択的な神経細胞の活動抑制は、前肢運動野に限局していると考えられる。そのため、前肢運動野の 2 光子カルシウムイメージングで得られた結果は、前腕運動の運動準備過程を反映している可能性が高いと推察される。

4.3. 皮質 2/3 層と 5a 層の活動の違いについて

CFA および RFA の皮質 2/3 層では、運動準備が十分なされている場合に instruction-responsive neuron と other neuron の活動が抑制されたが、CFA 皮質 5a 層ではこのような活動抑制は観察されなかった。また、選択的な神経細胞の活動抑制が生じないためか、皮質 5a 層では

反応時間が短い試行と長い試行で、神経細胞集団の活動パターンの類似性に差は認められなかった。このような層間の活動差は、両者が異なる脳内投射経路を持ち(Oswald, Tantirigama, Sonntag, Hughes, & Empson, 2013)、運動の準備と実行に異なる役割を果たしているからかもしれない。運動野皮質 2/3 層は皮質間の投射関係を持つとともに視床からの入力を受けており、統合された情報を皮質 5b 層に出力することで運動の準備と実行に寄与していると考えられる(Hooks et al., 2013)。一方、皮質 5a 層は大脳基底核を構成する脳部位の 1 つである線条体へと投射し(Kiritani, Wickersham, Seung, & Shepherd, 2012)、皮質-大脳基底核ループを通じて運動の準備と実行に寄与していると考えられる。線条体は 2 つの経路（直接路および間接路）でさらに別の皮質下領域に投射しているが、それらの投射経路は視床で統合され、最終的に視床が大脳皮質に再度投射することで皮質-大脳基底核ループを形成している(Nambu, 2011)。線条体を始点とする直接路および間接路は、それぞれが協調して活動することで不必要な運動を抑制するとともに、必要な運動を生起させることが示唆されている(Friend & Kravitz, 2014; Jin, Tecuapetla, & Costa, 2014)。このように、皮質 2/3 層と 5a 層は脳内において異なる解剖学的特徴を有しているため、両者は学習された運動の準備や実行に関しても、それぞれ異なる役割を担っている可能性が高い。例えば、運動学習の過程では、皮質 2/3 層と 5a 層は異なる様式でその活動が変化するが、皮質 5a 層では、運動学習が進行するにつれて、学習の進行を反映するような神経細胞の活動が増加することが報告されている(Masamizu et al., 2014)。本実験では、課題学習過程における神経細胞の活動を経時観察しなかったため、本実験で見られた層間の活動差が最初から存在していたものなのか、あるいは運動学習によって獲得されたものなのかを推察することはできない。しかしながら、層間によって運動準備中の神経細胞の活動が異なるという本実験の結果は、両者が異なるメカニズムで運動準備の形成に寄与していることを示している。今後の実験ではオプトジェネティクスを利用した層特異的な活動調節などを通じて、各層の活動がどのように運動準備に寄与しているのかを明らかにしていく必要があるだろう

第 3 章まとめ

本章では、*in vivo* 2 光子カルシウムイメージングによって、前肢運動野における選択的な神経細胞の活動抑制が、前腕運動の準備およびそれに付随する再現性の高い神経細胞集団の活動パターンの形成に重要であることが示された。統制実験として行った後肢運動野の 2 光子カルシウムイメージングの結果から、前肢運動野で観察された選択的な神経細胞の活動抑制は、後肢運動野で観察されないことが明らかとなった。そのため、選択的な神経細胞の活動抑制は、大脳皮質全体の活動変化を反映しているわけではなく、前肢運動野に限局している可能性が高いと考えられる。このことは、前肢運動野で観察された神経活動が、前腕運動の準備状態を反映している可能性が高いことを示唆している。

本実験の結果をまとめると、運動準備が最適化されるためには、あるタイプの神経細胞（build-up neuron）の活動が増加するだけではなく、他のタイプの神経細胞（instruction-responsive neuron および other neuron）の活動が適切に抑制されることが重要であり、この選択的な活動抑制によって、効果的に準備した運動を実行できるのだと考察される（図 4.6H）。

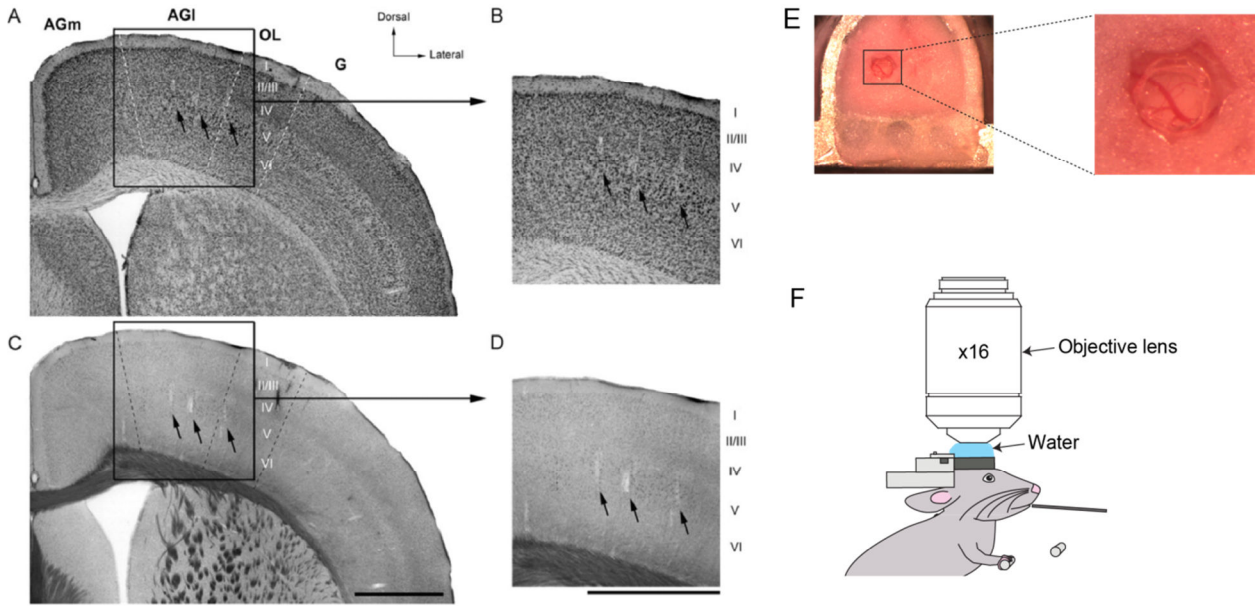


図 4.1　大脳の断面図（冠状断）、観察用ウィンドウおよび対物レンズの設置図

（A-D）大脳を冠状断にした脳切片（大脳を横から垂直に切った断面図）。図中のローマ数字は皮質の層を示す。Tennant ら（2011, Figure1）から OXFORD UNIVERSITY PRESS の許可を得て転載。（A）および（B）はニッスル染色、（C）および（D）はミエリン染色されている。（A）および（C）の黒線で囲まれた部位に CFA が含まれる。（B）および（D）はそれぞれ（A）と（B）の黒線部に対応する。（B）および（D）の黒い矢印は、電気刺激で前肢を動かす実験のため、皮質 5 層に刺入された電極の位置を示す。

（E）CFA の観察用ウィンドウの例。CFA 上部の頭骸骨を除去し、代わりにカバーガラスを設置して脳内の神経細胞を 2 光子励起レーザー顕微鏡で観察した。

（F）観察用ウィンドウに対する対物レンズの設置模式図。2 光子カルシウムイメージングを行う際は、観察用ウィンドウ真上に対物レンズを移動し、両者の間を純水で充填した。

