

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700479

研究課題名（和文） 運動、運動学習を制御する大脳基底核神経回路の作動原理の解明

研究課題名（英文） Mechanism of the basal ganglia circuit to regulate motor and motor learning.

研究代表者

佐野 裕美（SANO HIROMI）

生理学研究所・統合生理研究系・特任助教

研究者番号：00363755

研究成果の概要（和文）：大脳基底核神経回路は、運動の調節に重要であることが知られている神経回路である。光遺伝学（光学と遺伝学を融合し、光受容体を神経に発現させ光照射により神経活動を操作する技術）をマウスに用いて、運動における特定の神経経路の役割を解析した。片側の線条体投射ニューロンの興奮を選択的に誘導したところ、大脳基底核神経回路からの出力信号が一過性に減り、マウスは一方向への回転運動を始めた。出力信号の一過性的変化が運動の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The basal ganglia is supposed to important for motor control. We have applied ‘optogenetics (the combination of genetics and optics to control cellular excitability)’ to mice to clarify the mechanism of motor control in the pathway of the basal ganglia. Specific excitation in striatal projection neurons in the hemisphere has induced phasic inhibition in the output signal from the basal ganglia, and has induced rotational behavior. These data suggest that phasic response in the output signal is important to regulate motor activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：運動、大脳基底核、大脳皮質、線条体

## 1. 研究開始当初の背景

大脳基底核神経回路に障害が生じると、パーキンソン病、ハンチントン病、ジストニアなどの重篤な運動障害が認められることから、大脳基底核の神経回路全体として自発運動や運動学習の制御に重要であることが知られていた。これまでに、大脳基底核神経回路に関する様々な基礎研究や臨床研究が行われており、直接経路、間接経路、ハイパー直接経路の3つの経路により運動野運動学習が制御されているという回路モデルも提唱されている（研究の方法、図1参照）。そのため、教科書的には大脳基底核神経回路が制

御する自発運動や運動学習の作動原理が明らかにされているように思われがちである。しかし、実際の大脳基底核神経回路の神経連絡は複雑であり、回路モデルに沿った個々の神経経路の役割の解析は、マーカー分子を上手く利用した生物学的手法を用いた極少数の研究に限られている。そのため、神経回路を構成する個々の神経経路が自発運動や運動学習をどのように制御しているのかについての詳細は、十分に解明されていない。

一方で、藻類などの光受容体を利用した光遺伝学の利用が神経科学分野で急速に発展しつつある。光遺伝学はミリ秒単位で神経細

胞の興奮や抑制を誘導することができるため、目的とする神経経路に特異的に遺伝子導入することができれば、神経活動と行動との関係を解明するために非常に強力なツールとなり得る。

また、新規の遺伝子導入法として、注入部位から逆行性に遺伝子導入できるウイルスベクターが開発されており、特異的なマーカーが知られていない神経経路に遺伝子導入するためには有効なツールである。例えば、大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路にはそれぞれに特異的なマーカーが知られておらず、逆行性のウイルスベクターによる遺伝子導入法を利用すれば、大脳皮質-線条体経路あるいは大脳皮質-視床下核経路に特異的な遺伝子導入が可能となる。

そこで、運動や運動学習の制御における大脳基底核神経回路の作動原理を解明するため、特異的なマーカーをコードする遺伝子を利用してこれまでに独自に作製してきた遺伝子組換えマウスや、逆行性のウイルスベクターを用いた光遺伝学を利用する。そして、神経活動と行動制御との関係を明らかにすることにより、運動や運動学習の制御における大脳基底核神経回路の作動原理を解明しようと考えた。

## 2. 研究の目的

大脳基底核神経回路は運動制御や運動学習に重要であることがよく知られている。しかし、神経回路を構成する個々の神経経路がどのように神経核の活動を調節して情報を出力部へと伝え、行動を制御しているのかという、生理学的役割と行動学的役割の関係は十分に解明されていない。そこで、覚醒下のマウス個体において、光遺伝学を用いて、標的とする神経経路の神経活動を特異的に操作し、神経回路を構成する神経核の神経活動を制御する機構と行動の調節に与える影響を解析する。

本研究では、大脳基底核神経回路を構成する神経経路のうち、線条体投射ニューロン（線条体-淡蒼球投射ニューロンと線条体-黒質投射ニューロン）と大脳皮質-線条体経路に特に注目し、これまでに作製してきた遺伝子組換えマウスや逆行性のレンチウイルスベクターを利用して、これらの神経経路に光受容体を発現させ、光照射により神経経路特異的かつ時間分解能良く神経活動を操作する。このとき、覚醒下で保定したマウスから、淡蒼球、黒質網様部など大脳基底核神経回路を構成する神経核の活動を記録する。一方で、標的とした神経経路の活動を操作したときの自発運動や運動学習に与える影響を行動学的に解析する。

