解 説

課題実行中の視床軸索イメージングからわかる
運動学習時の脳活動のダイナミクス田 中 康 代^{*1,*3}, 田 中 康 裕^{*2,*3}, 松 崎 政 紀^{*3}ハーバード大学 分子細胞生物学^{*1}, 玉川大学 脳科学研究所^{*2}, 東京大学医学系研究科 細胞分子生理学^{*3}

Two-photon Calcium Imaging of Axons Reveals Thalamocortical Neuronal Dynamics during Motor Learning

Yasuyo H. Tanaka,^{*1,*3} Yasuhiro R. Tanaka^{*2,*3} and Masanori Matsuzaki^{*3}Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University^{*1}Brain Science Institute, Tamagawa University^{*2}Cellular and Molecular Physiology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo^{*3}

概要

本稿では、2光子イメージングを用いた運動学習における脳活動のダイナミクス研究について述べる。運動学習の際、大脳皮質運動野や大脳基底核、小脳など多くの脳領域で様々な神経活動の変化が起こることが知られている。近年、2光子顕微鏡技術の発展により細胞体だけではなく軸索のカルシウムイメージングが可能となり、離れた脳領域からの入力を動物が課題を行っている最中に捉えられるようになった。最近筆者らのグループは運動学習で形成される視床から大脳皮質へのシグナルについてそのダイナミクスを明らかにした。さらに、そのダイナミクス形成には大脳基底核や小脳の活動が必須であることも明らかにした。近年のこの分野の発展と合わせて運動学習の新しい研究アプローチについて考察する。

1. はじめに

バイオリンなどの楽器演奏や、卓球などのスポーツに必要な熟練運動から、パソコンのタイピングやたまねぎのみじん切りのような日常生活の動作に至るまで、繰り返しの練習によりそれらのスキルを獲得できるということを我々は日常的に経験している。このような運動学習による記憶は、無意識下でしばしば長期的に保存され簡単には消失しない。仮に忘れていたとしても最初に獲得した時よりも短い期間での再学習が可能である。動物にとって運動学習は、生きるために最適な行動を効率よく行うための非常に重要な機能の一つであるといえる。では、運動学習中に脳の中では一体何が起きているのであろうか。これまでにfMRIやPETを使ったヒトの研究により、運動学習中には大脳皮質や皮質下の領域で血流量の上昇がみられている^{1–4)}。また、サル電気生理実験により、運動野、小脳、視床な

どの神経活動のパターンが運動学習によって特定のパターンを持つようになることもわかっている^{5–10)}。本稿では近年、急速な技術発展を遂げている2光子顕微鏡を用いた運動学習の研究について焦点をあてる。

2. 2光子イメージングを用いた脳活動測定

2光子顕微鏡技術の発展により、動物が課題を行っているときの神経活動をカルシウムイメージングにより観察できるようになった。神経細胞で活動電位が発生すると、それに伴ってカルシウム濃度上昇が起こる。このカルシウム濃度上昇を蛍光輝度変化に変換するインディケーターを用いることで光学的に神経活動を検出することができる。カルシウムインディケーターとして、当初はカルシウムキレーター由来の合成小分子が用いられていたが¹¹⁾、現在では遺伝的に組み込むことが可能なカルシウムインディケータータンパク質が広く用いられるようになり¹²⁾、観察に適した光学系の開発や測定法の最適化などを行うことで非常に多くの神経細胞の活動を記録することが可能となった。また、タンパク質の持続的かつ安定的な発現により数週間から

^{*1} 16 Divinity Ave, Cambridge, MA 02138, USA^{*2} 〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1^{*3} 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

数か月といった長期間にわたる観察を行うことも可能になり、長期訓練を必要とする学習や学習の安定性についても比較的容易にアプローチすることができるようになった¹³⁾。最近では、2視野同時イメージング¹⁴⁾や視野面積を拡張した対物レンズ¹⁵⁾を用いる、観察視野を高速に移動する¹⁶⁾などの工夫で離れた脳領域同士のイメージングや広視野でのイメージングが可能になっている。