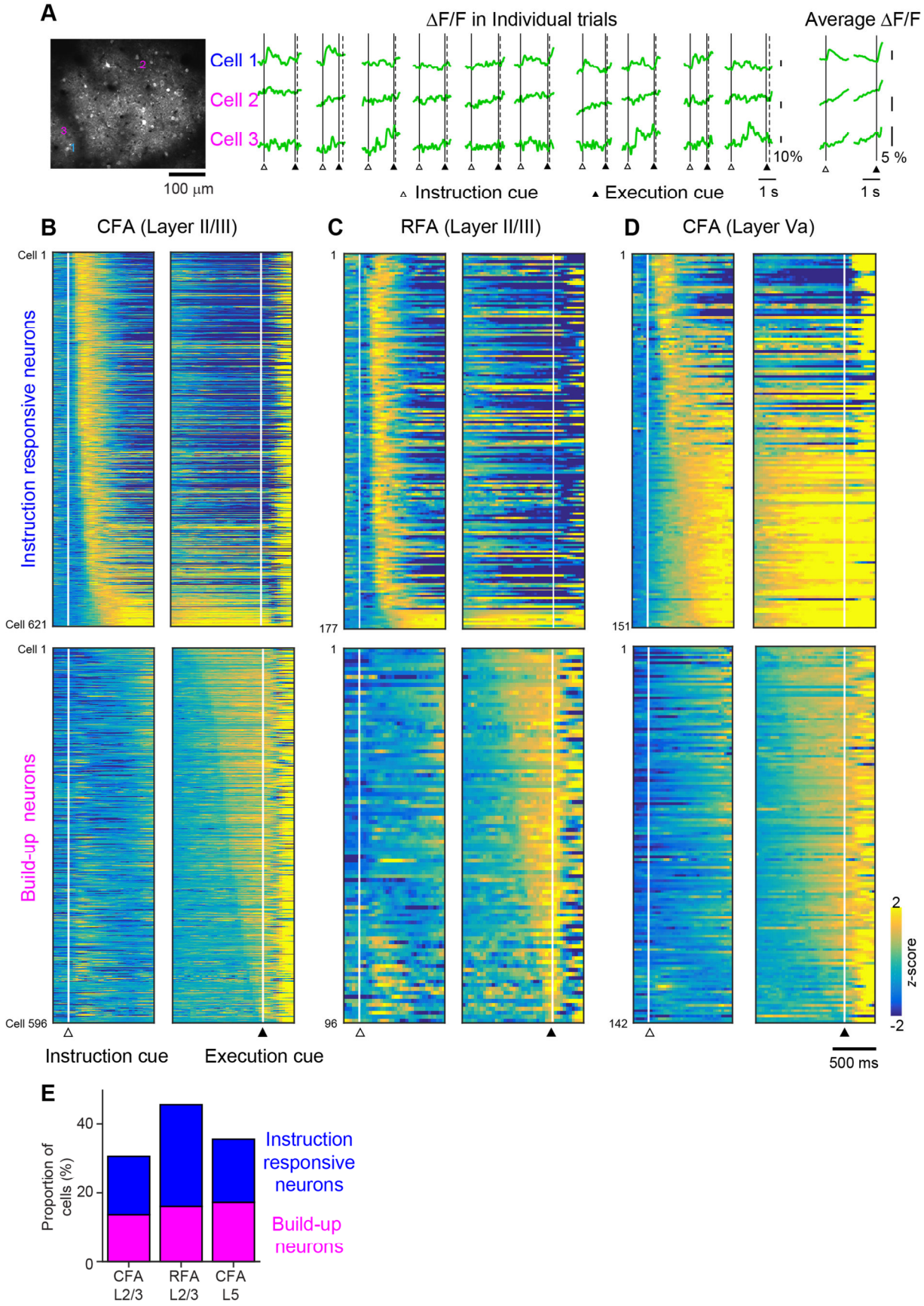

A
ΔF/F in Individual trials
Average ΔF/F
Cell 1
Cell 2
Cell 3
100 μm
10%
5 %
Instruction cue
Execution cue
1 s
1 s
B
CFA (Layer II/III)
C
RFA (Layer II/III)
D
CFA (Layer Va)
Instruction responsive neurons
Build-up neurons
Cell 1
Cell 621
Cell 596
1
177
96
151
142
z-score
2
-2
Instruction cue
Execution cue
500 ms
E
Proportion of cells (%)
40
20
0
CFA L2/3
RFA L2/3
CFA L5
Instruction responsive neurons
Build-up neurons

図 4.2　各タイプの神経細胞の活動パターン

（A）左図：2 光子カルシウムイメージングの例。画像内の小円がカルシウム感受性タンパク質 GCaMP6m を発現した神経細胞。中図：ある 10 試行における神経細胞の活動パターンの例（カルシウムシグナル信号変化率のトレース）。Cell 1 は instruction-responsive neuron の活動パターンの例。Cell 2, Cell 3 は build-up neuron の活動パターンの例。白い三角形に指された実線は instruction cue の呈示を、黒い三角形に指された実線は execution cue の呈示を、破線はマウスがホールドバーを離した時点を示す。右図：各神経細胞における 10 試行の神経活動の平均。白い三角形に指された実線は instruction cue の呈示を、黒い三角形に指された実線は execution cue の呈示を示す。

（B-D）標準化（z 得点化）した instruction-responsive neuron および build-up neuron のカルシウムシグナル信号変化率。活動開始のタイミングに応じて各神経細胞をソーティングし、Y 軸に並べた。X 軸は時間経過を示す。白い三角形に指された実線は instruction cue の呈示を、黒い三角形に指された実線は execution cue の呈示を示す。（B）CFA の instruction-responsive neuron（上図）および build-up neuron（下図）。11 匹のマウスから得られた 3650 個の神経細胞のうち、621 個の神経細胞が instruction-responsive neuron に、596 個の神経細胞が build-up neuron に分類された。（C）RFA の instruction-responsive neuron（上図）および build-up neuron（下図）。3 匹のマウスから得られた 596 個の神経細胞のうち、177 個の神経細胞が instruction-responsive neuron に、96 個の神経細胞が build-up neuron に分類された。（D）CFA5a 層の instruction-responsive neuron（上図）および build-up neuron（下図）。5 匹のマウスから得られた 823 個の神経細胞のうち、151 個の神経細胞が instruction-responsive neuron に、142 個の神経細胞が build-up neuron に分類された。

（E）CFA、RFA および CFA 皮質 5a 層における instruction responsive neuron と build-up neuron の存在比率。

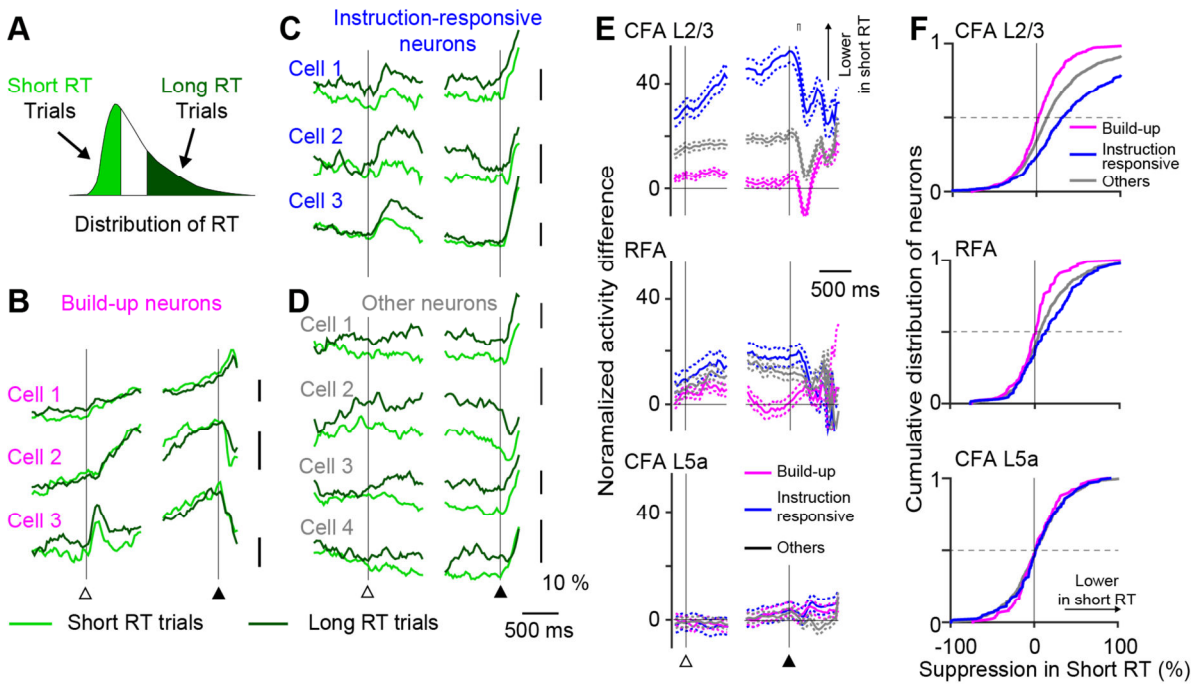


図 4.3　運動準備中の選択的な神経活動の抑制

（A）ある 1 イメージングセッションにおける反応時間の分布。反応時間によって試行を 3 つのグループに分類した。上位 33%の試行を反応時間が短い試行、下位 33%の試行を反応時間が長い試行と定義し、解析に用いた。