これらの電気生理学的解析と行動学的解析から、自発運動や運動学習の制御において

標的とした神経経路がどのように大脳基底核神経回路の活動を調節し、その結果、行動が制御されるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

これまでに提唱されている大脳基底核神経回路のモデルを図1に示した。線条体投射ニューロンには線条体-淡蒼球投射ニューロンと線条体-黒質投射ニューロンの2種類があり、これらの線条体投射ニューロンの解析には、これまでに独自に作製した遺伝子組換えマウスを利用する。一方、大脳皮質-線条体経路の解析には、逆行性のレンチウイルスベクターを利用する。

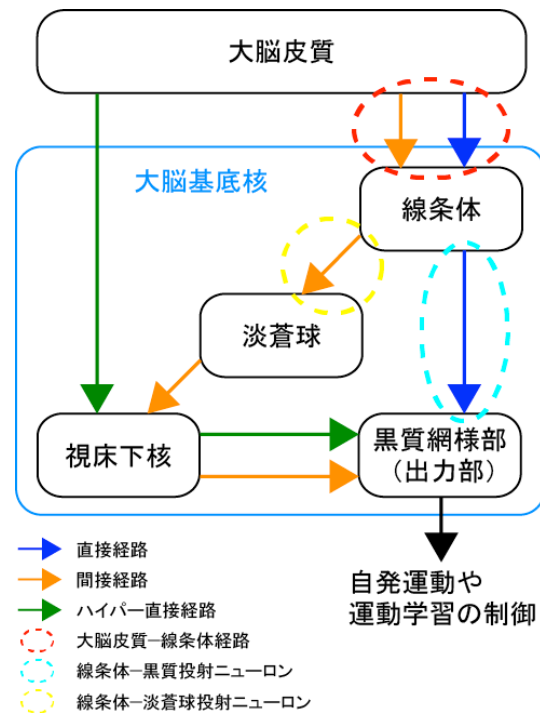


図1 大脳基底核神経回路のモデル

大脳基底核神経回路を構成するニューロンは麻酔薬の影響を受けやすく、麻酔薬の使用により神経活動が変化することがよく知られている。そのため、電気生理学的解析は全て覚醒下で行う。

### (1) 線条体投射ニューロンの電気生理学的解析

これまでの研究で、線条体投射ニューロンである線条体-淡蒼球投射ニューロンと線条体-黒質投射ニューロンの両方の経路に特異的に発現するマーカー分子として phosphodiesterase10A2 (PDE10A2) を報告しており (Sano and Yokoi, J Neurosci, 2007)、この PDE10A2 の遺伝子座に tetracycline transactivator (tTA) を挿入したマウス (PDE10A2-tTA マウス) も独自に作製している (Sano and Yokoi, J Neurosci, 2007)。一方、研究協力者が作製した tetracycline

operator(tet0)の下流で光受容体であるchannelrhodopsin2(ChR2)を発現するtet0-ChR2マウスを入手しており、これらの2種類のマウスを交配して得られるダブル遺伝子組換えマウス(PDE10A2-tTA::tet0-ChR2マウス)は、線条体のほぼ全ての投射ニューロンにChR2を発現する。そこで、このPDE10A2-tTA::tet0-ChR2マウスを利用して、線条体投射ニューロンの電気生理学的解析を行う。

- ①覚醒下で無痛的に脳定位固定装置にマウスを保定するため、アダプターをマウスの頭部に取り付け、光ファイバーや記録電極が刺入できるように頭蓋骨の一部を剥離する。
- ②マウスの頭部に取り付けたアダプターを介して無痛的に覚醒下で脳定位固定装置にマウスを保定し、光ファイバーを接着した記録電極を線条体に刺入する。光照射と細胞外記録を同時に行い、光照射に応じて線条体の神経活動の興奮が認められるのかどうかを確認する。
- ③線条体に光ファイバー、淡蒼球、黒質網様部に記録電極を刺入し、線条体へ光照射したとき、淡蒼球、黒質網様部において細胞外記録を行う。線条体投射ニューロンの興奮により、淡蒼球や黒質網様部など大脳基底核神経回路を構成する神経核の神経活動がどのように変化するのかを解析する。

