

機関番号：74415

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700439

研究課題名（和文） 瞬目条件反射学習における中位核神経細胞の役割

研究課題名（英文） The function of cerebellar nucleus and cortex in eyeblink conditioning

研究代表者

矢和多 智 （ Yawata Satoshi ）

財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 システムズ生物学部門 研究員

研究者番号：90455246

研究成果の概要（和文）：

瞬目条件反射学習において、小脳皮質と小脳中位核の両方が必要であることが知られている。しかし、それぞれでどのような可塑的变化が起こり、それらがどのように学習・記憶に関わっているかはほとんど解明されていない。瞬目条件反射学習における小脳核、小脳皮質の役割を解明するために以下の2つの研究を行った。

①瞬目条件反射学習中のマウス中位核から神経活動を記録し、学習による変化を観察した。その結果、学習前のマウスでは、無条件刺激である瞼刺激には反応し活動上昇を示す細胞が存在するが、条件刺激である音刺激に反応する細胞は見られなかった。一方、学習を行ったマウスでは、瞼刺激に反応する細胞は音刺激にも反応していた。

②高速度ビデオカメラを用いて瞼動作を詳細に観察する系を立ち上げた。学習とともに獲得した反応は大きくなっていくことが確認できた。また、小脳皮質の除去を行うことで、獲得した反応が小さく潜時の短い反応になることが観察された。

研究成果の概要（英文）：

Conditioned eyeblink is typical cerebellum-dependent motor learning. The cerebellar cortex and the interpositus nucleus (IN) receive both conditioned stimulus (CS) and unconditioned stimulus (US) information through the mossy fiber and climbing fiber projections, respectively. However, the underlying mechanism of associative eyeblink learning remains unclear.

To analyze neural plasticity in the IN involved in acquisition of conditioned response (CR), I recorded neural activity during eyeblink conditioning *in vivo*. Some neurons in the IN of mice which have not trained eyeblink conditioning showed increased activities respond only to US. On the other hand, IN neurons of trained mice showed increased activities respond to both US and CS.

To analyze the detail temporal information of CR, we observed the eyelid movement using high-speed video camera. Mice which have trained eyeblink conditioning showed larger eyelid closure respond to CS. Lesion of cerebellar cortex made CR to small and short latency response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,800,000	540,000	2,340,000
22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン シナプス 神経回路

1. 研究開始当初の背景

瞬目反射とは、目や瞼（まぶた）への刺激により瞬きを起こす反射である。音刺激を瞼刺激と組み合わせることで、音に反応し瞬きが起こるようになる。この反応は瞬目条件反射と呼ばれ、その学習および記憶は小脳皮質と中位核からなる情報経路が重要な役割を果たしている。

瞬目条件反射は瞼刺激と音刺激の組み合わせにより引き起こされるので、その学習や記憶は、両刺激の情報が統合する中位核およびプルキンエ細胞で行われる。薬剤等による中位核の活動抑制により学習・記憶が阻害されることが示されており、中位核で起こる可塑的変化が瞬目条件反射学習に必要なことが知られている。一方、小脳皮質の機能抑制でも瞬目条件反射の学習・記憶が障害される。プルキンエ細胞のシナプス可塑性が阻害される遺伝子改変マウスでは、瞬きのタイミングを学習できないことが示されており、小脳皮質でのシナプス可塑性がタイミングの学習に重要であると考えられる。

瞬目条件反射学習に伴う中位核細胞の活動変化も報告されており、学習に従い音刺激に対する反応性が上昇することが知られている。

中位核神経細胞はプルキンエ細胞から強い抑制性入力を受けており、プルキンエ細胞の活動パターンは中位核細胞の神経活動に影響を及ぼす。瞼・音刺激の情報はプルキンエ細胞でも統合され、瞬目条件反射の学習に従いプルキンエ細胞の活動パターンが変化する。逆に中位核の活動抑制により学習が起こらなくなることから、中位核においても何らかの可塑的変化が起きていると考えられ

