

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

研究課題「小脳による学習機構についての
包括的研究」

研究終了報告書

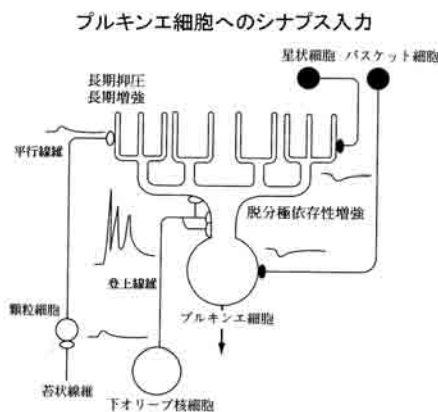
研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者：平野 丈夫
(京都大学 大学院理学研究科、教授)

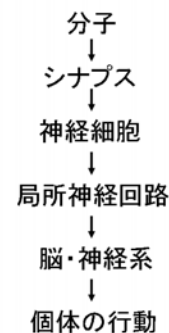
§1 研究実施の概要

1. 研究の背景とねらい

小脳は運動制御・学習にかかわる脳部位である。小脳皮質は規則正しく比較的単純な神経回路よりなり、中枢神経系がはたらくメカニズムを研究する際に優れたモデルシステムになると考えられる。小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞上に形成される興奮性および抑制性のシナプス(左下図)では、神経活動依存的な伝達効率変化(シナプス可塑性、長期抑圧・長期増強・脱分極依存性増強)が起こり、それらは運動学習の基盤になる現象と考えられている。私たちの研究グループは、以前これらのシナプス可塑性を培養下で再現することに成功し(Hirano, 1990, Neurosci lett; Kawaguchi & Hirano, 2000, Neuron)、その発現・制御の分子機構を解析してきた。またシナプス可塑性に障害をもつ mutant マウスの行動解析を行い、運動制御・運動学習能力を調べて、シナプス可塑性の生体内での役割についても検討してきた(Kashiwabuchi et al., 1995, Cell; Funabiki et al., 1995, NeuroReport)。



脳・神経系による行動制御の階層



本研究では、これらの成果と技術・実験手法を土台として、それらを発展させるとともに、遺伝子改変マウス利用を推進し、さらに細胞内分子情報伝達系のコンピューターモデルシミュレーションおよび覚醒小型動物からの神経細胞活動記録等を行ってきた外部研究者との共同研究を開始して、分子・細胞・組織・個体の各レベル(右上図)での研究を関連付け、小脳による学習機構全体のしくみを包括的に解明することをめざした。より具体的には、(A)運動学習の基盤と考えられる小脳皮質内シナプス可塑性の発現・維持・制御の分子機構解明と、(B)シナプス可塑性が小脳神経回路における情報処理および個体の運動制御・学習においていかなる役割をはたしているかを、明らかにすることを目標とした研究を行ってきた。本研究では、電気生理学・分子生物学・細胞生物学・生化学・生細胞でのイメージング・行動解析・コンピューターシミュレーションなど多くの研究手法を組み合わせた解析を実施して、各レベル間の知見を関連付けて小脳による学習機構を統合的に理解するように努めてきた。

2. 成果概要

研究実施方法

シナプス可塑性の分子機構に関する研究では、分子生物学・細胞生物学・生化学・電気生理学・生細胞での分子およびイオンイメージング等の手法を組み合わせる実験を行った。標本としては、遺伝子改変マウス・小脳神経細胞の初代培養・脳切片標本を用いた。シナプス応答の計測では、パッチクランプ法を用いてシナプス応答および伝達物質(グルタミン酸または GABA) 投与により引き起こされる電流を計測した。シナプス可塑性制御に関与する分子の解析においては、阻害剤・活性化剤等の使用に加えて、特定の蛋白質を欠損したノックアウトマウス由来の細胞の利用、RNAi によるタンパク質ノックダウン法および培養細胞への蛋白質、オリゴペプチドの注入、DNA 導入による発現実験等を組み合わせた。またシナプス可塑性制御において、重要な役割を担う Ca^{2+} および C キナーゼ等の細胞内動態の計測には、Fura2 等 Ca^{2+} 指示薬および GFP 等蛍光蛋白質を融合した分子と共焦点顕微鏡等の高解像度光学顕微鏡を利用した。遺伝子改変マウス作成・利用にあたっては横井グループの、また受容体分子の生化学・細胞生物学的解析に関しては亀山グループの協力を受けた。また、シナプス可塑性を制御する分子機構に関するコンピューターシミュレーションによるシステムバイオロジー的解析に関しては、黒田グループの協力を得て実施した。シナプス制御の神経回路内および個体内での役割に関する研究では、遺伝子改変マウスを利用して、主として反射性眼球運動の解析を中心にして研究を行った。小型ビデオカメラと二重回転台を用いるマウス用の眼球運動解析用実験システムを独自に作成して研究を行ってきた。また、眼球運動記録と同時に小脳のプルキンエ細胞活動も記録できるように実験システムの改良を行った。これらの研究は船曳グループと協力して実施した。

主な研究成果

シナプス可塑性の分子機構に関する研究は、小脳皮質唯一の出力神経細胞であるプルキンエ細胞へのグルタミン酸性興奮性シナプスおよび GABA 性抑制性シナプス(前ページ左図)に焦点を絞って研究を行った。プルキンエ細胞は二種類の興奮性シナプス入力を受ける。一つは小脳顆粒細胞からの平行線維入力であり、もう一つは下オリーブ核からの登上線維入力である。両者がほぼ同期して入力すると平行線維・プルキンエ細胞間シナプス伝達が持続的に減弱することが知られている。このシナプス可塑性は小脳長期抑圧と呼ばれ、運動学習の細胞レベルの一メカニズムと考えられてきた。長期抑圧の分子機構に関する研究では、平行線維・プルキンエ細胞間シナプスに局限して存在するグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットが、PICK1 分子との結合を介して長期抑圧に関与することを示した(Yawata et al., 2006, J Neurosci)。また、平行線維と登上線維入力の統合を担う分子と推定されてきた C キナーゼ α の長期抑圧誘導時の細胞内動態を明らかにし、長期抑圧誘導に際して C キナーゼ α は持続的に活性化する必要がないことを示した(Tsuruno & Hirano, 2007, Mol Cell Neurosci)。また、Src 型チロシン基リン酸化酵素が長期抑圧発現に関与することを示す結果も報告した(Tsuruno et al., 2008,

Neurosci Res)。さらに、 $\delta 2$ サブユニットと結合する分子として同定されたデルフィリンを欠損させると、長期抑圧誘導に際しての Ca^{2+} 依存性が低減して、引き起こされやすくなることも明らかにした。なお、デルフィリン欠損マウスでは、視運動性眼球運動の適応(運動学習)の亢進も認められた(Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE)。生後成長期における登上線維・プルキンエ細胞間シナプスについても研究を行い、登上線維・プルキンエ細胞間の成体型シナプス結合パターン形成に寄与すると推定される新規のシナプス可塑性を発見した(Ohtsuki & Hirano, 2008, Eur J Neurosci)。黒田グループは、小脳長期抑圧に関してモデルを用いたシステムバイオロジー研究を行い、長期抑圧誘導時の細胞内 Ca^{2+} 濃度制御において IP3 受容体が重要な役割を担うことを示した(Doi et al., 2005, J Neurosci)。亀山グループは、グルタミン酸受容体のシナプス後膜への輸送に δ -catenin が関与するメカニズムの研究等で成果を挙げた(Ochiishi et al., 2008, Mol Cell Neurosci)。

プルキンエ細胞への抑制性シナプス入力、登上線維入力等による脱分極により長時間増強される。このシナプス可塑性は Rebound Potentiation (RP、脱分極依存性増強、前ページ左図)と呼ばれる。RP の制御機構に関する解析を行い、細胞と細胞外基質との接着を担うインテグリン分子が、Src 型チロシン基リン酸化酵素活性を介して RP 制御に関わることを明らかにした(Kawaguchi & Hirano, 2006, Mol Cell Neurosci)。また、メタボトロピック受容体 mGluR1 の活性が RP を起こりやすくする形で作用することを示した(Sugiyama et al., 2008, Eur J Neurosci)。さらに、 GABA_A 受容体と結合する細胞内タンパク質 GABARAP が、RP 発現において中心的な役割を果たすことも突き止めた(Kawaguchi & Hirano, 2007, J Neurosci)。RP 制御の複雑な細胞内シグナル伝達経路のモデルを構築して、コンピューターシミュレーションを行い、多くの実験結果を再現した。さらに、モデル上で RP 誘導の閾値制御機構を検討して、フォスフォジエステラーゼ PDE1 が重要な役割を果たすとの理論予測を行い、神経細胞を用いた電気生理学実験等で検証した。また、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスで、神経回路の異常な活動パターンが定常状態で RP を引き起こし、RP が飽和状態になっていることも明らかにした(Ohtsuki et al, 2004, J Neurosci)。

シナプス制御が、神経回路における情報処理および個体の運動制御・学習においていかなる役割をはたしているかに関する研究では、まず $\delta 2$ サブユニット欠損マウスおよびプルキンエ細胞それ自体の欠損が起こるラーチャーマウスを用いて、一連の実験を行った。 $\delta 2$ 欠損マウスおよびラーチャーマウスでは、反射性眼球運動の適応(運動学習)が起こらず、反射性眼球運動の動特性にも異常が認められることを示した(Katoh et al., 2005, Eur J Neurosci)。また、 $\delta 2$ 欠損マウスの運動失調はラーチャーマウスより重篤であることを示し、その一因として、 $\delta 2$ 欠損マウスで周期的な不随意運動が起こることを見出した。さらに、不随意運動発生機構を検討して、 $\delta 2$ 欠損マウスにおけるシナプス制御欠陥によりプルキンエ細胞が異常な活動電位発火パターンを示すことが原因であることを突き止めた(Yoshida et al, 2004, J Neurosci)。また、 $\delta 2$ 欠損マウスで認められる反射性眼球運動の一つである視運動性眼球運動での顕著なタイミング遅れの原因を調べ、登上線維入力の亢進がプルキンエ細胞の発火タイミングを狂わせていることが一因であることを明らかにした(Yoshida et al., 2007, Eur J Neurosci)。また上述したように、長期抑圧が起こりやすくなっているデルフィリン欠損マウスでは、一部の運動学習が促進されることを示し(Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE)、シナプス可塑性制御が動物の学習能力に大きな影響を及

ぼすことを明示した。船曳グループは、上述した $\delta 2$ 欠損マウスにおける視運動性眼球運動タイミング制御に関する研究に大きな貢献をしたが、その他の遺伝子改変動物に関しても眼球運動解析を行って成果を挙げた (Sato et al., 2008, Nat Neurosci)。また、脳深部の蛍光標識した神経細胞から電氣的活動記録を行う新技術の開発も行い、特許申請した。横井グループは、特定の神経回路・神経経路のみを可視化できる遺伝子改変マウスの作成を行って、それまで不十分な報告しか存在しなかった神経経路を明らかにした (Sano and Yokoi, 2007, J Neurosci)。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究では、分子・細胞・組織・個体の各レベルでの研究を関連付け、小脳による学習機構全体のしくみを包括的に解明することをめざした。具体的には、(A)学習の基盤と考えられるシナプス可塑性の発現・維持・制御の分子機構解明と、(B)シナプス可塑性が小脳神経回路における情報処理および個体の運動制御・学習においていかなる役割をはたしているか、を明らかにすることを目標とした研究を行ってきた。本研究実施にあたっては、代表者(平野)グループが重要研究項目のほとんどにおいて中心的な役割を担い、他研究グループには、代表者グループ単独では実施が困難な研究に関する支援を依頼する形で研究を遂行してきた。シナプス可塑性の分子機構に関する研究では、分子生物学・細胞生物学・生化学・電気生理学・生細胞での分子および Ca^{2+} イメージング等の手法を組み合わせる研究を進めた。ミュータントマウス作成・利用にあたっては横井グループの、また受容体分子の生化学・細胞生物学的解析に関しては亀山グループの協力を受けた。また、シナプス可塑性を制御する分子機構に関するコンピューターシミュレーションによるシステムバイオロジー的解析に関しては、黒田グループの協力を得て実施した。シナプス制御の神経回路内および個体内での役割に関する研究では、船曳グループの協力を得て、遺伝子改変マウスを利用した反射性眼球運動解析を行った。

(2) 実施体制

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
平野グループ	平野丈夫	京都大学・大学院理学研究科教授	小脳による学習機構についての包括的研究
黒田グループ	黒田真也	東京大学・大学院理学系研究科教授	シナプス可塑性を制御する細胞内分子情報伝達系のモデリング

船曳グループ	船曳和雄	大阪バイオサイエンス研究所 システムズ研究部門 副部長	ミュータントマウスにおける In Vivo 神経活動解析
横井グループ	横井峰人	京都大学大学院医学研究科 助教	シナプス可塑性異常等 を示すミュータントマウスの作成
亀山グループ	亀山仁彦	産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 室長	神経伝達物質受容体 制御の分子機構

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 小脳におけるシナプス可塑性の分子機構(京都大学 平野グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

小脳皮質から出力する唯一の神経細胞種であるプルキンエ細胞上に形成されるグルタミン酸性興奮性シナプスおよび GABA 性抑制性シナプスにおいて、シナプス可塑性の誘導・発現・制御の分子メカニズムを研究した。以下、興奮性シナプス(A)と抑制性シナプス(B)に分けて研究実施内容および成果を説明する。

A 興奮性シナプスにおける可塑性について

A-1 グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの長期抑圧関与メカニズム

平行線維・プルキンエ細胞間シナプスでのシナプス可塑性に関しては、まずそのシナプスに局限して存在するグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの長期抑圧への関与(Hirano et al., 1994, Neurosci Lett; Kashiwabuchi et al., 1995, Cell)の分子メカニズムを検討した。 $\delta 2$ サブユニット欠損培養プルキンエ細胞において、 $\delta 2$ サブユニットおよびそのミュータント分子を発現させて長期抑圧が起こるか否かを調べる実験により、 $\delta 2$ サブユニットが長期抑圧発現に直接的にかかわっていること(図1)、細胞膜近傍 C 末端領域が長期抑圧発現に必須であることを示した。さらに、酵母ツーハイブリッド法および免疫沈降実験により、その部位に結合する蛋白質として PICK1 を同定し、 $\delta 2$ サブユニットと PICK1 の結合が長期抑圧発現に必要なことを明らかにした(Yawata et al., 2006, J Neurosci)。