（B）CFA 皮質 2/3 層における、反応時間が短い試行と長い試行の build-up neuron の活動（カルシウムシグナル変化率）。

（C）CFA 皮質 2/3 層における、反応時間が短い試行と長い試行の instruction-responsive neuron の活動。

（D）CFA 皮質 2/3 層における、反応時間が短い試行と長い試行の other neuron の活動。

（E）反応時間が長い試行と短い試行の間の神経活動の差（Normalized difference）。反応時間が長い試行の活動が高い（あるいは反応時間が短い試行の活動が低い）ほど、normalized difference の値は大きくなる。Normalized difference は instruction cue（白い三角形）あるいは execution cue（黒い三角形）の呈示に揃えて表示した。マゼンタ、ブルー、グレーのラインは、

それぞれ build-up neuron、instruction-responsive neuron,、other neuron の活動を示す。各色の実線および破線は、それぞれのタイプの細胞の normalized difference の平均値±SEM を示す。

（F）3 つの領域における各タイプの神経細胞の normalized difference の累積分布。上図：CFA 皮質 2/3 層における各神経細胞の累積分布。390 個の build-up neuron、394 個の instruction-responsive neuron、1315 個の other neuron から作成。中図：RFA における各神経細胞の累積分布。96 個の build-up neuron、135 個の instruction-responsive neuron、249 個の other neuron から作成。下図：CFA 皮質 5a 層における各神経細胞の累積分布。127 個の build-up neuron、129 個の instruction-responsive neuron、470 個の other neuron から作成。

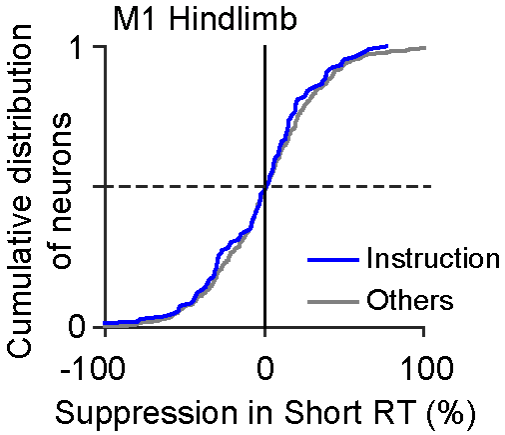


図 4.4. 後肢運動野における各タイプの神経細胞の normalized difference の累積分布

106 個の instruction-responsive neuron、196 個の other neuron から作成。反応時間が長い試行と短い試行の活動を比較した際、後肢運動野では両者に有意な差は認められなかった（instruction responsive neurons, -2.2 ± 3.4 %, $p > 0.2$; other neurons, 3.9 ± 2.6 %, $p > 0.05$、ブートストラップ検定）。後肢運動野では、build-up neuron の比率が少なかったため（3.7%）、分布からは除外した。

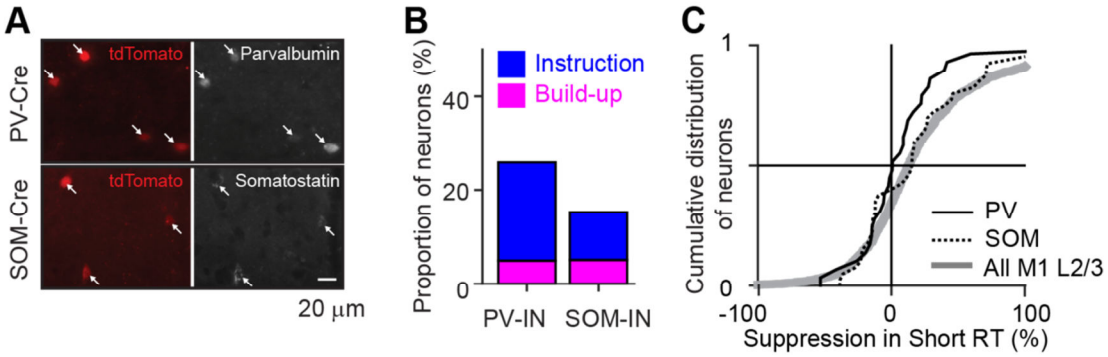


図 4.5　介在神経細胞の活動パターン

（A） Parvalbumin （PV）陽性および somatostatin （SOM）陽性の介在神経細胞は、AAV2/1-CAG-Flex-tdTomato を利用した tdTomato の発現によって他の神経細胞と区別した。tdTomato の発現は PV 陽性神経細胞 （上図）および SOM 陽性神経細胞（下図）に限定されていた。左図は tdTomato の発現を、右図は免疫染色での Alexa647 の蛍光を示す。tdtomato と免疫染色による蛍光が同時に見られる細胞を矢印で指し示した。

（B）CFA皮質2/3層の介在神経細胞におけるinstruction responsive neuronとbuild-up neuronの存在比率。PV陽性神経細胞は4匹のマウスから81個、SOM陽性神経細胞は3匹のマウスから59個の細胞のデータを取得した。PV陽性神経細胞におけるbuild-up neuronの比率はCFA皮質2/3層におけるbuild-up neuronの比率よりも有意に小さかったが（$p < 0.04$、ピアソンカイ2乗検定）、SOM陽性神経細胞の比率に有意な差は認められなかった（$p < 0.08$、ピアソンカイ2乗検定）。Instrcution-responsive neuronの比率に関しては、どちらの介在神経細胞もCFA皮質2/3層におけるbuild-up neuronの比率との間に有意な差は認められなった。

（C）介在神経細胞に関するnormalized differenceの累積分布。PV陽性神経細胞（黒い実線）、SOM陽性神経細胞（黒い破線）、CFA皮質2/3層の全てのタイプの神経細胞（灰色の実線）の累積分布を示した。PV陽性神経細胞もSOM陽性神経細胞も反応時間が短い試行において、その活動は抑制された（PV, 11.6 ± 8.3%; SOM, 20.3 ± 7.0%、ブートストラップ検定）。PV陽性および

SOM陽性細胞とnormalized differenceとCFAの神経細胞のnormalized differenceの大きさに有意な差は見られなかった（PV陽性細胞, $p > 0.1$; SOM陽性細胞, $p > 0.2$, ウィルコクソン順位検定）。