3. 2光子顕微鏡による軸索のカルシウムイメージング

筆者らのグループは、軸索イメージングに焦点をあてて運動学習の研究を行った¹⁷⁾。軸索は1つの神経細胞から伸びる出力線維である。細胞の種類にもよるが、細胞体から出た軸索は髄鞘化により跳躍伝導が実現され、速いものでは100 m/s程度の速さで情報を伝えることができる。視床から大脳皮質に投射する軸索も途中は太い有髄線維であるが、皮質内では細い無髄線維となり、数多く枝分かれし、神経伝達物質をため込んだ小胞が詰まった膨らみが多くみられるようになる。このような部位は軸索ブトンと呼ばれ、多くの場合プレシナプスとして神経伝達物質を放出していると考えられる。軸索を伝わった活動電位は軸索ブトンでもカルシウム濃度上昇を起こす。生体内で軸索の活動電位と軸索ブトンのカルシウム濃度上昇がどの程度関連しているかを直接調べるのは非常に困難であるが、スライスでは電気刺激回数に相関して軸索の輝度が高くなることが確認されたため、軸索ブトンでのカルシウムインディケーター輝度上昇は神経活動と関係していると捉えることができる^{17, 18)}。軸索カルシウムイメージングの利点は、これまで確立している細胞体イメージングの実験状況をほとんど変えずに、観察部位と関連した脳深部の神経活動を調べることができる点である。細胞体イメージングによって脳深部にある神経細胞の活動を調べようと思えば、脳の一部を切除して観察部位を露出する、内視鏡を用いる、より強いレーザーを用いるなど、観察法の大きな変更を迫られる。しかし、視床など大脳皮質表層に軸索を送っている深部構造については、軸索の活動をみれば脳深くに位置する細胞の活動を比較的低侵襲に観察することが可能である^{17, 19)}。これまで電気生理学実験では入力を見る方法として局所フィールド電位 (LFP) の測定が行われてきたが、この方法では入力の総和をみていることになるため、入力元を特定しながら、活動を計測することができなかった。軸索ブトンイメージングは入力を特定しつつ活動をみることができ、しかも空間解像度が高いため、隣を走る軸索の活動の違いまでわかる点が最大の強み

であると思われる。

一方、イメージングの問題点として動物の体動によるアーティファクトが考えられる。軸索は非常に小さい構造であり、その小さな構造を高い解像度を持つイメージングで捉えるという本手法は、宿命的に脳の揺れの影響を大きく受けてしまう。これまでに多く調べられてきた細胞体はマウスの場合でも直径にして10~20 μm 程度あるため、数 μm の上下揺れがあっても観察面から消えてしまう心配はほとんどない。それに対して、軸索ブトンはせいぜい数 μm の大きさを持つ構造である。そのため、脳の上下揺れのせいでブトンがしばしば観察面から消えていってしまう。この問題を解決するため、筆者らは揺れの分を含め、上下方向4 μm おきに3枚の画像を撮るという方策をとった¹⁷⁾。1枚当たりの撮像には10 msほどかかるが、観察面を動かすためにピエゾ素子を用いて対物レンズを動かすことで、100 msで元の平面まで戻るというイメージング条件を確立した。こうして、深さの違う3枚1組の時系列画像を10 Hz程度で記録し、この3枚1組の画像の真ん中の深さにあたる時間平均画像に最も近い像を、揺れている際にも得ることを目標とした。揺れが原因となって、例えば深さ方向に軸索が2 μm ほどずれてしまったとしても、生体の2光子顕微鏡像では点拡散関数が深さ方向に数 μm 伸びていることもあり、記録した3枚の画像を用いた補完によって目標とする画像を得ることができた。実際には各時点で最適な補完パラメーターを見つけるのが難しい問題であるため、逐次モンテカルロ法を用いてパラメーターを探索している。もちろん筆者らの方策が唯一の解決策ではない。手術技術の向上によって、揺れないサンプルを用意し、さらに非線形の揺れ補正を行うなどによって揺れの問題を解析に影響しない程度にしているケースもある²⁰⁾。今後顕微鏡技術が更に発展し走査速度が上がれば厚みのあるポリウムを高速に取得することが可能となり、揺れ補正問題も扱いやすくなると考えられる²¹⁾。筆者らはカルシウム濃度変化に応じて輝度が変わらない赤色蛍光タンパク質を発現させておき、揺れ補正に際してはカルシウムインディケーターの緑色画像と同時に記録した赤色画像を用いて揺れ補正を行った。以下で詳述する視床大脳皮質投射軸索の性質は揺れ補正後の緑色画像から得られたものだが、同程度のアーティファクトを含むと考えられる揺れ補正後の赤色画像からは同様のシグナルは全く観察されなかったため、筆者らの研究においては今回とった方策で十分な揺れ補正が得られていたと考えられる¹⁷⁾。