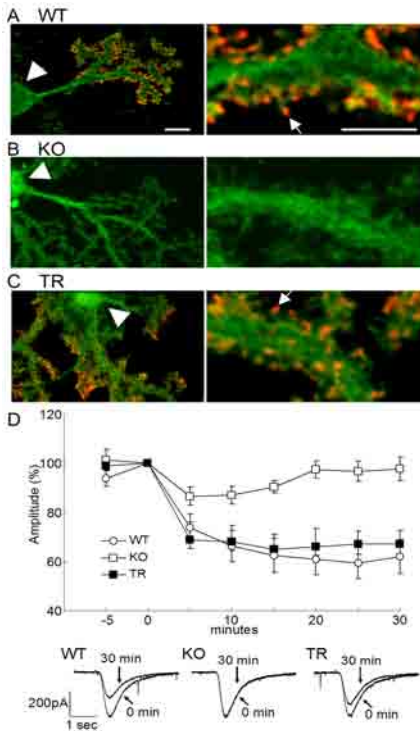


図1 野生型 (A, WT)、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウス (B, KO) および欠損マウス由来のプルキンエ細胞で $\delta 2$ サブユニットを強制発現した (C, TR) 時の $\delta 2$ サブユニットの細胞内分布 (赤) と強制発現による長期抑圧の回復 (D) (Yawata et al., 2006, J Neurosci)

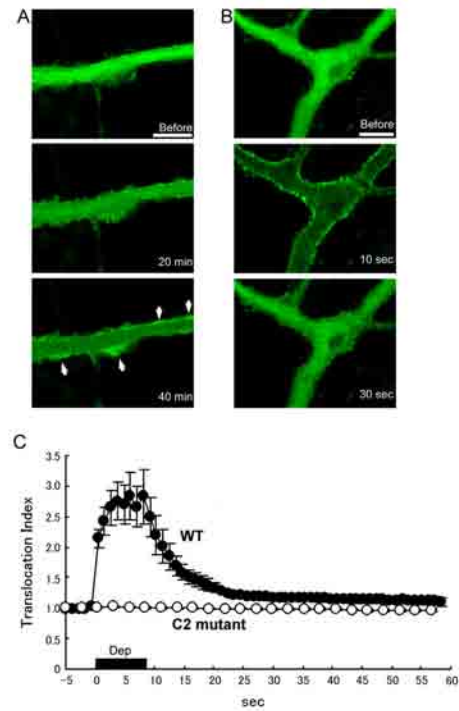


図2 フォルボールエステル投与 (A) および脱分極 (B) による C キナーゼ α (PKC α) の細胞内局在変化。脱分極により PKC α が一過性に膜移行する。(Tsuruno & Hirano, 2007, Mol Cell Neurosci)

A-2 長期抑圧誘導時の C キナーゼ α の動態について

長期抑圧誘導に際しては、平行線維と登上線維入力と同時に活性化される必要がある。これら二つの入力を細胞内で統合する分子の候補の一つがタンパク質リン酸化酵素 C キナーゼ α であった。登上線維入力によってはプルキンエ細胞内で大きな Ca^{2+} 濃度上昇が起こり、また平行線維入力によってはメタボトロピックグルタミン酸受容体 mGluR1 が活性化する。mGluR1 は G タンパク質およびフォスホリパーゼ C を介して細胞膜の PIP2 を分解して、IP3 とジアシルグリセロールを産生する。IP3 は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に寄与し、 Ca^{2+} は C キナーゼ α と結合し、それを細胞膜へ移行させる。細胞膜へ移動した C キナーゼ α は、膜のジアシルグリセロールと結合して強く活性化する。C キナーゼ α に GFP を融合した分子を培養プルキンエ細胞で発現させ、その挙動を調べることで、各種の刺激による C キナーゼ α の細胞内局在変化を調べた。その結果、C キナーゼ α は登上線維入力を代行する脱分極により引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により細胞膜に移動すること (図2)、長期抑圧発現に際して C キナーゼ α は一過性に細胞膜へ移動するだけであることを明らかにした。前述したように、C キナーゼ α は細胞膜に結合した状態で活性化するので、長期抑圧発現に持続的な C キナーゼ α の活性化は必要ではないと考えられる。また、プルキンエ細胞において、ジアシルグリセロールが C キナーゼ α の膜局在を長引かせるが、ジアシルグリセロールは主に DAG リパーゼにより分解されることを示す結果も得た (Tsuruno & Hirano, 2007, Mol Cell Neurosci)。

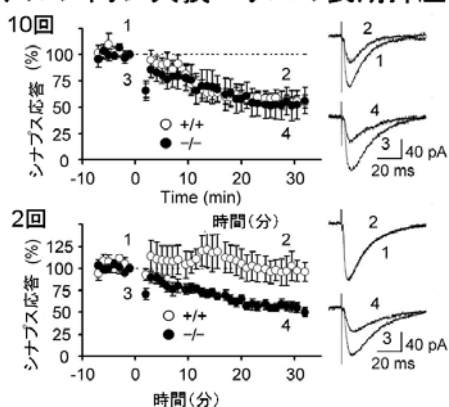
A-3 長期抑圧への Src 型チロシンリン酸化酵素の関与

A-2 で説明したように、C キナーゼ α は、登上線維入力により引き起こされるプルキンエ細胞内での細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と、平行線維入力により活性化された mGluR1 の下流で起こるジアシルグリセロール産生によって、持続的に活性化されると考えられてきた。しかしながら、C キナーゼ α の持続的活性化は長期抑圧誘導には必ずしも必要でなく、また mGluR1 の活性化は C キナーゼ α の細胞膜移行にほとんど影響を及ぼさなかった (Tsuruno & Hirano, 2007, Mol Cell Neurosci)。しかしながら一方で、mGluR1 の活性化が長期抑圧に必要であるという以前の結果 (Shigemoto et al., 1994, Neuron) は確認できた。こうしたことから、mGluR1 は C キナーゼ α の活性化以外の経路でも、長期抑圧誘導に関与するかもしれないと考えた。そこで他の経路を検討して、Src 型チロシン基リン酸化酵素が mGluR1 によって抑えられることが、長期抑圧発現に必要なことを示唆する結果を得た (Tsuruno et al., 2008, Neurosci Res)。

A-4 デルフィリン欠損マウスにおける長期抑圧誘導の低下

デルフィリンはその PDZ ドメインを介して $\delta 2$ サブユニット C 末端と結合することが知られている分子で、 $\delta 2$ サブユニットと同様に小脳プルキンエ細胞の平行線維シナプスに局在する。私たちは、デルフィリンも長期抑圧にかかわるのではないかと考えた。ノックアウトマウスを用いて詳細な検討を行ったところ、デルフィリン欠損マウスでは長期抑圧が引き起こされやすくなっていることが明らかになった (図3)。野生型マウス小脳切片においては、長期抑圧を引き起こすには 10 回の組み合わせ刺激 (脱分極と平行線維刺激) が必要であったが、デルフィリン欠損マウスから取り出した小脳切片では、2回の組み合わせ刺激で長期抑圧を引き起こせた (Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE)。またそのメカニズムを検討し、デルフィリン欠損マウスでは長期抑圧誘導に必要な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が野生型マウスより小さいことを示した (図4)。

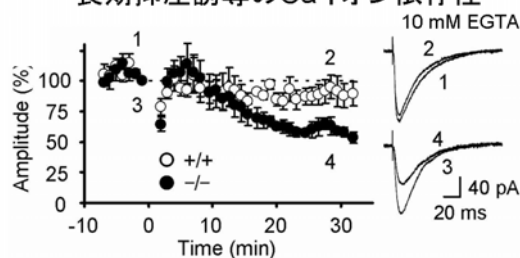
デルフィリン欠損マウスの長期抑圧



デルフィリン欠損マウスでは、長期抑圧が起こりやすい
(条件刺激2回でも長期抑圧が起こる)

図3 Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE

長期抑圧誘導の Ca^{2+} 依存性



デルフィリン欠損マウスでは、長期抑圧誘導の Ca^{2+} 依存性が低い
(10mM EGTA存在下でも、長期抑圧が起こる)

図4 Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE

A-5 幼弱期登上線維・プルキンエ細胞間シナプスにおける新奇シナプス可塑性

プルキンエ細胞への平行線維入力数は 100, 000 以上と推定されるが、成体でのプルキンエ細胞への登上線維入力は1本だけである。幼弱期においては、複数の登上線維がプルキンエ細胞に入力するが、発生過程においてほとんどの登上線維入力が除去される。1対1の登上線維・プルキンエ細胞間シナプス結合パターンは、小脳皮質の正常なはたらきにも重要と考えられている。シナプス可塑性は、発生過程のシナプス結合形成およびその調整においても重要な役割を果たすことが知られているので、小脳皮質におけるプルキンエ細胞への過剰な登上線維入力の除去に関与するのではないかと考えられるシナプス可塑性を探索した。そうしたところ、生後5日から9日のマウス小脳で、登上線維の頻回刺激により、登上線維・プルキンエ細胞間シナプスで、長期増強または長期抑圧が引き起こされることがわかった。元々情報伝達効率がよいシナプスでは長期増強が起りやすく、比較的効率がよくないシナプスでは長期抑圧が引き起こされる傾向があった。また、これらのシナプス可塑性の発現がシナプス前部の変化によるものか後部の変化によるものかを検討し、長期増強時には登上線維シナプス終末からのグルタミン酸放出確率が高くなっていること、また長期抑圧に際しては放出確率が低下していることを明らかにした。これらの両方向性シナプス可塑性は、成体型の登上線維・プルキンエ細胞間シナプス結合パターンの形成に寄与すると考えられる (Ohtsuki & Hirano, 2008, Eur J Neurosci)。

B 抑制性シナプスでのシナプス可塑性(脱分極依存性増強、RP)

B-1 メタボトロピックグルタミン酸受容体を介する RP 発現の制御

プルキンエ細胞上に形成される GABA 作動性抑制性シナプスでの情報伝達効率は、プルキンエ細胞の脱分極により持続的に増強される(RP)。以前、RP が起きるシナプス自身の活性化によりシナプス後 GABA_B 受容体を介して RP 発現が抑制されることを見出していたが (Kawaguchi & Hirano, 2000, Neuron)、RP 発現が mGluR1 刺激により cAMP 増加・A キナーゼ活性化・DARPP32 のリン酸化・PP1 活性の抑制という一連の細胞内情報伝達経路 (Kawaguchi & Hirano, 2002, J Neurosci) を介して、促進されることを明らかにした (Sugiyama et al., 2008, Eur J Neurosci)

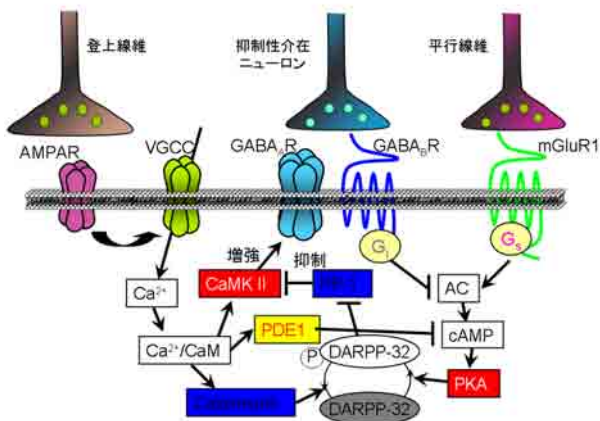


図5 RP 制御の分子情報伝達システム

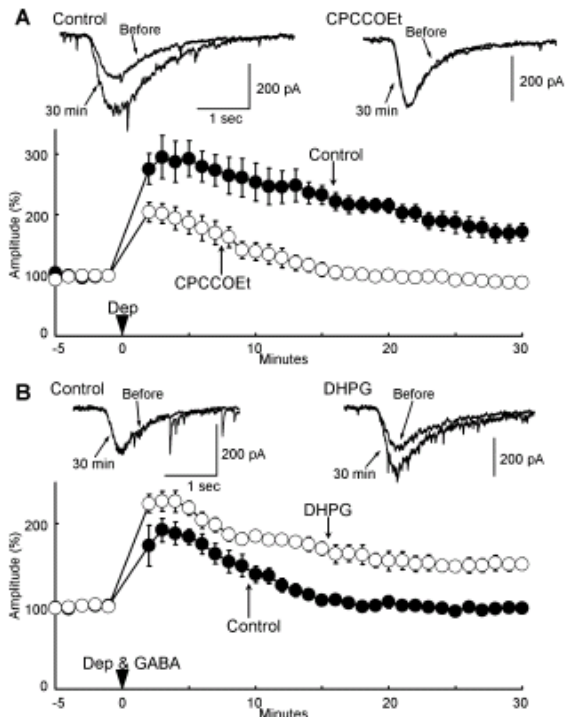


図6 mGluR1 阻害剤(CPCCOEt)による RP 阻害(A)と mGluR1 活性化剤(DHPG)による RP 促進(B) (Sugiyama et al., 2007, Eur J Neurosci)

B-2 インテグリンによる RP 発現の長期抑制機構

GABA_B 受容体刺激による RP 発現の長期的抑制機構を検討して、転写を介した細胞接着分子インテグリンの増加が、RP 発現の抑制に関与していることを明らかにした。さらにインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ 型が、Src 型チロシン基リン酸化酵素活性を介して、RP 発現を抑えていることも明らかにした (Kawaguchi & Hirano, 2006, Mol Cell Neurosci)。この研究成果は、細胞と細胞外基質との結合で重要な役割を担うタンパク質であるインテグリンが、抑制性シナプス可塑性の制御にも関与することを明示したものである。

B-3 GABARAP の RP 発現・維持への関与

RP は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により引き起こされる Ca^{2+} ・カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) 活性化を介して、GABA_A 受容体の GABA に対する応答性を増強することで発現する (図5)。CaMKII がどのようにして GABA_A 受容体応答を増強するか調べ、GABA_A 受容体と結合する細胞内タンパク質 GABARAP が、RP 発現において中心的な役割を果たすことを突き止めた (Kawaguchi & Hirano, 2007, J Neurosci)。GABARAP と GABA_A 受容体との結合を阻害する $\gamma 2$ ペプチドを、RP 誘導後にプルキンエ細胞に注入すると、RP により増強された GABA 応答は元のレベルまで減少した (図7)。この結果は、RP の維持に GABARAP と GABA_A 受容体の結合が必要であることを示している。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により、GABARAP は CaMKII 活性依存的にそのコンフォメーションを変化させることが、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 計測により判明した。そして、このコンフォメーション変化が、GABA_A 受容体との結合および RP 発現に必要なこともわかった。これらの結果を考え合わ

せると、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は CaMKII 活性化依存的に GABARAP のコンフォーメーションを変化させて、その結果 GABARAP は GABA_A 受容体と結合して、 GABA_A 受容体の GABA に対する応答性を増強するか、細胞膜上の GABA_A 受容体数を増やすことにより、RP 誘導に寄与していると推定される(図8)。