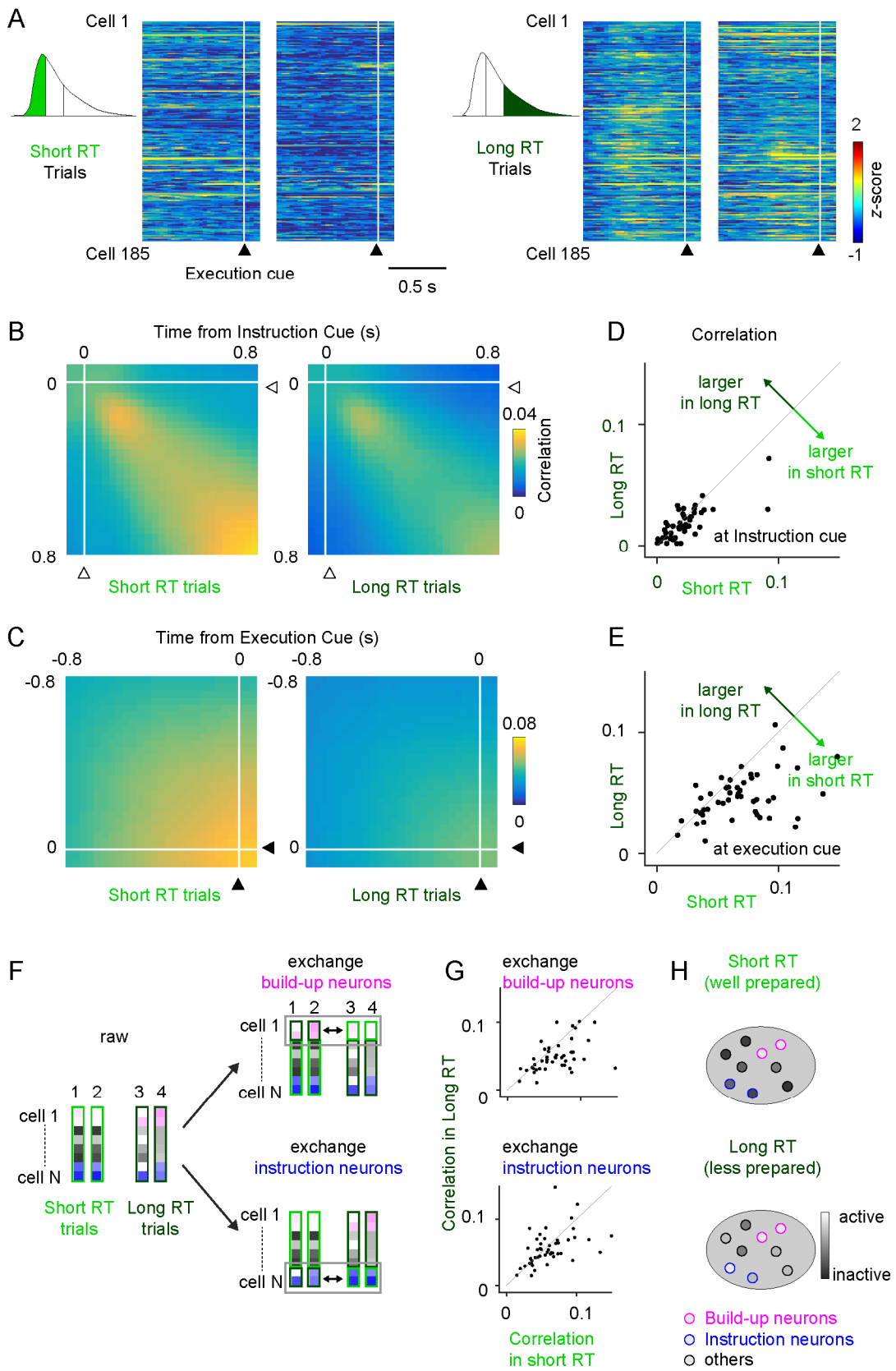

A
Cell 1
Short RT
Trials
Cell 185
Execution cue
0.5 s
Cell 1
Long RT
Trials
Cell 185
2
z-score
-1
B
Time from Instruction Cue (s)
0
0.8
0
0.8
0.04
Correlation
0
Short RT trials
Long RT trials
D
Correlation
larger
in long RT
larger
in short RT
at Instruction cue
0.1
Long RT
0
0
Short RT
0.1
C
Time from Execution Cue (s)
-0.8
0
-0.8
0
0.08
0
Short RT trials
Long RT trials
E
larger
in long RT
larger
in short RT
at execution cue
0.1
Long RT
0
0
Short RT
0.1
F
raw
1 2
3 4
cell 1
cell N
Short RT
trials
Long RT
trials
exchange
build-up neurons
1 2 3 4
cell 1
cell N
exchange
instruction neurons
cell 1
cell N
G
exchange
build-up neurons
0.1
0
Correlation in Long RT
exchange
instruction neurons
0.1
0
0
0.1
Correlation
in short RT
H
Short RT
(well prepared)
Long RT
(less prepared)
active
inactive
Build-up neurons
Instruction neurons
others

図4.6.　反応時間が短い試行と長い試行における神経細胞集団の活動パターン

（A）ある1イメージングセッションにおける、反応時間が短い試行と長い試行における各神経細胞の活動パターン。左図：反応時間が短い試行の活動パターンの例。右図：反応時間が長い試行の活動パターンの例。神経細胞の活動は標準化（z得点化）して示した。

（B）Instruction cue呈示前後の相関係数マトリックス。左図：反応時間が短い試行間の相関係数マトリックス。右図：反応時間が長い試行間の相関係数マトリックス。

（C）Execution cue呈示前後の相関係数マトリックス。左図：反応時間が短い試行間の相関係数マトリックス。右図：反応時間が長い試行間の相関係数マトリックス。

（D）各イメージングセッションにおける、instruction cue呈示時点での反応時間が短い試行と反応時間が長い試行の神経活動パターン間の相関係数。

（E）各イメージングセッションにおける、execution cue呈示時点での反応時間が短い試行と反応時間が長い試行の神経活動パターン間の相関係数。

（F）試行取替え後の相関係数分析の概要。右図上：反応時間が短い試行と長い試行のbuild-up neuronの活動を入れ替えて相関係数を再度算出する。このとき、反応時間が長い試行の相関係数は、反応時間が短い試行のbuild-up neuronの活動をもとに相関係数が算出される。同様に、反応時間が短い試行の相関係数は、反応時間が長い試行のbuild-up neuronの活動をもとに相関係数が算出される。右図下：Instruction-responsive neuronに関しても、build-up neuronと同様の手続きで入れ替えを行い、相関係数を再度算出した。

（G）Execution cue呈示時点における試行入れ替え後の相関係数。上図：反応時間が短い試行と長い試行のbuild-up neuronの活動を入れ替えた後の相関係数。Build-up neuronの活動が入れ替わっても、依然として反応時間が短い試行間では神経細胞集団の活動の相関係数は大きい。下図：反応時間が短い試行と長い試行のinstruction responsive neuronの活動を入れ替えた後の相関

係数。Instruction responsive neuronの活動が入れ替えられると、反応時間が短い試行と長い試行の間で見られた相関係数の差は消失した。

（H）本実験の結果をまとめた模式図。Build-up neuron の活動は反応時間が短い試行（運動準備が十分な状態）でも長い試行（運動準備が不十分な状態）でも大きくは変化しない。一方、instruction responsive neuron および other neuron の活動は、運動準備が十分な状態（反応時間が短い）だと抑制される。このような選択的な神経細胞の活動抑制を通じて、運動準備が最適化されることで、効果的に運動を実行できるのだと推察される。

第 4 章

総合考察

1. 本研究のまとめ

何らかの動作を行う際、次に行う動作をあらかじめ準備することで、円滑に素早くその動作を実行することができる。この「運動準備」が脳内でどのように進行・形成されているのかについて、これまで様々な研究が行われてきた。霊長類を使った先行研究から、運動と関連する大脳皮質の領域では、運動準備中に活動の上がる神経細胞が発見されており(Boussaoud & Wise, 1993a, 1993b; Crammond & Kalaska, 2000; Kurata & Wise, 1988; Riehle & Requin, 1989; Tanji & Evarts, 1976; Weinrich & Wise, 1982; Wise, 1985; Wise et al., 1983)、このような神経細胞の活動増加が運動準備を反映すると考えられてきた(Wise, 1985)。しかしながら近年の研究では、個々の神経細胞の活動が単純に増加することではなく、神経細胞の集団がある特定パターンの活動になることで運動準備が最適化されるという仮説が提唱されている(Churchland et al., 2006)。そのため、運動準備の神経メカニズムを検討するためには、数十から数百個の神経細胞集団の活動を同時に観察し、集団レベルでの活動パターンの変化を記録することが重要だと考えられる。

そこで本研究では、神経細胞の活動を集団レベルで測定することができる 2 光子カルシウムイメージングを利用して、運動準備が大脳皮質の神経細胞集団でどのように形成されているのかを検討した。本稿第 2 章では、運動準備を必要とする行動課題を開発し、本研究の目的に対する課題の妥当性を検討するとともに、課題遂行に前肢運動野が必要かどうかを検討した。実験 1 では、頭部固定下のマウスを対象とした運動課題である Go/Nogo リーチング課題を開発し、マウスが運動準備を必要とする課題を高い精度で遂行できることを確認した。実験 2 では、マウスが体内時計に強く依拠して課題（Go 試行）を行っているわけではなく、音刺激（execution cue）の呈示に伴い、準備した動作を実行していることをさらに確認した。実験 3 で

は、ムシモール注入実験を行うことで、前肢運動野が Go/Nogo リーチング課題の遂行、とりわけ Go 試行の遂行に必要であることを確かめた。

本稿第 3 章では、前肢運動野で 2 光子カルシウムイメージングを行い、前腕運動の運動準備がどのように神経細胞集団によって形成されているのかを検討した。実験 4 では、前肢運動野で得られた 2 光子カルシウムイメージングのデータを分析し、Go/Nogo リーチング課題の Go 試行中に何らかの活動パターンを示した前肢運動野の神経細胞を、build-up neuron 、instruction-responsive neuron および other neuron に分類した。これらの細胞の活動を、運動準備が不十分な状態（反応時間が長い試行）と運動準備が十分な状態（反応時間が短い試行）で比較すると、運動準備が十分なときに、instruction-responsive neuron および other neuron の活動が選択的に抑制されていることが明らかとなった。統制実験として行った後肢運動野のカルシウムイメージングでは、運動準備が十分な状態で、これらの細胞の活動抑制は見られなかった。このことは、運動準備が十分な状態で instruction-responsive neuron および other neuron に生じた活動抑制は、前肢運動野に限局している可能性が高いことを意味している。さらに、運動準備と神経細胞集団の活動パターンの関係を調べると、運動準備が十分な状態（反応時間が短い試行）では、神経細胞集団の活動パターンは試行間での類似性が高かった。さらに、課題関連細胞がどのようにして活動パターンの類似性に寄与しているのかを調べると、instruction-responsive neuron および other neuron の活動抑制によって、類似性の高い活動パターンが形成されていることが明らかとなった。

