

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790084

研究課題名（和文） マウス瞬目反射条件付けを用いた運動学習シナプス基盤の解明

研究課題名（英文）

Analysis of the synaptic basis underlying motor learning by mouse eyeblink conditioning

研究代表者

岸本 泰司 (KISHIMOTO YASUSHI)

徳島文理大学 香川薬学部 助教

研究者番号：90441592

研究成果の概要（和文）：

運動学習である瞬目反射条件付けの分子基盤を明らかにすることを目的として、様々な機能分子の役割を特定の脳領域に着目して解析した。具体的には、3種のパラダイム(遅延課題, 痕跡課題, 前抑制効果)において、ある特定の脳領域に発現する機能分子が記憶成立にどのように関与しているのかを調べた。遅延課題においては、小脳皮質内の2種の内因性カンナビノイドが記憶成立に重要であることが明らかとなった。また、条件反射の表出と形成には異なる分子機構がはたらいっていることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the molecular basis of motor learning, three paradigms of eyeblink conditioning (delay, trace and latent inhibition) were investigated by pharmacological treatment and/or genetically-engineered mice. In delay conditioning, endocannabinoids 2-AG and anandamide are important for memory formation of eyeblink conditioning. Furthermore, this research clearly shown that multiple distinct molecular mechanisms exist for the expression and acquisition during eyeblink conditioning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：行動遺伝学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：瞬目反射条件付け, 運動学習, 内在性カンナビノイド, 代謝型グルタミン酸受容体, Tet システム

1. 研究開始当初の背景

運動学習のひとつとして知られる「瞬目反射条件づけ」は音を条件刺激(CS), 瞼への刺激を無条件刺激(US)としたとき, この両刺激を被験者に繰り返し提示すると, 音だけで瞬きの条件反射(CR)が出現するようになる連合学習の一形態である。マウスにおける瞬目反射条件付け実験系は, 申請者らにより日本で開発された経緯を持ち, 研究開始時点においては多くの研究グループによって様々な関連遺伝子が同定されるに至っていた。しかしながら脳のどの部位でどの分子が働いているかについては, ほとんど不明であり, またパラダイムによって, 基盤となる分子機構が異なるかどうかについても殆ど検討されていなかった。

2. 研究の目的

運動学習のひとつとして知られる「瞬目反射条件づけ」を行動学的指標に据え, 運動記憶成立に必要な脳領域(小脳, 海馬, 側座核)におけるシナプス機構を明らかにすることを目的に設定した。具体的には様々なパラダイム(遅延課題, 痕跡課題, 前抑制効果)における記憶の成立と発現の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

行動学的解析は, すべて瞬目反射条件付けを用いた。機能分子の操作については, 薬理学的もしくは遺伝子工学的に, 特定の分子機能を失活させる方法を用いた。条件付けのプロトコルは以下のとおりである。

マウスは手術終了後, 少なくとも2日間の回復期間を置き, その後, 遅延課題については, 7日間のCS-US連合刺激による学習試行と4日間のCS単独刺激による消去試行, 痕跡課題については10日間の学習試行と4日間の消去試行を行った。前抑制効果については条件付け開始前の数日間(3~5日間)に渡って一日100回CSのみを与える過程が付加された。学習試行については, 1回のCS only trialと9回のCS-US paired trialの10trialを1blockとし, 1日10block行った。消去試行についてはCS only trialを1日100trial行った。

4. 研究成果

分子, シナプス, 行動の各層を繋ぐ実験を行い, 既存神経回路モデルの検証も行った(Kishimoto, 2010)。

(1) 瞬目反射条件付け記憶に関与する内因性カンナビノイドの同定

まず, 内因性カンナビノイドの候補物質である内因性カンナビノイド 2-AG 分解酵素 monoacylglycerol Lipase (モノアシルグリセロールリパーゼ, MGL)および anandamide 分解酵素 FAAH(fatty acid amide hydrolase)の特異的阻害剤の効果調べた。その結果, 両阻害剤ともCR獲得の亢進をもたらし, 2-AGおよび anandamide の両方が内因性カンナビノイドとして小脳記憶の成立に関与し得ることが示された(図1)。

