

「脳を創る」

平成10年度採択研究代表者

永雄 総一

(自治医科大学医学部生理学神経脳生理 助教授)

### 「運動の学習制御における小脳機能の解明」

#### 1. 研究実施の概要

小脳皮質の神経伝達可塑性「長期抑圧」と運動学習の因果関係を実証できる実験パラダイムを、眼球運動（滑動性眼球運動、サッカード、輻輳運動）や四肢の運動や自律系を用いて作成した。それらを用いて、短期の運動学習の原因が小脳の長期抑圧であることを直接的に示す実験的根拠を提出した。また運動学習の記憶形成の神経機構、実際に関与する活性物質の候補を実験的に検索した。また小脳による学習と大脳などの他の脳部位による学習との連関を推定できるパラダイムを開発し、神経薬理や系統解剖を用いて学習の具体的な生成過程を推定した。

#### 2. 研究実施内容

永雄のグループは、数時間で生じる短期運動学習と数日から週の単位で生じる長期の運動学習の神経過程を分離して評価できる実験パラダイムを作成し、それを用いて短期運動学習と長期の運動学習の記憶痕跡が小脳を含む神経回路内にそれぞれ別の部位に貯蔵されていることを示す根拠を見出した。マウスに1日1時間、縞のスクリーンの正弦波状の回転を持続的に見せることにより視運動性トレーニングを行うと、視機性眼球反応(OKR)と呼ばれる眼球反射に短期の適応が生じ利得（眼とスクリーンの動きの比）が0.1程増加した。この利得の増加は、マウスを真っ暗にしたホームケージに戻しておくと24時間以内に消失したが、4-5日にわたって1日1時間のトレーニングを毎日おこなうと、長期の利得の学習が生じ最終日のトレーニング開始前の利得は初日の利得に比べて0.3近く増加していた。このあと1時間のトレーニングを行うと、短期の学習がおこりさらに利得は増加した。また同時に前庭総動眼反射の利得にも同様な増加が見られた。トレーニング終了後通常の飼育の条件に戻すと、長期学習による利得の変化はゆっくりと回復し2-3週間後にほぼもとの状態にもどった。次に、短期と長期の学習の記憶の貯蔵部位を同定するために、最終日の1時間のトレーニングが終了し利得が最大に上昇した後に、両側小脳片葉に局所麻酔薬（5%リドカイン液）を微小注入に小脳片葉のシャットダウンを行った。すると直ちにその日の短期の学習によって生じた利得の増加は消失したが、4日間のトレーニングの結果生じた長期の学習で増加した利得にはまったく影響がなかった。この実験結果は、時間単

位で生じる短期の学習の記憶は小脳皮質（片葉）に貯えられているが、4-5日の長期運動学習の記憶は小脳皮質以外の部位に貯えられていることを示唆する。視機性眼球反応と前庭動眼反射の神経回路はともに同定されており、片葉と前庭神経核が両眼球運動の回路のオーバーラップする場であることが知られている。従ってこの実験結果は、数時間の単位でおこる運動学習は小脳皮質の神経回路の可塑性で生じ、数日-週の単位で生じる運動学習は前庭核の神経活動の変化で生じることを示唆する。これらの結果は運動学習における小脳の役割に関する論争にとって大きな意義があると考えられる。

永雄の研究グループは、大脳と小脳の共同作業によって実現する随意運動制御における小脳の役割について新しい知見を得た。小脳第半球第7小葉は、滑動性追跡眼球運動やサッケード眼球運動に関与する領域を含む対側の前頭眼野からの入力を橋核経由で受け取り、眼球運動に関与する領域を含む同側の小脳核（前中位核、歯状核）部位に出力する（Xiong, Hiramatsu & Nagao, 2002）。2頭の猿を用いて、一側の小脳半球第7小葉を破壊し眼球運動に及ぼす影響を調べた。第7小葉の外側を破壊した場合には、滑動性追跡眼球運動の速度非依存性の利得の30%程度の低下とサッケード運動開始時間の遅れが見られたが、視標の速度の加速に対する滑動性追跡眼球運動の短期の運動学習には変化はなかった。一方、第7小葉の内側を破壊した場合には、滑動性追跡眼球運動は速度依存性に利得が最大50%程度低下するとともに、視標の速度の加速に対する滑動性追跡眼球運動の短期の運動学習は50%程度に減弱した。これらの結果は、昨年度報告した一側の前頭眼野の滑動性追跡眼球運動関連領域のムシモールによる不活化の効果--不活化した前頭眼野と同側及び対側に向かう滑動性追跡眼球運動の利得が40%程度低下し、対側方向の短期運動学習の消失する--に対応しており、第7小葉の内側の領域が滑動性追跡眼球運動の適応制御の場であることを示唆する。

