

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01982

研究課題名(和文) 運動学習獲得ストラテジーにおける2種の小脳シナプス可塑性の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of motor learning strategy via two types of the cerebellar synaptic plasticity

研究代表者

山口 和彦 (Yamaguchi, Kazuhiko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・客員研究員

研究者番号：00191221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：小脳の運動学習に、平行線維-プルキンエ細胞間シナプス伝達の長期抑圧LTDが必須である。このLTDの大きさがラットでは段階的であるが、マウスでは不明であった。本研究ではマウスで段階的なLTD形成があるか調べた結果、マウスではLTDは全か無の方式で形成された。またラットのプルキンエ細胞においては常時AMPA型グルタミン酸受容体のリサイクリングがあることを我々は報告したが、マウスでは見られない。モデルを用いたシミュレーションによって検討したところ、常時リサイクリングが段階的LTD形成に有利であることが示唆された。段階的LTDは意志による困難な運動学習獲得に有利と考えられ、進化の方向が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経科学において、遺伝子と行動発現の因果関係の解析には、30年以上にわたり、ほとんど唯一のモデル動物としてマウスが用いられてきた。少なくとも小型実験動物においてはマウスの脳神経機能のみが報告されてきた。しかし、マウスとラットの間には大きな進化的ギャップがあることが心理実験等から示唆されている。本研究において、ラットのみで見られる段階的可塑性の形成に、ひいては意志による学習に、構成性AMPA受容体リサイクリングの有無が重要であることを初めて示唆した。ヒトのりハビリの基礎における意志と効果を最適化する実験動物としてはラットが有用であることが示唆され、今後の医療面への応用の道を開いた。

研究成果の概要(英文)：Long-term depression (LTD) of synaptic transmission between parallel fiber and Purkinje cell is essential for motor learning in the cerebellum. The size of the LTD was reported to be graded in rats, but not in mice. In the present study, the presence of graded LTD formation was examined in mice cerebellar slice, and as a result, LTD was formed in an all-or-nothing manner in mice. We have also reported that there is a constitutive recycling of AMPA-type glutamate receptors in rat Purkinje cells, but not in mice. A simulation using a model suggests that constitutive recycling of AMPA-receptor is advantageous for graded LTD formation. The graded LTD was considered to be advantageous for the difficult motor learning by volition, and the direction of evolution was suggested.

研究分野：脳神経科学

キーワード：小脳 シナプス可塑性 長期抑圧LTD プルキンエ細胞 アンパ型グルタミン酸受容体 リサイクリング
運動学習 マウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小脳は運動学習の要と考えられてきた。小脳皮質では唯一の出力細胞である**プルキンエ細胞(PC)**への興奮性シナプス入力(平行線維-PC間のシナプス入力)が、誤差信号を運ぶと考えられる登上線維の発火とタイミングが重なると、平行線維-PC間シナプスの伝達効率が長期間にわたって抑圧され(**長期抑圧、LTD**)、このLTDが運動学習の基礎であるという仮説(**Marr-Alubs-Ito仮説**)(総説: Ito et al, 2014)が提出されていた。しかし登上線維の活動のみによって惹起される抑制性シナプスの**反動性増強 RP**を生じなくさせたトランスジェニック動物で運動学習に障害が生じたことから、**RPが運動学習に重要**、と示唆された(Tanaka et al, 2013)。申請者はごく最近、上記のGluA2-CT変異体ノックインマウスの小脳において、**刺激条件を変えるだけで上記2種類のGluA2-CT遺伝子改変マウスにもLTDが生じる**ことを発見した(Yamaguchi et al, 2016)。そこで**RPとLTDのどちらのシナプス可塑性が小脳、運動学習の獲得に重要なのか**、未解明であった。申請者は学習初期にRP、後期にLTDが必要という仮説を立て、これを証明するためにこの研究計画を立てた。

