

「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づける点にある。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 分子との相互作用を介して長期抑圧発現に寄与すること、 $\delta 2$ 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、また反射性眼球運動の制御および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の運動失調の一因が、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報告し、反射性眼球運動時の神経活動解析を開始した。

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づけ、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。(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いる。平成 17 年度に以下のような知見を得た。

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 $\delta 2$ が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示した。さらに、その部位に結合する蛋白質として PICK1 を同定し、GluR $\delta 2$ と PICK1 の結合が長期抑圧発現に必要であることを示した (Yawata et al., 2006)。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あり、それらミュータントマウスを用いて今後 GluR $\delta 2$ が関わると推定されるさまざまなはたらきの生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により引き起こされる細胞内 Ca イオン濃度上昇により細胞膜に移動すること、長期抑圧発現に際して C キナーゼは一過性に細胞膜へ移動するだけで十分であることを明らかにした。また、プルキンエ細胞において DAG が C キナーゼの膜局在を長引かせるが、DAG は主に DAG リパーゼにより分解されることを示唆する結果も得た。

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、平成 17 年度は RP 発現が mGluR 刺激により、cAMP 増加・A キナーゼ活性化・DARPP32 のリン酸化・PP1 活性の抑制という一連の細胞内情報伝達経路を介して、促進されることを明らかにした。また、RP 制御に関する一連の細胞内情報伝達系の動作をコンピューターシミュレーションにより再現することに成功した。

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見出していたが、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ていることを示した。インテグリンは Src 型チロシンキナーゼ活性を介して RP 発現を抑えていることが判明した (Kawaguchi & Hirano, 2006)。

B GluR $\delta 2$ 欠損マウスを用いた行動・神経活動解析

GluR $\delta 2$ 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、その一因が自発性の不随意運動で

あることを示唆し、さらに不随意運動は亢進した登上線維活動によっていることを 2004 年に報告した。その後、GluR δ 2 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)の解析も行い、GluR δ 2 欠損マウスの運動学習障害および反射性眼球運動の動特性異常を示した(Katoh et al., Eur. J. Neurosci. 2005)。この研究で、GluR δ 2 欠損マウスは頭部回転時の視野のブレを抑える反射性の視運動性眼球運動のタイミングが大きく遅れることも報告した。このタイミング遅れが生じるメカニズムを調べるために、視運動性眼球運動時のプルキンエ細胞活動記録を行い、亢進した登上線維活動がプルキンエ細胞の出力に大きな影響を及ぼしていることが、タイミング遅れの主因であることを示唆する予備的な実験結果を得た。

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、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、助教授(特任))
- 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、助教授(特任))
- 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、助教授(特任))
- 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 仁彦(産業技術総合研究所、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(原著論文)発表

- Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T. and Kengaku, M.

- (2005) DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nature Neurosci.* 8, 873-880.
- Tohgo, A., Eiraku, M., Miyazaki, T., Miura, E., Kawaguchi, S., Nishi, M., Watanabe, M., Hirano, T., Kengaku, M. and Takeshima, H. (2006) Impaired cerebellar functions in mutant mice lacking DNER. *Molecular and Cellular Neuroscience* 31, 326-333.
 - Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2006) Integrin $\alpha 3 \beta 1$ suppresses long-term potentiation at inhibitory synapses on the cerebellar Purkinje neuron. *Molecular and Cellular Neuroscience* 31, 416-426.
 - Yawata, S., Tsuchida, H., Kengaku, M. and Hirano, T. (2006) Membrane-proximal region of GluR $\delta 2$ is critical for LTD and interaction with PICK1 in a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* (In press)
 - Takahashi H, Funabiki K, Hasebe S, Fukuda-Yamamoto T, Kaieda S, Iwanaga T, Kumagami H, Takasaki K. (2005) Clinical efficacy of 5-fluorouracil (5-FU) topical cream for treatment of cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx.* Dec;32(4):353-7. Epub
 - Murai N, Funabiki K, Naito Y, Ito J, Fukuyama H. (2005) Validity and limitation of manual rotational test to detect impaired visual-vestibular interaction due to cerebellar disorders. *Auris Nasus Larynx.* Mar;32(1):23-8.
 - 船曳和雄(2005), 遺伝子操作マウスでの眼運動と神経活動記録でおこなうシステム解析, *Equilibrium Res* Vol. 64(3); P176-79
 - Nagai Y, Sano H, Yokoi M.(2005) Transgenic expression of Cre recombinase in mitral/tufted cells in the olfactory bulb., *Genesis* 43, 12-16 .
 - Sasagawa, S., Ozaki, Y., Fujita, K. & Kuroda, S. (2005) Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol* 7, 365-373
 - Ozaki, Y., Sasagawa, S. & Kuroda, S. (2005) Dynamic characteristics of transient responses. *J Biochem (Tokyo)* 137, 659-663