

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22220005

研究課題名(和文)小脳運動記憶と神経回路形成の分子生物学的研究

研究課題名(英文)Molecular studies of motor learning and maturation of the cerebellar network

研究代表者

中西 重忠(Nakanishi, Shigetada)

公益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・所長

研究者番号：20089105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は小脳神経回路における記憶誘導の処理、統合機構と活動依存的な神経回路成熟化機構を明らかにする事である。神経回路の伝達を可逆的、特異的に遮断するreversible neurotransmission blocking (RNB)法を開発し、条件付瞬目反射と視運動性眼球反射の小脳記憶の素過程において共通性と神経回路による制御機構の違いがあること、また小脳顆粒細胞の成熟化を制御するシグナル伝達系とマスター転写因子の同定と協調的な内的及び外的因子による成熟化のシグナル制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This project is directed to explore how motor learning is acquired, expressed and stored in the cerebellar network and how the functional cerebellar network is organized during development in an activity-dependent manner. The studies using a novel, pathway-specific neurotransmission blocking technique disclosed that two forms of motor learning, eyeblink conditioning and optokinetic reflex, are induced by distinct circuit-dependent neural plasticity. The studies also identified the key signaling mechanism and the master transcription factor responsible for cerebellar maturation and demonstrated that the cerebellar maturation is controlled by convergence of the activity-dependent and extracellular signaling mechanisms.

研究分野：総合領域

キーワード：小脳 運動記憶 神経回路 神経成熟 細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

小脳神経回路は協調運動のみならず条件付け瞬目反射 (eyeblink conditioning) や視運動性眼球反射 (optokinetic reflex; OKR) の運動記憶を制御する脳部位である。また本回路の形成は発達期の活動依存的な調節が重要な役割を果たしている。小脳神経回路に関しては数多くの研究がなされているが、小脳運動記憶の伝達制御と小脳神経回路の成熟機構は多くが不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は独自に開発した可逆的神経伝達阻止法 (reversible neurotransmission blocking: RNB 法) や in vivo 顕微内視鏡、さらに分子生物学、組織培養等種々の手法を用いて小脳運動記憶の獲得、維持、発現等の素過程の機構と小脳神経回路形成の成熟化機構の解析を進め、脳情報の処理と統合の制御機構及び活動依存的な機能的神経回路の形成機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

独自に開発した特定の神経伝達を遮断する RNB 法、in vivo 顕微内視鏡 (図 1)、分子生物学的手法を用いて小脳運動記憶誘導の

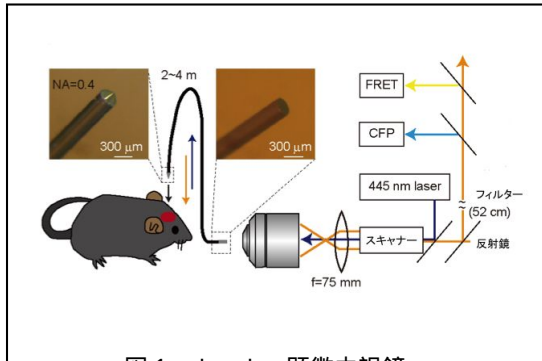


図 1 in vivo 顕微内視鏡

各素過程の機構を解析し、さらに顆粒細胞単離培養、器官培養、発達期の小脳を分子生物学、Ca<sup>2+</sup>及び FRET イメージング等の手法を用い活動依存的な小脳顆粒細胞の成熟化機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 小脳運動記憶の機構

小脳は条件付け瞬目反射 (eyeblink conditioning)、視運動性反射 (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) 或いは前庭核 (OKR) の 2 つの神経回路に伝達されることによって誘導される (図 2)。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。我々は上記 RNB 法を用いて顆粒細胞からプルキンエ細胞への伝達を特異的・可逆的に遮断することによって条件付け瞬目反射の運動記憶

においては小脳深部核が記憶の獲得、維持に必須の役割を果たしていることを示した。一方 OKR 記憶においては記憶の獲得に前庭核が必要であるが、一旦記憶が誘導されると記憶情報は前庭核に保持されプルキンエ細胞への入力がなくとも視運動性刺激によって OKR 記憶が誘導され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