4. レバー引き課題実行時の運動野における 視床皮質軸索活動のダイナミクス

2 光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより、大脳皮質運動野の神経細胞の活動は運動学習を通してダイナミックに変化することが明らかになっている^{12), 22)}。また、大脳皮質運動野以外にも、大脳基底核と小脳など皮質下構造も運動学習に必須であることが知られている。大脳基底核は脳の深部に位置し複数の神経核から成り、運動の制御、認知機能、動機付け、報酬など様々な機能を担っている。一方、小脳は感覚情報と運動司令を統合し細かい運動の制御に関わっている²³⁾。そのため、大脳基底核および小脳の障害は運動失調および運動障害疾患をもたらす。したがって、運動学習中には脳の様々な領域で大きな変化が起こればと考えられ、運動学習のメカニズム解明には脳の異なる領域間の情報のやり取りを調べるのが一つの重要な観点となる。大脳基底核、小脳からのそれぞれのシグナルは、視床を介して運動野などの大脳皮質に送られる^{24), 25)}。大脳皮質で適切に信号が処理された後、最終的に一次運動野の皮質脊髄投射細胞という神経細胞群が脳の出力を担い、脊髄へとシグナルを送ることで精緻な運動を遂行することができると考えられている。この運動系の経路において視床は非常に重要なハブとして捉えることができるが、これまで運動学習時に大脳基底核や小脳がどのようなシグナルを運動野に送っているかは不明なままであった。そこで筆者らは、視床から運動野へと送られるシグナルについて調べることは運動学習のメカニズムの解明に貢献するところが大いと考え、視床から一次運動野へとシグナルを送る経路に着目した¹⁷⁾。

筆者らは、マウスが自発的にレバーを引き 600 ms 以上レバーを保持できたら報酬として水がもらえるという課題を用いて、先に述べた 2 光子顕微鏡による軸索カルシウムイメージング法で、視床から一次運動野へ投射する視床皮質細胞の軸索ブトンの神経活動を運動学習中に計測した。カルシウム応答タンパク質は GCaMP6f²⁶⁾ を用い、そのタンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスを運動野に投射する視床に注入することで、運動野に投射する視床の軸索ブトンのカルシウム濃度上昇を蛍光輝度値の変化により検出した。運動野における視床皮質軸索は 1, 3, 5, 6 層に多くみられるが、今回は 2 光子顕微鏡で観察が比較的容易な運動野の 1 層と 3 層とで視床皮質軸索ブトン活動をイメージングし、レバー引き中の活動を学習前後で比較した。まず、レバー引き中の 1 層と 3 層の軸索ブトン活動から

レバー引き軌道の予測を行い、その精度を比較してみると、学習を経てどちらも予測精度が高くなった。また、セッション内の活動の再現性も学習を経て高くなった。これは、学習によって軸索ブトン活動がレバー引きの情報を持つようになることを意味する。次に、1 層と 3 層の視床軸索のレバー引き中における活動のダイナミクスについて違いがないか調べた。まず、レバー引き中の軸索ブトンの活動のタイミングについて解析した結果、1 層に入力する軸索ブトンのシグナルはレバー引きの開始時と終了時に強くなり、3 層に入力する軸索ブトンのシグナルはレバー引きの開始時のみに強くなることがわかった。更に、レバー引き中において軸索ブトンが順序よく活動しているようにみられたため、そのシーケンス構造について調べた。その結果、実際にレバー引き時の軸索ブトンの神経活動はシーケンス構造を示すことがわかり、その持続時間は 1 層では長く、3 層では短いことが示された (図 1)。神経活動におけるシーケンス構造の定義には、まだ決定的なものがないが、筆者らはシーケンスの長さを「レバー引き試行の周辺期間で、確率的に観察されるよりも多くのブトンが統計的予測性を保って活動している期間」と定義した。2 つのブトン A, B があるとき、片方のブトン A がもう片方のブトン B の活動に対して統計的予測性を持っているかどうかは、B の活動を予測する式を B の履歴のみから計算した場合と、A と B 両方の履歴を加味して計算した場合を Wald test により比較し決定した (グランジャー的因果)、そのような組み合わせが予測性をランダムに持ち得る期待値を一定の有意水準の元で別に求めて、実際の観察数が期待値を大きく上回っている期間をシーケンス長さとして用いている。ここまで示された 1 層と 3 層の軸索ブトンの活動のダイナミクスは、個体の行動の何を表象しているのであろうか。この問題に答えるために、軸索ブトンの活動とレバー引き行動との関係を調べた。各層の神経活動の特徴から行動を説明する統計モデルを立て、どの神経活動の特徴が最適なモデルを立てるために選ばれたかを調べた。統計モデルには一般化線形モデルを用い、モデル選択には赤池情報量基準を用いた。モデル自体に意味があるかどうかは、学習段階の違い (初期/後期) のみから行動を説明するモデルに対して有意かどうかを判定している。すると、1 層に入力する軸索ブトンのシグナルはレバー引きの速度や引き時間の長さ、軌道の安定性、3 層に入力する軸索ブトンのシグナルはレバー引きの成功率と関係していることが明らかになった (図 1)。