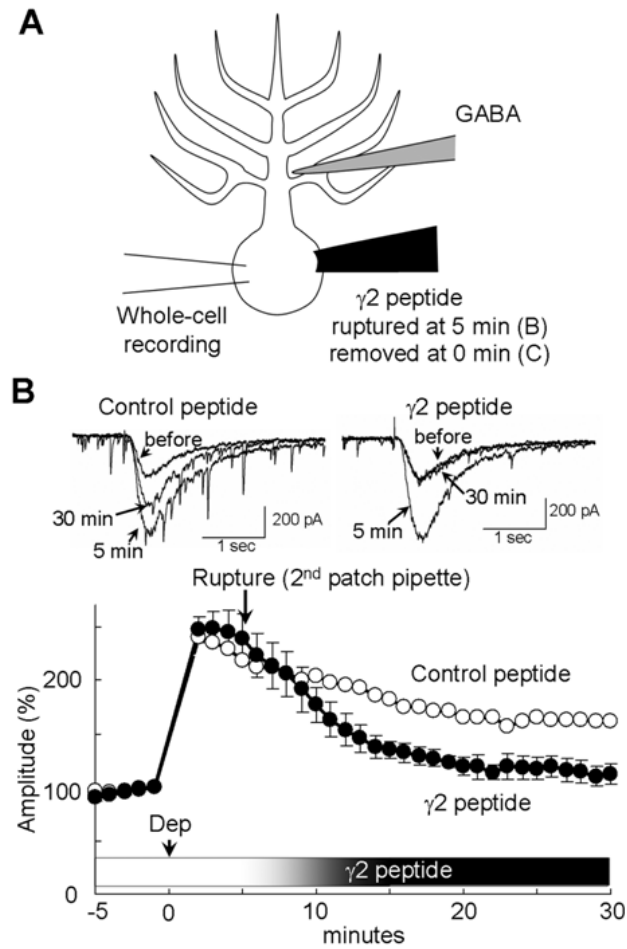
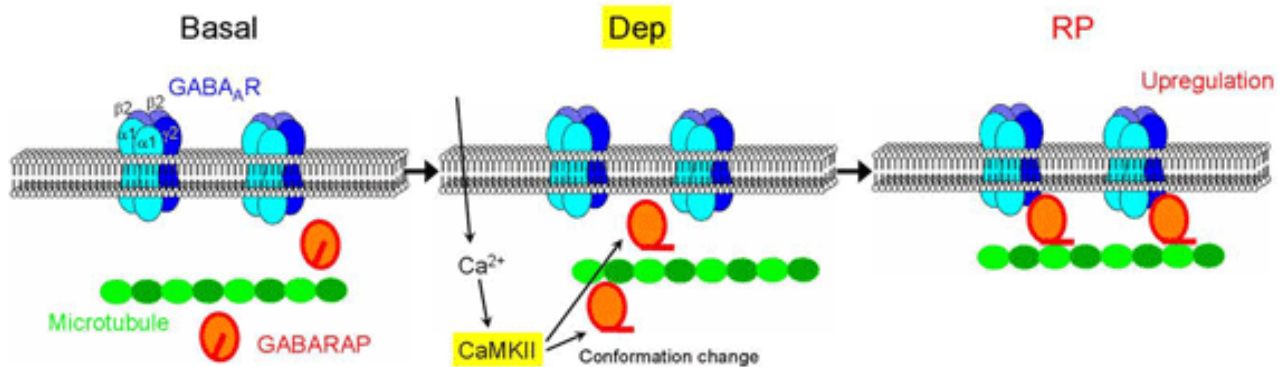


図7 GABARAP と GABA_A 受容体との結合を阻害する $\gamma 2$ ペプチドの細胞内注入により、RP の維持が抑えられる。(Kawaguchi & Hirano, 2007, J Neurosci)。

Model 1

Augmentation of individual GABA_AR function by direct binding of structurally altered GABARAP



Model 2

Increase in surface GABA_AR number by facilitated trafficking depending on structurally altered GABARAP

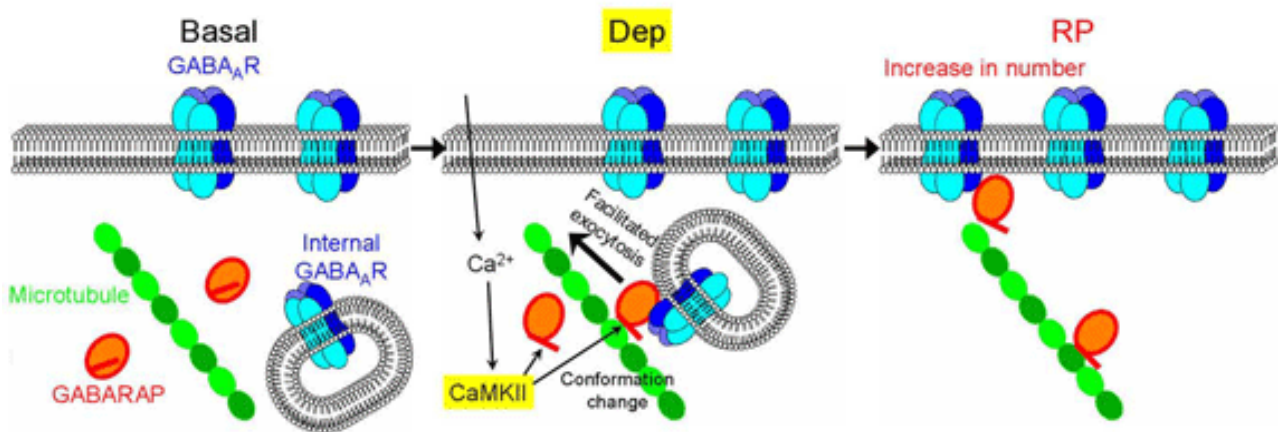


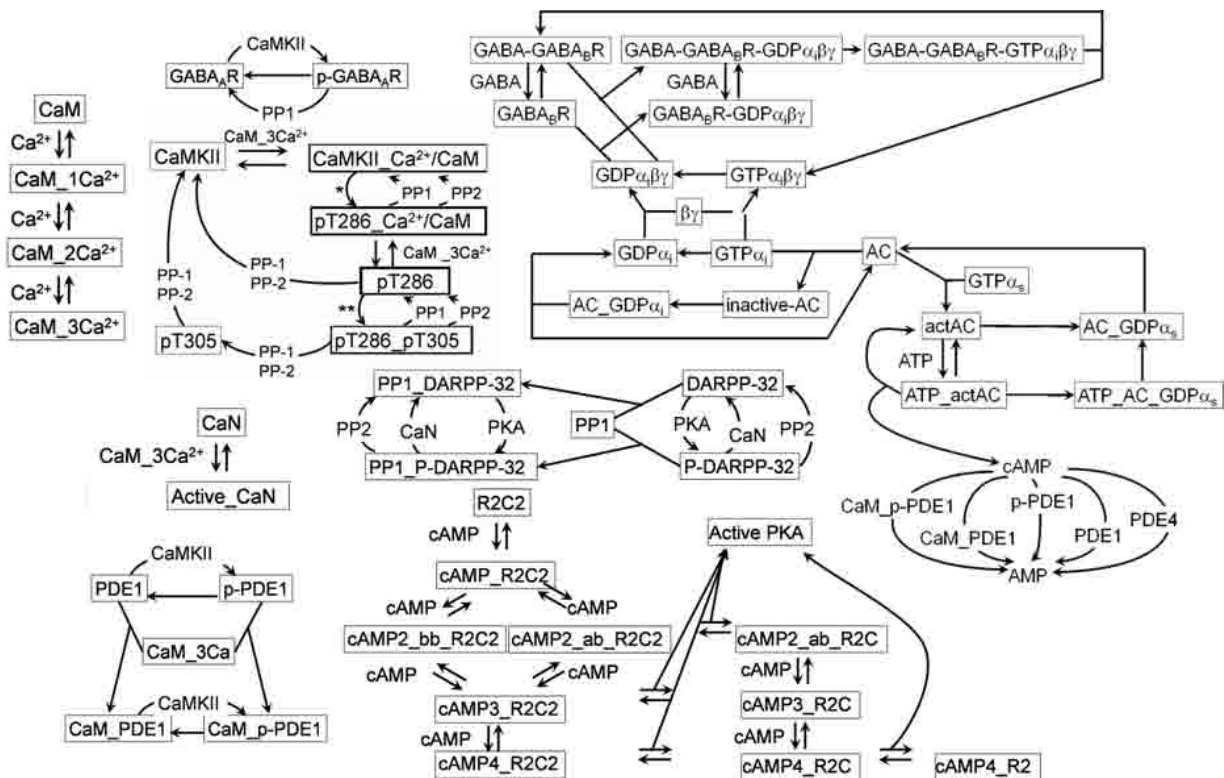
図8 GABARAP による RP 増強機構の想定図 (Kawaguchi & Hirano, 2007, J Neurosci)

B-4 δ2 サブユニット欠損マウスにおける RP 飽和

小脳長期抑圧が起こらない δ2 サブユニット欠損マウス(Kashiwabuchi et al., 1995, Cell)では、登上線維入力
が亢進しているために自発的に RP が起こり、プルキンエ細胞に対する抑制が強くなっていることを明らかにした
(Ohtsuki et al. J. Neurosci. 2004)。δ2 サブユニット欠損マウスで抑制性シナプス入力が強くなっていることに気
づき、その原因を調べた。δ2 サブユニット欠損マウスから取り出した小脳切片では RP が起こらなくなっていたが、
δ2 サブユニット欠損マウスからプルキンエ細胞を取り出して培養すると、その細胞では RP が起こった。これらの
結果は、δ2 サブユニット欠損マウスでは、定常状態で RP が起こってしまっているために、新たに RP を引き起こ
すような刺激がきても、さらに RP が起こることはないことを示唆している。

B-5 RP 制御機構に関するモデルを用いたシミュレーション解析

図5に示した RP 誘導制御の細胞内分子情報伝達経路に関する詳細な化学反応(図9)をモデル化して、コンピュータ内の Genesis Kinetikit プラットフォーム上に構築した。このモデルを用いてコンピュータシミュレーションを行い、以前に得ていた実験結果(Kawaguchi & Hirano, 2000, 2002)を再現した。また、このモデルを用いて RP の起こりやすさを制御する分子の検討を行った。フィードバックループを形成する分子に注目して様々な条件でシミュレーション解析を行ったところ、cAMP 分解酵素の一つであり CaMKII により活性が上昇する PDE1(図5)が、RP 誘導の Ca^{2+} 依存性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。この理論予測を検証する電気生理学実験を行い、PDE1 による RP 誘導の Ca^{2+} 閾値制御が確認された。



脱分極依存性増強を制御する分子間相互作用の詳細。各反応について、反応速度等を推定して数値計算を行い、様々な状況においてシナプス伝達がどのようになるか、理論的な予測を行うことができる。

図9 RP 誘導制御の細胞内分子情報伝達システムのモデル

C その他の分子・細胞レベルの研究

前述した $\delta 2$ サブユニットがシナプス形成にかかわることも発見した(Kuroyanagi et al, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。 $\delta 2$ サブユニットを非神経培養細胞(HEK 細胞)で発現させ、小脳顆粒細胞と共培養したところ、顆粒細胞シナプス前終末が HEK 細胞上に形成された。

また、小脳プルキンエ細胞・顆粒細胞の分化に関して、他研究グループとの共同研究を行った。プルキンエ細胞で発現し Notch と結合するタンパク質 DNER(Eiraku et al., 2002, J. Biol. Chem)が、小脳の Bergmann グリ

ア細胞の分化に影響を及ぼし(Eiraku et al., 2005, Nat Neurosci)、プルキンエ細胞近傍へ放出されたグルタミン酸の取り込みを阻害して軽い運動失調を引き起こすこと(Tohgo et al., 2006, Mol Cell Neurosci)、を明らかにした。また、7回膜貫通型カドヘリン細胞間接着分子である Celsr が、プルキンエ細胞等の樹状突起形成に大きな影響を及ぼすことを報告した (Shima et al., 2004, Dev Cell; Shima et al., 2007, Nat Neurosci)。発生期の小脳顆粒細胞の移動・分化に関しても研究も行い、顆粒細胞の小脳表面に対して平行方向および垂直方向の2相性移動様式の詳細、および細胞体移動と中心体移動の関係等に関する新知見を報告した(Kawaji et al., 2004, Mol Cell Neurosci; Umeshima et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。

文献

- Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T. and Kengaku, M. (2002) (CREST 研究期間前の成果) Delta/Notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 25400-25407.
- Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T. and Kengaku, M. (2005) DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nature Neurosci.* 8, 873-880.
- Hirano, T. (1990) (CREST 研究期間前の成果) Depression and potentiation of the synaptic transmission between a granule cell and a Purkinje cell in rat cerebellar culture. *Neurosci. Lett.* 119, 141-144.
- Hirano, T., Kasono, K., Araki, K., Shinozuka, K. and Mishina, M. (1994) (CREST 研究期間前の成果) Involvement of the glutamate receptor $\delta 2$ subunit in the long-term depression of glutamate responsiveness in cultured rat Purkinje cells. *Neurosci. Lett.* 182, 172-176.
- Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S. and Mishina, M. (1995) (CREST 研究期間前の成果) Disturbed motor coordination, Purkinje cell synapse formation and cerebellar long-term depression of mice defective in the $\delta 2$ subunit of the glutamate receptor channel. *Cell* 81, 245-252.
- Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2000) (CREST 研究期間前の成果) Suppression of inhibitory synaptic potentiation by presynaptic activity through postsynaptic GABA_B receptors in a Purkinje neuron. *Neuron* 27, 339-347.
- Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2002) (CREST 研究期間前の成果) Signaling cascade regulating long-term potentiation of GABA_A receptor responsiveness in cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 22, 3969-3976.
- Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2006) Integrin $\alpha 3\beta 1$ suppresses long-term potentiation at inhibitory synapses on the cerebellar Purkinje neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 416-426.
- Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2007) Sustained GABARAP structural change underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* 27, 6788-6799.
- Kawaji, K., Umeshima, H., Eiraku, M., Hirano, T. and Kengaku, M. (2004) Dual phases of migration of cerebellar

- granule cells guided by axonal and dendritic leading processes. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 228-240.
- Kuroyanagi, T., Yokoyama, M. and Hirano, T. (2009) Postsynaptic glutamate receptor δ family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106,4912-4916.
- Ohtsuki, G. and Hirano, T. (2008) Bidirectional plasticity at developing climbing fiber – Purkinje neuron synapses. *Eur. J. Neurosci.* 28,2393-2400.
- Ohtsuki, G., Kawaguchi, S., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Enhanced inhibitory synaptic transmission in the cerebellar molecular layer of the GluR δ 2 knockout mouse. *J. Neurosci.* 24, 10900-10907.
- Shigemoto, R., Abe, T., Nomura, S., Nakanishi, S. and Hirano, T. (1994) (CREST 研究期間前の成果) Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* 12, 1245-1255.
- Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M. and Uemura, T. (2004) Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev. Cell* 7, 205-216.
- Shima, Y., Kawaguchi, S., Kosaka, K., Nakayama, M., Hoshino, M., Nabeshima, Y., Hirano, T. and Uemura, T. (2007) Opposing roles in neurite growth control by two 7-pass transmembrane cadherins. *Nat. Neurosci.* 10, 963-969.
- Sugiyama, Y., Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2008) mGluR1-mediated facilitation of long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *Eur. J. Neurosci.* 27, 884-896.
- Takeuchi, T., Ohtsuki, G., Yoshida, T., Fukaya, M., Wainai, T., Yamashita, M., Yamazaki, Y., Mori, H., Sakimura, K., Kawamoto, S., Watanabe, M., Hirano, T. and Mishina, M. (2008) Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphilin. *PLoS ONE* 3, e2297, 1-11.
- Tsuruno, S. and Hirano, T. (2007) Persistent activation of protein kinase C α is not necessary for expression of cerebellar long-term depression. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 38-48.
- Tsuruno, S., Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2008) Src-family protein tyrosine kinase negatively regulates cerebellar long-term depression. *Neurosci. Res.* 61, 329-332.
- Tohgo, A., Eiraku, M., Miyazaki, T., Miura, E., Kawaguchi, S., Nishi, M., Watanabe, M., Hirano, T., Kengaku, M. and Takeshima, H. (2006) Impaired cerebellar functions in mutant mice lacking DNER. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 326-333.
- Umeshima, H., Hirano, T. and Kengaku, M. (2007) Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16182-16187.
- Yawata, S., Tsuchida, H., Kengaku, M. and Hirano, T. (2006) Membrane-proximal region of GluR δ 2 is critical for LTD and interaction with PICK1 in a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* 26, 3626-3633.