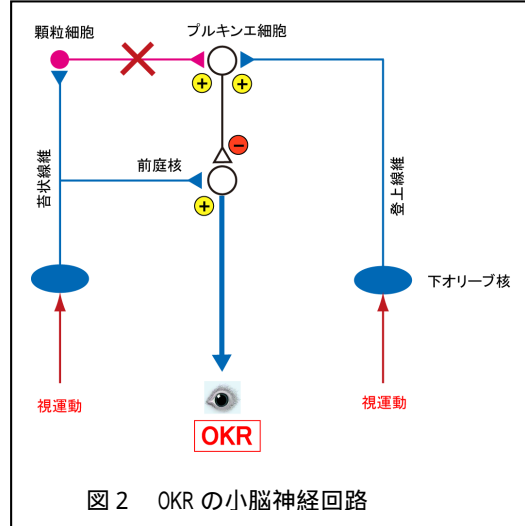


図 2 OKR の小脳神経回路

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こと、さらに条件付け瞬目反射と OKR の運動記憶の素過程にかかわる機構は一部異なるものであるという全く新しい事実を明らかにした。一方 in vivo の小脳細胞の活動を Ca<sup>2+</sup>イメージング法及び FRET 法と in vivo 顕微内視鏡法を組み合わせ測定できる手法を開発し視運動性刺激によって誘発される特徴的な小脳顆粒細胞の活動パターンを明らかにすることに成功した。

(2) 小脳神経回路の成熟機構

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、未成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

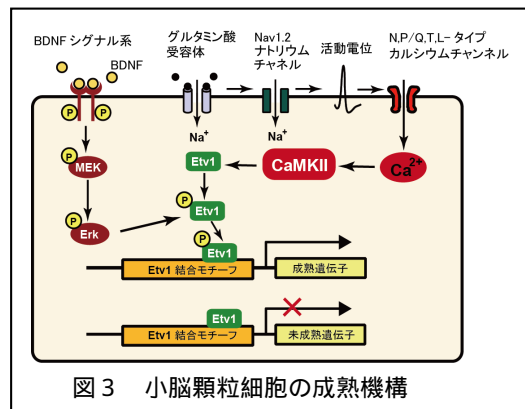


図 3 小脳顆粒細胞の成熟機構

態に移行する。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の移行に伴い細胞内の  $Ca^{2+}$  シグナル系が変化し、未成熟な顆粒細胞では  $Ca^{2+}$  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少なくとも 20 種類の一連の成熟遺伝子を誘導する事、逆に少なくとも 10 種類の未成熟遺伝子発現が抑制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、この結果 oscillatory な  $Ca^{2+}$  の流入が誘発され、この一連の共通の機構が上記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。更にこの発現機構において、転写因子 Ets family に属する Etv1 がマスター制御転写因子として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という事実を明らかにした (図 3)。一方成熟遺伝子の発現には BDNF が細胞外発現誘導因子として働く。我々は BDNF が Erk シグナル系を活性化し Erk による Etv1 の磷酸化が成熟遺伝子の誘導に必須であることを明らかにした。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において活性依存的な機構と細胞外シグナル機構が収斂し制御するという全く新しい機構を提示したものである。

### (3) RNB 法の新たな展開と運動制御機構

我々は小脳と同様運動制御に重要な役割を果たす大脳基底核の伝達制御の解析に RNB 法を適用し運動制御及び行動選択に関して全く新しい機構を明らかにした。大脳基底核の線条体、側座核の出力は直接路と間接路の 2 つの経路で伝達され、両経路はドーパミンによって制御を受けパーキンソン病ではドーパミンが枯渇し運動失調をきたす。我々は RNB 法を用いて直接路と間接路の伝達を選択的に阻害し、急性期のコカイン投与による運動亢進は両経路が関与すること、一方コカインの連続投与の結果起こるドーパミンの持続的な上昇は直接路を選択的に活性化し運動亢進をもたらすこと、さらに報酬行動と忌避行動は直接路の D1 受容体と間接路の D2 受容体を介したドーパミン受容体の選択的な作用がそれぞれの行動を制御しているという大脳基底核の新たな伝達制御の機構を明らかにした。

