

## 小脳運動記憶と神経回路形成の分子生物学的研究

Molecular studies of motor learning and maturation of the cerebellar network

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・所長



### 研究の概要

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 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。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

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や視運動性眼球反射(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なお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(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 法を用いて小脳運動誘導の各素過程を解析し、また分子生物学的、イメージング法等種々の手法を駆使して小脳神経回路の活動パターンの特徴を明らかにし、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>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機構を明らかにする。

### 4. これまでの成果

#### 1. 小脳運動記憶の機構

小脳記憶は平行線維と登上線維のプルキンエ細胞への入力と苔状繊維と登上線維の小脳深部核(小脳中位核や前庭核)への2つの入力収斂することによって誘導される。我々が開発した RNB 法は顆粒細胞からプルキンエ細胞への伝達を選択的、可逆的に遮断することができる。RNB 法を用いた OKR の運動記憶の解析の結果、本記憶の誘導には顆粒細胞からプルキンエ細胞への情報伝達が必須であるが、一旦誘導された記憶情報は前庭核で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。従って小脳記憶の条件付け瞬目反射と OKR の運動記憶の獲得、維持、発現の素過程にかかわる機構は異なるという極めて興味ある結果が示された。一方 *in vivo* の小脳細胞の活動を Ca<sup>2+</sup>イメージング法と *in vivo* 顕微内視鏡法を組み合わせて測定することに成功し、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し、現在条件付け瞬目反射と OKR 運動記憶における小脳顆粒細胞、小脳中位核、前庭核の神経活動の特徴と相違の解析を進めている。

#### 2. 小脳顆粒細胞成熟機構

小脳顆粒細胞は生後の発達期に膜電位が脱分極から非脱分極に移行し、この膜電位の

移行が苔状線維と顆粒細胞のシナプス伝達にかかわる一連の成熟遺伝子の誘導と未成熟遺伝子の抑制を引き起こし機能的シナプスが形成される。我々は小脳顆粒細胞の成熟化機構を顆粒細胞単離培養、器官培養、個体レベルで解析を進め、顆粒細胞の非脱分極化は顆粒細胞のグルタミン酸伝達物質の反応性を高め、グルタミン酸受容体、Na<sup>+</sup>チャンネル及びCa<sup>2+</sup>チャンネルの活性化という共通の機構が一連の成熟遺伝子発現の誘導と未成熟遺伝子の発現を抑制していることを明らかにした。さらに本機構はoscillatoryなCa<sup>2+</sup>上昇を誘発しCaMKIIを活性化し、その結果Etv1転写遺伝子が誘導され、Etv1転写遺伝子が成熟遺伝子と未成熟遺伝子の発現を統一的に制御していることを明らかにした。さらにBDNF-Erk系を介した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。以上の結果は神経細胞の成熟化を活動依存的に制御するEtv1マスター転写遺伝子を初めて同定したものであり、更に活動依存的なEtv1の誘導とBDNFシグナル系によるEtv1の磷酸化のシグナルが収斂するという内的因子と外的因子の協調的な作用が神経細胞の成熟を制御している極めて重要な成果を示したものである。

### 3. RNB法の展開と運動制御機構

大脳基底核は小脳と同様運動の制御に重要であるのみならず、好ましいものを求める報酬記憶と忌まわしいものを避ける忌避記憶を制御する。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、コカインの連続投与によるドーパミンの持続的な上昇の結果起こる運動亢進は直接路が選択的に関わること、さらに報酬記憶と忌避記憶は直接路のD1受容体と間接路のD2受容体を介した長期増強がそれぞれ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することに成功した。

## 5. 今後の計画

### 1. 小脳運動記憶の機構解析

条件付け瞬目反射とOKR記憶の誘導時にプルキンエ細胞への入力を遮断しoptogenetic法や電気刺激で刺激頻度、時間軸等のパラメーターを変えた入力をプルキンエ細胞に与え、記憶情報処理機構を解析する。またin vivo顕微内視鏡と電気生理学を組み合わせ運動記憶誘導時の小脳中位核(瞬目反射)及び前庭核(OKR)細胞の条件付け刺激に対する可塑的变化を解析する

2. 小脳神経回路形成の成熟機構  
脱分極下、非脱分極下の細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の違いによるCa<sup>2+</sup>依存的磷酸化酵素と脱磷酸化酵素の反応性の違い、Etv1転写コンプレックス及びCaMKIIの局在、Etv1の活性化機構を解析し、成熟遺伝子と未成熟遺伝子の発現の制御機構を明らかにする。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. 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* (in press)
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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).

## 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  
OBI Annual Report 2011