2. 研究の目的

2018年に他研究室より発表された論文において、光遺伝学的な操作によって選択的に平行線維シナプスのLTDを阻害すると眼球運動の運動学習が阻害され、しかも抑制性シナプスのRPは正常であることが示された(Kakegawa et al, 2018)。RPよりもLTDが運動学習に重要と思われたので、検証する仮説を変更した。ラットにおいては登上線維-平行線維の同時刺激の回数により、段階的な大きさのLTDが生じることが報告されている(Karachot et al., 1994)。この段階的LTDは複雑な運動学習獲得の戦略として、一般的である可能性がある。しかし、マウス小脳においては段階的なLTDは報告されていない。そこでまずマウスにおいて段階的LTDが記録できるか、検証することにした。次に我々はラット小脳においてAMPA型グルタミン酸受容体が常時リサイクルしていることを発見した(Tatsukawa et al, 2006)。一方、マウス小脳プルキンエ細胞においてはAMPA型受容体の常時リサイクリングの報告もあるが(Kim et al, 2017)否定的な報告もあり(Kakegawa et al., 2018)はっきりしない。これを確定し、マウスについてモデルを用いたシミュレーション解析を行い、運動学習獲得戦略の一般法則を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

成体マウス(3-6カ月令)の小脳虫部より、スライス標本を作製(厚さ300ミクロン)し、全細胞パッチクランプ法にてプルキンエ細胞細胞体よりシナプス電気活動を記録した。生理的条件に近づけるため、実験温度は30とした。刺激電極を分子層表面に置き平行線維を刺激、またプルキンエ細胞層直下で登上線維を刺激した。平行線維シナプス電流は刺激の強さに応じて段階的に振幅を増すこと、および2発刺激(50msec間隔)に対しペアパルス促進を示すことを同定条件とした。一方、登上線維シナプス電流の同定には刺激強度の変化に対し、全か無の法則に従うこと、および2発刺激に対しペアパルス抑圧を示すことを指標とした。スライスの灌流(2ml/分)には酸素(95%)・2酸化炭素(5%)を吹き込んだ人工脳脊髄液を用い、灌流液にはピクロトキシン(0.1mM)を加え、抑制性シナプス受容体イオンチャンネルを阻害した。LTDの誘導に当たっては平行線維と登上線維の同時刺激を1Hzで、100-300回、繰り返す。平行線維のダブルパルス刺激(50msec間隔)と登上線維刺激を同時に1Hzで100-300回繰り返す。Cs内液を用い、平行線維のダブルパルス刺激と細胞体脱分極刺激(-70から+10mV、50msec)を1Hzで60から180回繰り返す。Cs内液を

用い、平行線維の高頻度刺激(100Hz、5 発)と細胞体脱分極刺激(-70 から+10mV、50msec)を 0.5Hz で 30 から 90 回繰り返す、という 4 つのプロトコルを用いた。Cs イオンをベースにしたピペット内液は、通常の K イオンをベースにした内液に比べ、K チャネルを阻害し、樹状突起のケーブル定数を上昇させ、平行線維シナプスのある樹状突起部での Ca スパイクの発生確率を上昇させるという理由で用いた。

4 . 研究成果

(1) 平行線維ダブルショックと細胞体脱分極による LTD 誘導 : LTD を誘導する際に、刺激回数を変えることで、段階的 LTD を誘導できるかについて検討した。ラット小脳においては段階的な LTD が誘導できることが報告されている (Karachot et al,1994)。しかしマウスにおいては段階的 LTD の誘導は試みられていない。マウス小脳において、1Hz で 180 回刺激した場合、有意に LTD が生じたが、60 回、1Hz で組み合わせ刺激をした場合は LTD は全く生じなかった。

