

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目： 特別推進研究  
 研究期間： 2005 ～ 2009  
 課題番号： 17002016  
 研究課題名（和文） 機能的神経ネットワークの構築と制御の分子メカニズムの研究  
 研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms that control development and function of the neural network  
 研究代表者 中西 重忠  
 (Shigetada Nakanishi)  
 (財)大阪バイオサイエンス研究所・所長  
 研究者番号：20089105

## 研究成果の概要（和文）：

本研究プロジェクトにおいては、特定の神経回路の神経伝達を可逆的かつ選択的に遮断する独自の手法を開発し、小脳運動記憶の時系列を持った素過程を明らかにし、小脳記憶は2つの神経回路の情報の処理と統合によって誘導されること、また報酬記憶と忌避記憶が大脳基底核の2つの神経経路によって特異的に支配されていること、更に小脳神経回路の活動依存的な成熟化の分子機構を明らかにした。これらの成果は機能的神経回路の形成と制御の全く新しい機構を示したものである。

## 研究成果の概要（英文）：

This project established a novel technique that allowed selective and reversible blockade of specific transmission in the network. The studies using this technique unraveled sequential and integrative processes of acquisition, expression and storage of motor learning at different cerebellar circuits and distinct roles of two parallel pathways of the basal ganglia in reward-based and aversive learning. This project also disclosed a novel mechanism that controls the activity-dependent maturing processes of the functional cerebellar network organization.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	99,600,000	29,880,000	129,480,000
2006年度	105,600,000	31,680,000	137,280,000
2007年度	109,600,000	32,880,000	142,480,000
2008年度	109,600,000	32,880,000	142,480,000
2009年度	99,600,000	29,880,000	129,480,000
総計	524,000,000	157,200,000	681,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：小脳、大脳基底核、運動記憶、報酬・忌避記憶、薬物依存、神経回路、発達、神経伝達

## 1. 研究開始当初の背景

脳神経系は多数の神経細胞が機能的な神経ネットワーク（神経回路）を形成し、この

神経回路の中で情報が処理、統合、保持、抽出される事によって脳機能が発現される。近年多くの脳機能分子の実体が明らかにさ

れたが、脳機能発現にかかわる情報伝達の制御というソフトの問題はなお多くが不明であった。さらに神経回路が機能性を持つためには、発達過程、特に生後の神経細胞の活性調節 (activity dependency) が必須であり、神経回路形成においても神経情報伝達というソフトの問題を理解する事が不可欠である。従って、本研究は機能的神経回路の構築と制御機構を明らかにすることである。

## 2. 研究の目的

小脳及び大脳基底核の神経回路は共に運動の制御に関わり、また小脳神経回路は運動記憶の誘発に、一方大脳基底核の神経回路は報酬と忌避の記憶を支配する重要な脳部位である。また基底核は薬物依存症の誘発に関わる脳部位である。さらに小脳の神経回路は生後の発達期に神経細胞が増殖、分化、移動、成熟し機能的神経回路を形成し、かつこの過程は神経細胞の活動が神経回路の形成を制御している。両神経回路は形態学的及び生理学的に良く解析されており、更に入力と出力が定量的に解析出来る系である。従って本研究は両神経回路の特徴を生かして以下の3本の柱からなる研究を進める事を目的とした。

柱1：生後の発達期に見られる小脳の神経回路の構築が神経細胞の活動によってどのように制御されているのか。

柱2：小脳の神経回路の神経伝達がどのように協調的な運動をもたらし、また運動記憶を引き起こすのか。

柱3：大脳基底核の神経伝達がどのように運動のバランスを制御し、また薬物依存を引き起こすのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究者のグループは第1に DOX 依存的に伝達物質の遊離を阻止する破傷風毒素を特定の神経細胞に発現する変異モデルマウスを作製し、神経回路の特定の神経細胞の伝達を選択的かつ可逆的に阻止する可逆的神経伝達阻止法 (RNB 法) を開発した。第2に特定の神経細胞にヒト IL-2 受容体を発現し、本受容体に対するイムノトキシンを投与して神経回路から特定の神経細胞のみを除去するイムノトキシン標的神経細胞破壊法 (IMCT 法) を開発した。両手法とも成熟マウスの特定の神経回路の伝達制御を個体レベルで解析する事ができる本研究グループが開発した独自の新しい手法である。本研究はこれらの手法に加え動物行動学、生体工学、電気生理学、形態学などの異なった手法を融合し、小脳の神経回路構築と制御及び基底核の伝達制御と可塑性の機構を明らかにした。