滑動性追跡眼球運動に関与するもう1つの領域として、第7小葉に隣接する傍虫部が重要であることが、板東のグループの高木らの損傷実験(2000)によって示されている。永雄と山田のグループは共同で、アカゲザルを用いて傍虫部の入出力の特徴を解剖学的に調べた。傍虫部と前頭眼野、頭頂眼球運動連合野MT/MSTとの結合関係を比較したが、前者からは橋核を経由した強力な投射が見られたが、後者からの投射は微弱であることがわかった。傍虫部を破壊することによって、滑動性追跡眼球運動の利得と短期運動学習がともに約50%低下することが高木らによって報告されており、第7小葉と傍虫部がともに前頭眼野で生成された滑動性追跡眼球運動の運動指令を修飾することによりこの眼球運動が適応制御されていることを示唆する。

永雄と糸原のグループは利根川らのグループによって作成されたCキナーゼ $\gamma$ サブタイプ遺伝子ノックアウトマウスを用いて実験を行い、眼球運動の短期運動学習の発現に直接関与するのは $\alpha$ サブタイプであり、小脳のプルキンエ細胞に特異的に発現している $\gamma$ サブタイプは、学習の条件設定に関与していることを示した（Eur. J. Neurosci., 2003 in press）。

藤田のグループは、文脈依存性の運動学習と熟練運動の認知的キューによる瞬時切り

替えの獲得についての行動実験をすすめて、運動モデルを拡張し、運動の重要なキーとなるシンボルの起源について考察した。文脈依存性の運動学習に関与する小脳の関係部位の同定を、f-MRIを用いて試みた。疲労の選択的適応という所見から、サッケードにおいて適応が絶えず（分刻みで）日常生活にも進行していることを示す予備的データを得た。また学習のもととなる誤差情報について2つの新しい所見を得た。①経路描写による視覚と四肢運動の統合において、誤差の提示を500 ms以上遅らせると学習が困難になることを見出した。この時間差は、サッケードの遅延適応と同じタイムスケールであり、両者の学習機構が基本的には同じあることを示唆する。②プリズム適応を誘導する誤差情報について、運動直後の視覚情報が必須でないという結果が得られた。

板東らのグループはネコを用いて、視標接近の4秒前に予告信号を与える輻輳の条件反射付けを行ったが、約1ヶ月の訓練で視標接近に最大約300msec先行する予測性輻輳運動が引き起こされた。そのときにMT野に相当する大脳頭頂連合野輻輳運動（LS）領域にGABAアゴニストを脳内局所微量注入し不活化したところ、視覚性輻輳運動は減弱したが、予測性輻輳運動は残存した。しかし、電気凝固法によるLS破壊では両運動ともに減弱した。この結果は、LSは視覚性と予測性の両輻輳運動に関与するが、具体的な神経回路は異なることを示唆する。

糸原グループは、運動の学習制御における小脳神経回路の役割を明らかにする目的で、プルキンエ細胞の遺伝学的破壊システムを、マウスを用いて作成した。脂溶性リガンドRU486依存的にCre組み換え酵素が活性化されようになると、プルキンエ細胞でジフテリア毒素Aフラグメントの発現が誘導され、その細胞は死滅するようになる。リガンド投与量とプルキンエ細胞の消失度に正の相関が有ることを確認し、瞬目条件反射学習の学習獲得期および学習成立後にプルキンエ細胞を破壊した。結果は、プルキンエ細胞は学習の獲得のみならず記憶の発現にも重要な役割を果たす事が示唆した。しかしながら、現在のシステムでは、プルキンエ細胞以外の細胞でも低レベルながら細胞死が生じているので、結果の評価は慎重にする必要があると解釈している。並行して、瞬目条件反射学習に伴って、小脳深部核で発現レベルが変化する遺伝子を探索した。