#### (2) 大脳皮質-線条体経路の電気生理学的解析

大脳皮質-線条体経路には特異的に発現するマーカー分子が知られていないため、狂犬病の糖タンパクを持つ逆行性のレンチウイルスベクター(RVG)を利用する。RVG-ChR2をマウスの線条体に注入し、逆行性に大脳皮質-線条体経路にChR2を発現させ、大脳皮質-線条体経路の電気生理学的解析を行う。

- ①マウスの線条体にRVG-ChR2ベクターを注入し、大脳皮質におけるChR2の発現を組織化学的に確認する。
- ②覚醒下で無痛的に脳定位固定装置にマウスを保定するため、アダプターをマウスの頭部に取り付け、光ファイバーや記録電極が刺入できるように頭蓋骨の一部を剥離する。
- ③マウスの頭部に取り付けたアダプターを介して無痛的に覚醒下で脳定位固定装置にマウスを保定し、光ファイバーを接着した記録電極を大脳皮質運動野に刺入する。光照射と細胞外記録を同時に行い、光照射に応じて大脳皮質運動野の神経活動の興奮が認められるのかどうかを確認する。
- ④大脳皮質運動野に光ファイバー、淡蒼球、黒質網様部に記録電極を刺入し、大脳皮質運動野へ光照射したとき、淡蒼球、黒質網様部

において細胞外記録を行う。大脳皮質-線条体経路の興奮により、淡蒼球や黒質網様部など大脳基底核神経回路を構成する神経核の神経活動がどのように変化するのかを解析する。

#### (3) 線条体投射ニューロン、大脳皮質-線条体経路の行動学的解析

自由行動下で標的とする領域に光刺激ができるように、PDE10A2-tTA::tet0-ChR2マウス、RVG-ChR2ベクターを線条体に注入したマウスの脳にカニューレを埋め込む。

カニューレから光ファイバーを刺入し、マウスをオープンフィールドに置き、自発運動を観察する。光照射に応じて自発運動がどのように変化するのかを解析し、線条体投射ニューロン、大脳皮質-線条体経路の自発運動の制御における役割を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 線条体投射ニューロンの電気生理学的解析

PDE10A2-tTA::tet0-ChR2マウスにおいて、光ファイバーを接着した記録電極を線条体に刺入し、光照射と細胞外記録を同時に行ったところ、光照射に応じた神経活動の興奮が認められた(図2)。

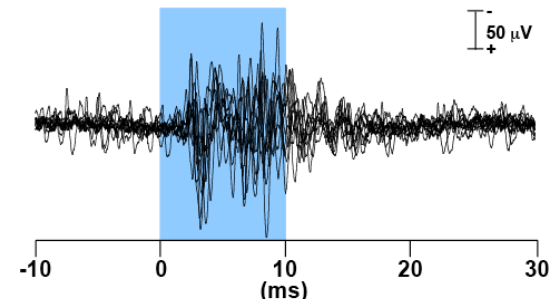


図2 線条体投射ニューロンの光刺激による活動変化

PDE10A2-tTA::tet0-ChR2マウスにおいて、線条体に光ファイバーを接着した記録電極を刺入し、10msの青色光を照射したとき(青色部分)の活動を記録した。光照射10回の重ね書き。光照射に応じた興奮が認められた。

次に、線条体に光ファイバー、淡蒼球、黒質網様部に記録電極を刺入し、線条体投射ニューロンの興奮を誘導したときの淡蒼球、黒質網様部の神経活動を記録したところ、光照射に応じた一過性の抑制が認められた(図3)。



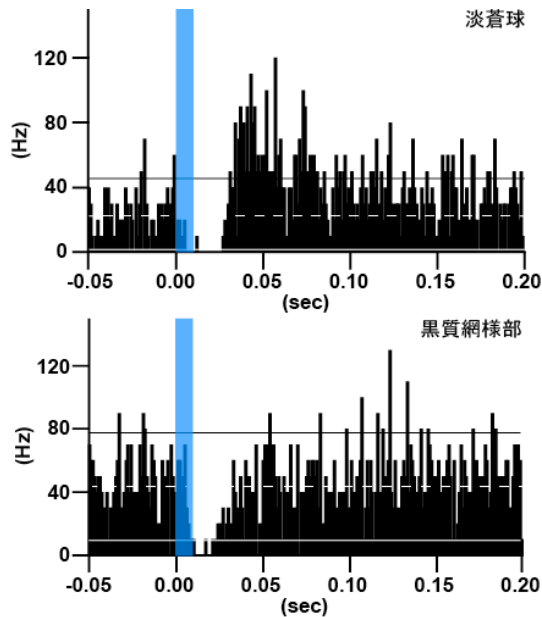


図 3 線条体投射ニューロンを光刺激したときの淡蒼球と黒質網様部における応答

PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウスにおいて、線条体に光ファイバー、淡蒼球、黒質網様部に記録電極を刺入し、10msの青色光を照射したとき（青色部分）の神経活動を記録した。光照射 100 回のヒストグラム。光照射に応じた抑制が認められた。破線は光照射前の平均発火頻度、黒線、白線は有意水準 ( $p < 0.05$ )

