

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 : 小脳による学習機構についての包括的研究

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者:

平野 丈夫 (京都大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者:

黒田 真也 (東京大学大学院理学系研究科 教授)

船曳 和雄 (大阪バイオサイエンス研究所システムズ研究部門 副部長)

横井 峰人 (京都大学大学院医学研究科 助授 ~H20年3月)

亀山 仁彦 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門 室長~H18年3月)

3. 研究内容及び成果

(1) 研究課題全体の成果概要

本研究では、分子・細胞・組織・個体の各レベルでの研究を関連付け、小脳による学習機構の全体の仕組みを包括的に解明することを目指した。具体的には、(A)学習の基盤と考えられるシナプス可塑性の発現・維持・制御の分子機構解明と、(B)シナプス可塑性が小脳神経回路における情報処理および個体の運動制御・学習においていかなる役割を果たしているか、を明らかにすることを目標とした。本研究では電気生理学・分子生物学・細胞生物学・生化学・生細胞でのイメージング・行動解析・コンピューターシミュレーションなど多くの研究手法を組み合わせることで解析を実施し、小脳プルキンエ細胞上のシナプスで起こる可塑性の精緻な制御機構を明らかにした。これら成果の概要を以下に示す。

(A)学習の基盤と考えられるシナプス可塑性の発現・維持・制御の分子機構解明

本研究では、小脳皮質唯一の出力神経細胞であるプルキンエ細胞へのグルタミン酸性興奮性シナプスおよび GABA 性抑制性シナプスに焦点を絞って研究を行った。

①興奮性シナプスにおける可塑性について

プルキンエ細胞は二種類の興奮性シナプス入力を受ける。一つは小脳顆粒細胞からの平行線維入力であり、もう一つは下オリーブ核からの登上線維入力である。両者がほぼ同期して入力すると平行線維・プルキンエ細胞間シナプス伝達が持続的に減弱することが知られている。このシナプス可塑性は小脳長期抑圧と呼ばれ、運動学習の細胞レベルの主要なメカニズムと考えられてきた。長期抑圧の分子機構に関する研究では、平行線維・プルキンエ細胞間シナプスに局限して存在するグルタミン酸受容体  $\delta 2$  サブユニットが、PICK1 分子との結合を介して長期抑圧に関与することを示した(Yawata et al., 2006, J Neurosci)。また、平行線維と登上線維入力の統合を担う分子と推定されてきた C キナーゼ  $\alpha$  の長期抑圧誘導時の細胞内動態を明らかにし、長期抑圧誘導に際して C キナーゼ  $\alpha$  は持続的に活性化する必要がないことを示した(Tsuruno & Hirano, 2007, Mol Cell Neurosci)。また、Src 型チロシン基リン酸化酵素が長期抑圧発現に関与することを示す結果も報告した(Tsuruno et al., 2008, Neurosci Res)。さらに、 $\delta 2$  サブユニットと結合する分子として同定されたデルフィリンを欠損させると、長期抑圧誘導に際しての  $Ca^{2+}$  依存性が低減して、長期抑圧が引き起こされやすくなることも明らかにした。なお、デルフィリン欠損マウスでは、視運動性眼球運動の適応(運動

学習)の亢進も認められた(Takeuchi et al., 2008, Plos ONE)。生後成長期における登上線維・プルキンエ細胞間シナプスについても研究を行い、登上線維・プルキンエ細胞間の成体型シナプス結合パターン形成に寄与すると推定される新規のシナプス可塑性を発見した(Ohtsuki & Hirano, 2008, Eur J Neurosci)。

## ②抑制性シナプスでのシナプス可塑性

プルキンエ細胞への抑制性シナプス入力、登上線維入力等による脱分極により長時間増強される。このシナプス可塑性は **Rebound Potentiation (RP)**、脱分極依存性増強と呼ばれる。RPの制御機構に関する解析を行い、細胞と細胞外基質との接着を担うインテグリン分子が、**Src**型チロシンキリン酸化酵素活性を介してRP制御に関わることを明らかにした(Kawaguchi & Hirano, 2006, Mol Cell Neurosci)。また、メタボトロピックグルタミン酸受容体 **mGluR1**の活性がRPを起りやすくする形で作用することを示した(Sugiyama et al., 2008, Eur J Neurosci)。さらに、**GABA<sub>A</sub>**受容体と結合する細胞内タンパク質 **GABARAP**が、RP発現において中心的な役割を果たすことも突き止めた(Kawaguchi & Hirano, 2007, J Neurosci)。RP制御の複雑な細胞内シグナル伝達経路のモデルを構築して、コンピューターシミュレーションを行い、多くの実験結果を再現した。さらに、モデル上でRP誘導の閾値制御機構を検討して、フォスホジエステラーゼ **PDE1**が重要な役割を果たすとの理論予測を行い、神経細胞を用いた電気生理学実験等で検証している。また、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスで、神経回路の異常な活動パターンが定常状態でRPを引き起こし、RPが飽和状態になっていることも明らかにした(Ohtsuki et al, 2004, J Neurosci)。