(2) 研究成果の今後期待される効果

プルキンエ細胞は、小脳皮質から出力する唯一の神経細胞であり、小脳機能にとって最も重要な細胞である。

本研究では、そのプルキンエ細胞上に形成される興奮性シナプスおよび抑制性シナプスでの可塑性の分子機構を研究した。

興奮性シナプスに関しては、体中でプルキンエ細胞でしか発現しないグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットに注目し、それが通常の興奮性シナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞内局在制御にかかわる PICK1 との相互作用を介して、長期抑圧に関与することを示した (Yawata et al., 2006)。また、 $\delta 2$ サブユニットと結合する分子として同定されたデルフィリンに着目し、デルフィリン欠損マウスでは長期抑圧が起こりやすくなっていることを示した (Takeuchi et al., 2008)。この結果は予想外であったが、後述するようにデルフィリン欠損マウスでは運動学習の亢進が認められたこともあり、興味深く重要な成果と考えている。デルフィリン欠損マウスでは、長期抑圧誘導に必要な細胞内 Ca^{2+} 濃度の閾値が低下していることも判明したが、どのような分子機構で閾値低下が生じたかは不明であり、今後に残された課題である。また本研究で、長期抑圧誘導に際しての C キナーゼ α および Src 型チロシン基リン酸化酵素のはたらきについても新知見を報告した (Tsuruno & Hirano, 2006; Tsuruno et al. 2008)。これらは長期抑圧誘導・制御の分子機構解明に役立つ知見であるが、新たな問題点も提起する成果であった。黒田らは、長期抑圧誘導にかかわる細胞内分子情報伝達系のモデルを構築して、システム解析を行い、後述するような優れた成果を挙げた (Kuroda et al., 2001; Doi et al., 2005)。しかしながら現時点では、これらのモデルに $\delta 2$ サブユニット・デルフィリン・Src 等の分子は組み込まれていない。今後はこれらの分子に関する新知見を加えた形のモデルの作成または改訂を行い、デルフィリン欠損による細胞内 Ca^{2+} 濃度閾値の低下メカニズム等も説明できるようなものを構築したい。そして、現時点でも残されている各研究グループからの報告間の矛盾点・未解明の問題等を解決し、長期抑圧誘導・発現・維持・制御の分子機構全体像の包括的理解をめざした研究を継続・発展させたいと考えている。

また本研究で、生後成長期における登上線維・プルキンエ細胞間シナプスについても研究を行い、登上線維・プルキンエ細胞間の成体型シナプス結合パターン形成に寄与すると推定される新規のシナプス可塑性を発見して報告した (Ohtsuki & Hirano, 2008)。本 CREST 研究では、学習に寄与しうると推定されるシナプス可塑性に重点を置いたが、シナプス可塑性は正常な神経回路網の形成においても重要な役割を担うと考えられており、神経回路形成に寄与するシナプス可塑性は重要である。また、両者は必ずしも独立ではないと推定される。今後、新たな型のシナプス可塑性が見出される可能性が残っており、その探索も哺乳類中枢神経系の大事な特徴である柔軟性の理解に必要と考えている。

抑制性シナプスの可塑性 RP については、二つの蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を用いた FRET のイメージング実験、細胞内記録中の神経細胞内へのペプチド投与実験等、高度な細胞生物学実験・電気生理実験を分子生物学実験と組み合わせて、RP 発現への GABARAP の関与を明らかにした (Kawaguchi and Hirano, 2007)。また、RP の誘導制御の分子機構を検討して、インテグリン・Src 型チロシン基リン酸化酵素・mGluR1 の関与を明らかにした (Kawaguchi and Hirano, 2006; Sugiyama et al., 2007)。さらに、RP 誘導に関する細胞内分子情報伝達系のモデルを構築して、以前の実験結果 (Kawaguchi and Hirano, 2000, 2002) をコンピューターシミュレーションで再現した。その上で、さまざまな条件での RP 誘導を検討し、cAMP 依存性酵素の一つである PDE1

が、RP 誘導に必要な細胞内 Ca^{2+} 濃度に大きな影響を及ぼすという理論予測を得た。そして、この予測を検証する電気生理学実験を行った。モデルを用いてコンピューターシミュレーションによる理論予測を行い、それを生理学実験等により検証する研究方法は、複雑な生体システムの解析において、有効な新手法になると期待している。抑制性シナプスの RP については、その誘導の細胞内 Ca^{2+} 濃度閾値について、PDE1 の寄与メカニズムを理論的には定量的に解明できた。顆粒細胞・プルキンエ細胞間興奮性シナプスにおける長期抑圧誘導の細胞内 Ca^{2+} 濃度閾値のデルフィリンによる制御についても、今後、同様のモデルを利用した理論的解析を行いたいと考えている。本研究では、プルキンエ細胞の興奮性シナプスに局在するグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットを欠損したミュータントマウスで、プルキンエ細胞活動パターンの変化を介して RP が自発的に起こることも示した (Ohtsuki et al., 2004)。このように、神経活動依存的なシナプス可塑性は間接的な形でも引き起こされ、それがさらなる変化を神経回路活動に与えることがあると考えられる。今後は、神経回路内の複雑なシナプス可塑性の相互作用にも十分な配慮をする必要がある。

今回の一連の研究により、小脳プルキンエ細胞上シナプスで起こる可塑性の精妙な制御機構が明らかになり、またモデルを用いたコンピューターシミュレーションによるシステムバイオロジー研究による理論予測と実験による検証、分子生物学手法で作成した蛍光分子融合タンパク質を用いた FRET イメージングと電気生理学実験の組み合わせ等、分子・細胞神経科学分野の研究を大きく進展させる手法を確立できたと考えている。一方で、「小脳におけるシナプス可塑性の分子機構」に関する研究単独では、直接的な社会への波及効果は限られよう。しかしながら、次章で説明するように、長期抑圧が起こりやすくなったデルフィリン欠損マウスでは運動学習が亢進していた。したがって、シナプス可塑性の微妙な調節が学習能力に相当の影響をおよぼすことが明示されたことになる。シナプス可塑性の分子メカニズムに関する正確・詳細な知見は、学習メカニズムの根源的解明に寄与し、学習効率の向上・リハビリテーションの効率向上・神経疾患の治療・予防の改善に貢献するとともに、より長期的には人の個性・能力の多様性の起源の理解にも有用な情報を提供できるのではないかと考える。

3. 2 シナプス可塑性の運動学習・運動制御における役割の検討(京都大学 平野グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

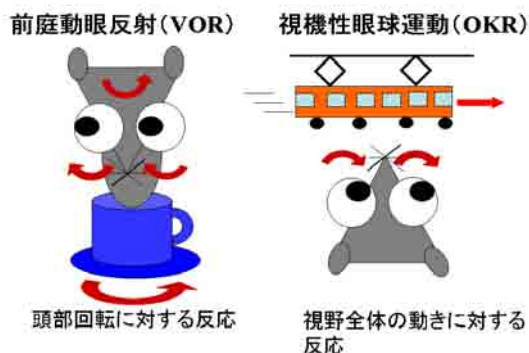
小脳長期抑圧が起こらないグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスおよび長期抑圧が起こりやすくなったデルフィリン欠損マウスを用いて、運動学習能力および運動制御能力を調べた。刺激を正確にコントロールすることが可能であり、また運動制御の神経経路が単純(図 1 1)で、さらに学習も起こる反射性の視運動性眼球運動(OKR, 図 1 0)を軸に行動実験を行い、プルキンエ細胞活動記録も実施した。

1 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスの反射性眼球運動

私たちの研究グループが作成したマウス眼球運動計測システム (Iwashita et al., 2001, Neurosci Res, 図 1

2)を用いて、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスと野生型マウスの反射性眼球運動(図10)およびその適応(運動学習)の解析を行った。前述したように、 $\delta 2$ サブユニットは小脳プルキンエ細胞で特異的に発現する分子で、その欠損マウスでは長期抑圧が起こらない。まず、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウス(Kashiwabuchi et al., 1995, Cell)が、運動学習障害および反射性眼球運動の動特性異常を示すことを明らかにした。また小脳部分除去実験等により、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスでは、反射性眼球運動を制御する脳幹部も変化していることを示唆した(Kato et al., Eur J Neurosci 2005)。

運動学習の測定に用いられる反射性眼球運動



VOR、OKRは頭部の動きで生じる視野のブレを補正する反射

図10 反射性眼球運動

VOR、OKRに関する神経回路

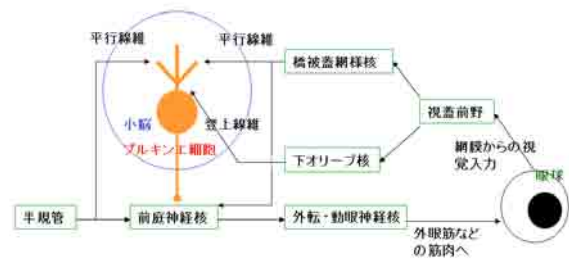


図11 反射性眼球運動 VOR, OKR を制御する神経回路

OKRの測定方法

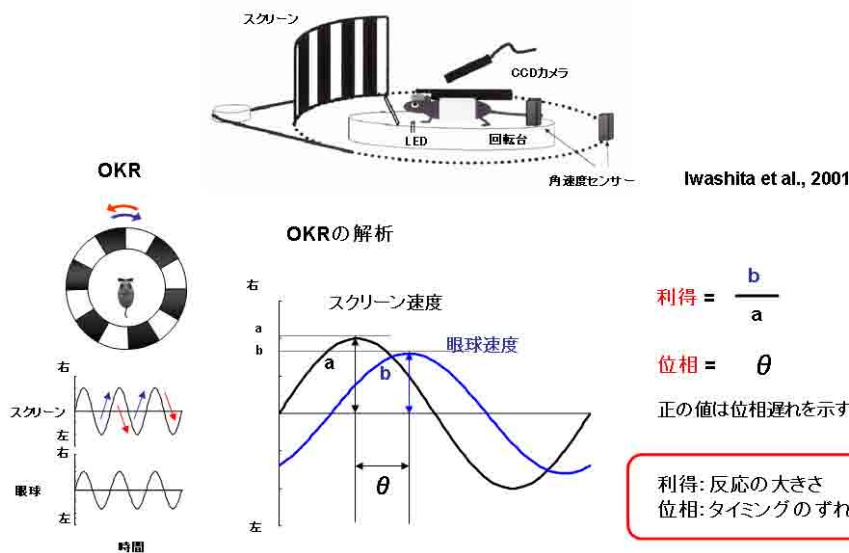


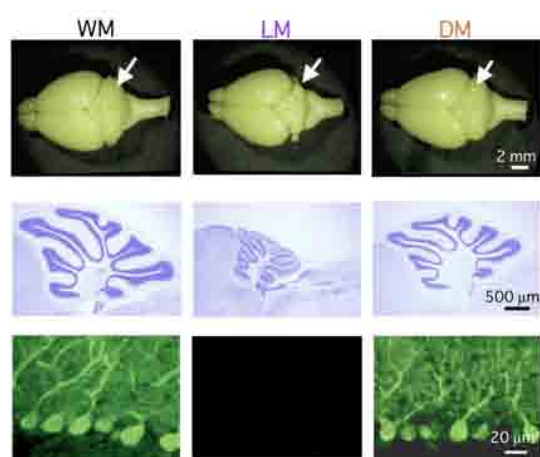
図12 マウス用反射性眼球運動計測システムと OKR 解析方法 (Iwashita et al., 2001, Neurosci Res)

2 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスとラーチャーマウスの比較

運動制御におけるプルキンエ細胞および $\delta 2$ サブユニットの役割を明らかにする目的で、 $\delta 2$ サブユニット

欠損マウスに加えて、プルキンエ細胞自体が発生過程で消失してしまうラーチャーマウスの行動実験を行った。まず、マウス・ラットにおける運動能力検査として多用されているロタロッドテストを行ったところ、意外なことに $\delta 2$ サブユニット欠損マウスの方が、ラーチャーマウスよりも成績が悪かった(図 1 3)。その原因の一つは、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスで不随意のふるえが良く起こることのように思われた。そこで、特に刺激を加えない状況での眼球の動きを調べたところ、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスでは、自発的な眼球振動が常時起こっていることがわかった(図 1 4)。 $\delta 2$ サブユニットはプルキンエ細胞に限局して発現する分子であり、またプルキンエ細胞が小脳皮質における唯一の出力神経細胞種であることから、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスでは、プルキンエ細胞活動に異常が生じており、それが不随意運動の原因と考えた。そこで、眼球運動と反射性眼球運動を制御する小脳片葉領域のプルキンエ細胞から活動電位の同時記録を行ったところ、不随意眼球運動の原因と推定できる眼球運動と同期した神経活動を記録することができた(図 1 4) (Yoshida et al., 2004, J Neurosci)。これらの結果は、 $\delta 2$ サブユニット欠損によって、プルキンエ細胞へのシナプス入力制御が正常に行われなくなったことにより、プルキンエ細胞の活動電位発火パターンが異常になり、それが前庭神経核等脳幹の眼球運動制御神経細胞の活動に影響を及ぼして(図 1 1)、不随意眼球運動が生じたことを示唆している。異常なプルキンエ細胞出力は、その欠失よりも大きな悪影響を運動制御に及ぼすという興味深い事実が明らかになった(図 1 5)。