以上の実験結果をまとめると、本研究は、1）特定タイプの神経細胞の活動抑制が運動準備の進行・形成と関連していること、2）運動準備が十分な状態では、選択的な神経細胞の活動抑制を通じて活動パターンの再現性が高まること、の 2 点を新たに明らかにしたといえる。

2. 選択的な神経細胞の活動抑制が生じるメカニズムについて

本研究では、instruction-responsive neuron および other neuron の活動が選択的に抑制されることが運動準備の進行にとって重要であるという知見が得られた。しかしながら、本研究の結果からは、どのようなメカニズムで選択的な活動抑制が生じるのかは明らかではない。神経細胞の活動が抑制されるという観点から、運動準備の進行が進むにつれて、前肢運動野内の抑制性神経細胞（介在神経細胞）が周囲の細胞の活動を抑制していたという可能性が推測された。しかしながら、実験 4 の結果を考慮すると、少なくとも PV 陽性神経細胞および SOM 陽性神経細胞は、本研究で観察された選択的な神経細胞の活動抑制には関与していないと考えられる。もしこれらの介在神経細胞が選択的な神経細胞の活動抑制に関与しているのであれば、反応時間が短い試行でその活動は特異的に上昇し、instruction-responsive neuron および other neuron の活動を抑制すると予測される。しかしながら、反応時間が短い試行でも、介在神経細胞の活動と他の神経細胞との活動に違いは見られなかった。このことは、instruction-responsive neuron および other neuron の活動抑制が、少なくとも PV 陽性介在神経細胞あるいは SOM 陽性神経細胞の活動に由来しないことを意味している。

大脳皮質における、PV および SOM 陽性神経細胞以外の主要な介在神経細胞としては、VIP（Vasoactive intestinal polypeptide）陽性神経細胞が挙げられる。本研究では、Go/Nogo リーチング課題遂行中の VIP 陽性介在神経細胞の活動をカルシウムイメージングでモニターしなかったため、運動準備の進行に伴ってこの介在神経細胞の活動がどのように変化するのかは不明である。VIP 陽性神経細胞は、主に SOM 陽性介在神経細胞の活動を調節することで、皮質における局所神経回路の活動を調節している(Pfeffer, Xue, He, Huang, & Scanziani, 2013; Tremblay et al., 2016)。本研究では SOM 陽性介在神経細胞の活動も測定したが、この介在神経細胞の活動は instruction-responsive neuron および other neuron の活動抑制に関係しないことが示された。この結果を考慮すると、VIP 陽性神経細胞は、前肢運動野の instruction-responsive neuron および other

neuron の活動抑制に関与していないのかもしれない。しかしながら、VIP 陽性介在神経細胞が前頭皮質において興奮性の神経細胞の活動を直接抑制し、その活動を調節しているという可能性も示唆されている(Garcia-Junco-Clemente et al., 2017)。そのため、VIP 陽性介在神経細胞が興奮性の神経細胞の活動を直接抑制することで選択的な神経細胞の活動抑制に関与していた可能性を本研究から否定することはできない。今後の研究では、VIP 陽性介在神経細胞の活動も測定することで、介在神経細胞と活動抑制の関係を調べる必要があるだろう。

介在神経細胞の活動によって選択的な活動抑制が引き起こされているわけではないのであれば、どのようなメカニズムで選択的な神経細胞の活動抑制が引き起こされるのだろうか。前肢運動野内の介在神経細胞が活動抑制に関与していないのならば、前肢運動野と連絡を持つ脳領域からの入力が変化することで、前肢運動野の活動が調整されているのかもしれない。大脳皮質の細胞活動が、皮質下の脳領域からの入力によって調整される例としては、1 次視覚野の例が挙げられる。ネコの 1 次視覚野では、視床の一部である外側膝状体からの入力が変化することによって、視覚野の神経細胞の活動が抑制されるという実験結果が報告されている(Freeman, Durand, Kiper, & Carandini, 2002)。この実験結果は、皮質内の介在神経細胞だけでなく、皮質下の脳領域からの入力によっても大脳皮質の活動が抑制されることを示している。また、Guo らは、マウスを対象とした意思決定課題において、視床（主に ventral medial nucleus および ventral lateral-medial nucleus）と anterior lateral motor area（ALM; 前頭皮質に位置する領域）の活動が、相補的に維持されていることをオプトジェネティクスを利用した実験を通じて明らかにしている(Guo et al., 2017)。この実験では、視床の活動が抑制されるとそれに応じて ALM の活動が減少し、ALM の活動が抑制されるとそれに応じて視床の活動が減少した。ALM と同様の活動調整メカニズムが前肢運動野にもあてはまるのならば、前肢運動野の活動を維持するために必要な他の脳領域の活動（例えば運動性視床）が弱まることで、結果的に前肢運動野の一部の神経細胞の活動が選択的に抑制されるのかもしれない。

前肢運動野は、皮質内および皮質下の領域と直接的、間接的につながっており、複雑なネットワークを形成している。例えば、前肢運動野は CFA と RFA で相互に投射しているが、CFA は主に RFA の皮質 5b 層から投射を受けているのに対し、RFA は主に CFA の皮質 2/3 層および 5a 層から投射を受けている(Hira, Ohkubo, Tanaka, et al., 2013)。本研究では CFA と RFA の活動は質的に異ならなかったが、CFA と RFA 間の投射関係が同一ではないことから、相互の活動調節は異なるメカニズムで行われている可能性が推察される。前肢運動野は 1 次感覚野および 2 次感覚野とも投射関係を持つが、マウスのヒゲ体性感覚野とヒゲ運動野では、学習によって感覚野から運動野への情報出力が変化する(Yamashita & Petersen, 2016)。前肢運動野においても、前腕運動の学習の進行に伴って前肢の感覚野から前肢運動野への情報出力が変化することで、感覚野が前肢運動野の活動に何らかの影響を与えているかもしれない。また、前章で述べた皮質－大脳基底核ループに加え、皮質-小脳ループ（小脳-視床-皮質）の経路によっても、前肢運動野は皮質下領域からの活動調節を受けている(Kaneko, 2013) 。大脳基底核および小脳から視床への投射は、それぞれ inhibitory input-dominant zone（IZ）と excitatory subcortical input-dominant zone（EZ）に抑制性入力および興奮性入力がなされているが、IZ と EZ は皮質運動野に対してそれぞれ異なる投射パターンを有している。そのため、大脳基底核と小脳は、異なるメカニズムで皮質運動野における運動の準備と実行に寄与していると考えられる。このように、前肢運動野は皮質および皮質下領域と複雑なネットワークを形成し、複数の領域からの活動調節を受けることで、その機能が成立していると推察される。本実験では前肢運動野の神経活動に着目したため、前肢運動野と関連する皮質領域あるいは皮質下領域の活動を測定しなかった。今後は前肢運動野に加え、前肢運動野と連絡をもつ皮質領域あるいは皮質下領域の神経活動を Go/Nogo リーチング課題遂行中に測定することで、その領域が運動準備に果たす役割を調べるとともに、その領域が前肢運動野の活動抑制にどのように寄与するのかについても検討していく必要があるだろう。

3. 今後の課題と展望

本研究では、独自の運動課題を開発し、その課題遂行中に前肢運動野で 2 光子カルシウムイメージングを行うことで、運動準備の神経メカニズムに関する新たな知見を得ることができた。しかしながら、得られた知見を発展させる上で、今後検討すべき課題が残っている。本節では、今後の実験により検討していくべき点およびその展望について述べる。

