

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

平成15年度採択研究代表者

平野 丈夫

(京都大学大学院理学研究科 教授)

「小脳による学習機構についての包括的研究」

1. 研究実施の概要

小脳は運動制御・学習にかかわる中枢神経系領域である。小脳皮質は規則正しく比較的単純な神経回路で、中枢神経系がはたらくメカニズムを研究する際に優れたモデルシステムになると考えられる。小脳皮質の興奮性および抑制性シナプスでは、神経活動依存的な情報伝達効率変化（シナプス可塑性）が起こり、それらは運動学習の基盤になる現象と考えられている。本研究では分子・細胞・組織・個体各レベルの研究を関連付け、小脳による学習機構全体のしくみを包括的に解明することをめざしている。より具体的には、(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はたしているか、を明らかにすることを目標としている。本研究の特徴は、電気生理学・分子生物学・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手法を組み合わせた解析を行い、各レベル間の知見を関連付ける点にある。これまでの本研究により、小脳の平行線維・プルキンエ細胞間の興奮性シナプスに局在し長期抑圧発現に必須であるグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットを欠損したマウスでは抑制性シナプスも変化していること、また眼球運動の学習が障害されていること、を明らかにした。またこのミュータントマウスは運動失調を示すが、その一因がシナプス制御異常に起因する登上線維入力の亢進による不随意リズム運動発現であることも明らかにした。今後は、ミュータントマウスを用いた個体レベルの研究に行動・学習時の神経活動記録を適用して、学習のメカニズムの神経回路レベルでの解析を進めるとともに、学習の基礎となる現象であるシナプス可塑性の分子機構解析を進めていく。

2. 研究実施内容

運動制御・学習にかかわる小脳皮質の興奮性および抑制性シナプスでは、神経活動依存的な情報伝達効率変化（シナプス可塑性）が起こり、それらが運動学習の基盤現象と考えられている。本研究では分子・細胞・組織・個体各レベルの研究を関連付け、小脳による学習機構全体のしくみを包括的に解明することをめざしており、(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はたしているかを明らかにすることを目標として研究を行っており、これまでに以下のような知見を得ている。

A-a 小脳長期抑圧

A-a-1 グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluR $\delta 2$) の長期抑圧関与について

GluR $\delta 2$ 欠損培養プルキンエ細胞において、GluR $\delta 2$ およびそのミュータント分子を発現させる実験により、GluR $\delta 2$ は長期抑圧発現に直接的にかかわっていること、C末端細胞内領域の細胞膜近傍領域が長期抑圧発現に必須であることを明らかにした。またその部位に結合する蛋白質を同定し、GluR $\delta 2$ とその蛋白質の長期抑圧発現におけるはたらきを検討している。また、GluR $\delta 2$ と長期抑圧発現に際して競合すると期待されるGluR $\delta 2$ C末端細胞内領域ペプチドを発現させるトランスジェニックマウス等の作成が進行中で、それらミュータントマウスを用いてGluR $\delta 2$ が関わりと推定されるさまざまなはたらきのマウス個体内での役割を検討していく。

A-a-2 長期抑圧発現時のCキナーゼ制御について

長期抑圧発現にあたっては、プルキンエ細胞上に形成される二つの異なる興奮性シナプス、すなわち平行線維と登上線維入力、が同時に活性化する必要がある。これら二つの入力を統合する分子の候補の一つがCキナーゼである。CキナーゼにGFPを融合した分子を培養プルキンエ細胞で発現し、その挙動を調べることで各種の刺激によるCキナーゼの制御を調べた。その結果、Cキナーゼは登上線維入力を代行する脱分極のみで細胞膜に一過性に移動すること、また長期抑圧発現時にCキナーゼは一時的に細胞膜に移動するだけで長期的な活性化はしないことが明らかになった。

A-b 脱分極依存性増強 (RP)

A-b-1 メタボトロピックグルタミン酸受容体を介するRP発現の短期制御

プルキンエ細胞上に形成されるGABA作動性抑制性シナプスは、プルキンエ細胞の脱分極により持続的に増強される(RP)。以前、RPを起こすシナプス自身の活性化によりシナプス後GABA(B)受容体を介してRP発現が抑制されることを見出していたが、今回はRP発現がmGluR刺激によりcAMP増加を介して促進されることを明らかにした。また、一連のRP制御の細胞内情報伝達系のコンピューターシミュレーションを開始した。