また, MGLや合成酵素(ジアシルグリセロール)を遺伝子的に阻害した時に, 瞬目反射条件付け遅延課題の獲得あるいは消去に顕著な変化が現れることも明らかにした。さらに, 小脳プルキンエ細胞特異的に 2-AG を欠失させたマウスでは遅延課題における条件反射獲得に異常が見られた。こうした結果は, 瞬目反射条件付けの記憶獲得に関わる内因性カンナビノイドシグナリングの少なくともその一部を, 2-AG が担っていることを示唆するものである。さらに, 小脳学習におけるアナンダミドの重要性を示唆する予想外の結果を得ることとなった。なお, 痕跡課題については, 2-AG, アナンダミドのいずれも顕著な作用を持っていないことが明らかとなった。

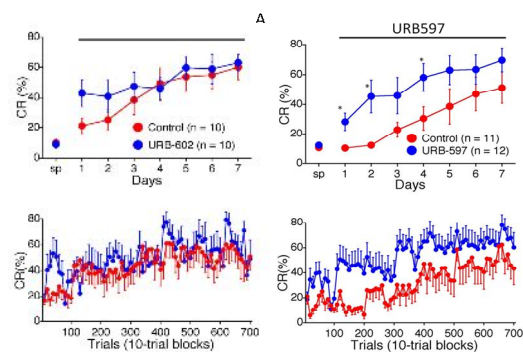


図1. 遅延課題における2-AG分解酵素阻害剤(左)およびanandamide分解酵素阻害剤(右)の効果

次に, EVA樹脂(ethylene-vinyl acetate copolymer)を用いて, 学習実験中に, 薬物を小脳皮質特異的かつ持続的に投与する方法を開発した。この方法を用いて, 内因性カンナビノイドのもう一つの候補物質である anandamide の小脳学習における寄与を検討した。anandamideの分解酵素の阻害薬であるURB597を含有させたEVA樹脂を小脳皮質に被せて持続投与したところ, 瞬目反射条件付けは有意に更新することが示された。またこの効果はCB1受容体の拮抗薬であるAM251