3.1. 前肢運動野の皮質 5b 層の活動について

実験 4 では前肢運動野の皮質 2/3 層および 5a 層で 2 光子カルシウムイメージングを行ったが、皮質 5b 層に関しては 2 光子カルシウムイメージングを行わなかった。これは、本研究の 2 光子励起レーザー顕微鏡のセットアップでは、皮質 5b 層の深さで解析に耐えうるイメージングデータが取得できなかったためである。運動野皮質 5b 層には、皮質から脊髄まで軸策を投射している神経細胞（corticospinal neuron）が存在しており、皮質からの運動情報を直接脊髄に出力している(Oswald et al., 2013)。そのため、Go/Nogo リーチング課題遂行中の皮質 5b 層の神経細胞の活動を調べることで、運動実行に直接関与する神経細胞でどのように運動準備が表現されているのかを検討できる。運動の実行に直接関与する神経細胞集団（皮質 5b 層の神経細胞）でも、皮質 2/3 層と同様に選択的な活動抑制が生じるのか、あるいは別の現象によって運動準備が形成されるのかを明らかにすることは、運動準備の神経メカニズムを解明する上で重要な知見になると考えられる。実験 4 ではカルシウム感受性蛍光タンパク質の GCaMP6m を細胞に発現させて 2 光子カルシウムイメージングを行ったが、近年ではより深部を観察することができる新たなカルシウム感受性蛍光タンパク質が開発されてきている。新たなカルシウム感受性タンパク質を利用した研究では、波長の長い励起光でこの蛍光タンパク質を励起することで、脳表から深さ約 850 um (Dana et al., 2016)あるいは 1200 um (Kondo, Kobayashi, Ohkura, Nakai, &

Matsuzaki, 2017)まで 2 光子カルシウムイメージングが可能であるとの報告がなされている。そのため、今後の研究では深部観察に適した新たなカルシウム感受性タンパク質を利用することで、皮質 5b 層の活動を調べる必要があるだろう。

また、皮質 5b 層の神経細胞の活動を測定することで、運動準備の神経活動がどのように運動実行の神経活動に変換されるのかを調べることができるかもしれない。運動準備が不十分な状態と、運動準備が十分な状態で、運動準備－運動実行の変換過程に違いはあるのか、違いがあるとしたら、どのような違いが生じているのかを明らかにすることも、運動の準備と実行の神経メカニズムを解明する一助になるだろう。しかし、この運動準備－運動実行の変換プロセスを検討するには、2 光子カルシウムイメージング法は適していないと考えられる。2 光子カルシウムイメージング法の欠点として、低い時間分解能が挙げられる。2 光子カルシウムイメージング法では、カルシウム感受性蛍光タンパク質がカルシウムと結合することにより生じる蛍光変化を検出することで細胞の活動を計測している。使用するカルシウム感受性蛍光タンパク質の種類に依存するが、蛍光変化が素早いカルシウム感受性蛍光タンパク質である GCaMP6f でも、蛍光変化がピークに到達する過程には約数十 ms 程度の時間がかかる(T. W. Chen et al., 2013)。この理由から、2 光子カルシウムイメージング法は神経細胞の瞬時の活動変化を捉えることには適していない。一方で、電気生理学的手法は時間分解能に優れており、神経細胞の瞬時の活動変化を記録することができる。そのため、運動準備－運動実行の変換プロセスを検討するためには、2 光子カルシウムイメージング法と電気生理学的手法を組み合わせたアプローチ方法を試していく必要があるだろう。

3.2. 各タイプの細胞の解剖学的・遺伝学的特徴について

本研究では 2 光子カルシウムイメージングで観察された神経細胞を、build-up neuron 、instruction-responsive neuron および other neuron に分類し、その機能的側面について解析を行っ

た。しかし、これらの細胞の解剖学的特徴あるいは遺伝学的特徴などについては本研究では検討できていない。非常にクリアではなくとも、これらの細胞がある程度解剖学的に異なる特徴をもっているのであれば、解剖学観点からも活動抑制の発生機序について検討することができるだろう。カルシウムイメージングで得られた全ての細胞の解剖学的特徴を調べるのは困難だが、2 光子励起レーザー顕微鏡下で任意の細胞に蛍光色素を導入するといった手法を用いることで、少数ではあるが課題関連細胞の解剖学的特徴を追及できるかもしれない。

また、解剖学的特徴に加え、各タイプの細胞の遺伝学的特徴を明らかにすることも今後の研究にとって重要だと考えられる。もし各タイプの細胞の遺伝学的特徴が異なっていれば、遺伝子操作技術を利用することで、任意の細胞だけを標的として機能操作に必要なタンパク質を発現させることができる。それが可能となれば、オプトジェネティクスを利用することで、任意の種類の細胞の活動を操作し、各タイプの細胞の活動がどのように運動準備の成立に寄与するのかを、より実証的に調べることができるだろう。また、build-up neuron の活動を操作してその機能的意義を検討することは、運動実行の神経メカニズムを解明する上で重要だと考えられる。本研究では、build-up neuron の活動は運動の準備状態にかかわらず、ほぼ同様の活動パターンを示した。このことは、運動の効果的な準備とは独立して、build-up neuron が運動実行に必要な情報をコードしている可能性を示唆している。また、皮質 2/3 層の細胞の活動が運動実行を担う皮質 5b 層の細胞に出力されることを考慮すると(Hooks et al., 2013)、build-up neuron の活動が運動実行に必要な情報として 5b 層の細胞に出力されるのに対し、運動準備が十分な状態で抑制される instruction-responsive neuron と other neuron の活動は、5b 層の細胞にとって build-up neuron の情報入力を妨げるノイズとなっているのかもしれない。

Build-up neuron のみならず、各タイプの細胞の機能的意義を調べることによって、皮質運動野における運動準備の神経メカニズムをより詳細に明らかにすることができる。そのため、各タイプの神経細胞の遺伝学的特徴を調べ、細胞ごとの機能操作の実現可能性を追求すること

は、今後の研究にとって重要だと考えられる。しかしながら、各タイプの神経細胞の遺伝学的特徴に何らかの差異が見られない場合も十分想定される。このような場合には、2 光子カルシウムイメージング中に視野内の細胞がどのタイプに属するのかを同定しながら、あるタイプの細胞群の活動のみをオプトジェネティクスでピンポイントに操作するような実験を行う必要があるだろう(Packer, Russell, Dalgleish, & Hausser, 2015)。

3.3. 活動抑制の普遍性について

本研究では、前肢運動野で観察された選択的な神経細胞の活動抑制が運動準備にとって重要であると結論付けたが、この現象はどこまで普遍的なのだろうか。今後の研究では、活動抑制が本研究の課題構造（Go/Nogo リーチング）によるものなのか、それとも、前腕を使ったどの運動課題においても同様に観察されるのかを検討していく必要がある。とりわけ、本研究では前腕運動を行う Go 試行と前腕運動を行わない Nogo 試行という相反する種類の運動をマウスにトレーニングした上で、Go 試行の神経データに着目して解析を行った。そのため、Go 試行で観察された運動準備の神経活動は、Nogo 試行が組み合わせられることで前腕運動の準備がより強調されて生じていた可能性が考えられる。この問いに答えるためには、呈示される刺激の種類によって、前腕を左方向あるいは右方向のいずれかに動かすといった、Go-Go 方式の two alternative choice task（2 肢選択課題）を行い、Go-Go 方式の課題においても運動準備と活動抑制が関連しているのかを確かめる必要がある。また、前腕以外の身体部位を動かす行動課題を行った場合、その身体部位に対応した運動野において、前肢運動野で観察された選択的な神経細胞の活動抑制は生じるのだろうか。もし本研究の前肢運動野で見られた現象が本当に運動準備にとって重要ならば、前腕運動だけでなく、その他の身体運動を準備するときにも、選択的な神経細胞の活動抑制が観察されると推測される。本研究の結果の頑健性を裏付けるために、前腕以外の身体部位を利用する運動課題をさらに開発し、どの身体部位の運動準備に関しても

選択的な神経細胞の活動抑制が生じるのかどうか、今後の実験で検討していく必要があるだろう。

結論

1. 前肢運動野には、運動の準備状態に強く依存せず、運動開始に向けて徐々にその活動が増加する神経細胞（build-up neuron）と、運動準備が十分なされているときにその活動が抑制される神経細胞（instruction-responsive neuron と other neuron）が存在する。

2. 運動準備が十分な状態では、instruction-responsive neuron と other neuron の活動が抑制されることで、前肢運動野の神経細胞集団で再現性の高い活動パターンが形成される。

3. 運動の準備状態が最適化されるには、instruction-responsive neuron と other neuron の活動が選択的に抑制されることが重要である。

引用文献

Afshar, A., Santhanam, G., Yu, B. M., Ryu, S. I., Sahani, M., & Shenoy, K. V. (2011). Single-trial neural correlates of arm movement preparation. *Neuron, 71*(3), 555-564. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.047

Akerboom, J., Chen, T. W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., Mutlu, S., . . . Looger, L. L. (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci, 32*(40), 13819-13840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012

Azim, E., Jiang, J., Alstermark, B., & Jessell, T. M. (2014). Skilled reaching relies on a V2a propriospinal internal copy circuit. *Nature, 508*(7496), 357-363. doi: 10.1038/nature13021

Boussaoud, D., & Wise, S. P. (1993a). Primate frontal cortex: effects of stimulus and movement. *Exp Brain Res, 95*(1), 28-40.