る。すなわち瞬目条件反射学習における中位核での活動変化は、中位核細胞自体の変化とプルキンエ細胞の活動変化が反映されており、両方での変化が統合され中位核の活動が制御されているものと思われる。

2. 研究の目的

小脳ネットワークの役割の解明を目的とし、瞬目条件反射学習により引き起こされる変化を、生体内神経活動記録法を用いて解析する。また瞼動作を詳細に観察することで、小脳ネットワークがどのように瞬目条件反射における反応のタイミングを制御しているかを解析する。

3. 研究の方法

①中位核神経細胞の活動変化を解析する

学習にかかわる神経活動変化を観察するために、課題中のマウス中位核から生体内細胞記録を行った。瞬目条件反射学習中の中位核からの記録は、これまでにラット・ウサギなどを用いて行われており、学習に伴い中位核細胞が音刺激に反応し活動上昇することが示されている。これらの動物に比べるとマウスは小さく、記録が困難である。しかしながらマウスは遺伝子操作が行えるという点で他の動物より優れており、マウスを用いた実験系の確立は重要である。

②瞼動作を観察することで、瞬目条件反射のより詳細で定量的な解析を行う

瞬目条件反射のタイミングの学習は顆粒細胞-プルキンエ細胞間のシナプス可塑性で記憶されていると考えられる。これまで瞬目反射の解析に用いてきた筋電位記録法では、瞼動作の詳細な大きさ、タイミングを観

察することが難しい。そこで高速度ビデオカメラを用いた観察系を確立し、瞼動作の詳細な解析を行った。

4. 研究成果

①

瞬目条件反射学習中マウスの中位核神経細胞の活動を観察するために、テトロード電極による記録を行った。

瞼刺激にエアパフを用いることで、電気的ノイズが記録に混入することを防いでいる。固定下のマウス中位核にテトロード電極を刺入し、活動記録を行ったところ、中位核から20 Hz ~ 80 Hzの神経活動を記録した。記録部位は、実験終了後ニッスル染色を行うことで確認した。