$\delta 2$ ノックアウトマウスとlurcherマウスの比較



WM 野生型
LM *lurcher* プルキンエ細胞欠損
DM $\delta 2$ 欠損マウス

形態異常がより顕著なLMよりもDMの方が運動制御異常が大きい。

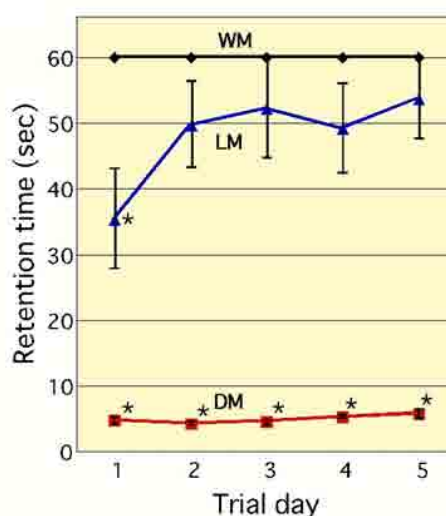
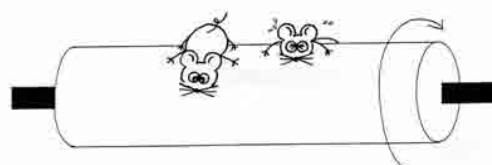


図 1 3 $\delta 2$ サブユニット欠損マウス・ラーチャーマウス・野生型マウスの比較 (Yoshida et al., 2004, J Neurosci)

GluRδ2^{-/-}は自発性眼球運動を示した

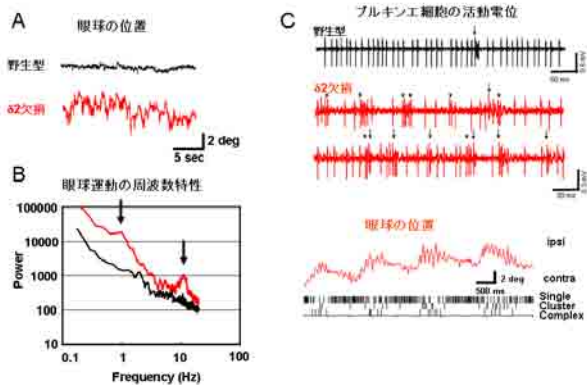


図14 野生型およびδ2 サブユニット欠損マウスの自発性眼球運動(A, B, C)と小脳片葉プルキンエ細胞の自発発火(C)。Bの矢印は、眼球運動に1Hzと10Hzの周波数成分があることを示す。Cの矢印は複雑スパイク(後述)を示す。δ2 サブユニット欠損マウスでは、自発性眼球運動とプルキンエ細胞の活動電位発火は共に約10 Hzの周期性を示し、同期していた。(Yoshida et al., 2004, J Neurosci)

野生型(WM)、lurcherマウス(LM)、δ2ノックアウトマウス(DM)での小脳のはたらき



図15 δ2 サブユニット欠損マウスではプルキンエ細胞の異常な発火パターンが運動制御を妨害していると考えられる。

3 δ2 サブユニット欠損マウスにおける反射性眼球運動タイミング異常の神経機構

Katoh et al., (2005)の論文で、δ2 サブユニット欠損マウスでは、頭部回転に際しての視野のブレを抑える反射性視運動性眼球運動(OKR)のタイミングが大きく遅れることを報告した。このタイミング遅れが生じるメカニズムを調べるために、視運動性眼球運動を行っている時の、マウス小脳片葉内プルキンエ細胞活動記録を行った。その解析により、亢進した登上線維活動がプルキンエ細胞の出力に大きな影響を及ぼしていることが、タイミング遅れの主因であることを明らかにした。プルキンエ細胞は登上線維入力により引き起こされる複雑スパイクと平行線維入力等により制御される単純スパイクという二種類の活動電位を発生する(図16)。視運動性眼球運動とプルキンエ細胞活動の同時記録を行ったところ、野生型マウスでもδ2 サブユニット欠損マウスでも、単純スパイク・複雑スパイクは視運動性眼球運動時に同じようなタイミングで、スパイク種間に関してはお互いに逆位相で発火した。しかしながら、野生型では複雑スパイクの発火頻度が単純スパイクの100分の1程度であったのに対し、δ2 サブユニット欠損マウスでは複雑スパイクと単純スパイクの発火頻度が同程度になっていた。そのため、δ2 サブユニット欠損マウスでは視運動性眼球運動時のプルキンエ細胞のスパイク全体としての発火タイミングが大きくずれ、それが視運動性眼球運動のタイミングの遅れとよく一致していた(Yoshida et al., 2007, Eur J Neurosci) (図17)。この研究結果は、神経細胞への異なる種類のシナプス入力強度のバランスが、反射行動タイミングの決定に大きな影響を及ぼすことを明示した重要な成果である。

生体内におけるプルキンエ細胞の活動の解析

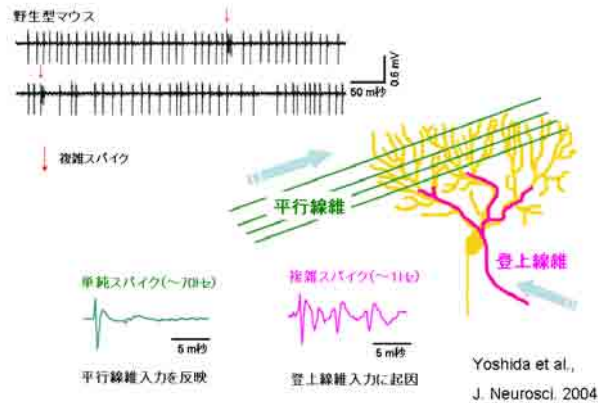


図16 平行線維入力により制御される単純スパイクと登上线維入力により引き起こされる複雑スパイク。

GluRδ2欠損マウスでは高頻度の複雑スパイクが全スパイク活動パターンを変化させている

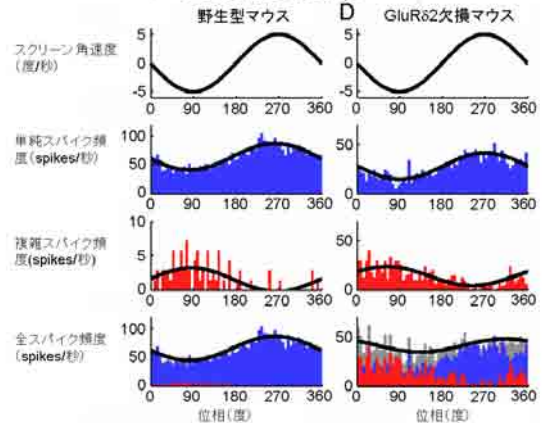


図17 野生型マウスと $\delta 2$ サブユニット欠損マウスにおける視運動性眼球運動時の単純スパイクと複雑スパイク活動。 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスでは、複雑スパイク頻度が大きく、複雑スパイクと単純スパイクを合わせた全スパイク頻度が視(スクリーン)刺激から遅れる。(Yoshida et al., 2007, Eur J Neurosci)

4 デルフィリン欠損マウスにおける運動学習促進

前述したように、デルフィリン欠損マウスにおいては、小脳長期抑圧が引き起こされやすくなっている(図3)。このシナプス可塑性の亢進が運動学習能力にも影響するのではないかと考え、視運動性眼球運動の適応現象を調べた。視運動性眼球運動は、視野全体が動いた時に眼球がその動きに追従して動くことにより視覚のブレを防ぐ反射であるが、視覚のブレは前庭器官入力に依存する前庭動眼反射によっても補正される(図10)ために、通常は視運動性眼球運動だけでは視野の動きに追いつけない。しかしながら、視野の動きを継続的に与え続けると(眼前の縦縞スクリーンを左右に正弦波状に動かし続けると)、眼球の動きがしだいに速くなっていく。これが視運動性眼球運動の適応であり、運動学習の一つのモデルとなっている。デルフィリン欠損マウスでは、野生型マウスよりも速やかに、視運動性眼球運動の適応が起こった(図18)。この結果は、長期抑圧の起こりやすさが運動学習の効率と相関することを示唆する重要な成果である。ただし、前述したロタロッド試験を繰り返してその成績の向上程度を比べる実験を行ったところ、デルフィリン欠損マウスと野生型マウスで差が認められなかった。したがって、デルフィリン欠損により、全ての運動学習が向上するということではない(Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE)。

デルフィリン欠損マウスでは視運動性眼球運動の適応(運動学習)が亢進している

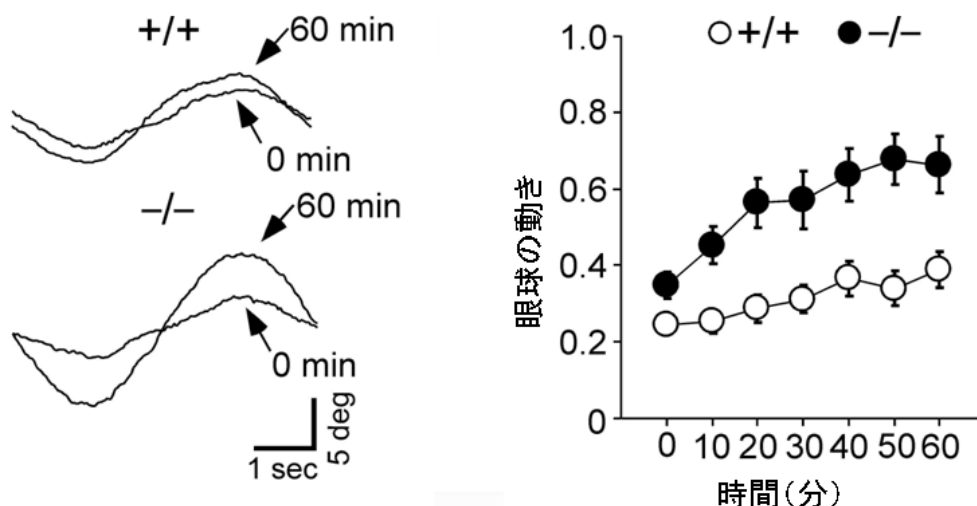


図 18 デルフィリン欠損マウスにおける視運動性眼球運動適応の促進。(Takeuchi et al., 2008, PLoS ONE)

5 その他の個体レベルでの研究結果

小脳皮質内シナプス伝達が変化すると推定される他のミュータントマウスについても、共同研究を行った。Notch と結合する分子である DNER の欠損マウスでは、プルキンエ細胞近傍へ放出されたグルタミン酸の取り込みが阻害されるが、そのマウスでは軽い運動失調が認められた (Tohgo et al., 2006, Mol Cell Neurosci)。また、シナプス前終末からの伝達物質放出を阻害する破傷風毒素を、薬剤投与により小脳顆粒細胞特異的に発現させることのできるミュータントマウスにおいて、瞬膜反射条件付け等を調べる研究に協力した。瞬膜反射は、動物の眼球に空気を吹き付けられた時に、まぶたを閉じる(無条件応答)防御反射である。ところで、空気を動物に吹き付ける前に、音を聞かせるなどそれ自身ではまぶたを閉じさせる作用のない条件刺激を与えることを繰り返すと、動物は音を聞いただけでもまぶたを閉じるようになる(条件応答)。これが瞬膜反射の条件付けであり、小脳がかかわる運動学習のモデルの一つである。顆粒細胞からの伝達物質放出を抑えて、平行線維・プルキンエ細胞間シナプス伝達が抑制された

状態では、単純スパイクがほとんどでなくなり条件応答も起こらないが、薬剤投与を停止してシナプス伝達が戻った時には、条件応答が認められることを報告した (Wada et al., 2007, Proc Natl Acad Sci USA)。

文献

- Iwashita, M., Kanai, R., Funabiki, K., Matsuda, K. and Hirano, T. (2001) (CREST 研究期間以前の成果) Dynamic properties, interactions and adaptive modifications of vestibulo-ocular reflex and optokinetic response in mice. *Neurosci. Res.* 39, 299-311.
- Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S. and Mishina, M. (1995) (CREST 研究期間前の成果) Disturbed motor coordination, Purkinje cell synapse formation and cerebellar long-term depression of mice defective in the $\delta 2$ subunit of the glutamate receptor channel. *Cell* 81, 245-252.
- Katoh, A., Yoshida, T., Himeshima, Y., Mishina, M. and Hirano, T. (2005) Defective control and adaptation of reflex eye movements in mutant mice deficient in either the glutamate receptor $\delta 2$ subunit or Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1315-1326.
- Takeuchi, T., Ohtsuki, G., Yoshida, T., Fukaya, M., Wainai, T., Yamashita, M., Yamazaki, Y., Mori, H., Sakimura, K., Kawamoto, S., Watanabe, M., Hirano, T. and Mishina, M. (2008) Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphilin. *PLoS ONE* 3, e2297, 1-11.
- Tohgo, A., Eiraku, M., Miyazaki, T., Miura, E., Kawaguchi, S., Nishi, M., Watanabe, M., Hirano, T., Kengaku, M. and Takeshima, H. (2006) Impaired cerebellar functions in mutant mice lacking DNER. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 326-333.
- Wada, N., Kishimoto, Y., Watanabe, D., Kano, M., Hirano, T., Funabiki, K. and Nakanishi, S. (2007) Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16690-16695.
- Yoshida, T., Katoh, A., Ohtsuki, G., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Oscillating Purkinje neuron activity causing involuntary eye movement in a mutant mouse deficient in the glutamate receptor $\delta 2$ subunit. *J. Neurosci.* 24, 2440-2448.
- Yoshida, T., Funabiki, K. & Hirano, T. (2007) Increased occurrence of climbing fiber inputs to the cerebellar flocculus in a mutant mouse is correlated with the timing delay of optokinetic response. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1467-1474.