## 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 9 件)

1. Nakanishi, S., Hikida, T. & Yawata, S. Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors. *Neuroscience* 282:49-59 (2014) (査読有)
2. Danjo, T., Yoshimi, K., Funabiki, K., Yawata, S. & Nakanishi, S. Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of VTA dopamine neurons is mediated by D2 receptors in the nucleus accumbens. *Proc.Natl.Acad.USA* 111:6455-6460 (2014) (査読有)
3. Wada, N., Funabiki, K. & Nakanishi, S. Role of granule-cell transmission in memory trace of cerebellum-dependent optokinetic motor learning. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 111:5373-5378 (2014) (査読有)
4. Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T. & Nakanishi, S. Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* 78:537-544 (2013)(査読有)
5. Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y. & Nakanishi, S. Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 110: 342-347 (2013) (査読有)
6. Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Hikida, T. & Nakanishi, S. Pathway-specific control of reward learning and its flexibility via selective dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 109:12764-12769 (2012)(査読有)
7. Abe, H., Okazawa, M. & Nakanishi, S. Gene regulation via excitation and BDNF is mediated by induction and phosphorylation of the Etv1 transcription factor in cerebellar granule cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 109:8734-8739 (2012)(査読有)
8. Abe, H., Okazawa, M. & Nakanishi, S. The Etv1/Er81 transcription factor orchestrates activity-dependent gene regulation in the terminal maturation program of cerebellar granule cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 108: 12497 -12502 (2011) (査読有)
9. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. & Nakanishi, S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896-907 (2010) (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

Nakanishi, S. (May 15, 2014) The distinct

dopaminergic control of the nucleus accumbens circuit in reward-based and aversive learning. "Cold Spring harbor Asia Conference:Neural circuit basis of behavior and its disorders" Suzhou, China.

Nakahara, I., Goto, A. & Funabiki, K. (February 22, 2014) Development of micro-endoscope for in vivo Ca and FRET imaging. "ARO miwinter meeting" San Diego, USA.

Nakanishi, S. (September 17, 2013) Molecular diversity and synaptic mechanisms of glutamate receptors. "Ion Channels in Health and Disease" Cambridge, UK.

Nakanishi, S. (July 11, 2013) Information processing and integration of the basal ganglia. "The 12<sup>th</sup> Meeting of the Asia Pacific Federation of Pharmacologists" Shanghai, China.

Nakanishi, S. (May 28, 2013) Dopamine-mediated neural plasticity in reward and aversive learning. "Dopamine 2013" Sardinia, Italy.

中西重忠 (2013年3月23日) 意志決定の伝達制御 "第86回日本薬理学会年会基調講演" 福岡市福岡国際会議場

船曳和雄 (2013年2月13日) Development of micro-endoscope for in vivo Ca and FRET imaging in freely moving animal. "WPI-IIIS seminar" つくば市筑波大学

中西重忠 (2012年7月6日) From molecular neuroscience to systems neuroscience. "Riken BSI Summer Program" 埼玉県理化学研究所

Nakanishi, S. (2012年2月15日) The basal ganglia synaptic modulation in rewarding and aversive learning. "The 14<sup>th</sup> Conference of Peace through Mind/Brain Science" 静岡県浜松市ホテルクラウンパレス浜松

Nakanishi, S. (September 28, 2011) From molecular neuroscience to systems neuroscience. "Korea-Japan Science Forum 2011" Seoul, Republic of Korea.

Nakanishi, S. (May 19, 2011) Information processing and integration of the basal ganglia. "Herbert Memorial Lecture" Portland, USA.

中西重忠(2010年9月15日) 基底核神経回路の情報処理と制御 "第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会号同年会特別講演" 仙台市仙台国際センター

Nakanishi, S. (June 8, 2010) The molecular diversity and function of glutamate receptors. "CINP 2010" Hong Kong

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:特許  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

1. (公財)大阪バイオサイエンス研究所ホームページ [www.obl.or.jp](http://www.obl.or.jp)  
2. OBI Annual Report 2010~2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西重忠 (Shigetada Nakanishi)  
(公財)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

船曳和雄 (Kazuo Funabiki)  
(公財)大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究副部長  
研究者番号:00301234

岡澤慎 (Makoto Okazawa)  
(公財)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

矢和多智 (Satoshi Yawata)  
(公財)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

和田教男 (Norio Wada)  
(公財)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:90525958