学習前のマウスでは、瞼刺激に反応するが、音刺激には反応しない細胞が観察できた(図1)。

一方、学習を行ったマウスでは、瞼刺激のみならず、音刺激にも反応している細胞が存在した(図2)。

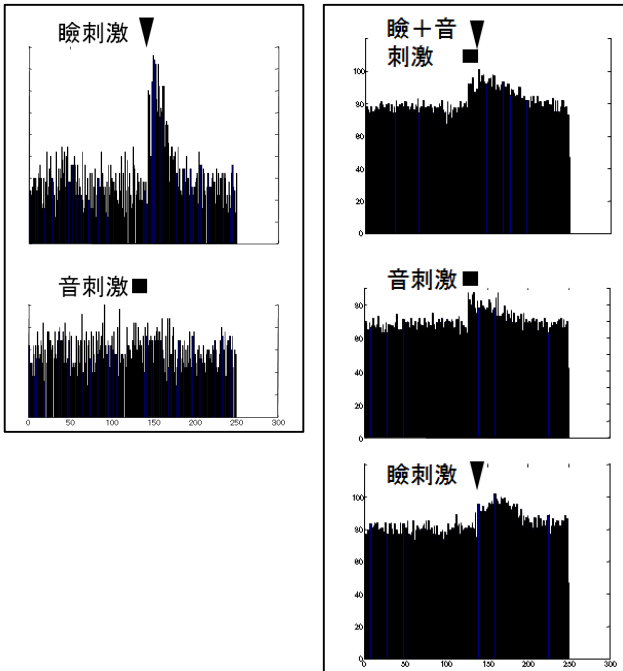


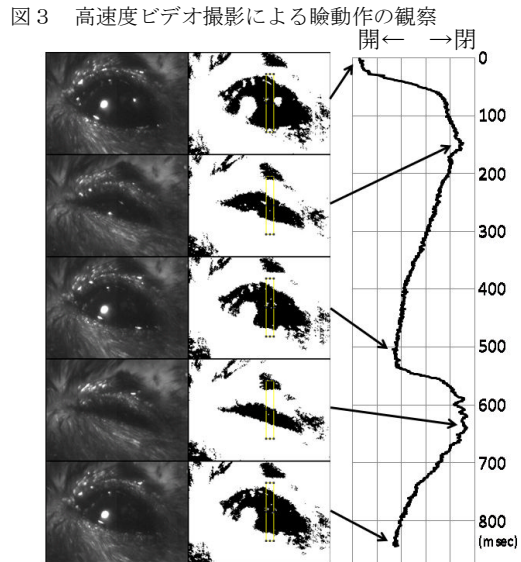
図1 (左図) 学習前
瞼刺激に反応して、強い活動上昇が観察される(上)。一方、音刺激に対しては、反応は見られない(下)。
図2 (右図) 学習後
音刺激、瞼刺激に対しても反応し、活動の上昇がみられる。

以上のように、マウス中位核からの生体内神経活動記録が可能になった。また、マウス中位核細胞も、瞬目条件反射学習により、条件刺激への反応性が上昇することが確認できた。

②

これまで、瞬目条件反射における反応の検出には、瞼に埋め込んだ電極から筋電位を測定することで行ってきた。しかし、この方法では瞼動作の詳細な観察は難しい。そこで高速度ビデオカメラにより直接瞼動作を観察する系を立ち上げた。

高速度ビデオ撮影(毎秒1250枚)を行い、得られた画像を二値化、中央の眼球部分の面積を計算することで、瞼の開閉状態を定量することができる。(図3)

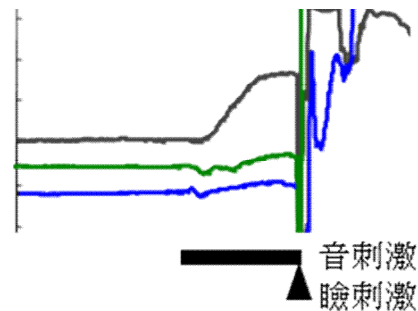


動物固定下で実験を行わなければならないというデメリットはあるものの、瞼への電極等の装着を行わずに実験を行えるメリットがある。

まず、野生型マウスを用いて反応の変化を観察した。学習により、音刺激に反応して瞼がより大きく閉じている様子が観察でき、瞬目条件反射による反応を記録できた。

小脳皮質を吸引により除去したマウスでは、獲得した反応が小さくなり、潜時の短い反応のみが残った(図4)。

図4 小脳皮質除去前後の反応



瞬目条件反射を学習したマウスは大きく瞼を閉じる(黒)。しかし、小脳皮質を除去するとその反応は小さくなり、潜時の短い反応のみを示した(緑、青)。

また、小脳顆粒細胞からの神経伝達を可逆的に阻害できるマウス（reversible neurotransmission block, RNB）を用いて実験を行った。筋電位による瞬目条件反射の解析では、RNBマウスからCRを検出できなかった。しかし、ビデオによる解析では、音刺激に対する反応が観察された。その反応は小さく潜時の短いものであった（図5）。

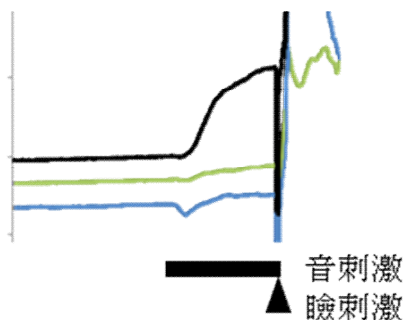


図5 RNBと野生型マウスの比較
野生型マウスは音に反応して大きく眼を閉じる（黒）。一方、RNBマウスは音刺激に反応は示すものの、その反応は小さく、また潜時が短い。

以上のように、高速度ビデオカメラを用いて、瞬目条件反射における眼動作を詳細に観察することができた。また、瞬目条件反射において小脳皮質で行われる学習が、その反応の大きさやタイミングに関与していることが示唆される。

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織 (1) 研究代表者

矢和多 智（ Yawata Satoshi ）
財団法人 大阪バイオサイエンス研究所
システムズ生物学部門 研究員
研究者番号：90455246

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：