によって阻害された。これらの結果は、瞬目反射条件付けの記憶獲得に小脳皮質の *anandamide* が重要であることを示すものである。

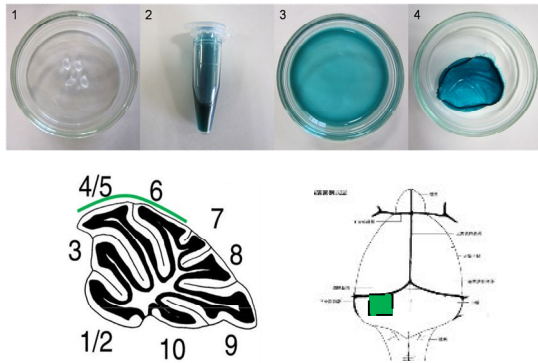


図 2. EVA シートの作成と成体マウス小脳への implant 法

(2) テトラサイクリン遺伝子発現誘導系を用いた記憶形成と発現の分子機構

Tet システムは Tet 抑制因子と Tet オペレーター配列の性質を利用して開発され、Tet の誘導体ドキシサイクリン(Dox)の投与により特定の遺伝子発現の有無(On/Off)を可逆的に切り替えることを可能とする。この技術の特異的なプロモータと組み合わせることにより、ある特定のニューロンで、特定の遺伝子のみを発現を可逆的に制御することが *in vivo* で可能となった。そこで我々は、まず MAP キナーゼキナーゼの一種である MEK1 のドミナントネガティブ体 (dnMEK1) を小脳プルキンエ細胞(PC)のみで発現させたマウスについて、瞬目反射条件づけを測定した。条件づけは、Dox 投与の切り替え期間として 7 週間を挟んで 2 セット行った(第 1 試行 7 日間+第 2 試行 5 日間)。Dox 非投与群に対し、Dox 投与群では、7 日間の第 1 試行においてその条件反射(CR)の獲得が著明に抑制された。また、Dox 非投与群は第 1 試行で学習が成立した後、切り替え期間中に mGluR1 が完全に消失させても、第 2 試行の最初からその学習率を完全に保持していた。dnMEK1 の発現は食餌中のドキシサイクリンの有無によって制御したところ、dnMEK1 が発現する場合において、条件反射(CR)は著明に障害を受けた。その後 PC の機能を正常に戻すと、徐々に CR が形成されるにいたった。さらに、我々は、次に小脳 LTD に必須である代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1) を PC 選択的かつ可逆的に発現可能なマウス (mGluR1c KO)を用いて同様の実験を行ない、小脳皮質の可塑性が瞬目反射条件づけ記憶の表出ではなく、獲得そのものに必須であることの可能性を検討した(図 3)。結果として mGluR1c KO マウスは第 2 相の初期でも学習障害が残っており潜在記憶は形成されなかった。この結果は小脳皮質が、瞬目反射条件づけ記憶の符号化に必

須であり発現には必須ではないこと、少なくとも顆粒細胞-プルキンエ細胞間のポストシナプス機能は瞬目反射条件づけ記憶の形成自体に不可欠であることを示すものであり瞬目反射条件付けの小脳 LTD 仮説と矛盾しないものとなった。以前我々は、GC から PC への神経伝達物質の放出を可逆的に阻害できるマウス (reversible neurotransmission blocking (RNB) マウス)を利用して瞬目反射条件づけにおける小脳皮質の役割を調べた。しかしこのマウスにおいては、顆粒細胞-プルキンエ細胞間の神経伝達をブロックした状態でも瞬目反射条件付けの記憶は潜在的に形成されていた (Wada *et al.*, PNAS 2007)。潜在記憶が RNB マウスで形成され、mGluR1c KO では形成されなかった理由は不明であるが、*in vivo* の生理的状況では GC からの神経伝達が完全には阻害されていない可能性も考えられる。今回の結果は、小脳皮質が瞬目反射条件付けの記憶の形成自体に必須であることを示すものであり、小脳皮質の重要性に確証を与えるものとなった。

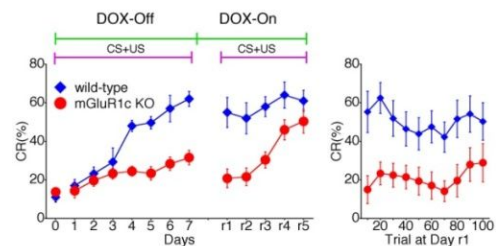


図 3. mGluR1 の PC 内発現の On/Off が CR に及ぼす効果

(a) 野生型マウス(n = 10)と mGluR1c KO マウス(n=10)について、第 1 相(Dox 非投与)および第 2 相(Dox 投与)中の瞬目反射条件づけを計測した(b) mGluR1c KO では第 2 相開始直後に学習は認められなかった。

(3) 前抑制効果の分子機構

前抑制効果 (LI) は、先行して CS を聞かせておくと、条件づけの成立が抑制されるという効果である。この学習に必要な脳部位、シナプス基盤を明らかにするために、まず脳破壊実験を行った。遅延課題の LI はイボテン酸による両側海馬破壊および側座核破壊のいずれによっても大きく消失した。一方、痕跡課題の LI は海馬破壊によって、亢進することが明らかとなった。

(4) 運動学習における抑制性シナプスの機能解析

GABA 合成酵素の一種である GAD67 の発現が抑制されているマウス(GFP/GAD67 マウス)を用いて瞬目反射条件づけ遅延課題を測定したところ、その学習能力が大きく損なわれていることを見出した。本結果は記憶学習に抑制性シナプスが重要な役割を果たして