### (2) 大脳皮質-線条体経路の電気生理学的解析

マウスの線条体に RVG-ChR2 ベクターを注入し、大脳皮質-線条体経路での ChR2 の発現を組織化学的に確認したところ、発現量が非常に低く、光ファイバーを接着した記録電極を大脳皮質運動野に刺入し、光照射したときの神経活動を記録したところ、非常に弱い興奮しか誘導することができなかった。そこで、RVG ベクターとアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の 2 種類のウイルスベクターを用いた 2 重感染を利用し、Cre-loxP システムを用いて、大脳皮質-線条体経路に ChR2 を発現させたところ、RVG-ChR2 ベクターよりも ChR2 は高い発現レベルを示した (図 4)。

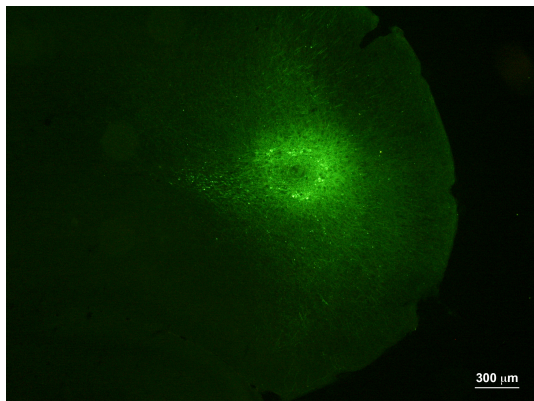


図 4 2 重感染による Cre-loxP システムを利用したマウス大脳皮質における ChR2 の発現

さらに、光ファイバーを接着した記録電極を大脳皮質運動野に刺入し、光照射したときの神経活動を記録したところ、光照射に応じた興奮が認められた (図 5)。

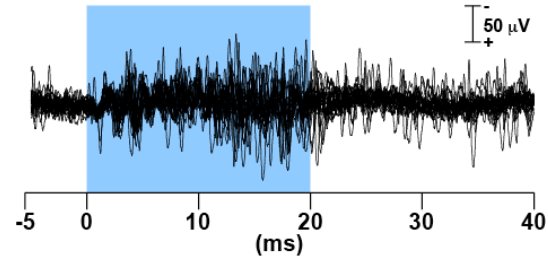


図 5 大脳皮質-線条体経路の光刺激による活動変化

2 重感染による Cre-loxP システムを利用して大脳皮質-線条体投射経路に ChR2 を導入したマウスにおいて、大脳皮質運動野に光ファイバーを接着した記録電極を刺入し、20ms の青色光を照射したとき（青色部分）の活動を記録した。光照射 20 回の重ね書き。光照射に応じた興奮が認められた。

次に、大脳皮質に光ファイバー、淡蒼球、に記録電極を刺入し、大脳皮質-線条体経路の興奮を誘導したときの淡蒼球の神経活動を記録したところ、光照射に応じて抑制あるいは抑制-興奮の傾向の応答パターンが認められた (図 6)。

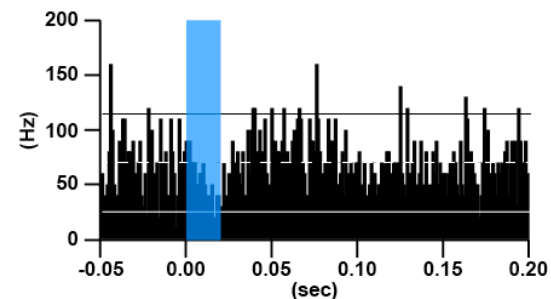


図 6 大脳皮質-線条体経路を光刺激したときの淡蒼球における応答

2 重感染による Cre-loxP システムを利用して大脳皮質-線条体経路に ChR2 を導入したマウスにおいて、大脳皮質運動野に光ファイバー、淡蒼球に記録電極を刺入し、20ms の青色光を照射したとき（青色部分）の神経活動を記録した。光照射 100 回のヒストグラム。光照射に応じた抑制の傾向が認められた。破線は光照射前の平均発火頻度、黒線、白線は有意水準 ( $p < 0.05$ )