(2) 研究成果の今後期待される効果

小脳は運動制御・運動学習にかかわる。本研究では、長期抑圧等小脳皮質の各機能が動物個体内の行動制御において果たす役割を、遺伝子改変マウスを利用して検討した。長期抑圧が起こらないグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスでは、視運動性眼球運動および前庭動眼反射の適応という運動学習が起こらないことを示した (Katoh et al., 2005)。また、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスで不随意運動が認められ、プルキンエ細胞自体を欠失したラーチャーマウスよりも重篤な運動失調を示すことを見出し、不随意運動発生の神経機構を明らかにした (Yoshida et al., 2004)。さらに、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスでの視運動性眼球運動タイミング遅れが生じるメカニズムを調べるために、運動中のマウスからのプルキンエ細胞活動記録を行い、 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスにおける複雑スパイクの発火頻度上昇がプルキンエ細胞の活動パターンを変えて、その結果、視運動性眼球運動のタイミングが遅れたことを示唆した (Yoshida

et al., 2007)。この研究結果は、神経細胞への異なる種類のシナプス入力強度のバランスが、反射行動タイミングの決定に大きな影響を及ぼすことを明示した重要な成果と考えている。82 サブユニット欠損マウスでは長期抑圧が不全であったが、前述したように私たちは、デルフィリン欠損マウスで長期抑圧が起こりやすくなっていることも見出し、その学習能力を調べた。そして、デルフィリン欠損マウスでは、視運動性眼球運動の適応がより速やかに起こることを明らかにした (Takeuchi et al., 2008)。この結果は、長期抑圧の起こりやすさが運動学習の効率と相関することを示し、一般的にシナプス可塑性の起こりやすさが学習スピードと関連していることを示唆する重要な成果である。しかしながら、ロタロッドテストでは、デルフィリン欠損マウスの方が野生型マウスより学習が速いということにはなかった。長期抑圧が起こりやすくなることで、全ての運動学習が促進するのではなく、課題と条件によっては学習が低下する場合もあるかもしれない。今後は、前庭動眼反射の適応等も調べ、長期抑圧が起こりやすくなったことの個体行動への影響を詳細に検討することにより、長期抑圧が神経回路および動物個体の行動制御にどのような影響を及ぼすかを、より包括的に把握できるように努めたい。

今後、長期抑圧以外のシナプス可塑性の役割の検討も必要と考える。長期抑圧とは逆方法の可塑性である長期増強の役割、また RP など抑制性シナプスの可塑性の役割についての研究が重要である。RP については、まだその動物個体内での役割に関する知見がない。PDE1 が RP の起こりやすさの制御に関係することが確認できたので、今後 PDE1 欠損マウスの運動学習能力を検討したい。また、RP が起こらないと思われる遺伝子改変マウスも作成できると考えられる。そのマウスで RP 不全が確認できれば、運動学習・運動制御能力を詳細に検討し、RP の生体内での役割を明確にしたい。今回の CREST 研究では、シナプス可塑性が変化した遺伝子改変動物に注目したが、プルキンエ細胞欠損ラチャーマウスも研究に用いた。また、小脳ゴルジ細胞欠損マウスも存在し、以前私たちはこの遺伝子改変動物に関する行動実験を行った (Watanabe et al., 1998, Cell)。前述したように、顆粒細胞・プルキンエ細胞間シナプス伝達を薬物投与により特異的に遮断できる遺伝子改変マウスもあり、興味深い表現型を示した (Wada et al. 2007)。今後は、こうした特定ニューロン欠損マウス・特定シナプス伝達欠損マウス等についても研究を実施して、小脳皮質のニューロン・シナプス・可塑性等特定シナプス機能など、各機能ユニットの役割を明らかにし、小脳の神経回路が全体としてどのようにはたらくかについて、包括的な理解を得ることが大きな目標になる。そうした研究の実施にあたっては、神経回路機能についても、細胞内分子情報伝達系に関して構築したような定量的なモデルを構築して、システム全体のはたらきを、コンピューターシミュレーションにより、理論的・定量的に解析することも有用と考える。

上述してきた研究成果は、小脳のシナプス可塑性を含むシナプス制御およびそれらにかかわる分子の運動学習・運動制御における役割を明らかにすることに寄与し、将来的には脳機能疾患の理解および治療方法・リハビリテーション方法の改善、そして運動学習効率の向上等に役立つ知見と考える。ところで、今回研究したデルフィリン欠損マウスは、シナプス可塑性不全ではなく、可塑性が起こりやすくなるという比較的軽微なシナプス可塑性変化の表現型を示した。また今回の研究で、PDE1 もシナプス可塑性の起こりやすさに影響を及ぼすと理論予測した。こうした比較的微妙なシナプス機能変化は、ことによると疾患等よりも動物個体の個性に寄与しているか

もしれない。シナプス機能調節の詳細を理解していくことにより、動物個体の個性・多様性の根源にせまり、より深くヒトとその心を理解するための基盤構築に貢献できるのではなかろうか。そして、それはヒトがもっている潜在能力をよりよく発揮することにも寄与すると期待している。

3.3 シナプス可塑性を制御する細胞内分子情報伝達系のモデリングの研究(東京大学 黒田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

これまで、我々は小脳プルキンエ細胞の長期抑圧 (Long-term depression: LTD) に関わる実験的知見を元に、シグナル伝達経路のシミュレーションモデルを構築し、小脳 LTD のシステム生物学的理解を試みてきた (Kuroda et al, 2001, J Neurosci)。モデルは、平行線維 (Parallel fiber: PF) と登上線維 (Climbing fiber: CF) からの入力同期時に生じる細胞内 Ca^{2+} 上昇から、LTD に対応する AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化までを非常に良く説明した。しかし、LTD をトリガーするメカニズム、すなわち PF と CF からの刺激入力同期時に、なぜ細胞内 Ca^{2+} 上昇が生じるのかについては議論の対象外であった。

そこで、我々は再びシミュレーションモデルを構築し、PF 刺激と CF 刺激のタイミング依存的な、細胞内 Ca^{2+} 上昇のメカニズムをシステム生物学的見地から明らかにした (図 1, Doi et al, 2005, J Neurosci)。小脳プルキンエ細胞における Ca^{2+} 上昇は、細胞内 Ca^{2+} ストアを介した Ca^{2+} 再生サイクル (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR) が原因であると目されている。また、PF 刺激は IP_3R を介して CICR 発生の閾値を低下させる事も知られている (図 1a)。詳細なモデルを用いたシミュレーションにより、PF 刺激により CICR の閾値が低下した直後に CF 刺激を行うと、少量の Ca^{2+} 流入で CICR がトリガーされて細胞内 Ca^{2+} が劇的に上昇することが明らかとなった (図 1b)。また、LTD における PF 刺激と CF 刺激のタイミング依存性は、PF 刺激から IP_3 産生までの時間遅れにより決定されることも明らかとなった。さら

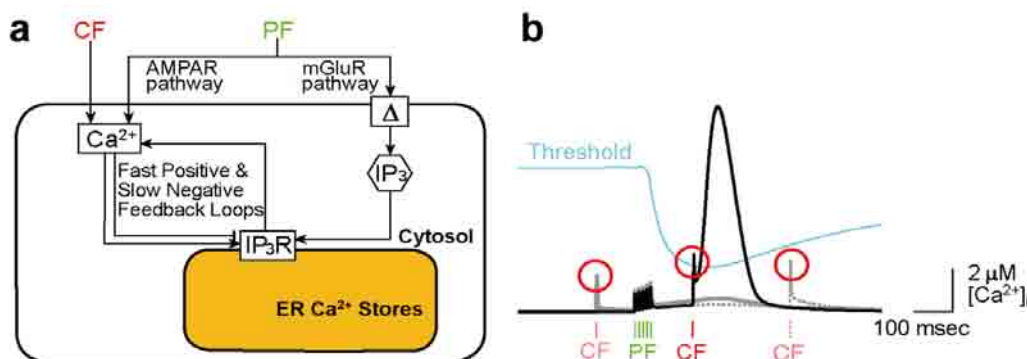


図 1 : PF 刺激と CF 刺激によるタイミング依存的な Ca^{2+} 上昇。a, CICR による細胞内 Ca^{2+} の上昇の概念図。b, モデルシミュレーション結果。

に、他のさまざまな小脳 LTD の実験結果を統一的に説明できることも分かった。まとめて、これまで実

験者間でバラバラに行われていたシグナル伝達分子の同定やその特性解析、様々な刺激プロトコルで誘導される小脳 LTD について、一つの筋の通った説明を行うことができた。このような統合的観点から行われた分子シミュレーションは世界初であり、小脳長期抑圧について類似のシミュレーション研究は存在しない。

一方、このような刺激タイミング依存的なシナプス可塑性は、小脳のみならず海馬や大脳皮質など、多くのニューロンにおいて観測されている。そこで、我々は大脳皮質第 2/3 層錐体細胞におけるスパイクタイミング依存シナプス可塑性 (Spike-timing-dependent plasticity: STDP) に注目し、タイミング検知から可塑性誘導までの統合的なシミュレーションモデルの開発を行った (図 2, Urakubo et al, 2008, J Neurosci)。

まず、実験により提案されている STDP 誘導メカニズムに基づいてモデルを作り (図 2a)、プレシナプス細胞 (プレ) - ポストシナプス細胞 (ポスト) のペア発火による STDP の再現を試みた。その結果、STDP の長期増強 (long-term potentiation: LTP) は再現できたものの、LTD は再現できなかった (図 2c 左)。多くの実験において、プレ発火後 10 ms 以内にポスト発火する場合には LTP を導き ($T_{\text{post}} - T_{\text{pre}} < 10$ ms)、ポスト発火後 30 ms 以内にプレ発火する場合には LTD を導く ($T_{\text{post}} - T_{\text{pre}} > -30$ ms)。しかし、モデルシミュレーションで LTD を導くことはできなかった。

この結果は、実験により提案された STDP の LTD を導くメカニズムが不完全であることを示す。実験観測により、ポスト→プレ発火時の LTD は、ポスト発火に伴う Voltage-gated Ca^{2+} channel (VGCC) 依存性の Ca^{2+} 上昇がプレ発火時の NMDA 型グルタミン酸受容体の活性を抑圧することによって導かれるとする報告がある。しかし、実際には NMDA 受容体の活性により導かれる Ca^{2+} 上昇が NMDA 受容体自身をタイミング非依存的に抑圧し、ポスト発火による Ca^{2+} 上昇の検知を妨害してしまうことが明らかとなった。

この不都合を回避する種々の可能性を検討した結果、我々は NMDA 受容体の Ca^{2+} 抑圧の時定数がプレ発火の前後、すなわち神経伝達物質グルタミン酸 (Glutamate: Glu) の有無により異なるとする、アロステリック効果の仮説にたどり着いた (図 1 b)。

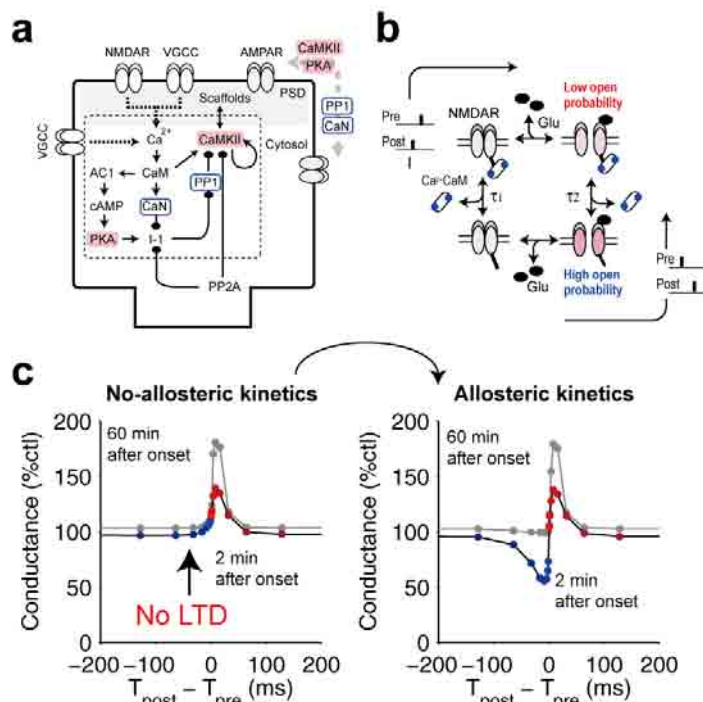


図 2 : STDP モデルとアロステリック効果の予測。a, モデルの概要。b, 提案する Glu と NMDA 受容体間のアロステリック効果。c, アロステリック効果の有無による、シミュレーション結果の違い。

(τ_1) より 100 倍以上遅いと仮定すると、STDP の LTD が形成される (図 1c 右)。これは、NMDA 受容体の抑圧がプレ→ポスト発火時には遅く、ポスト→プレ発火時には速いことが、VGCC 性の Ca^{2+} 上昇による NMDA 受容体の抑圧を可能にする為である。

アロステリック効果の仮説に従ったモデルは、単純なプレーポスのペア発火による STDP のみならず、triplet (プレ/ポスト 3 組の発火) や quadruplet (プレ/ポスト 4 組の発火) など、あらゆる発火パターンにより誘導される LTP や LTD をほぼ完全に再現した。さらに、ポスト→プレ発火時に観測される NMDA 受容体性電位上昇の抑圧パターンは、アロステリック効果の存在を支持した。これらの結果は、NMDA 受容体の単純なアロステリック効果が、脳の複雑なスパイク活動を可塑性へコードするカギとなっている可能性を示唆する。

まとめて、実験のみから推測したシナリオは、量的な観点から見るとしばしばおかしい場合がある。このような矛盾点は詳細なモデルシミュレーションにより明らかにすることができると共に、矛盾点を埋める未知の分子的特性を推測することもできる。また、「推測した特性があると仮定した場合の」シミュレーションを行い他の実験と比較することで、推測した特性の妥当性を検討することもできる。これまで、STDP の説明を試みる多くの電気生理—分子モデルが提案されてきたものの、いずれも概略的なモデルであり、単純なプレーポスのペア発火による STDP すら十分に説明できていなかった。本シミュレーション研究は、STDP の研究分野の理解を一気に加速させるものであり、意義は大きい。

文献

- Doi, T., Kuroda, S., Michikawa, T. and Kawato, M. (2005) Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} threshold dynamics detect spike timing in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 25, 950-961.
- Kuroda, S., Schweighofer, N and Kawato, M (2001) (CREST 研究期間以前の成果) Exploration of signal transduction pathways in cerebellar long-term depression by kinetic simulation. *J. Neurosci.* 21, 5693-5702.
- Urakubo, H., Honda, M., Froemke, R.C. and Kuroda, S. (2008) Requirement of an allosteric kinetics of NMDA receptors for spike-timing-dependent plasticity. *J. Neurosci.* 28, 3310-3323

(2) 研究成果の今後期待される効果

小脳 LTD および大脳皮質 STDP について、入力刺激から誘導までを記述する詳細な分子モデルの作成に成功した。これは、シナプス可塑性のアルゴリズムを明らかにしたことでもある。ニューロンネットワークはシナプス強度のパターンとして情報を記憶することが知られているが、どのようなニューロン活動でどのようにシナプス強度パターンが変化し、それがどのような情報処理に供するのか、未だ明らかでない。モデルニューロンネットワークを作成し、我々のシナプス可塑性モデルがどのように働くのかシミュレーションを行うことは、今後の研究の一つの方向性であろう。また、モデルが予測する NMDA 受容体アロステリック効果の直接の検証、あるいはモデルと

現実の細胞の間のギャップを繋ぐ再構成系での実験など、考えられる展開は多々ある。

また、これらの研究を通じて、モデルシミュレーションと生体现象を詳細に比較することで、生物のシステムとしての理解を導くシステム生物学的手法が有効であることも示された。学問分野としてのシステム生物学は未だ黎明期を脱したとさえ言えないが、近年の観測技術の発展で生物実験の方法はより多様になり、得られる観測データの量も飛躍的に増えつつある。各々の実験観測の結果を発散させず、統合的な枠組みの中で取り扱う必要が無くなることは決してなく、観測事実から解釈可能なシナリオを導くためにも、システム生物学的見地にもとづいた研究はこれから益々必須となるであろう。

3. 4 神経伝達物質受容体制御の分子機構(産業技術総合研究所 亀山グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

興奮性シナプスにおいて、可塑性発現の分子レベルでのメカニズムを解明するため、グルタミン酸受容体の翻訳後修飾やその結合蛋白質によるシナプス部位への輸送に関して生化学的、細胞生物学的解析を行った。受容体の輸送およびシナプスの形態の維持に関与すると考えられる δ -catenin に注目して、その分子コンプレックスについて解析を行った。 δ -catenin が PSD-95 を介してグルタミン酸受容体 NMDA サブタイプとも、GRIP を介してグルタミン酸受容体 AMPA サブタイプ GluR2 サブユニットとも複合体を形成することを見出した。特に AMPA サブタイプのシナプス膜表面への輸送に δ -catenin のカルボキシル基末端と GRIP の PDZ ドメインとの結合が必要であることを示した (Ochiishi et al., 2008, *Mol Cell Neurosci*)。また、AMPA サブタイプ GluR1 サブユニットのリン酸化を解析し、新規のリン酸化部位 (T840) を見出した。この部位は主に PKC によりリン酸化され、この部位のリン酸化が幼少期のマウスの海馬の LTD の形成に関与するが、成熟したマウスでは影響を与えないことを見出した (Lee et al., 2007, *Mol Cell Neurosci*)。

文献

- Lee, H. K., Takamiya, K., Kameyama, K., He, K., Yu, S., Rossetti, L., Wilen, D. and Huganir, R. L. (2007) Identification and characterization of a novel phosphorylation site on the GluR1 subunit of AMPA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 86-94.
- Ochiishi, T., Futai, K., Okamoto, K., Kameyama, K. and Kosik, K. S. (2008) Regulation of AMPA receptor trafficking by delta-catenin. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 499-507.