いることを示唆するものとして興味深いものとなった。また、中位核に対して GABA_A アンタゴニストであるピクロトキシンを注入して遅延課題の条件づけを行った場合、学習は阻害された。記憶の形成には中位核の活性化が不可欠であることを示すものである。

(5)運動記憶の固定化における小脳皮質と小脳核の役割

可逆的に遺伝子を制御するテトラサイクリン遺伝子発現誘導系(Tet系)と薬理的なニューロン不活性化を組み合わせた方法論により、瞬目反射条件づけ記憶の固定化、保持における小脳皮質の特異的機能を明らかにすることを目的とした。ドキシサイクリン(Dox)を与えないことにより小脳プルキンエ細胞のみに1型代謝型グルタミン酸(mGluR1)を発現するミュータントマウス(mGluR1c KO)を用いて、瞬目反射条件づけ遅延課題(条件刺激: 80dB、350ms、無条件刺激: 100ms)の解析を行った。小脳核領域にmuscimolを微小注入し、小脳核ニューロンを薬理的に不活性化させた場合の学習への効果を見た。Dox非投与群は第1試行で学習が成立した後、切り替え期間中にmGluR1が完全に消失させても、第2試行の最初からその学習率を完全に保持していた。しかしながら、切り替え期間中に小脳核領域にmuscimolを注入した場合、この保持効果は失われた。この結果は、瞬目反射条件づけ記憶の保持ないし固定化には小脳核ニューロンの活性化が必要であることを明らかにするものとなった。小脳皮質から小脳核への記憶のcontentの移行が、運動学習の長期的な蓄積に必要であることを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Y. Kishimoto (2010). Experimental verification of classical conditioning models by inducible on/off control of gene expression. *Seibutubutsuri*. (in press)
- ② Y. Kishimoto, H. Nakao, A. Aiba and Y. Kirino. (2009). The role of mGluR1 within cerebellar PCs in eyeblink conditioning as evidenced by reversible and cell-type restricted manipulation. *Soc. for Neuroscience Abst.* **39**
- ③ Y. Kishimoto and Y. Kirino. (2009) The molecular basis of eyeblink conditioning: based on subregional analysis using cerebellar cell-type specific gene manipulations. *Neurosci. Res. (Suppl.)* **32**.

④ Y. Kishimoto and Y. Kirino. (2008) The inhibition of monoacylglycerol lipase impairs extinction of cerebellum-dependent conditioned eyeblink responses. *Neurosci. Res. (Suppl.)* **31**, S257.

⑤ Y. Kishimoto, T. Harada., and A. Aiba (2008). The role of MAPK/ERK kinase 1 in associative learning: based on behavioral analysis using tetracycline-inducible gene expression system. *J. Pharmaceut. Soc. Japan* **128**, 80.

[学会発表] (計16件)

- ① 岸本泰司, 中尾晴美, 饗場篤, 桐野豊 (2010) 「運動記憶の符号化と固定化における小脳皮質と小脳核の役割」日本薬学会第130回年会、3月28日-3月30日、岡山大学他、岡山市
- ② 中山順子, 松元博志, 岸本泰司, 桐野豊 (2010) 「小脳皮質内内在性カンナビノイドの瞬目反射条件づけにおける役割」日本薬学会第130回年会、3月28日-3月30日、岡山大学他、岡山市
- ③ 岸本泰司 (2009) 「Neural mechanisms responsible for eyeblink conditioning evidenced by gene-manipulation studies in mice (国際シンポジウム)」日本生物物理学会第47回年会、10月30日-11月1日、アスティとくしま、徳島市。
- ④ 岸本泰司, 中尾晴美, 饗場篤, 桐野豊 (2009) 「瞬目条件反射の獲得と発現における代謝型グルタミン酸受容体1(mGluR1)の役割」日本生物物理学会第47回年会、10月30日-11月1日、アスティとくしま、徳島市。
- ⑤ 中山順子, 岸本泰司, 奥郁子, 桐野豊 (2009) 「瞬目反射条件づけの記憶獲得および消去に関与する内在性カンナビノイドの同定」日本生物物理学会第47回年会、10月30日-11月1日、アスティとくしま、徳島市。
- ⑥ Y. Kishimoto, H. Nakao., A. Aiba and Y. Kirino. (2009) "The role of mGluR1 within cerebellar PCs in eyeblink conditioning as evidenced by reversible and cell-type restricted manipulation" The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Oct. 17-22, 2009, McCormick Place, Chicago, USA.
- ⑦ 岸本泰司, 桐野豊 (2009) "The molecular basis of eyeblink conditioning: based on subregional analysis using cerebellar cell-type specific gene manipulations" 第32回日本神経科学学会大会、9月16日-9月18日、名古屋国際会議場、名古屋市。
- ⑧ 中尾晴美, 岸本泰司, 橋本浩一, 中尾和