### (3) 線条体投射ニューロン、大脳皮質-線条体経路の行動学的解析

PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウスの線条体にカニューレを埋め込み、カニューレから光

ファイバーを刺入し、マウスをオープンフィールドに置き、自発運動を観察したところ、光照射を始めて数分後から、一方向への回転運動が観察された。電気生理学的解析結果と合わせると、淡蒼球、黒質網様部における一過性の抑制が回転運動を誘発したと考えられる。

大脳皮質-線条体経路に ChR2 を発現させたマウスの大脳皮質にカニューレを埋め込み、カニューレから光ファイバーを刺入し、マウスをオープンフィールドに置き、自発運動を観察したところ、光照射に応じた明らかな行動変化は観察できなかった。光照射に応じた大脳皮質-線条体経路の興奮が弱く、淡蒼球での一過性の応答も弱いため、顕著な行動変化が認められなかった可能性が考えられる。

#### 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 3 件)

(1) Sano H, Chiken S, Hikida T, Kobayashi K, Nambu A

Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra.

J Neurosci, 33(17), 7583-7594, 2013, 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4932-12.2013

(2) \*Bepari AK, \*Sano H, Tamamaki N, Nambu A, Tanaka KF, Takebayashi H.

\*Bepari AK and \*Sano H contributed equally to this work.

Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by Npas4 expression.

PLOS ONE, 7(12), e52783, 2012, 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0052783.

(3) Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A.

Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced expression system.

Cell Report, 2(2), 397-406, 2012, 査読有  
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.06.011.

[学会発表] (計 8 件)

(1) Sano H, Chiken S, Kobayashi K, Nambu A.

Striatopallidal neurons attenuate motor activity through the phasic response pattern in the basal ganglia.

NEUROSCIENCE 2012, October 15, 2012, New Orleans, Louisiana, USA

(2) Sano H, Chiken S, Murata M, Kobayashi K, Nambu A.

Young Investigator Colloquia: Neurodegeneration

Pathophysiology and therapy for basal ganglia disease.

The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry (APSN2012), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October 2, 2012, Kobe, Japan

(3) Sano H, Kato S, Chiken S, Kobayashi K, Kobayashi K, Nambu A.

Selective activation of cortico-striatal projections by using optogenetics with retrograde gene transfer.

第35回日本神経科学大会、2012年9月20日、名古屋市

(4) 佐野裕美、加藤成樹、知見聡美、小林憲太、小林和人、南部篤

光遺伝学を応用した大脳皮質-線条体経路の神経生理機能の解明

包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、2012年7月26日、仙台市

(5) Sano H, Chiken S, Hikida T, Kobayashi K, Nambu A.

Striatopallidal neurons regulate motor activity through cortically evoked response patterns in the substantia nigra pars reticulata.

第89回日本生理学会大会、2012年3月31日、松本市

(6) 佐野裕美、知見聡美、小林和人、南部篤  
線条体-淡蒼球投射ニューロンが制御する運動調節機能の解明

第58回中部日本生理学会、2011年11月1日、福井市

(7) Sano H, Chiken S, Kobayashi K, Nambu A.

Striatopallidal neurons regulate motor activity through response pattern in the external segment of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata.

第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜市

(8) 佐野裕美、加藤成樹、知見聡美、小林憲太、小林和人、南部篤

大脳基底核の生理機能解明への光遺伝学の  
応用  
包括型脳科学研究推進支援ネットワーク  
夏のワークショップ、2011年8月22日、神  
戸市

〔その他〕

(1) 生理学研究所ホームページ、プレスリリ  
ース

[http://www.nips.ac.jp/contents/release/  
entry/2013/04/post-244.html](http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2013/04/post-244.html)

(2) 日本神経科学学会ホームページ、神経科  
学トピックス

<http://www.jnss.org/20130524-02/>

(3) 日本生理学会ホームページ、サイエンス  
トピックス

[http://physiology.jp/exec/page/stopics8  
5/](http://physiology.jp/exec/page/stopics85/)

(4) 日経産業新聞、2013年4月25日、11面、  
意思に反した手足の動きを抑える神経回路  
発見

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 裕美 (SANO HIROMI)

生理学研究所・統合生理研究系・特任助教

研究者番号：00363755

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者