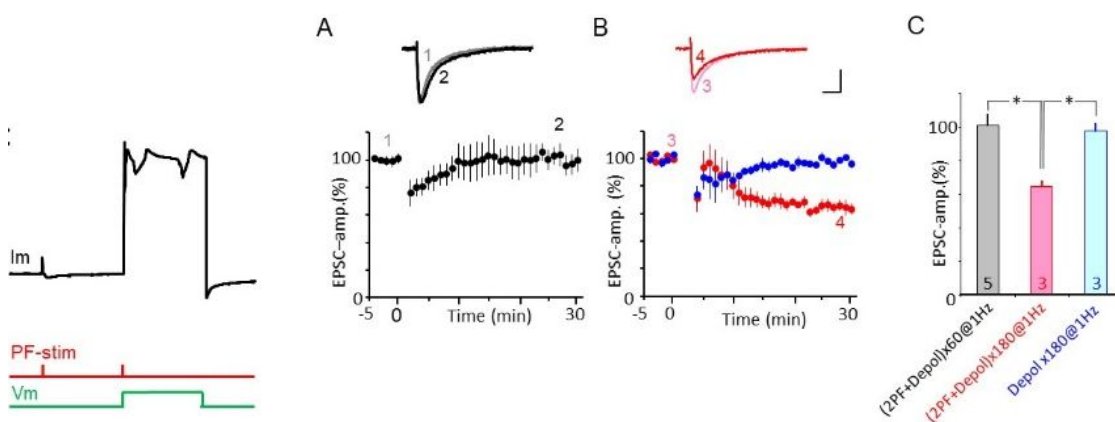


図 1. 平行線維ダブルショックと細胞体脱分極による LTD 誘導における刺激回数の効果

(2) 平行線維高頻度刺激 (100Hz x 5) と細胞体脱分極による LTD 誘導 (Yamaguchi and Ito, 2019)

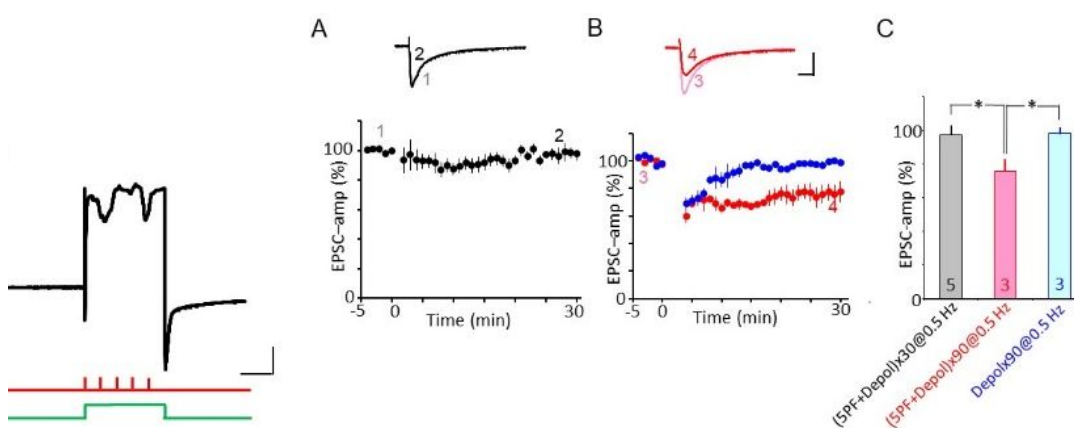


図 2. 平行線維高頻度刺激 (100Hz x 5) と細胞体脱分極による LTD 誘導

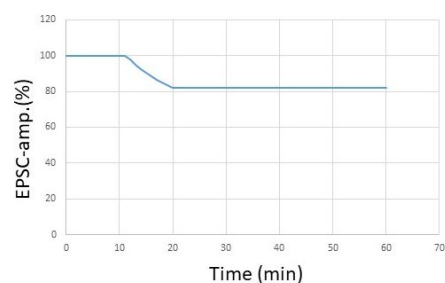
平行線維シナプス伝達の LTD を、平行線維高頻度刺激(100Hz x 5)と細胞体脱分極により誘導した。0.5Hz で 90 回 (3 分間) 同時刺激した場合、LTD が生じた ($76.0 \pm 6.7\%$)。一方、30 回、0.5Hz で組み合わせ刺激をした場合は LTD は全く生ぜず ($97.6 \pm 4.4\%$) 対照群との差はなく ($p > 0.9$)、90 回刺激群との差は有意であった ($p < 0.05$)。以上の結果は、少なくとも今回用いた実験条件では、マウス小脳において段階的 LTD 大きさの LTD を誘導することは