Boussaoud, D., & Wise, S. P. (1993b). Primate frontal cortex: neuronal activity following attentional versus intentional cues. *Exp Brain Res, 95*(1), 15-27.

Chen, Q., Cichon, J., Wang, W., Qiu, L., Lee, S. J., Campbell, N. R., . . . Feng, G. (2012). Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice.. *Neuron, 76*(2), 297-308. doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.011

Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., . . . Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature, 499*(7458), 295-300. doi: 10.1038/nature12354

Churchland, M. M., Yu, B. M., Ryu, S. I., Santhanam, G., & Shenoy, K. V. (2006). Neural variability in premotor cortex provides a signature of motor preparation. *J Neurosci, 26*(14), 3697-3712. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3762-05.2006

Coles, M. G. (1989). Modern mind-brain reading: psychophysiology, physiology, and cognition. *Psychophysiology, 26*(3), 251-269.

Crammond, D. J., & Kalaska, J. F. (2000). Prior information in motor and premotor cortex: activity during the delay period and effect on pre-movement activity. *J Neurophysiol, 84*(2), 986-1005.

Crochet, S., & Petersen, C. C. (2006). Correlating whisker behavior with membrane potential in barrel cortex of awake mice. *Nat Neurosci, 9*(5), 608-610. doi: 10.1038/nn1690

Dana, H., Chen, T. W., Hu, A., Shields, B. C., Guo, C., Looger, L. L., . . . Svoboda, K. (2014). Thy1-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS One, 9*(9), e108697. doi: 10.1371/journal.pone.0108697

Dana, H., Mohar, B., Sun, Y., Narayan, S., Gordus, A., Hasseman, J. P., . . . Kim, D. S. (2016). Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife, 5*. doi: 10.7554/eLife.12727

Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science, 248*(4951), 73-76.

Dorris, M. C., Pare, M., & Munoz, D. P. (1997). Neuronal activity in monkey superior colliculus related to the initiation of saccadic eye movements. *J Neurosci, 17*(21), 8566-8579.

Fink, A. J., Croce, K. R., Huang, Z. J., Abbott, L. F., Jessell, T. M., & Azim, E. (2014). Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature, 509*(7498), 43-48. doi: 10.1038/nature13276

Freeman, T. C., Durand, S., Kiper, D. C., & Carandini, M. (2002). Suppression without inhibition in visual cortex. *Neuron, 35*(4), 759-771.

Friend, D. M., & Kravitz, A. V. (2014). Working together: basal ganglia pathways in action selection. *Trends Neurosci, 37*(6), 301-303. doi: 10.1016/j.tins.2014.04.004

Garcia-Junco-Clemente, P., Ikrar, T., Tring, E., Xu, X., Ringach, D. L., & Trachtenberg, J. T. (2017). An inhibitory pull-push circuit in frontal cortex. *Nat Neurosci, 20*(3), 389-392. doi: 10.1038/nn.4483

Gouvea, T. S., Monteiro, T., Motiwala, A., Soares, S., Machens, C., & Paton, J. J. (2015). Striatal dynamics explain duration judgments. *Elife, 4*. doi: 10.7554/eLife.11386

Gratton, G., Bosco, C. M., Kramer, A. F., Coles, M. G., Wickens, C. D., & Donchin, E. (1990). Event-related brain potentials as indices of information extraction and response priming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 75*(5), 419-432.

Gratton, G., Coles, M. G., Sirevaag, E. J., Eriksen, C. W., & Donchin, E. (1988). Pre- and poststimulus activation of response channels: a psychophysiological analysis. *J Exp Psychol Hum Percept Perform, 14*(3), 331-344.

Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron, 73*(5), 862-885. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.011

Guo, Z. V., Hires, S. A., Li, N., O'Connor, D. H., Komiyama, T., Ophir, E., . . . Svoboda, K. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PLoS One, 9*(2), e88678. doi: 10.1371/journal.pone.0088678

Guo, Z. V., Inagaki, H. K., Daie, K., Druckmann, S., Gerfen, C. R., & Svoboda, K. (2017). Maintenance of persistent activity in a frontal thalamocortical loop. *Nature, 545*(7653), 181-186. doi: 10.1038/nature22324

Hanes, D. P., & Schall, J. D. (1996). Neural control of voluntary movement initiation. *Science, 274*(5286), 427-430.

Harvey, C. D., Coen, P., & Tank, D. W. (2012). Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task. *Nature, 484*(7392), 62-68. doi: 10.1038/nature10918

Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. [Review]. *Nat Methods, 2*(12), 932-940. doi: 10.1038/nmeth818

Hira, R., Ohkubo, F., Ozawa, K., Isomura, Y., Kitamura, K., Kano, M., . . . Matsuzaki, M. (2013). Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. *J Neurosci, 33*(4), 1377-1390. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2550-12.2013

Hira, R., Ohkubo, F., Tanaka, Y. R., Masamizu, Y., Augustine, G. J., Kasai, H., & Matsuzaki, M. (2013). In vivo optogenetic tracing of functional corticocortical connections between motor forelimb areas. *Front Neural Circuits, 7*, 55. doi: 10.3389/fncir.2013.00055

Hooks, B. M., Mao, T., Gutnisky, D. A., Yamawaki, N., Svoboda, K., & Shepherd, G. M. (2013). Organization of cortical and thalamic input to pyramidal neurons in mouse motor cortex. *J Neurosci, 33*(2), 748-760. doi: 10.1523/jneurosci.4338-12.2013

Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2011). How inhibition shapes cortical activity. *Neuron, 72*(2), 231-243. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.027

Jin, X., Tecuapetla, F., & Costa, R. M. (2014). Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat Neurosci, 17*(3), 423-430. doi: 10.1038/nn.3632

Kaneko, T. (2013). Local connections of excitatory neurons in motor-associated cortical areas of the rat. *Front Neural Circuits, 7*, 75. doi: 10.3389/fncir.2013.00075

Kawai, R., Markman, T., Poddar, R., Ko, R., Fantana, A. L., Dhawale, A. K., . . . Olveczky, B. P. (2015). Motor cortex is required for learning but not for executing a motor skill. *Neuron, 86*(3), 800-812. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.024

Kiani, R., Esteky, H., Mirpour, K., & Tanaka, K. (2007). Object category structure in response patterns of neuronal population in monkey inferior temporal cortex. *J Neurophysiol, 97*(6), 4296-4309. doi: 10.1152/jn.00024.2007

Kiritani, T., Wickersham, I. R., Seung, H. S., & Shepherd, G. M. (2012). Hierarchical connectivity and connection-specific dynamics in the corticospinal-corticostriatal microcircuit in mouse motor cortex. *J Neurosci, 32*(14), 4992-5001. doi: 10.1523/jneurosci.4759-11.2012

Koay, G., Heffner, R. S., & Heffner, H. E. (2002). Behavioral audiograms of homozygous medJ mutant mice with sodium channel deficiency and unaffected controls. *Hearing Research, 171*(1), 111-118. doi: https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00492-6

Komiyama, T., Sato, T. R., O'Connor, D. H., Zhang, Y. X., Huber, D., Hooks, B. M., . . . Svoboda, K. (2010). Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature, 464*(7292), 1182-1186. doi: 10.1038/nature08897

Kondo, M., Kobayashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., & Matsuzaki, M. (2017). Two-photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion. *Elife, 6*. doi: 10.7554/eLife.26839

Kornhuber, H. H., & Deecke, L. (1965). Changes in the Brain Potential in Voluntary Movements and Passive Movements in Man: Readiness Potential and Reafferent Potentials. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere, 284*, 1-17.

Kubota, Y., Hatada, S., Kondo, S., Karube, F., & Kawaguchi, Y. (2007). Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J Neurosci, 27*(5), 1139-1150. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3846-06.2007

Kurata, K., & Wise, S. P. (1988). Premotor cortex of rhesus monkeys: set-related activity during two conditional motor tasks. *Exp Brain Res, 69*(2), 327-343.

Kutas, M., & Donchin, E. (1974). Studies of squeezing: handedness, responding hand, response force, and asymmetry of readiness potential. *Science, 186*(4163), 545-548.

Kutas, M., & Donchin, E. (1980). Preparation to respond as manifested by movement-related brain potentials. *Brain Res, 202*(1), 95-115.