図1 レバー引き学習を通して現れる視床皮質軸索活動のダイナミクス。学習が進むと視床から大脳皮質1次運動野にレバー引きに関連したシグナルが送られるようになる(文献17より一部修正して転載)。

5. 視床皮質軸索ダイナミクス形成における大脳基底核と小脳の寄与

今回の研究で示された1層と3層の軸索ブトンのダイナミクスは、どのような回路によって生み出されているのであろうか。運動性視床核は大脳基底核、小脳からの入力を強く受けることがわかっているため、それらの領域と視床皮質軸索とのつながりを明らかにするために、筆者らは次に大脳基底核の出力を担う黒質網様部、または小脳核の神経細胞をチャンネルロドプシン2による光刺激で興奮させたときの、視床皮質軸索ブトンの応答性をみた。その結果、黒質網様部を刺激したときは1層の軸索ブトンが3層の軸索ブトンよりも高率に応答し、小脳核を刺激したときは3層の軸索ブトンが1層の軸索ブトンよりも高率に反応した(図1)。これは、解剖の結果とも矛盾しない結果であった²⁷⁾。次に筆者らは、レバー引き運動学習における大脳基底核系と小脳系の寄与について調べるために、線条体または小脳核を破壊したマウスを作製し、レバー引き課題を行わせ、そのときの視床軸索ブトン活動を2光子イメージングにより計測した。どちらを破壊したマウスでも学習による成功率の上昇は阻害された。しかし、その阻害のされ方は互いに異なり、小脳破壊マウス群では学習初期では正常マウス群と変わらなかったものの、学習後期で成功率の上昇は正常マウス群よりも低かった。それに対し、線条体破壊マウス群では学習初期から成功率は損なわれ、後期になっても正常マウス群には及ばなかった。更に筆者らは、これらの破壊マウスにおいて視床皮質軸索ブトン活動のダイナミクスを、2光子顕微鏡を用いて調べた。すると、1層と3層

の両方で正常マウス群にみられたような際立った特徴は現れなかった。この際、相関係数と引き時間の情報を基に、ある程度似た成功トライアルのみを集めて破壊時と正常時の神経活動の比較解析を行った。つまり、行動は似ているにもかかわらず、破壊時にはシグナルが現れないということの意味する。このことから、レバー引き運動学習を通して軸索ブトンのダイナミクスが現れるには、大脳基底核と小脳の両方の活動を必要とすることがわかった。これらの結果は、前述した大脳基底核-視床-大脳皮質運動野と小脳-視床-大脳皮質運動野の経路において、運動野1層は大脳基底核優位な経路で、3層は小脳優位な経路であるという解剖学や生理学実験の結果と一見矛盾するものであった。そこで筆者らは学習中における神経回路の相互作用の考えに至った。

6. 大脳基底核系と小脳系の相互作用

上述した結果より、1層の視床軸索活動は大脳基底核から、3層の視床軸索活動は小脳からの影響をそれぞれ強く受けることがわかったが、大脳基底核と小脳のどちらかが破壊されれば両方のシグナルが消えることから、学習を通して互いのシグナル形成に影響を及ぼし合っていると考えられた。運動学習中の大脳基底核と小脳からのシグナルは、それぞれ視床を介して大脳皮質運動野へ入力する。大脳皮質運動野はまさに大脳基底核系と小脳系の情報を統合する場であり、大脳皮質運動野でどのように2つの情報が統合されるのかは非常に重要な問題である。大脳皮質運動野の1層に送られる情報は先端樹状突起や1層の抑制性神経細胞に入り、3層に送られる情報は抑制性神経細胞や興奮

図2 運動学習の際、重要であると示唆される神経回路。今回の筆者らの研究により、黒色の矢印がそのときに主に使われると考えられる経路である。灰色の矢印は、まだ調べられていない、もしくは黒色に比べて貢献度が低いと考えられたものである（文献 17 より一部修正して転載）。

性神経細胞の細胞体周辺および樹状突起に入る。大脳皮質運動野局所回路で計算された情報は、その後脊髄へ出力されると同時に再び大脳基底核と小脳に送られる。そしてまた、それぞれのシグナルが視床を通して大脳皮質運動野へと送られる（図2）。このようにして形成されるループ構造は繰り返しの訓練により外界から修飾を受け、更に脳内の相互作用を通して次第に際立った特徴を持つシグナルを形成していくと考えられる。そして、それらのシグナルが最終的にそれぞれの役割を担うようになって運動スキルは習得されると考えられる。このように、大脳基底核系と小脳系が独立して特定の機能を実現しているというよりも、両方向性に作用して様々な機能を実現しているという考え方は、基礎と臨床の両方で近年重要視されるようになってきた^{28, 29)}。大脳基底核系と小脳系のネットワークが混じり合う経路として、解剖学的あるいは機能的にはこれまで大脳皮質だけではなく小脳核から視床を介して線条体へ投射する経路や、視床下核から橋核を介して小脳核に投射する経路³⁰⁻³²⁾が知られていたが、更に最近では小脳核からドーパミン細胞が存在する腹側被蓋野への直接投射が報告されており、この経路は社会性にかかわることが明らかになった³³⁾。大脳基底核

