

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500638

研究課題名(和文)長期運動記憶の固定化における登上線維の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of role of climbing fibers in memory trace of motor learning.

研究代表者

立川 哲也(TATSUKAWA, TETSUYA)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：60435659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：運動記憶の固定化には、小脳皮質での小脳プルキンエ細胞シナプスの伝達効率の長期間の低下(長期抑圧LTD)と小脳核での苔状線維-小脳核細胞シナプスの伝達効率の長期間の亢進(長期増強LTP)が細胞機構として考えられている。我々は神経細胞型の一酸化窒素合成酵素のノックアウトマウスを用いて、苔状線維-小脳核細胞シナプスにおけるLTPの細胞内メカニズムとして、一酸化窒素-サイクリックGMP依存性タンパク質リン酸化酵素カスケードが過分極誘発性陽イオンチャネルを介して、細胞内のカルシウム流入を担うリバウンド脱分極を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Long-term depression (LTD) of synaptic efficacy at parallel fiber-Purkinje cell synapses and long-term potentiation (LTP) of synaptic efficacy at mossy fiber-deep cerebellar nuclei neuron synapses provide the underlying mechanisms for memory trace of motor learning. We analyzed intracellular signaling for the induction of LTP at mossy fiber-deep cerebellar nuclei synapses by means of whole-cell patch clamp technique in acute cerebellar slices of nitric oxide synthase knockout mice. We found that nitric oxide-protein kinase G signaling regulated the LTP induction by intracellular calcium level through hyperpolarization-activated cation currents.

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：運動記憶 小脳核細胞 シナプス可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

小脳核細胞シナプスにおける運動記憶の痕跡化：運動記憶の形成過程において、短期記憶（小脳皮質）から長期記憶（小脳核もしくは前庭核）へと記憶痕跡が移行し、固定化される説が支持されつつある。運動学習における小脳の役割を解明するために眼球反射（前庭動眼反射と視機性眼球反応）ならびに瞬目条件反射の適応実験が広く用いられている。これら反射の適応のもとになる学習は、平行線維 - プルキンエ細胞シナプスにおける長期抑圧（LTD）によって小脳皮質で起こるとする説（伊藤）とその出力先である前庭核もしくは小脳核で起こるとする説（Lisberger）とで数十年来論争が行われてきた。近年視機性眼球反応の適応実験から、短期適応（数時間）の記憶痕跡は LTD により小脳皮質に形成され、一方、長期適応（数日～1週）の記憶痕跡は小脳皮質で形成された後、その出力先である前庭核に移行して固定化されることを強く示唆する所見が見出された。さらに、瞬目条件反射の適応実験からも小脳核での記憶痕跡の形成を強く示唆する報告がなされている。小脳核での記憶痕跡の固定化には、プルキンエ細胞抑制性出力の脱抑制による小脳核細胞膜興奮性の亢進や苔状線維 - 小脳核細胞シナプスにおけるシナプス伝達効率の可塑性が報告されており、何らかの新規の蛋白質合成による長期的な変化が示唆されている。

小脳皮質プルキンエ細胞 - 平行線維シナプスでの可塑性変化には、苔状線維からの情報と登上線維からの情報が同時に入力することが必須である。苔状線維および登上線維は、小脳核細胞にも側枝を伸ばし、前者は顆粒細胞を介して、後者は直接プルキンエ細胞に終枝し、これら二つの入力はプルキンエ細胞を介して小脳核細胞にループ回路を形成する。登上線維は生後直後にはプルキンエ細胞を多重支配しているが、生後約3週で1本の登上線維が1個のプルキンエ細胞を支配するようになり、神経回路形成が成熟する。このような登上線維の投射の発達学的変化を小脳核細胞でも捉えることが可能なのか、運動学習発達に伴いこのような閉ループ回路がどのように形成されていくのか、という点に強く興味を抱き、本研究着想の原点となっている。加えて、登上線維入力が小脳核細胞シナプスの可塑性変化にどのように関与しているか、その詳細な機構については明確となっていない。