## 4. 研究成果

### 柱1. 小脳神経回路の構築機構

小脳皮質の主要な神経回路は苔状線維-顆粒細胞-平行線維-プルキンエ細胞からなる。小脳顆粒細胞は生後の発達期に外顆粒細胞層で増殖、分化し、内顆粒層に移動して成熟したシナプスを形成する。小脳の顆粒細胞は他の神経細胞の成熟と同様に発達に伴って顕著な膜電位の変化を示し、未熟な顆粒細胞の脱分極の状態から成熟細胞の非脱分極の状態に移行する (図1)。我々は小脳器官培養と顆粒細胞培養系を用いて生体と同様、未成

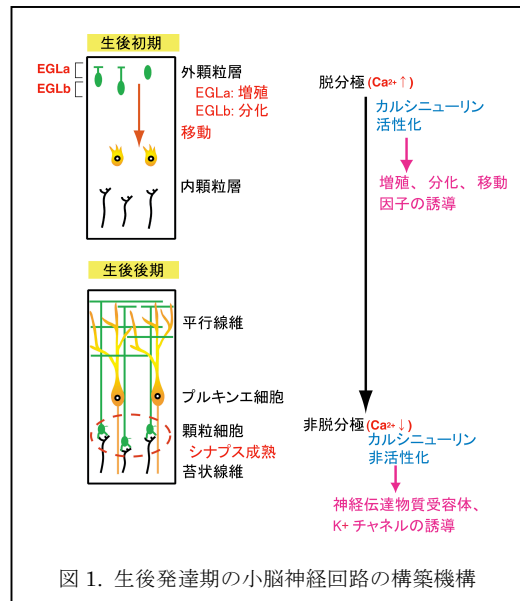


図1. 生後発達期の小脳神経回路の構築機構

熟顆粒細胞は成熟するに伴い静止膜電位が脱分極から非脱分極に移行すること、脱分極から非脱分極に移行することに伴い細胞内の  $Ca^{2+}$  シグナル系が変化し、未熟な顆粒細胞では  $Ca^{2+}$  がカルシニューリン脱リン酸化酵素 (CaN) を活性化し、細胞の分裂、分化、移動にかかわる種々の蛋白を誘導することを明らかにした。また我々は単離培養細胞、器官培養及び発達期の小脳 in vivo 解析を進め、非脱分極は恒常的な (tonic) 細胞外  $Ca^{2+}$  の流入を抑え、CaN を不活性化し、苔状線維と顆粒細胞の機能的シナプス伝達に関わる一連の成熟遺伝子が誘導され、(少なくとも15種類同定)、逆に未成熟遺伝子発現が抑制 (少なくとも5種類同定) される事を明らかにした。更に我々は顆粒細胞の非脱分極化がグルタミン酸伝達物質に対する AMPA 型及び NMDA 型の受容体の応答性を高め、 $Na^+$  チャンネル、引き続き  $Ca^{2+}$  チャンネルを活性化し、phasic な  $Ca^{2+}$  の流入が CaMKII と P13 Kinase を活性化し、共通の機構で上記一連の成熟遺伝子の誘導と未成熟遺伝子の抑制を制御している事を明らかにした。更にこの遺伝子発現機構の解析を進め、一つの転写因子がマスター制御因子として正負にコントロールし

ているという事実を明らかにした。これまで神経細胞の増殖、分化、移動を支配する転写因子に関しては数多くの研究がなされ、それらの機構が明らかにされてきたが、本研究成果は神経細胞の成熟という最終分化プログラムの転写制御機構を明示したものであり、また activity-dependency による神経細胞成熟のマスター転写因子を初めて提示したものである。

## 柱 2. 小脳神経回路の制御機構

小脳は条件付け瞬目反射 (eyeblink conditioning), 視運動性反射 (optokinetic reflex, OKR) などの運動記憶を制御する脳部位である。小脳記憶は条件付け刺激と無条件刺激が小脳の苔状線維と登上線維によってそれぞれプルキンエ細胞と小脳深部核 (eyeblink) 或は脳幹 (OKR) の2つの神経回路に伝達される事によって誘導される (図 2)。