できなかった。

(3) AMPA 型受容体の平行線維 プルキンエ細胞間シナプスにおける構成性リサイクリングの検討

ラット小脳スライスにおいて、プルキンエ細胞内に破傷風毒素を投与し VAMP を消化することにより、エキソサイトーシスを阻害すると平行線維 - プルキンエ細胞間シナプスにおいて、EPSC 振幅が徐々に小さくなることを観察した (Tatsukawa et al., 2006)。また、ダイナミン阻害ペプチドの細胞内投与、ダイナミン阻害剤 (ダイナソール) の細胞外投与により EPSC 振幅が増大することも観察された (Yamaguchi, 2017)。これらの結果はラットの平行線維 - プルキンエ細胞間シナプスにおいて、AMPA 受容体が常時リサイクリングをしている証拠と考えられる。マウスにおいては同様の構成性リサイクリングが報告されたこともあるが (Kim et al., 2017)、一方では AMPA 受容体の構成性リサイクリングに否定的な報告 (Kakegawa et al., 2018) もありはっきりしなかった。我々は、成体マウス (生後 3 ヶ月) を用い、できるだけ生理的な温度条件に近づけ、31 °C で実験を行い、破傷風毒素を細胞内投与したが、EPSC 振幅の減少は見られなかった。またダイナミン阻害剤を細胞外投与した場合も、EPSC 振幅の増大は見られなかった。この結果はマウス小脳の平行線維シナプスにおいては構成性リサイクリングが生じていないことを示していた。これはマウスとラットの小脳における大きな違いであると考えた。マウスのプルキンエ細胞においては AMPA 受容体の構成性リサイクリングは存在しない (Kakegawa et al. 2017)。一方、ラットのプルキンエ細胞においては AMPA 受容体の速い構成性リサイクリングが報告されている (Tatsukawa et al. 2006)。また、マウスにおける LTD は全か無の方式で誘導されるのに対し、ラットにおいては段階的な大きさの LTD が報告されている (Karachot et al. 1994)。ラットにおける AMPA 受容体の構成性リサイクリングの存在は、段階的 LTD の誘導に何らかの役割があるかについて、理論的なモデルを用いて検討した。マウスでは構成性リサイクリングがないため、常時はエキソサイトーシスの反応速度もエンドサイトーシスの反応速度、さらに安定化反応速度、脱安定化反応速度、すべて値はゼロであり、LTD 誘導時のみ、脱安定化とエンドサイトーシスが最大値になる。LTD の大きさが大体 20-30% の AMPA 受容体の減少になるが、残りは脱安定化されないメカニズムがあると仮定される (図 5)。一方、ラットのプルキンエ細胞においては常時リサイクリングがあり、LTD 誘導刺激により脱安定化反応速度が一時的に増大すると考えられる。絵くそサイトーシス、エンドサイトーシスの値は変わらない。リサイクリングのあるシステムでは、上限は定められているものの、脱安定化反応速度の上昇の程度、あるいは上昇の持続時間に依存して段階的な LTD を誘導することができる (図 3)。この脱安定化に寄与するのは誤差信号である登上線維の発火の強さ、持続時間であるが、これは意識により“誤差”と認識される限り継続する。あるいは誤差信号を持続させる程度に応じて、より正確な運動を、徐々に学習することができると言えるだろう。一方、マウスのような全か無の場合、全か無の閾値を設定しているのは生得的な要因のため、意思により徐々に困難な運動を学習することは難しく、生得的に備えられている範囲内で、自己訓練により運動を習得することができるだろう。進化的に AMPA 受容体のリサイクリングを持つラットの方が、より自身の意志により難しい運動を習得する戦略を獲得したということが示唆された。