また、神経細胞型の一酸化窒素（NO）合成酵素（nNOS）のノックアウトマウスにおいて、眼球運動の適応実験で記憶痕跡が形成されないこと、ならびに小脳プルキンエ細胞 LTD において NO-PKG-G substrate のカスケードが必須であることから運動学習における NO の関与が指摘されているが、小脳核細胞における NO の役割については明確となっていない。

## 2. 研究の目的

小脳核細胞への登上線維入力の特性を解明し、運動学習における長期記憶の固定化の神経機構を電気生理学的技法ならびにイメージング技法を用いて明らかにする研究を行う。小脳核細胞における登上線維シナプス形成、登上線維 - 小脳核細胞シナプスにおけるシナプス前性特性、小脳核細胞における登上線維入力に伴うカルシウム動態、苔状線維 - 小脳核細胞シナプスにおけるシナプス可塑性変化（LTP or LTD）への登上線維入力の関与、AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス表面発現の調節機構について、細胞内シグナルの関与、の5つの点について解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

小脳核細胞への登上線維入力特性の構造学的・電気生理学的解析；小脳核細胞が蛍光ラベルされたマウス（*Thy1-YFP Tg mice*）の下オリブ核へ順行性色素（デキストラン - テトラメチルローダミン）を注入し、登上線維を蛍光ラベルする。注入後2wで急性小脳スライス標本を作製し、小脳核細胞からパッチクランプ法により、登上線維シナプスの興奮性シナプス応答を記録し、周波数特性などシナプス前性の伝達物質放出の特性を検討する。記録したスライス標本は実験後4%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光画像を取得する。また、登上線維をラベルした後灌流固定し、凍結切片を作製し、免疫組織化学的に登上線維終末を同定し、その分布を明らかにする。

苔状線維 - 小脳核細胞シナプス可塑性における登上線維入力の役割の解明；苔状線維の高頻度刺激とプルキンエ細胞からの抑制性入力が脱抑制することを模した細胞体への過分極性電流注入との組み合わせのタイミングにより両方向性に LTP もしくは LTD を誘発することに成功している。LTP はカルモジュリンキナーゼ II の活性を介した AMPA 型グルタミン酸受容体の表面発現量増加に起因し、一方 LTD は代謝型グルタミン酸受容体の活性を介した AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞質内への内在化による表面発現量減少に起因する。その他の細胞内シグナル伝達の関与については報告例がないが、我々は一酸化窒素 - プロテインキナーゼ G (NO-PKG) の関与を示唆する結果を得ている。現在、神経細胞型の NO 合成酵素 (nNOS) をノックアウトしたマウスを系統維持しており、これらのマウスを用いてシナプス可塑性のメカニズムを詳細検討する。

## 4. 研究成果

苔状線維 - 小脳核シナプスにおけるシナプス可塑性のメカニズム；生後15-20日齢のマウスを用いて、厚さ300 $\mu$ mの急性小脳スライス標本を作製する。小脳核細胞にパッチク

ランプ法を適用し、電位固定法により苔状線維刺激による興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録する。15 秒毎に EPSC を記録し、安定してきたところで、LTP の誘導を行う。単極性の刺激電極を小脳核細胞周辺の白室内に置き、125Hz で 250m 秒間苔状線維を刺激し、刺激終了直後に細胞体へ 150m 秒間電流注入して -20-30mV の過分極を誘発するとリバウンド脱分極という現象が生じ、細胞内へのカルシウム流入を引き起こす高頻度な活動電位発火が生じる (図 1)。これを 5 秒ごとに 30 回繰り返した後、苔状線維刺激による EPSC を 30 分 (15 秒毎) モニターする。刺激後 5 分ほどで EPSC の振幅の増強が生じてきて、20 分ほどで約 40% ほど増強して定常状態に達した。これが苔状線維 - 小脳核細胞シナプスでの LTP である (図 2)。