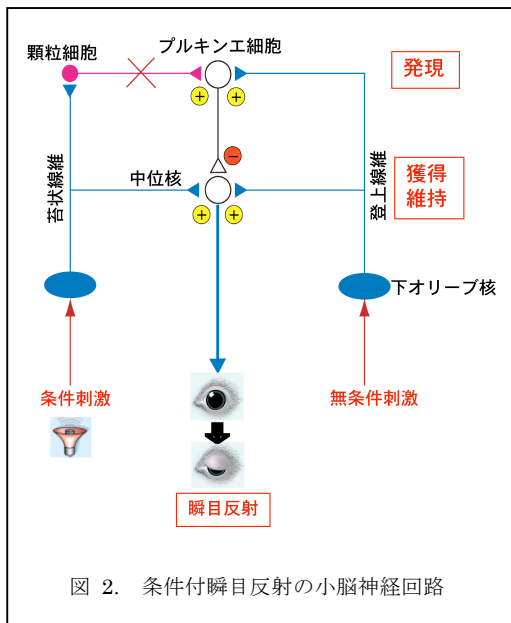


図 2. 条件付瞬目反射の小脳神経回路

しかしこの2つの神経回路が小脳記憶の素過程にどのようにかかわっているのか不明であった。我々は神経伝達物質の分泌を阻害する破傷風毒素を小脳神経回路の顆粒細胞に特異的かつ可逆的に発現し (RNB 法)、顆粒細胞からプルキンエ細胞への伝達を可逆的に遮断出来るモデルマウスを作製する事に成功した。このモデルマウスを用いて顆粒細胞からプルキンエ細胞への神経伝達を特異的、可逆的に阻止する事によって条件付瞬目反射及び OKR の運動記憶において共に小脳記憶の獲得と維持には小脳深部核 (瞬目反射) 或は前庭核 (OKR) が必須の役割を果たし、一方記憶の発現にはプルキンエ細胞の可塑的变化を必要とすることを明らかにした。この成果は小脳記憶の一連のプロセスが異なった神経回路の統合的な神経可塑性によって制御されているという新しい事実を明らか

にしたものである。

柱 3. 大脳基底核の神経回路の制御と可塑性  
大脳基底核神経回路においては、大脳皮質の入力が線条体の2種類の主要神経細胞 (サブスタンス P 及びエンケファリン発現細胞) に入り、それぞれの入力は直接路と間接路を介して黒質網様部に伝えられる (図 3)。この

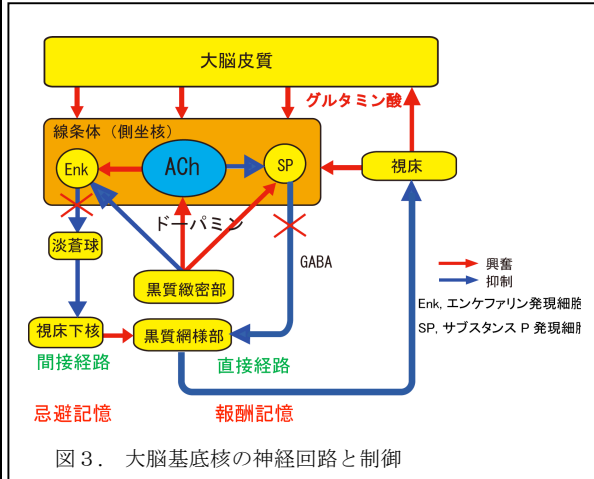


図 3. 大脳基底核の神経回路と制御

2つの経路は拮抗的に働き基底核-視床-大脳皮質の神経伝達系を制御している。さらに黒質緻密部からのドーパミン (DA) と基底核内のアセチルコリン (ACh) が直接路及び間接路に対してそれぞれ拮抗的に働いて基底核の活性を制御している。我々は破傷風毒素遺伝子導入ウイルスを組み合わせる事によって直接路及び間接路のそれぞれの神経伝達を可逆的かつ選択的に遮断出来るモデルマウスを作製する事に成功した。直接路遮断マウス (D-RNB マウス) 及び 間接路遮断マウス (I-RNB マウス) を解析する事によって直接路、間接路の両者がドーパミンの急性反応の応答に必要であるが、報酬反応及びコカインの依存性には直接路が、一方嫌悪刺激に対する忌避反応には間接路がそれぞれ制御するという新事実を明らかにした。この結果は大脳基底核の直接路と間接路の制御がそれぞれ独自の可塑的な変化を示しそれぞれの経路が報酬と忌避行動を選択的に制御するという新事実を明らかにしたものである。