(2) 研究成果の今後期待される効果

グルタミン酸受容体の細胞表面への輸送の制御がシナプスの興奮性の可塑性を制御する重要な分子レベルでのメカニズムと示唆されている。今後も受容体分子のシナプス部位での挙動について研究を行う。マウスの成長により可塑性発現のメカニズムが異なることが示唆されたことから、発達段階に応じた分子レベルでの可塑性発現機構についても研究を進めていきたい。

3. 5 シナプス可塑性異常等を示すミュータントマウスの作成(京都大学 横井グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

以下に記載するように、遺伝学手法を用いてシナプス可塑性変化を可視化するツールとなるミュータントマウスの作成を行った。

1 tTA/tetO システムによるインデューシブルな発現システムを用いた神経細胞の可視化

汎用性のある神経細胞可視化マウスツールとして tetO-GFP トランスジェニックマウスを、神経細胞軸索末端を可視化するマウスツールとして tetO-spH(シナプトフルオリン)トランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスが強力な GFP 発現ツールとして利用可能かどうかを検討するため、線条体投射神経細胞に特異的に tTA を発現する PDE10A2-tTA ノックイントランスジェニックマウスと交配させ、PDE10A2-tTA/tetO-GFP ダブルトランスジェニックマウスおよび PDE10A2-tTA/tetO-spH ダブルトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスでは、線条体投射神経細胞において非常に強い GFP 蛍光を示し、免疫組織的方法によらずに神経細胞を可視化することが可能であった。これらのマウスを用いて、これまで正確には記述されていなかった線条体投射神経細胞から外側視床下部領域への投射を明瞭に示すことに成功した。この神経回路は、快楽的摂食行動に関連がある神経回路の存在を示唆するものであった(Sano, H. and Yokoi, M., 2007, J Neurosci)。以上のように、汎用性のある神経細胞可視化マウスツールとして、tetO-GFP トランスジェニックマウス、tetO-spH トランスジェニックマウスの開発に成功した。

2 Cre/loxP システムによる神経細胞の可視化

脳内における神経細胞の可塑的变化を個々の神経細胞レベルでとらえるためには、個々の神経細胞全体を可視化することが必要であり、そのためには多数のポピュレーションの中でごくわずかの細胞のみをマーキングすることが有用である。これを実現するため、タモキシフェン投与量により組み換え活性を調節可能な CreER を利用したトランスジェニックマウスを作成した。転写ドライバーとしては嗅球 M/T 細胞選択的なプロモーターフラグメント Pcdh21 を使用し、Pcdh21-CreER トランスジェニックマウスを作成した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

グルタミン酸受容体の細胞表面への輸送の制御がシナプスの興奮性の可塑性を制御する重要な分子レベルでのメカニズムと示唆されている。今後も受容体分子のシナプス部位での挙動について研究を行う。マウスの成長により可塑性発現のメカニズムが異なることが示唆されたことから、発達段階に応じた分子レベルでの可塑性発現機構についても研究を進めていきたい。

3. 5 シナプス可塑性異常等を示すミュータントマウスの作成(京都大学 横井グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

以下に記載するように、遺伝学手法を用いてシナプス可塑性変化を可視化するツールとなるミュータントマウスの作成を行った。

1 tTA/tetO システムによるインデューシブルな発現システムを用いた神経細胞の可視化

汎用性のある神経細胞可視化マウスツールとして tetO-GFP トランスジェニックマウスを、神経細胞軸索末端を可視化するマウスツールとして tetO-spH(シナプトフルオリン)トランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスが強力な GFP 発現ツールとして利用可能かどうかを検討するため、線条体投射神経細胞に特異的に tTA を発現する PDE10A2-tTA ノックイントランスジェニックマウスと交配させ、PDE10A2-tTA/tetO-GFP ダブルトランスジェニックマウスおよび PDE10A2-tTA/tetO-spH ダブルトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスでは、線条体投射神経細胞において非常に強い GFP 蛍光を示し、免疫組織的方法によらずに神経細胞を可視化することが可能であった。これらのマウスを用いて、これまで正確には記述されていなかった線条体投射神経細胞から外側視床下部領域への投射を明瞭に示すことに成功した。この神経回路は、快楽的摂食行動に関連がある神経回路の存在を示唆するものであった(Sano, H. and Yokoi, M., 2007, J Neurosci)。以上のように、汎用性のある神経細胞可視化マウスツールとして、tetO-GFP トランスジェニックマウス、tetO-spH トランスジェニックマウスの開発に成功した。

2 Cre/loxP システムによる神経細胞の可視化

脳内における神経細胞の可塑的变化を個々の神経細胞レベルでとらえるためには、個々の神経細胞全体を可視化することが必要であり、そのためには多数のポピュレーションの中でごくわずかの細胞のみをマーキングすることが有用である。これを実現するため、タモキシフェン投与量により組み換え活性を調節可能な CreER を利用したトランスジェニックマウスを作成した。転写ドライバーとしては嗅球 M/T 細胞選択的なプロモーターフラグメント Pcdh21 を使用し、Pcdh21-CreER トランスジェニックマウスを作成した。

Pcdh21-CreER/loxP-stop-loxP-reporter ダブルトランスジェニックマウスを作成し、低用量タモキシフェン投与により、ごくわずかの嗅球 M/T 細胞のみをマーキングすることに成功し、単一の嗅球 M/T 細胞の全体像を描出した(Yonekura, J. and Yokoi, M., 2008, Mol Cell Neurosci) 。この結果は、CreER を用いたトランスジェニックマウスが単一神経細胞の可視化ツールとして有用であることを示した。

3 逆行性シナプス間遺伝学的トレーサーの開発

シナプス可塑性を可視化する補助的ツールとして、シナプス接続を可視化できることは、新たなシナプス可塑性研究の展開に有用と考えられる。テタヌストキシン(TTC)がシナプスを超えて逆行性に運ばれる性質を利用し、また、アルカリフォスファターゼ(AP)の酵素活性を鋭敏な可視化ツールとして利用した、APTTC ハイブリッド遺伝子フラグメントを作成した。この APTTC ハイブリッド遺伝子フラグメントがマウス生体において逆行性シナプス間トレーサーとして機能するかどうかを検討した。将来的な汎用性を考慮し、tTA/tetO システムに組み込むため、tetO-APTTC トランスジェニックマウスラインを作成した。tTA ドライバーマウスとして、線条体投射神経細胞に特異的に tTA を強力に発現する PDE10A2-tTA ノックイントランスジェニックマウスを使用した。PDE10A2-tTA/tetO-APTTC ダブルトランスジェニックマウスでは、脳内において tTA の発現は線条体投射神経細胞に限局していたが、AP 活性は、線条体投射神経細胞へ神経線維を送っている神経細胞群にも認められ、APTTC ハイブリッド遺伝子フラグメントがマウス生体において逆行性シナプス間トレーサーとして機能することを証明した(Sano, H. et al., 2007, Genesis)。

文献

- Sano, H., Nagai, Y. and Yokoi, M. (2007) Inducible expression of retrograde transynaptic genetic tracer in mice. *Genesis* 45, 123-128.
- Sano, H. and Yokoi, M. (2007) Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J. Neurosci.* 27, 6948-6955.
- Yonekura, J. and Yokoi, M. (2008) Conditional genetic labeling of mitral cells of the mouse accessory olfactory bulb to visualize the organization of their apical dendritic tufts. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 708-718.

(2) 研究成果の今後期待される効果

上記一連の研究で作成したトランスジェニックマウスは、特定の神経細胞のみの可視化および特定シナプス機能の可視化を可能にするもので、中枢神経系内の複雑な神経細胞間シナプス連絡の解析およびシナプス可塑性を研究する際に有用なツールとして利用できると考えている。これらのマウスは全て理研マウスリソースセンターに寄託し、全世界の研究者が利用可能な状態にした。

3.6 ミュータントマウスにおける In Vivo 神経活動解析(大阪バイオサイエンス研究所 船曳グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

小脳での運動学習の神経機構、特に in vivo での神経活動変化を明らかにするために、マウスでの眼球運動と神経活動の同時記録システムを立ち上げた。これで頭部固定した覚醒マウスで反射性眼球運動（前庭眼反射、視運動性眼球運動）記録時に同時に小脳プルキンエ細胞からの単一活動記録が可能になった。また、眼球運動をモニターするカメラシステムを通常のビデオ（60Hz）から4倍速（240Hz）に変更した。これにより眼球運動の急速相の動きを詳細にとらえられるようになった。

このシステムを用いて、グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスで見られる視運動性眼球運動の大きな時間ずれは、増強された登上線維入力プルキンエ細胞の出力パターンを変化させることで生じていることを明らかにした。(Yoshida et al. 2007, Eur J Neurosci)。また、NMDA型グルタミン酸受容体2A・2C両サブユニット欠損マウスの反射性眼球運動を解析し、その動特性が野生型とほとんど差がないが、視運動性眼球運動の適応性変化に傷害が見られることを明らかにした。さらに、野生型マウスで小脳片葉への微小電気泳動法によるD-AP5投与により、NMDA受容体の視運動性眼球運動の短期的な適応性変化への関与を観察したところ、D-AP5投与により視運動性眼球運動の短期的な適応性変化が阻害された。以上より、視運動性眼球運動の短期的な適応性変化には小脳片葉のNMDA受容体活動が関与することが明らかになった(論文投稿準備中、平野グループとの共同研究)。また、この眼球運動解析システムを使って、いくつかの遺伝子操作マウスの反射性眼球運動異常を明らかにした(Sato et al, 2008)。

上記の眼球運動、神経活動同時記録のシステムでは、電極を比較的短時間に目的領域（小脳片葉）まで動かすためと思われるが、神経活動を安定して記録できる時間が10分程度と短い。この問題を克服すべく長期間の学習における神経活動変化を記録できる系として、テトロード電極とマイクロドライブの頭部留置による単離された複数の神経細胞活動の長期間記録実験システムの構築を行った。このシステムに用いるテトロード電極で小脳皮質からの記録の可能性を検討したところ、小脳皮質では、反応波形の基線が太く個々の神経細胞からの記録が単離出来なかった。この太い基線は小脳を抜けると消失することより、記録システムの問題でなく、組織からの生体信号によると考えられたため、小脳皮質からの記録を断念した。そこで、このシステムは海馬での場所記憶の研究に用いた。具体的には海馬歯状回特異的にNMDA受容体のMgブロックを傷害したミュータントマウス(京大 鍋島研作成)の海馬CA1領域で場所細胞の特性と環境変化の場所細胞特性への影響を調べた。結果として、このミュータントマウスの海馬CA1では場所細胞は野生型マウスと変わらず観察され、環境のわずかな変化(具体的には場所cueの一部変更)に対しての場所細胞のprofile変化が起こりにくくなっていることがわかった。さらに環境の大きな変化(具体的には周辺の壁全体の変更)に対しては、そのprofileを野生型マウスと同様に変化させることから、この海馬歯状回のNMDA受容体のMgブロックによる可塑的な変化が、これら微妙

な環境変化の検出に寄与していることが明らかになった（林勇一郎研究員、論文投稿中）。

実験結果の理論的検証を、京都大学情報学研究科久保講師・安部氏・芦田氏らの協力を得て行った。手始めに検証すべき問題点が明確な、面フクロウの聴覚系ニューロンに関する研究、具体的には一致検出を行うことで両耳間時差の計算を行っていると考えられている層状核細胞の *in vivo* 細胞内記録の実験結果に関する理論的検討を行った。層状核細胞体で見られる小さなスパイクから予想される Na チャンネルの細胞内分布（細胞体には Na チャンネルがあまりなく、1st node でスパイクが発生する）が層状核細胞体で必要な高周波信号処理にどのようにかかわるかを検討した。その結果、小さな 1st node に Na チャンネルを分布させて細胞体には Na チャンネルを配置させない受動的な細胞体構造をとることが、層状核細胞にとって重要な高周波成分（2-8 KHz）を 1st node では増大させうることを示した。さらに、これが小さな 1st node が大きな細胞体と低抵抗で連結されることによる 1st node の時定数短縮と Na チャンネルが持つ（時定数により規定される）corner frequency 以下の成分を増強する効果によって、引き起こされたものであることを明らかにした（Ashida, et al, 2007, J Neurophysiol）。

また、小脳プルキンエ細胞以外の神経細胞からの記録の可能性を追求した。小脳プルキンエ細胞は単純スパイク、複雑スパイクという 2 種類のスパイクを発生させるため細胞外記録のトレースからの同定が可能であるが、これは例外的であり、その他の神経細胞はそのトレースから同定が困難である。しかし、それ以外の細胞、具体的には小脳ゴルジ細胞などは GFP でラベルされたトランスジェニックマウスが存在（IG17mouse、Watanabe et al, 1998, Cell）しており、これら蛍光を活動記録と同時に検出することができれば、同定が可能になる。この同定を可能にするために、神経活動記録に用いるガラス電極からの記録細胞の蛍光励起とその検出を試みた。現在この実験方法は開発途上であるが、5 μ m 程度の先端径を持つガラス電極からその先端近傍に存在する 1 細胞の蛍光励起と検出が可能となりつつある。現在、*in vivo* での検証を行うべく、大脳皮質錐体細胞にチャンネルロドプシンを導入した個体においての実験を行っている。さらに、記録している細胞の蛍光検出にとどまらず、その記録細胞を直視できないかと考え、林勇一郎研究員が中心となって電気記録に用いる極細ワイヤーと image bundle を組み合わせた電気記録可能な微細内視鏡を試作した。（特許出願中、林勇一郎、船曳和雄 「微細プローブおよびそれを用いた計測装置と計測方法」 出願日 2008 年 2 月 18 日 出願番号 2008-035812）

また、学習モデル、特に後天的な言語学習の動物モデルとして使われることの多いキンカチョウの歌学習の成鳥での可塑性や臨界期に関する研究を行った。具体的には、キンカチョウ成鳥の歌はすでに結晶化し、変化することがないと考えられていたが、少しずつ template として覚えた親鳥の歌から乖離すること、そしてこの乖離は再びその template を聞くことで修正されることを示した（Funabiki and Funabiki 2008, Dev Neurobiol）。

文献

- Ashida, G., Abe, K., Funabiki, K. and Konishi, M. (2007) Passive soma facilitates submillisecond coincidence detection in the owl's auditory system. *J. Neurophysiol.* 97, 2267-2282.
- Funabiki, Y. and Funabiki, K. (2008) Song retuning with tutor model by adult zebra finches. *Dev. Neurobiol.* 68, 645-655.
- Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T. and Furukawa, T. (2008) Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.* 11, 923-931.
- Yoshida, T., Funabiki, K. and Hirano, T. (2007) Increased occurrence of climbing fiber inputs to the cerebellar flocculus in a mutant mouse is correlated with the timing delay of optokinetic response. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1467-1474.