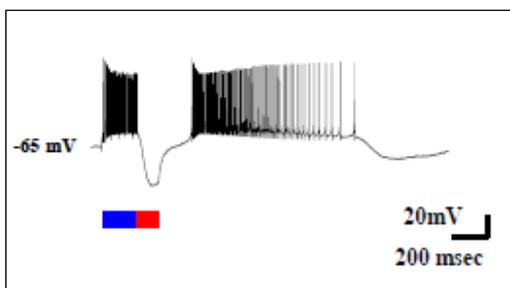


図 1 LTP 誘導方法とその電流応答

小脳核細胞からのホールセルパッチクランプ法による電流応答記録、青線は苔状線維刺激、赤線は細胞体への過分極性電流注入のタイミングを示している。保持電位 -65mV。

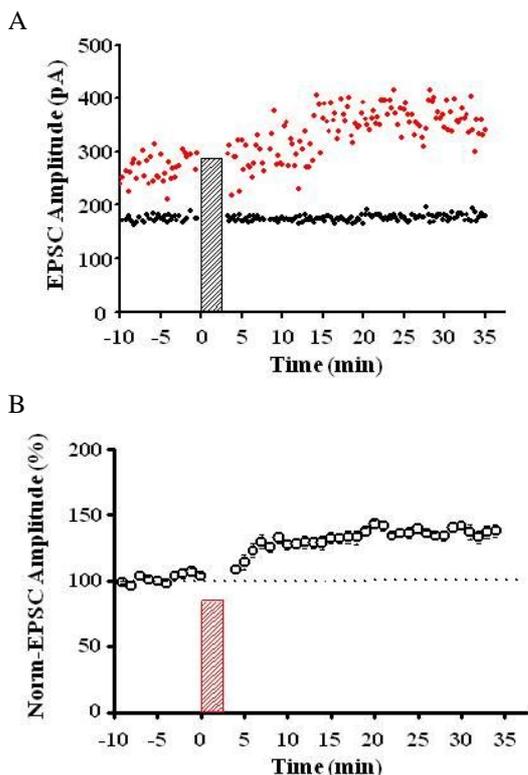


図 2 苔状線維-小脳核細胞シナプスでの LTP

A; 苔状線維刺激による EPSC の代表的な記録例 (赤) と記録時のパッチ電極のアクセス抵抗 (黒) B; 誘導刺激前の EPSC の振幅値で正規化したグラフ (12 例) 約 40% の EPSC の振幅の増大が生じた。

AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス膜への挿入を阻害する破傷風毒素を細胞内投与すると、LTP は誘発されなかった。また LTP を誘導した直後に、低親和性の AMPA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である  $\gamma$ -DGG を 5 分細胞外投与すると EPSC の振幅は一時的に抑制されるが、30 分経過したところでは正常な LTP を示した。これらのことから、EPSC の増強はシナプス後膜での AMPA 型グルタミン酸受容体数の増加に起因していることが確認された。

この LTP の誘導実験において、細胞外液に NO の合成酵素の阻害剤 L-NAME を投与すると、この LTP は消失した。さらに nNOS ノックアウトマウスにおいては、この LTP を誘導することは出来なかった。さらにグアニル酸シクラーゼの活性を抑制する薬物を投与すると、同様に LTP を誘導することが出来なかった。加えて、過分極誘発性陽イオンチャネルの阻害剤である ZD7288 を細胞外投与すると、細胞体にパッチ電極を介して過分極性電流を注入しても、リバウンド脱分極の発生が抑えられ、LTP が消失した。苔状線維刺激の代わりに細胞外に NO ドナー (30 $\mu$ M) を投与し、細胞体へ過分極性電流注入を行うと、約 30% 増強した LTP を引き起こすことが出来た。これは NO と細胞内カルシウム上昇によって、苔状線維 - 小脳核細胞シナプスにおける LTP を模倣することが出来ることを示唆している。