山口のグループは、小脳プルキンエ細胞のスパインシナプスの長期抑圧に伴って、シナプス表面に存在しているグルタミン酸受容体（GluR）がエンドサイトーシスによって内在化されることを、免疫細胞化学的手法により初めて可視化した。GluRはプルキンエ細胞スパイン表面へ破傷風毒素感受性の輸送によってエクソサイトーシスされ、GTPの加水分解に依存してエンドサイトーシスされることを示した。これらの結果から、エクソ/エンドサイトーシスの平衡により、Glu Rのシナプス表在が制御されていることが示唆された。

柳原のグループは、マウスを材料として、条件刺激として音刺激、無条件刺激として侵害刺激の呈示を組み合わせ、数秒間の音刺激呈示中に漸進的に心拍数が低下する徐脈（条件付け徐脈）の神経機構を調べた。この条件付け徐脈は小脳虫部の破壊により減弱する。グルタミン酸受容体の阻害薬NBQXを意図した時期に適量投与することにより、可逆的に小脳皮質の神経活動を抑えることができることを用いて、条件付け徐脈に対する小脳皮

質虫部の役割を調べた。条件付け徐脈反応は、NBQXが投与された日の試行においてのみ消失した。この結果から、心拍条件付け徐脈の発現に小脳皮質のAMPA型グルタミン酸受容体の活性化が関与していることが示唆された。

### 3. 研究実施体制

#### 永雄グループ

- ① 研究分担グループ長：永雄 総一（自治医科大学医学部、助教授）
- ② 研究項目：眼球運動学習制御と小脳機能

#### 藤田グループ

- ① 研究分担グループ長：藤田 昌彦（法政大学工学部、教授）
- ② 研究項目：人間の運動学習の行動及び理論的研究

#### 板東グループ

- ① 研究分担グループ長：板東 武彦（新潟大学医学部、教授（副学長））
- ② 研究項目：輻輳眼球運動調節の神経機構

#### 糸原グループ

- ① 研究分担グループ長：糸原 重美（理化学研究所脳科学研究センター、チームリーダー）
- ② 研究項目：遺伝子ノックアウトマウスを用いた小脳の運動学習の研究

#### 山口グループ

- ① 研究分担グループ長：山口 和彦（理化学研究所脳科学研究センター、副チームリーダー）
- ② 研究項目：小脳のシナプス伝達機構の電気生理学的研究

#### 柳原グループ

- ① 研究分担グループ長：柳原 大（豊橋技術科学大学、助教授）
- ② 研究項目：自律神経系制御における小脳の役割

#### 山田グループ

- ① 研究分担グループ長：山田 仁三（東京医科大学、教授）
- ② 研究項目：眼球運動神経回路の解剖学的研究

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文（原著論文）発表

- Shutoh F, Katoh A, Kitazawa H, Aiba A, Itohara S, Nagao S. Loss of adaptability of horizontal optokinetic response eye movements in *mGluRI* mutant mice. *Neurosci. Res.* 42: 141-145, 2002.
- Xiong G, Hiramatsu T, Nagao S Corticopontocerebellar pathway from the prearcuate region to hemispheric lobule VII of the cerebellum: An anterograde and retrograde tracing study in the monkey. *Neurosci Lett*

322:173-176, 2002.

- Xiong G, Nagao S. The Lobulus Petrosus of Monkey Paraflocculus Relays Visual Inputs to the Cerebellar Nuclear Complex, an Anterograde and Retrograde Tracing Study. *Exp. Brain Res.* 147:252-263, 2002.
- Fujita M, Amagai A, Minakawa F, Aoki M. Selective and delay adaptation of human saccades, *Cognitive Brain Res.* 13: 41-52, 2002.
- Ando T, Tanaka A, Fukasaku S, Takada R, Okada M, Ukai K, Shizuka K, Oyamada H, Toda H, Taniyama T, Usui T, Yoshizawa M, Kiryu T, Takagi M, Saida S, Bando T. Pupillary and cardiovascular response to a video movie in senior human subjects. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 97: 129-135, 2002.
- Kojima M, Shioiri T, Hosoki T, Sakai M, Bando T, Someya T. Blink rate variability in patients with panic disorder: new trial using audiovisual stimulation. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 56:545-549, 2002.
- Hayakawa Y, Nakajima T, Takagi M, Fukuhara N, Abe H. Human cerebellar activation in relation to saccadic eye movements: A functional magnetic resonance imaging study. *Ophthalmologica* 216:399-405, 2002.
- Yamaguchi K, Tanaka M, Mizoguchi A, Hirata Y, Ishizaki H, Kaneko K, Miyoshi J, Takai Y. A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small Gprotein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14536-14541, 2002.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）