のネットワークと小脳のネットワークがどのように相互作用して機能を実現しているかを明らかにすることは、運動のメカニズムの解明や病態の理解に向けて、今後非常に重要性が増すと考えている。また、今回の研究では、線条体破壊マウス群および視床破壊マウス群は学習の初期から成績が悪く、学習自体もわずかしかなかった。また、小脳核破壊マウス群および大脳皮質運動野破壊マウス群は学習の初期は正常マウス群と変わらないが、学習が損なわれ学習後期で正常マウス群よりも成績が低いという結果であった¹⁷⁾。このことから、学習初期の運動の実行には大脳基底核系や視床などの皮質下構造が重要であることが示唆され、学習中に、大脳基底核-視床-大脳皮質運動野と小脳視床-大脳皮質運動野の大脳皮質を通る経路が重要になってくると考えられる（図2）。

7. おわりに

筆者らは視床皮質軸索ブトンを2光子カルシウムイメージングにより観察し、運動学習中に現れる活動パターンが観察する層ごとに違い、大脳基底核や小脳の活動の影響を受けることを明らかにした。また2光子カルシウムイメージングと離れた脳領域の光刺激を組

み合わせることで機能的な回路の同定も行った。今後イメージングを用いた運動学習における神経回路研究はどのように進んでいくのだろうか。

いわゆるシステム神経科学のアプローチには、神経活動をどのように記録するか、動物の行動をどのように記録するか、その2つをどのように結びつけるかといった3つの要素を考えることができる。この3要素からイメージングを用いた運動学習における神経回路研究の新展開を捉えると、イメージング技術の発展、運動学習中の動物の動きのトラッキング技術の勃興、機械学習を用いた解析技術の成熟となるだろう。

まず神経活動を記録するイメージング技術の発展であるが、内視鏡を用いた2光子イメージングによるフリームービング下での軸索・樹状突起イメージングが今後出てくるだろう³⁴⁾。しかし、フリームービング下のイメージングは動きによるアーティファクトが大きい可能性もあるため今後も揺れを抑える、あるいは無効化する努力が必要となる。また、今後注目すべき技術として、遺伝的に制御可能な *in vivo* 膜電位イメージングの開発が進んでいる³⁵⁾。完全に遺伝子のみで制御できる高コントラストの膜電位イメージングが実現され、現在のカルシウムインディケータのように普及すれば、多くの研究室で多数の神経活動を1活動電位のレベルでイメージングできるようになるだろう。この際の問題は2光子顕微鏡が走査顕微鏡であり、1ピクセルごとに記録していかなければならないために生じてくる時間解像度の低さであるが、画像の事前情報とトモグラフィによる画像再構築を用いることで、1 KHz/frame を実現する撮像技術も出てきている³⁶⁾。

次に、運動学習中の動物行動のトラッキング技術について述べる。動画からのポーズ抽出は画像解析の一種であり畳み込みニューラルネットワークとの相性が良い。すでに残差ネットワークを用いて開発されていた人間用のポーズ検出技術を応用し神経科学業界に衝撃をもたらした DeepLabCut³⁷⁾ をはじめとして、3D など様々なシステム上で動物の動きを自動的にトラッキングできる技術が出てきている^{38, 39)}。行動シークエンスの解析についても、これまで人手で行うと多大な労力を要したものが、人工知能技術のアシストによって、かなり少ない手間で行えるようになってきている⁴⁰⁾。

最後に解析技術だが、行動のデータも神経活動のデータも動画として取られるようになっており、これらのデータを様々に変換して関係性をみていくことになる。行動データは上述のように、深層学習により軌道情報を抽出する、あるいはPCAなどの次元圧縮によって動画内に含まれる主な動きを抽出するといった解析が