## 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 21 件)

1. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior: Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S. Neuron (in press) (査読有)
2. Ca<sup>2+</sup>-dependent release of Munc18-1 from

- presynaptic mGluR<sub>1</sub> uRs in short-term facilitation. Nakajima, Y., Mochida, S., Okawa, K and Nakanishi, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:18385-18389 (2009) (有)
3. Role of calcineurin signaling in membrane potential-regulated maturation of cerebellar granule cells. Okazawa, M., Abe, H., Katsukawa, M., Iijima, K., Kiwada, T. and Nakanishi, S. J. Neurosci. 29: 2938-2947 (2009) (有)
  4. Dual regulation of NR2B and NR2C expression by NMDA receptor activation in mouse cerebellar granule cell cultures. Iijima, K., Abe, H., Okazawa, M., Moriyoshi, K. and Nakanishi, S. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 12010-12015 (2008) (有)
  5. Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission. Wada, N., Kishimoto, Y., Watanabe, D., Kano, M., Hirano, T., Funabiki, K. and Nakanishi, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:16690-16695 (2007) (有)
  6. Membrane potential -regulated Ca<sup>2+</sup> signaling in development and maturation of cerebellar granule cells. Nakanishi, S. and Okazawa, M. J. Physiol. 575:389-395 (2006) (有)
  7. Neuronal depolarization controls brain-derived neurotrophic factor-induced upregulation of NR2C NMDA receptor via calcineurin signaling. Suzuki, K., Sato, M., Morishima, Y. and Nakanishi, S. J. Neurosci. 25: 9535-9543 (2005) (有)
  8. A pivotal role of calcineurin signaling in development and maturation of postnatal cerebellar granule cells. Sato, M., Suzuki, K., Yamazaki, H. and Nakanishi, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5874-5894 (2005) (有)
  9. Enhanced cocaine responsiveness and impaired motor coordination in metabotropic glutamate receptor subtype 2 knockout mice. Morishima, Y., Miyakawa, T., Furuyashiki, T., Tanaka, Y., Mizuma, H. and Nakanishi, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:4170-4175 (2005) (有)
  10. Synaptic mechanisms of the cerebellar cortical network. Nakanishi, S. Trends Neurosci. 28:93-100 (2005) (有)

[学会発表] (計 68 件)

1. Nakanishi, S. Key-note lecture, Gordon Research Conference : Neural Circuits & Plasticity, June 7, 2009. Salve Regina University, Newport, USA 「Integrative and regulatory mechanisms of synaptic transmission in the neural network.」
2. Nakanishi, S. The Wellcome Trust and Cold Spring Harbor Laboratory joint conference on 'Integrative Approaches to Brain Complexity' October 2, 2008. Wellcome Trust Conference Centre, Cambridge, UK 「Integrative and regulatory synaptic mechanisms of the cerebellar network.」
3. Nakanishi, S. The 8<sup>th</sup> International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors. September 14, 2008. Taormina, Sicily, Italy. 「Function and signaling mechanism of the mGluR<sub>1</sub>-interacting scaffold tamalin.」
4. Nakanishi, S. Gruber Prize lecture, Neuroscience 2007, November 4, 2007. San Diego Convention Center, San Diego, USA. 「The neural network: integration and regulation of synaptic transmission.」
5. Nakanishi, S. Key-note lecture, ASPET The Third GPCR Colloquium, April 28, 2007. Washington DC Convention Center, Washington DC, USA. 「Integrative and regulatory mechanisms of synaptic transmission in the neural network.」

[図書] (計 1 件)

1. The History of Neuroscience in Autobiography. Nakanishi, S. Oxford University Press Vol. 6 :382 -419 (2009) (招待)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法

発明者：足田貴俊、中西重忠

権利者：財団法人 大阪バイオサイエンス研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2010/003089

出願年月日：2010年4月30日

国内外の別：国際

[その他]

ホームページ等

<http://www.obi.or.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 重忠 (Shigetada Nakanishi)  
(財)大阪バイオサイエンス研究所・所長  
研究者番号：20089105

(2) 研究分担者

岡澤 慎 (Makoto Okazawa)  
(財)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：40414130

黄檗 達人 (Tatsuto Kiwada)  
(財)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：50414131

疋田 貴俊 (Takatoshi Hikida)  
(財)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：70421378

土居 智和 (Tomokazu Doi)  
(財)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  
研究社番号：20435564

矢和多 智 (Satoshi Yawata)  
(財)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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：