A-b-2 インテグリンによるRP発現の長期抑制機構

GABA(B)受容体刺激によるRP発現抑制が数日間以上持続することを発見した。RP発現の長期的抑制には、転写を介した細胞接着分子インテグリンの増加が関与し、インテグリンがSrc型チロシンキナーゼを介してRP発現を長期間抑えることを明らかにした。

A-b-3 GluR $\delta 2$ 欠損マウスにおけるRP飽和

長期抑圧が起こらないGluR $\delta 2$ 欠損マウスでは、登上線維入力が進んでいるために自発的にRPが起こり、プルキンエ細胞に対する抑制が強くなっていることを明らかにした(Ohtsuki et al. J. Neurosci. 2004)。

B GluRδ2欠損マウスを用いた行動・神経活動解析

B-a GluRδ2欠損マウスにおける不随意運動発現機構

GluRδ2欠損マウスは運動制御・運動学習障害を示すが、運動障害はプルキンエ細胞を完全に欠失したラーチャーマウスよりも重篤であることを見出し、その原因を解析した。その結果、GluRδ2欠損マウスは自発性の不随意運動（眼球運動）を示し、それは亢進した登上線維入力に依存していることが明らかになった。GluRδ2という蛋白質分子の欠損が如何にして運動障害を引き起こすかについて、両者を繋ぐ細胞・神経回路レベルの変化を含めたモデルを提示した (Yoshida et al. J. Neurosci. 2004)。

B-b GluRδ2欠損マウスの反射性運動制御

GluRδ2欠損マウスを用いて反射性眼球運動およびその適応（運動学習）の解析を行い、GluRδ2欠損マウスが運動学習障害および反射性眼球運動の動特性異常を示すことを明らかにした。またGluRδ2欠損マウスにおける小脳部分除去実験等により、反射性眼球運動を制御する脳幹部にも可塑性があることを示唆した (Katoh et al., Eur. J. Neurosci. 2005)。

3. 研究実施体制

平野グループ

- ① 研究分担グループ長：平野 丈夫（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室・教授）
- ② 研究項目：小脳による学習機構についての包括的研究

船曳グループ

- ① 研究分担グループ長：船曳 和雄
（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構・特任助教授）
- ② 研究項目：ミュータントマウスにおけるIn Vivo神経活動解析

横井グループ

- ① 研究分担グループ長：横井 峰人
（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構・特任助教授）
- ② 研究項目：シナプス可塑性異常を示すミュータントマウスの作成

黒田グループ

- ① 研究分担グループ長：黒田 真也
（東京大学情報理工学系研究科生物情報科学学部教育特別プログラム・特任助教授）
- ② 研究項目：シナプス可塑性を制御する細胞内分子情報伝達系のモデリング

亀山グループ

① 研究分担グループ長：亀山 公彦

(独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門・主任研究員)

② 研究項目：神経伝達物質受容体制御の分子機構

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- Yoshida, T., Katoh, A., Ohtsuki, G., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Oscillating Purkinje neuron activity causing involuntary eye movement in a mutant mouse deficient in the glutamate receptor δ 2 subunit. *J. Neurosci.* 24, 2440-2448.
- Ohtsuki, G., Kawaguchi, S., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Enhanced inhibitory synaptic transmission in the cerebellar molecular layer of the GluR δ 2 knockout mouse. *J. Neurosci.* 24, 10900-10907.
- Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M. and Uemura, T. (2004) Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev. Cell* 7, 205-216.
- Murai, N., Tsuji, J., Ito, J., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Vestibular compensation in glutamate receptor delta-2 subunit knockout mice: dynamic property of vestibule-ocular reflex. *European Arc. Oto-Rhino-Laryngol.* 65, 82-86.
- Kawaji, K., Umeshima, H., Eiraku, M., Hirano T. and Kengaku, M. (2004) Dual phases of migration of cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 228-240.
- Katoh, A., Yoshida, T., Himeshima, Y., Mishina, M. and Hirano, T. (2005) Defective control and adaptation of reflex eye movements in mutant mice deficient in either the glutamate receptor δ 2 subunit or Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1315-1326.
- Doi, T., Kuroda, S., Michikawa, T. and Kawato, M. (2005) Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ threshold dynamics detect spike timing in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 25, 950-961.
- Kakegawa, W., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Kameyama, K. and Ozawa, S. (2004) Input- and subunit-specific AMPA receptor trafficking underlying long-term potentiation at hippocampal CA3 synapses. *Eur. J. Neurosci.* 20, 101-110.