- 貴, 狩野方伸, 桐野 豊, 饗場篤 (2009) 「mGluR1 は瞬目反射条件付け記憶の獲得に必要であり、その発現や保持には必要ではない」第32回日本神経科学学会大会、9月16日-9月18日、名古屋国際会議場、名古屋市。
- ⑨ 中山順子, 奥郁子, 桐野豊, 岸本泰司 (2009) 「瞬目反射条件づけ記憶獲得および消去に対するアナンダミド分解酵素 FAAH 阻害による効果」第32回日本神経科学学会大会、9月16日-9月18日、名古屋国際会議場、名古屋市
- ⑩ 高岸芳子, 宮田真理子, 岸本泰司, GJ Augustine, EA Finch, L Khiroug, 橋本浩一, 中尾和貴, 狩野方伸 (2009) "Myosin Va mutations in mice and rats cause deficits in synaptic plasticity and motor learning"第32回日本神経科学学会大会サテライトシンポジウム9月15日、名古屋国際会議場、名古屋市
- ⑪ 岸本泰司, 和田教男, 桐野豊, 狩野方伸, 中西重忠 (2008) 「運動記憶形成における小脳顆粒細胞シナプス機能の解明」第1回日本生物物理学会 中国四国支部大会、6月16日、高知大学 朝倉キャンパス、高知市
- ⑫ 岸本泰司, 桐野豊 (2008) 「モノアシルグリセロールリパーゼ(MGL)阻害による瞬目反射条件付け記憶の消去障害」第30回日本神経科学学会大会、7月9日-7月11日、東京国際フォーラム、東京
- ⑬ 岸本泰司, 原田武志, 平井良枝, 中尾晴美, 中尾和貴, 桐野豊, 饗場篤 (2008) 「Tet-OFF 遺伝子発現システムを用いた小脳学習における MAPK/ERK kinase 1 の機能解析」第45回日本生物物理学会年会、12月3日-12月5日、福岡国際会議場、福岡市
- ⑭ 岸本泰司, 原田武志, 饗場篤 (2008) 「ヒト-動物共通学習パラダイムを用いた MAPK/ERK kinase 1 の分子機能解析」第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、12月20日-12月21日、京都大学薬学部、京都市
- ⑮ 岸本泰司, 原田武志, 平井良枝, 中尾晴美, 中尾和貴, 饗場篤, 桐野豊(2008) 「テトラサイクリン遺伝子発現誘導系を利用した記憶学習の分子過程の解明」日本薬学会第129回年会、3月26日-3月28日、国立京都国際会館、京都市
- ⑯ 中山順子, 奥郁子, 岸本泰司, 桐野豊 (2008) 「小脳依存性学習に対するアナンダミド分解酵素阻害の効果」日本薬学会第129回年会、3月26日-3月28日、国立京都国際会館、京都市

[その他]

ホームページ等

http://sky.geocities.jp/kis_cosmo/kishimoto2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 泰司 (KISHIMOTO YASUSHI)

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：