NO の下流にある PKG の阻害剤である KT5823 を細胞内投与すると LTP が抑制されたことから、NO-PKG のカスケードが LTP 誘発に関与していることが示唆された。

細胞体への過分極性電流注入によるリバウンド脱分極の発生に関して、nNOS ノックアウトマウスではその開始時期が遅れ、細胞外に NO ドナーを投与するとその時期を早めることができた。

小脳核細胞シナプスでの可塑性は苔状線維入力とプルキンエ細胞からの脱抑制のタイミングに依存している。リバウンド脱分極の立ち上がりが遅れることで細胞内へのカルシウム流入量に差が見られ、LTP の大きさが抑えられたのだらうと推測された。実際に、小脳核細胞樹状突起上でのカルシウム動態をカルシウム指示薬である Oregon-green488 を細胞内投与して測定すると、苔状線維高頻度刺激とリバウンド脱分極の発生時の細胞内カルシウム上昇にタイミング依存的に差があることが確認された。つまり、大きな細胞内流入があるときは LTP に、小さい流入の時には逆に LTD が生じることが確認された (図 3)。

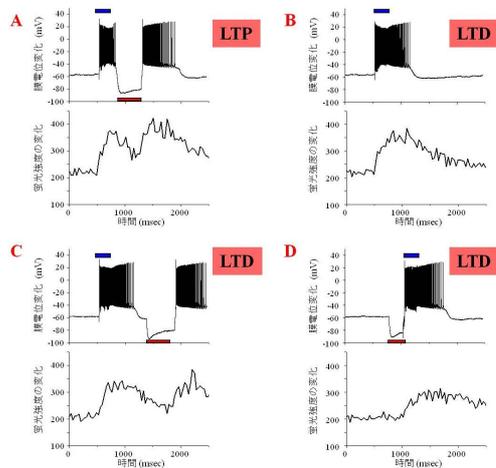


図3 LTP/LTD 誘導時のカルシウム動態  
小脳核細胞樹状突起での刺激パターン依存性のカルシウム上昇、A；苔状線維高頻度刺激（青）の直後に過分極性電流注入（赤）の誘導パターン時の電位変化（上）とその時のカルシウム指示薬の蛍光強度変化（下）、B；苔状線維高頻度刺激のみ、C；苔状線維高頻度刺激の後 600m 秒後に過分極性電流注入、D；過分極性電流注入の直後に苔状線維高頻度刺激のパターン。

これらの研究により、運動学習記憶の長期の固定化の細胞内メカニズムを明らかにすることができると思われる。

#### 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 1 件)

Todaka H, Tatsukawa T, Hashikawa T, Yanagawa Y, Shibuki K and Nagao S, Heterotrimeric guanosine triphosphate-binding protein-coupled modulatory actions of motilin on  $K^+$  channels and postsynaptic  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in mouse medial vestibular nuclear neurons. EJM 37; 339-350 (2013)  
査読有.

立川哲也 中外医学社  
Clinical Neuroscience  
「Neuroplasticity-脳は実は柔らかい」  
Vol.29 (7); 740-744 (2011)  
査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

立川哲也、永雄総一、苔状線維 - 小脳核細胞シナプスにおける一酸化窒素による HCN を介した LTP の制御  
第 89 回日本生理学会  
2012 年 3 月 29 日 長野

木下雅美, 佐野孝光, 大嶋恵理子, 清水知佳, 濱裕, 遠山稿二郎, 立川哲也, Dinh Tung Le, 鈴木寿紀, 山田一之, 宮脇敦, 永雄総一, 平林義雄.

オーファン受容体 GPRC5B ノックアウトマウスは小脳プルキンエ細胞の軸索変性によりその運動協調・学習機能が障害される

第 36 回日本神経科学大会  
2013 年 6 月 20 日 京都

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

立川哲也 (TATSUKAWA TETSUYA)

独立行政法人理化学研究所

運動学習制御研究チーム/神経遺伝研究チーム・研究員

研究者番号：60435659

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：