行われている。イメージングデータに対してはまず関心領域 (ROI) 取りが行われる。CNMF 法などの計算量を必要とする方法により精度を上げてきたが⁴¹⁾、近年は膨大化するデータに対応するためにできるだけ計算量を節約した方法も模索されている^{42, 43)}。神経生理学のデータが本格的にビッグデータ化し、データ量や解析における計算量の最適化も解析法を選択する上で重要な視点となってきている⁴⁴⁾。神経データと行動の関連付けという観点からは、機械学習を応用して神経活動と行動の統計的依存性を定式化するエンコーディングおよびデコーディングと呼ばれる解析法が成果を上げてきた⁴⁵⁾。この方法は脳に情報が保持されていることを確率の言葉で定量することができるため、運動学習中の変化をみていくうえで今後も有用だろう。また、1層視床軸索の活動に観察されるように、一連の運動は脳の中で細胞集団のダイナミクスとして連続的に表現されている可能性がある。最近、リカレントネットワークを用いたオートエンコーダーによって神経活動を学習し、リカレントユニットに抽出されたダイナミクスを調べる、学習後のリカレントユニットの線形結合を用いてデコーディングを行う、などの試みがなされている⁴⁶⁾。運動学習の過程で、運動時の各領域の神経ダイナミクスがどのように変化していき、それらのダイナミクスがどのように運動そのものと関連するか、また病的状態ではその関連がどのように破綻するのか。技術革新の総合により、1細胞解像度のデータに基づく哺乳類脳回路のダイナミカルな性質と動物個体の運動が実験的に結びつきつつある。

参 考 文 献

- 1) Jueptner, M., Weiller, C. (1998): A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movement as revealed by functional imaging studies, *Brain*, Vol.121, No.8, pp.1437–1449.
- 2) Ungerleider, L.G., Doyon, J., Karni, A. (2002): Imaging brain plasticity during motor skill learning, *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol.78, No.3, pp.553–564.
- 3) Halsband, U., Lange, R.K. (2006): Motor learning in man: A review of functional and clinical studies, *Journal of Physiology Paris*, Vol.99, Nos.4–6, pp.414–424.
- 4) Dayan, E., Cohen, L.G. (2011): Neuroplasticity subserving motor skill learning, *Neuron*, Vol.72, No.3, pp.443–454.
- 5) Evarts, E.V. (1973): Motor Cortex Reflexes Associated with Learned Movement, *American Association for the Advancement of Science*

- Stable, URL: <http://www.jstor.org/stable/1735616> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article: You may need, Vol.179, No.4072, pp.501–503.
- 6) Gilbert, P.F.C., Thach, W.T. (1977): Purkinje cell activity during motor learning, *Brain Research*, Vol.128, No.2, pp.309–328.
 - 7) Nambu, A., Yoshida, S., Jinnai, K. (1991): Movement-related activity of thalamic neurons with input from the globus pallidus and projection to the motor cortex in the monkey, *Experimental brain research, Experimentelle Hirnforschung, Experimentation Cerebrale*, Vol.84, No.2, pp.279–284.
 - 8) Van Donkelaar, P., Stein, J.F., Passingham, R.E., Miall, R.C. (2000): Temporary inactivation in the primate motor thalamus during visually triggered and internally generated limb movements, *Journal of Neurophysiology*, Vol.83, No.5, pp.2780–2790.
 - 9) Li, C.S.R., Padoa-Schioppa, C., Bizzi, E. (2001): Neuronal correlates of motor performance and motor learning in the primary motor cortex of monkeys adapting to an external force field, *Neuron*, Vol.30, No.2, pp.593–607.
 - 10) Vyas, S., Even-Chen, N., Stavisky, S.D., Ryu, S.I., Nuyujukian, P., Shenoy, K.V. (2018): Neural population dynamics underlying motor learning transfer, *Neuron*, Vol.97, No.5, pp.1177–1186.e3.
 - 11) Hira, R., Ohkubo, F., Ozawa, K., Isomura, Y., Kitamura, K., Kano, M., Kasai, H., Matsuzaki, M. (2013): Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement, *Journal of Neuroscience*, Vol.33, No.4, pp.1377–1390.