## (B)シナプス可塑性の小脳神経回路における情報処理および個体の運動制御・学習における役割の解明

### ① $\delta 2$ サブユニット欠損マウス及びラーチャーマウス

$\delta 2$ 欠損マウスおよびラーチャーマウスでは、反射性眼球運動の適応(運動学習)が起こらず、反射性眼球運動の動特性にも異常が認められることを示した(Katoh et al., 2005, Eur J Neurosci)。また、 $\delta 2$ 欠損マウスの運動失調はラーチャーマウスより重篤であることを示し、その一因として、 $\delta 2$ 欠損マウスで周期的な不随意運動が起こることを見出した。さらに、不随意運動発生機構を検討して、 $\delta 2$ 欠損マウスにおけるシナプス制御欠陥によりプルキンエ細胞が異常な活動電位発火パターンを示すことが原因であることを突き止めた(Yoshida et al, 2004, J Neurosci)。また、 $\delta 2$ 欠損マウスで認められる反射性眼球運動の一つである視運動性眼球運動での顕著なタイミング遅れの原因を調べ、登上線維入力の亢進がプルキンエ細胞の発火タイミングを狂わせていることが一因であることを明らかにした(Yoshida et al., 2007, Eur J Neurosci)。

### ②デルフィリン欠損マウス

長期抑圧が起こりやすくなっているデルフィリン欠損マウスでは、一部の運動学習が促進されることを示し(Takeuchi et al., 2008, Plos ONE)、シナプス可塑性制御が動物の学習能力に大きな影響を及ぼすことを明示した。

## (2)サブグループ毎の研究成果

### ① 黒田 真也 (東京大学大学院理学系研究科 教授)

小脳長期抑圧に関してモデルを用いたシステムバイオロジー研究を行い、長期抑圧誘導時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度制御において **IP3**受容体が重要な役割を担うことを示した(Doi et al., 2005, J Neurosci)。

② 船曳 和雄 (大阪バイオサイエンス研究所システムズ研究部門 副部長)

$\delta 2$  欠損マウスの視運動性眼球運動タイミング制御に関する研究に大きな貢献をしたが、その他の遺伝子改変動物に関しても眼球運動解析を行って成果を挙げた (Sato et al., 2008, Nat Neurosci)。また、蛍光標識した脳深部の神経細胞から電氣的活動記録を行う新技術の開発も行い、特許申請した。

③ 横井 峰人 (京都大学大学院医学研究科 助授)

特定の神経回路・神経経路のみを可視化できる遺伝子改変マウスの作成を行って、それまで不十分な報告しか存在しなかった神経経路を明らかにした (Sano and Yokoi, 2007, J Neurosci)。

④ 亀山 仁彦 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門 室長)

グルタミン酸受容体のシナプス後膜への輸送に  $\delta$ -catenin が関与するメカニズムの研究等で成果を挙げた (Ochiishi et al., 2008, Mol Cell Neurosci)。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表 (論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本プロジェクトは、小脳の運動学習機構を包括的に解明することを目指したもので当初の計画に沿って様々な角度からの研究が実施された。分子・細胞レベルの研究では、シナプス長期抑圧時におけるグルタミン酸受容体  $\delta 2$  サブユニットの関与機構、C キナーゼ  $\alpha$  の長期抑圧誘導時の細胞内動態を明らかにする、など小脳のプルキンエ細胞上シナプスでおこる可塑性に関して、世界をリードする優れた成果を得た。また、 $\delta 2$  サブユニット欠損マウスでは、運動学習および運動制御不全が認められること、さらに、 $\delta 2$  サブユニットと結合するデルフィリンを欠失させると、小脳長期抑圧が起こりやすくなり、視運動性眼球運動の適応 (運動学習) が亢進することを見いだすなど顕著な成果をあげた。また、代表者のリーダーシップのもと、各共同研究者が有機的に活動しチームとしての相乗効果を発揮し、且つ各サブグループともに質の高い成果を出しており、高く評価できる。これらの成果は、論文 (国内:1件、国際:42件)、学会発表 (国内 51 件、国際 5 件)、招待講演 (国内:12件、国際:2件)として発表された。また、国内1件の特許申請をおこなった。成果の一部は、4件の新聞報道で紹介された。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

分子・細胞レベルの研究により、小脳プルキンエ細胞上シナプスで起こる可塑性の発現・維持・制御の分子機構の理解が飛躍的に進んだ。また遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの研究で、デルフィリン欠損マウスではある種の運動学習が亢進していることを発見した。これらの成果は、学習の基盤と考えられるシナプス可塑性の微妙な調節が学習能力に影響を及ぼすことを示唆したもので、人の学習メカニズムの解明に貢献すると共に、将来学習効率の向上や効率的なリハビリテーション法の開発につながる事が期待される。今後、細胞レベルと個体レベルの研究をつなぐ神経回路レベルの研究を進めることで、大きな発展が期待される。また、今回の一連の研究で、モデルを使用したコンピューターシミュレーションによるシステムバイオロジー研究で得られた理論予測と実験による検証、分子生物学手法で作成した蛍光分子融合タンパク質を利用した FRET イメージングと電気生理学実験の組み合わせ等、分子・細胞神経科学分野の研究を大きく進展させる手法を確立した。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

今回の CREST 研究において、共同研究者の黒田真也は本研究期間中に東京大学教授に就任し、また新たな CREST 研究チームの代表者になった。船曳和雄は京都大学の特任准教授から大阪バイオサイエンス研究所システムズ研究部門の副部長に異動し、船曳和雄グループの研究者であった林勇一郎は 2008 年度にさきがけ研究の代表者になった。このように、参加メンバーのキャリアアップも多く見られ、CREST のチーム型研究の特徴を十分に活かした代表者の指導力は高く評価できる。

以上