Li, M., Liu, F., Jiang, H., Lee, T. S., & Tang, S. (2017). Long-Term Two-Photon Imaging in Awake Macaque Monkey. *Neuron, 93*(5), 1049-1057 e1043. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.027

Madisen, L., Garner, A. R., Shimaoka, D., Chuong, A. S., Klapoetke, N. C., Li, L., . . . Zeng, H. (2015). Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron, 85*(5), 942-958. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.022

Masamizu, Y., Tanaka, Y. R., Tanaka, Y. H., Hira, R., Ohkubo, F., Kitamura, K., . . . Matsuzaki, M. (2014). Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci, 17*(7), 987-994. doi: 10.1038/nn.3739

Mello, G. B., Soares, S., & Paton, J. J. (2015). A scalable population code for time in the striatum. *Curr Biol, 25*(9), 1113-1122. doi: 10.1016/j.cub.2015.02.036

Michaels, J. A., Dann, B., Intveld, R. W., & Scherberger, H. (2015). Predicting Reaction Time from the Neural State Space of the Premotor and Parietal Grasping Network. *J Neurosci, 35*(32), 11415-11432. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1714-15.2015

Murakami, M., Vicente, M. I., Costa, G. M., & Mainen, Z. F. (2014). Neural antecedents of self-initiated actions in secondary motor cortex. *Nat Neurosci, 17*(11), 1574-1582. doi: 10.1038/nn.3826

Nambu, A. (2011). Somatotopic organization of the primate Basal Ganglia. *Front Neuroanat, 5*, 26. doi: 10.3389/fnana.2011.00026

Neafsey, E. J., Bold, E. L., Haas, G., Hurley-Gius, K. M., Quirk, G., Sievert, C. F., & Terreberry, R. R. (1986). The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study.*Brain Res, 396*(1), 77-96.

Neafsey, E. J., & Sievert, C. (1982). A second forelimb motor area exists in rat frontal cortex. *Brain Res, 232*(1), 151-156.

O'Connor, D. H., Clack, N. G., Huber, D., Komiyama, T., Myers, E. W., & Svoboda, K. (2010). Vibrissa-based object localization in head-fixed mice. *J Neurosci, 30*(5), 1947-1967. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3762-09.2010

Oswald, M. J., Tantirigama, M. L., Sonntag, I., Hughes, S. M., & Empson, R. M. (2013). Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Front Cell Neurosci, 7*, 174. doi: 10.3389/fncel.2013.00174

Packer, A. M., Russell, L. E., Dalgleish, H. W., & Hausser, M. (2015). Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo. *Nat Methods, 12*(2), 140-146. doi: 10.1038/nmeth.3217

Park, J. E., Zhang, X. F., Choi, S. H., Okahara, J., Sasaki, E., & Silva, A. C. (2016). Generation of transgenic marmosets expressing genetically encoded calcium indicators. *Sci Rep, 6*, 34931. doi: 10.1038/srep34931

Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Compact 2nd ed.). Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.

Peters, A. J., Chen, S. X., & Komiyama, T. (2014). Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning. *Nature, 510*(7504), 263-267. doi: 10.1038/nature13235

Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J., & Scanziani, M. (2013). Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci, 16*(8), 1068-1076. doi: 10.1038/nn.3446

Pologruto, T. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2003). ScanImage: flexible software for operating laser scanning microscopes. *Biomed Eng Online, 2*, 13. doi: 10.1186/1475-925X-2-13

Reynolds, R. P., Kinard, W. L., Degraff, J. J., Leverage, N., & Norton, J. N. (2010). Noise in a Laboratory Animal Facility from the Human and Mouse Perspectives. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS, 49*(5), 592-597.

Riehle, A., & Requin, J. (1989). Monkey primary motor and premotor cortex: single-cell activity related to prior information about direction and extent of an intended movement. *J Neurophysiol, 61*(3), 534-549.

Rosenbaum, D. A. (1980). Human movement initiation: specification of arm, direction, and extent. *J Exp Psychol Gen, 109*(4), 444-474.

Sachidhanandam, S., Sreenivasan, V., Kyriakatos, A., Kremer, Y., & Petersen, C. C. (2013). Membrane potential correlates of sensory perception in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci, 16*(11), 1671-1677. doi: 10.1038/nn.3532

Sadakane, O., Masamizu, Y., Watakabe, A., Terada, S., Ohtsuka, M., Takaji, M., . . . Yamamori, T. (2015). Long-Term Two-Photon Calcium Imaging of Neuronal Populations with Subcellular Resolution in Adult Non-human Primates. *Cell Rep, 13*(9), 1989-1999. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.050

Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., . . . Nomura, T. (2009). Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature, 459*(7246), 523-527. doi: 10.1038/nature08090

Sato, T., Murthy, A., Thompson, K. G., & Schall, J. D. (2001). Search efficiency but not response interference affects visual selection in frontal eye field. *Neuron, 30*(2), 583-591.

Sato, T. R., & Schall, J. D. (2003). Effects of stimulus-response compatibility on neural selection in frontal eye field. *Neuron, 38*(4), 637-648.

Shenoy, K. V., Sahani, M., & Churchland, M. M. (2013). Cortical control of arm movements: a dynamical systems perspective. *Annu Rev Neurosci, 36*, 337-359. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150509

Smith, N. J., Horst, N. K., Liu, B., Caetano, M. S., & 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. doi: 10.3389/fnint.2010.00124

Soares, S., Atallah, B. V., & Paton, J. J. (2016). Midbrain dopamine neurons control judgment of time. *Science, 354*(6317), 1273-1277. doi: 10.1126/science.aah5234

Svoboda, K., & Yasuda, R. (2006). Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron, 50*(6), 823-839. doi: 10.1016/j.neuron.2006.05.019

Tanji, J., & Evarts, E. V. (1976). Anticipatory activity of motor cortex neurons in relation to direction of an intended movement. *J Neurophysiol, 39*(5), 1062-1068.

Tennant, K. A., Adkins, D. L., Donlan, N. A., Asay, A. L., Thomas, N., Kleim, J. A., & 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*(4), 865-876. doi: 10.1093/cercor/bhq159

Thevenaz, P., Ruttimann, U. E., & Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process, 7*(1), 27-41. doi: 10.1109/83.650848

Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron, 91*(2), 260-292. doi: 10.1016/j.neuron.2016.06.033

Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A., & Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet, 5*, 88. doi: 10.3389/fgene.2014.00088

Weinrich, M., & Wise, S. P. (1982). The premotor cortex of the monkey. *J Neurosci, 2*(9), 1329-1345.

Wise, S. P. (1985). The primate premotor cortex: past, present, and preparatory. *Annu Rev Neurosci, 8*, 1-19. doi: 10.1146/annurev.ne.08.030185.000245

Wise, S. P., Weinrich, M., & Mauritz, K. H. (1983). Motor aspects of cue-related neuronal activity in premotor cortex of the rhesus monkey. *Brain Res, 260*(2), 301-305.

Yamashita, T., & Petersen, C. (2016). Target-specific membrane potential dynamics of neocortical projection neurons during goal-directed behavior. *Elife, 5*. doi: 10.7554/eLife.15798

Zariwala, H. A., Borghuis, B. G., Hoogland, T. M., Madisen, L., Tian, L., De Zeeuw, C. I., . . . Chen, T. W. (2012). A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging in vivo. *J Neurosci, 32*(9), 3131-3141. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4469-11.2012

謝辞

本学位論文は、北海道大学大学院文学研究科博士後期課程在学中および University of Tuebingen 滞在中に行った一連の研究を学位申請論文としてまとめたものです。研究の遂行および本論文の執筆にあたり、日独の多くの方々からご助力を賜りました。

ゼロから神経科学の実験技術を習得するにあたって、Centre for Integrative Neuroscience, University of Tuebingen の佐藤隆グループリーダーには、マウスの扱い方から 2 光子顕微鏡の使い方に及ぶまで、様々なご指導を賜りました。北海道大学大学院文学研究科の指導教員である和田博美教授には、本稿の執筆にあたり、多くの有用なアドバイスをいただきました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

ドイツのラボで同じ時間を過ごした同僚の皆さまには、研究のみならず、日々の生活でも支えになっていただきました。また、博士後期課程在学中に留学したアメリカのラボの皆さまには、ドイツに移動してからも、研究生活について相談にのっていただき、精神的に支えていただきました。多くの人の助力なくして、本稿は執筆できなかったと思います。皆さま、本当にありがとうございました。

*本稿は「Selective Suppression of Local Circuits during Movement Preparation in the Mouse Motor Cortex」(Cell Reports, Volume 18, Issue11, p2676-2686)のデータを利用して執筆された。