 - 12) Masamizu, Y., Tanaka, Y.R., Tanaka, Y.H., Hira, R., Ohkubo, F., Kitamura, K., Isomura, Y., Okada, T., Matsuzaki, M. (2014): Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task, *Nature Neuroscience*, Vol.17, No.7, pp.987–994.
 - 13) Sadakane, O., Masamizu, Y., Watakabe, A., Terada, S.I., Ohtsuka, M., Takaji, M., Mizukami, H., Ozawa, K., Kawasaki, H., Matsuzaki, M., Yamamori, T. (2015): Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates, *Cell Reports*, Vol.13, No.9, pp.1989–1999.
 - 14) Wagner, M.J., Kim, T.H., Kadmon, J., Nguyen, N.D., Ganguli, S., Schnitzer, M.J., Luo, L. (2019): Shared cortex-cerebellum dynamics in the execution and learning of a motor task, *Cell*, Vol.177, No.3, pp.669–682.e24.
 - 15) Stirman, J.N., Smith, I.T., Kudenov, M.W., Smith, S.L. (2016): Wide field-of-view, multi-region, two-photon imaging of neuronal activity in the mammalian brain, *Nature Biotechnology*, Vol.34, No.8, pp.857–862.
 - 16) Terada, S.I., Kobayashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., Matsuzaki, M. (2018): Super-wide-field two-photon imaging with a micro-optical device moving in post-objective space, *Nature Communications*, Vol.9, No.1, p.3550.
 - 17) Tanaka, Y.H., Tanaka, Y.R., Kondo, M., Terada, S.I., Kawaguchi, Y., Matsuzaki, M. (2018): Thalamocortical axonal activity in motor cortex exhibits layer-specific dynamics during motor learning, *Neuron*, Vol.100, No.1, pp.244–258.e12.
 - 18) Petreanu, L., Gutnisky, D.A., Huber, D., Xu, N.L., Oconnor, D.H., Tian, L., Looger, L., Svoboda, K. (2012): Activity in motor-sensory projections reveals distributed coding in somatosensation, *Nature*, Vol.489, No.7415, pp.299–303.
 - 19) Yoshida, E., Terada, S.I., Tanaka, Y.H., Kobayashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., Matsuzaki, M. (2018): In vivo wide-field calcium imaging of mouse thalamocortical synapses with an 8 K ultra-high-definition camera, *Scientific Reports*, Vol.8, No.1, p.8324.
 - 20) Driscoll, L.N., Pettit, N.L., Minderer, M., Chettih, S.N., Harvey, C.D. (2017): Dynamic reorganization of neuronal activity patterns in parietal cortex, *Cell*, Vol.170, No.5, pp.986–999.e16.
 - 21) Ji, N., Freeman, J., Smith, S.L. (2016): Technologies for imaging neural activity in large volumes, *Nature Neuroscience*, Vol.19, No.9, pp.1154–1164.
 - 22) Peters, A.J., Chen, S.X., Komiyama, T. (2014): Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning, *Nature*, Vol.510, No.7504, pp.263–267.
 - 23) Hikosaka, O., Nakahara, H., Rand, M.K., Sakai, K., Lu, X., Nakamura, K., Miyachi, S., Doya, K. (1999): Parallel neural networks for learning sequential procedures, *Trends in Neurosciences*, Vol.22, No.10, pp.464–471.
 - 24) Houk, J.C., Wise, S.P. (1995): Feature article: Distributed modular architectures linking basal ganglia, cerebellum, and cerebral cortex: Their role in planning and controlling action, *Cerebral Cortex*, Vol.5, No.2, pp.95–110.
 - 25) Middleton, F.A., Strick, P.L. (2000): Basal