Mouse LTD: All-or-none



RatLTD LTD: Graded

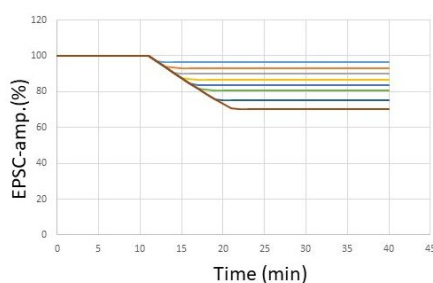


図 3. モデルによる全か無タイプの LTD と段階的 LTD の再構成

< 引用文献 >

Ito M, Yamaguchi K, Nagao S and Yamazaki T. Long-term depression, as a model of cerebellar plasticity. *Progress in Brain Research* 210 (2014): 1-30.

Kakegawa W, Katoh A, Narumi S, Miura E, Motohashi J, Takahashi A, Kohda K, Fukazawa Y, Yuzaki M, Matsuda S. Optogenetic control of synaptic AMPA receptor endocytosis reveals roles of LTD in motor learning. *Neuron* 99 (2018): 985-998.

Karachot L, Kado RT, Ito M. Stimulus parameters for induction of long-term depression in *in vitro* rat Purkinje cell. *Neuroscience Research* 21 (1994): 161-168.

Kim T, Yamamoto Y, Tanaka-Yamamoto K. Timely regulated sorting from early to late endosomes is required to maintain cerebellar long-term depression. *Nature Communication* 8 (2017): 401

Tanaka S, Kawaguchi S, Shioi G, Hirano T. Long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission onto cerebellar Purkinje neurons contributes to adaptation of vestibulo-ocular reflex. *J. Neuroscience* 33 (2013): 17209-17220.

Tatsukawa t, Chimura T, Miyakawa H, Yamaguchi K. Involvement of basal protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activities in constitutive internalization of AMPA receptors in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosciences* 26 (2006): 4820-4825.

Yamaguchi K, Itohara S, Ito M. Reassessment of long-term depression in cerebellar Purkinje cells in mice carrying mutated GluA2 C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (2016): 10192-10197.

Yamaguchi K. Kinetic analysis of constitutive and activity-dependent receptor-trafficking in cerebellar Purkinje cell. *Abstracts of Annual Meeting of Society for Neuroscience* (2017) 109.04.

Yamaguchi K, Ito M. Assessment of long-term depression induction in adult cerebellar slices. *Journal of Visualized Experiment* (152) e59859 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama K, Hatayama M, Tomioka N, Odagawa M, Kamiya A, Iwayama Y, Maekawa M, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsujii M, Yamada K, Yoshikawa T, Aruga J.	4. 巻 8
2. 論文標題 Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrln2/SALM1-deficient mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ncomms15800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi K, Ito M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Assessment of Long-term Depression Induction in Adult Cerebellar Slices	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yamaguchi, Kazuhiko
2. 発表標題 Mechanism of long-term synaptic plasticity in rat cerebellar Purkinje cell
3. 学会等名 第75回藤原セミナー「中枢神経系のハブとしての小脳」（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi, Kazuhiko
2. 発表標題 Reduction of exocytic insertion of AMPA-receptors into parallel fiber-Purkinje cell synapse is involved in LTD-expression
3. 学会等名 11th FENS forum of neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi, Kazuhiko
2. 発表標題 Analysis of Rapid Decrease in EPSC Amplitude after Sudden Block of Exocytic Insertion of AMPAR into Parallel Fiber-Purkinje Cell synapse
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi K.
2. 発表標題 Kinetic analysis of constitutive and activity dependent receptor-trafficking in cerebellar Purkinje cell
3. 学会等名 Society for Neuroscience, Washington D.C., U.S.A. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamaguchi K.
2. 発表標題 Patch-clamp techniques for studying physiological properties of the central neuron
3. 学会等名 IBRO-APRC Advanced Hong Kong School of Neuroscience (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考