- ganglia and cerebellar loops: Motor and cognitive circuits, *Brain Research Reviews*, Vol.31, Nos.2–3, pp.236–250.
- 26) Chen, T.W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L.L., Svoboda, K., Kim, D.S. (2013): Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity, *Nature*, Vol.499, No.7458, pp.295–300.
 - 27) Kaneko, T. (2013): Local connections of excitatory neurons in motor-associated cortical areas of the rat, *Frontiers in Neural Circuits*, Vol.7, No. May, pp.1–17.
 - 28) Caligiore, D., Pezzulo, G., Baldassarre, G., Bostan, A.C., Strick, P.L., Doya, K., Helmich, R.C., Dirksen, M., Houk, J., Jörntell, H., Lago-Rodriguez, A., Galea, J.M., Miall, R.C., Popa, T., Kishore, A., Verschure, P.F.M.J., Zucca, R., Herreros, I. (2017): Consensus paper: towards a systems-level view of cerebellar function: the interplay between cerebellum, Basal Ganglia, and Cortex, *Cerebellum*, Vol.16, No.1, pp.203–229.
 - 29) Bostan, A.C., Strick, P.L. (2018): The basal ganglia and the cerebellum: Nodes in an integrated network, *Nature Reviews Neuroscience*, Vol.19, No.6, pp.338–350.
 - 30) Ichinohe, N., Mori, F., Shoumura, K. (2000): A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat, *Brain Research*, Vol.880, Issues 1–2, pp.191–197.
 - 31) Hoshi, E., Tremblay, L., Féger, J., Carras, P.L., Strick, P.L. (2005): The cerebellum communicates with the basal ganglia, *Nature Neuroscience*, Vol.8, No.11, pp.1491–1493.
 - 32) Calderon, D.P., Fremont, R., Kraenzlin, F., Khodakhah, K. (2011): The neural substrates of rapid-onset Dystonia-Parkinsonism, *Nature Neuroscience*, Vol.14, No.3, pp.357–365.
 - 33) Carta, I., Chen, C.H., Schott, A.L., Dorizan, S., Khodakhah, K. (2019): Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior, *Science*, Vol.363, No.6424, p.eaav0581.
 - 34) Wallace, D.J., Kerr, J.N.D. (2019): Circuit interrogation in freely moving animals, *Nature Methods*, Vol.16, No.1, pp.9–11.
 - 35) Fan, L.Z., Kheifets, S., Böhm, U.L., Wu, H., Piatkevich, K.D., Xie, M.E., Parot, V., Ha, Y., Evans, K.E., Boyden, E.S., Takesian, A.E., Cohen, A.E. (2020): All-optical electrophysiology reveals the role of lateral inhibition in sensory processing in cortical layer 1, *Cell*, Vol.180, No.3, pp.521–535.e18.
 - 36) Kazemipour, A., Novak, O., Flickinger, D., Marvin, J.S., Abdelfattah, A.S., King, J., Borden, P.M., Kim, J.J., Al-Abdullatif, S.H., Deal, P.E., Miller, E.W., Schreier, E.R., Druckmann, S., Svoboda, K., Looger, L.L., Podgorski, K. (2019): Kilohertz frame-rate two-photon tomography, *Nature Methods*, Vol.16, No.8, pp.778–786.
 - 37) Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M., Abe, T., Murthy, V.N., Mathis, M.W., Bethge, M. (2018): DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning, *Nature Neuroscience*, Vol.21, No.9, pp.1281–1289.
 - 38) Nakamura, T., Matsumoto, J., Nishimaru, H., Bretas, R.V., Takamura, Y., Hori, E., Ono, T., Nishijo, H. (2016): A markerless 3D computerized motion capture system incorporating a skeleton model for monkeys, *PLoS ONE*, Vol.11, No.11, pp.1–18.
 - 39) Sheshadri, S., Dann, B., Hueser, T., Scherberger, H. (2020): 3D reconstruction toolbox for behavior tracked with multiple cameras, *Journal of Open Source Software*, Vol.5, No.45, p.1849.
 - 40) Markowitz, J.E., Gillis, W.F., Beron, C.C., Neufeld, S.Q., Robertson, K., Bhagat, N.D., Peterson, R.E., Peterson, E., Hyun, M., Linderman, S.W., Sabatini, B.L., Datta, S.R. (2018): The Striatum organizes 3D behavior via moment-to-moment action selection, *Cell*, Vol.174, No.1, pp.44–58.e17.
 - 41) Pnevmatikakis, E.A., Soudry, D., Gao, Y., Machado, T.A., Merel, J., Pfau, D., Reardon, T., Mu, Y., Lacefield, C., Yang, W., Ahrens, M., Bruno, R., Jessell, T.M., Peterka, D.S., Yuste, R., Paninski, L. (2016): Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data, *Neuron*, Vol.89, No.2, p.285.
 - 42) Berens, P., Freeman, J., Deneux, T., Cherkov, N., McColgan, T., Speiser, A., Macke, J.H., Turaga, S.C., Mineault, P., Rupprecht, P., Gerhard, S., Friedrich, R.W., Friedrich, J., Paninski, L., Pachitariu, M., Harris, K.D., Bolte, B., Machado, T.A., Ringach, D., Stone, J., Rogerson, L.E., Sofroniew, N.J., Reimer, J., Froudarakis, E., Euler, T., Román Rosón, M., Theis, L., Tolias, A.S., Bethge, M. (2018): Community-based benchmarking improves spike rate inference from two-photon calcium imaging data, *PLoS Computational Biology*, Vol.14, No.5, pp.1–13.
 - 43) Pachitariu, M., Stringer, C., Harris, K.D.

- (2018): Robustness of spike deconvolution for neuronal calcium imaging, *Journal of Neuroscience*, Vol.38, No.37, pp.7976–7985.
- 44) Friedrich, J., Yang, W., Soudry, D., Mu, Y., Ahrens, M., Yuste, R., Peterka, D., Paninski, L. (2017): Multi-scale approaches for high-speed imaging and analysis of large neural populations, *PLoS Computational Biology*, Vol.13, No.8, p.e1005685.
- 45) Runyan, C.A., Piasini, E., Panzeri, S., Harvey, C.D. (2017): Distinct timescales of population coding across cortex, *Nature*, Vol.548, No.7665, pp.92–96.
- 46) Pandarinath, C., O’Shea, D.J., Collins, J., Jozefowicz, R., Stavisky, S.D., Kao, J.C., Trautmann, E.M., Kaufman, M.T., Ryu, S.I., Hochberg, L.R., Henderson, J.M., Shenoy, K.V., Abbott, L.F., Sussillo, D. (2018): Inferring single-trial neural population dynamics using sequential auto-encoders, *Nature Methods*, Vol.15, No.10, pp.805–815.