(2) 研究成果の今後期待される効果

脳科学において分子レベルの解析に関する研究手法は近年急速に発展し、これらに関する知見が急速に蓄積されているが、それら分子がいったいどのような形で細胞レベルでの変化を起こし、さらにどのような局所神経回路レベルでの変化を起こし、最後にそれがどのような行動学的異常となって現れるかということをつまやかにすることは容易ではない。我々はマウスの反射性眼球運動を行動レベルの測定系として選び、このCREST研究を通じて、眼球運動記録と同時に *in vivo* で神経細胞、局所神経回路の挙動をできるだけつまやかにすることをめざして実験した。この中で痛感したことは、覚醒動物の *in vivo* から神経活動記録可能で、その記録から細胞の種類が同定できるのは、小脳プルキンエ細胞など非常に限られていること、そしておそらく上記が原因と思われるが、それ以外の神経細胞の *in vivo* での挙動に関してはほとんど知見が無いことなどであった。最後の1年半はこの問題を克服するべく、新たな測定系の開発を行ってきた。多くの試みが道半ばではあるが、今後これらの問題を克服することができる測定系を確立することで、益々その重要性が増すと考えられる *in vivo* での神経細胞機能解析に貢献したい。

個々の論文において、Ashida et al. (2007) は、聴覚一致検出器が扱う信号を直流でなく交流と捉え、その交流成分に対するNaチャンネルの関与を数値実験で検討した論文である。このような捉え方で神経細胞における信号処理を検討した例はなく、本論文はこの分野で徐々に認知度を増している。今後別の系の神経細胞の情報処理に関しての研究にも影響を与えると考える。Funabiki and Funabiki (2008) は、学習の臨界期についての研究でよく用いられるキンカチョウ成鳥の歌結晶後（臨界期終了後）の歌の可塑性についての行動学的新知見を報告したものであり、今後、同分野で分子生物学、電気生理学的な検討を行う上での重要な基礎になると考えている。

§4 研究参加者

①平野グループ(小脳による学習機構についての包括的研究の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	平野 丈夫	京都大学大学院 理学研究科	教授	研究全般	H15.10～ H21.3
	田川 義晃	同上	助教	シナプス可塑性制御の分子機構	H16.3～ H21.3
	川口 真也	同上	助教	抑制性シナプス可塑性制御の分子・細胞機構	H15.10～ H21.3
	水野 秀信	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H16.4～ H21.3
	北川 雄一	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構についてのコンピューターシミュレーション	H16.4～ H21.3
	宮脇 寛行	同上	大学院生	興奮性シナプス可塑性制御の分子・細胞機構	H17.4～ H21.3
	中原 一郎	同上	大学院生	ミュータントマウスの行動・神経活動解析	H17.4～ H21.3
	畔柳 智明	同上	大学院生	シナプス制御の分子・細胞機構	H18.4～ H21.3
	田中 洋光	同上	大学院生	シナプス制御の分子・細胞機構	H18.4～ H21.3
	阪東 勇輝	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H19.4～ H21.3
	山下 愛美	同上	大学院生	ミュータントマウスを用いたシナプス制御機構の解析	H19.4～ H21.3
	片原 由恵	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H20.4～ H21.3
	田中 進介	同上	大学院生	抑制性シナプス可塑性制御の分子・細胞機構	H20.4～ H21.3
	田村 泰基	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H20.4～ H21.3
	長崎 信博	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H20.4～ H21.3
	藤井 大祐	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H20.4～ H21.3
	山崎 義人	同上	大学院生	ミュータントマウスの行動・神経活動解析	H20.4～ H21.3
*	石井 貴美子	同上	研究補助員		H17.4～ H21.3
*	西山 あゆみ	同上	研究補助員		H19.8～ H21.3
	見学 美根子	研究参加時 同上	研究参加時 講師	シナプス可塑性制御の分子機構	H15.10～ H15.12

	永楽 元次	同上	研究参加時 大学院生	シナプス可塑性制御の分子機構	H15.10～ H15.12
	梅嶋 宏樹	同上	同上	シナプス可塑性制御の分子機構	H15.10～ H15.12
	藤島 和人	同上	同上	シナプス可塑性制御の分子機構	H15.10～ H15.12
	横山 斉輔	同上	同上	シナプス可塑性制御の分子機構	H15.10～ H15.12
	吉田 盛史	同上	同上	ミュータントマウスの行動・ 神経活動解析	H15.10～ H18.3
	津村 健策	同上	同上	ミュータントマウスの作成	H16.4～ H18.3
	渡辺 聡史	同上	同上	ミュータントマウスの行動・ 神経活動解析	H16.4～ H18.3
*	矢和多 智	同上	大学院生 CREST 研究員 (H18.6 ～ H19.3.31)	興奮性シナプス可塑性制御の分子・細胞機構	H15.10～ H19.3
	大槻 元	同上	大学院生	シナプス可塑性制御の細胞機構	H15.10～ H19.3
*	板橋 彩	同上	チーム事務員		H16.4～ H19.7
	鶴野 瞬	同上	大学院生	興奮性シナプス可塑性制御の分子・細胞機構	H15.10～ H20.3
*	杉山(関) 優子	同上	大学院生 研究補助員 (H17.7.1 ～ H18.3.31)	抑制性シナプス可塑性制御の分子・細胞機構	H15.10～ H20.3
	矢野 雄祐	同上	大学院生	ミュータントマウスの行動・ 神経活動解析	H18.4～ H20.3

②黒田グループ

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	黒田 真也	東京大学大学院 理学系研究科 (H18.3 までは東京 大学大学院情報 理工学系研究科・ 助教授)	教授	シナプス可塑性を制御する細胞内分子情報伝達系のモデリング	H15.10～ H21.3
*	浦久保 秀俊	東京大学大学院 理学系研究科 (H18.3 までは東京 大学大学院情報 理工学系研究科・ 研究員)	CREST 研究員 (H18.4/1～ H19.3/31)	同上	H15.10～ H19.3

③船曳グループ

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	船曳 和雄	大阪バイオサイ エンス研究所	副部長	In vivo での神経活動記 録・解析	H15.10～ H21.3
	船曳 康子	京都大学大学院 医学研究科 先端領域融合医 学研究機構	教務補佐員	データ解析 学習パラダイム考案	H15.10～ H17.3
*	林 勇一郎	大阪バイオサイ エンス研究所	CREST 研究 員 (H19.4.1～H 20.9.30)	顕微内視鏡システムの開 発	H16.5～ H20.9
	芦田 剛	京都大学大学院 医学研究科 先端領域融合医 学研究機構	研究員	データ解析 学習パラダイム考案	H17.10～ H19.3
	久保 雅義	京都大学大学院 情報学研究科 複雑系科学専攻	講師	実験結果の計算論的検討	H17.4～ H18.3
	安部 浩輔	同上	研究員	実験結果の計算論的検討	H17.4～ H18.3

④横井グループ

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	横井 峰人	京都大学大学院 医学研究科	助教	小脳遺伝子操作マウスの 作成	H15.10～ H20.3
	佐野 裕美	同上	助手 (特任)	同上	H16.4～ H19.3
	永井 由美子	同上	教務補佐員	同上	H15.11～ H19.3
	米倉淳一郎	同上	大学院生	同上	H17.4～ H20.3

⑤ 亀山グループ

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	亀山 仁彦	産業技術総合研究所	主任研究員	神経伝達物質受容体制御の分子機構	H15.10～ H18.3
	落石 知世	同上	同上	同上	H15.10～ H18.3

§ 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Trevor G.Smart (University College London, Professor)	代表者がオーガナイザーを務めた日本神経科学大会シンポジウムでの講演および小脳での GABA 性シナプス伝達制御に関する情報交換。	京都市	H18.7.16～H18.7.23

§ 6 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 1件、国際(欧文)誌 43件)

【平野グループ】

1. Yoshida, T., Katoh, A., Ohtsuki, G., Mishina, M. & Hirano, T.: Oscillating Purkinje neuron activity causing involuntary eye movement in a mutant mouse deficient in the glutamate receptor $\delta 2$ subunit. *J. Neurosci.* 24, 2440-2448 (2004).
2. Ohtsuki, G., Kawaguchi, S., Mishina, M. & Hirano, T.: Enhanced inhibitory synaptic transmission in the cerebellar molecular layer of the GluR $\delta 2$ knockout mouse. *J. Neurosci.* 24, 10900-10907 (2004).
3. Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M. & Uemura, T.: Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev. Cell* 7, 205-216 (2004).
4. Murai, N., Tsuji, J., Ito, J., Mishina, M. & Hirano, T.: Vestibular compensation in glutamate receptor $\delta 2$ subunit knockout mice: dynamic property of vestibulo-ocular reflex. *European Arc. Oto-Rhino-Laryngol.* 65, 82-86 (2004).
5. Kawaji, K., Umeshima, H., Eiraku, M., Hirano T. & Kengaku, M.: Dual phases of migration of cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 228-240 (2004).

6. Katoh, A., Yoshida, T., Himeshima, Y., Mishina, M. & Hirano, T.; Defective control and adaptation of reflex eye movements in mutant mice deficient in either the glutamate receptor $\delta 2$ subunit or Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1315-1326 (2005).
7. Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T. & Kengaku, M.: DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nature Neurosci.* 8, 873-880 (2005).
8. Tohgo, A., Eiraku, M., Miyazaki, T., Miura, E., Kawaguchi, S., Nishi, M., Watanabe, M., Hirano, T., Kengaku, M. & Takeshima, H.: Impaired cerebellar functions in mutant mice lacking DNER. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 326-333 (2006).
9. Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Integrin $\alpha 3\beta 1$ suppresses long-term potentiation at inhibitory synapses on the cerebellar Purkinje neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 416-426 (2006).
10. Yawata, S., Tsuchida, H., Kengaku, M. & Hirano, T.: Membrane-proximal region of GluR $\delta 2$ is critical for LTD and interaction with PICK1 in a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* 26, 3626-3633 (2006).
11. Tsuruno, S. & Hirano, T.: Persistent activation of protein kinase C α is not necessary for expression of cerebellar long-term depression. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 38-48 (2007).
12. Yoshida, T., Funabiki, K. & Hirano, T.: Increased occurrence of climbing fiber inputs to the cerebellar flocculus in a mutant mouse is correlated with the timing delay of optokinetic response. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1467-1474 (2007).
13. Fujishima, K., Kurisu, J., Hirano, T. & Kengaku, M.: Targeted disruption of Sept3, a binding partner of Sept5 and Sept7, unaffected neuronal development in the central nervous system. *J. Neurochem.* 102, 77-92 (2007).
14. Mizuno, H., Hirano, T. & Tagawa, Y.: Evidence for activity-dependent cortical wiring: formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. *J. Neurosci.* 27, 6760-6770 (2007).
15. Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Sustained GABARAP structural change underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* 27, 6788-6799 (2007).
16. Shima, Y., Kawaguchi, S., Kosaka, K., Nakayama, M., Hoshino, M., Nabeshima, Y., Hirano, T. & Uemura, T.: Opposing roles in neurite growth control by two 7-pass transmembrane cadherins. *Nat. Neurosci.* 10, 963-969 (2007).

17. Umeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M.: Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16182-16187 (2007).
18. Wada, N., Kishimoto, Y., Watanabe, D., Kano, M., Hirano, T., Funabiki, K. & Nakanishi, S.: Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16690-16695 (2007).
19. Sugiyama, Y., Kawaguchi, S. & Hirano, T.: mGluR1-mediated facilitation of long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *Eur. J. Neurosci.* 27, 884-896 (2008).
20. Tsuruno, S., Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Src-family protein tyrosine kinase negatively regulates cerebellar long-term depression. *Neurosci. Res.* 61, 329-332 (2008).
21. Takeuchi, T., Ohtsuki, G., Yoshida, T., Fukaya, M., Wainai, T., Yamashita, M., Yamazaki, Y., Mori, H., Sakimura, K., Kawamoto, S., Watanabe, M., Hirano, T. & Mishina, M.: Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphinin. *PLoS ONE* 3, e2297, 1-11 (2008).
22. Ohtsuki, G. & Hirano, T.: Bidirectional Plasticity at Developing Climbing Fiber – Purkinje Neuron Synapses. *Eur. J. Neurosci.*, 28, 2393-2400 (2008).
23. Kuroyanagi, T., Yokoyama, M. & Hirano, T.: Postsynaptic glutamate receptor δ family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 4912-4916 (2009).

【黒田グループ】

24. Sasagawa, S., Ozaki, Y., Fujita, K. & Kuroda, S.: Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat. Cell Biol.* 7, 365-373 (2005).
25. Ozaki, Y., Sasagawa, S. & Kuroda, S.: Dynamic characteristics of transient responses. *J. Biochem. (Tokyo)* 137, 659-663 (2005).
26. Doi, T., Kuroda, S., Michikawa, T. & Kawato, M.: Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} threshold dynamics detect spike timing in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.*, 25, 950-961 (2005).
27. Shinozaki, T., Cateau, H., Urakubo, H. & Okada, M.: Controlling synfire chain by inhibitory synaptic input. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 76, 44806-1-44806-6 (2007).

28. Urakubo, H., Honda, M., Froemke, R.C. & Kuroda, S.: Requirement of an allosteric kinetics of NMDA receptors for spike-timing-dependent plasticity *J. Neurosci.*, 28, 3310-3323 (2008).

【船曳グループ】

29. Takahashi, H., Funabiki, K., Hasebe, S., Fukuda-Yamamoto, T., Kaieda, S., Iwanaga, T., Kumagami, H. & Takasaki, K.: Clinical efficacy of 5-fluorouracil (5-FU) topical cream for treatment of cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx*. 32, 353-357 (2005).
30. Murai, N., Funabiki, K., Naito, Y., Ito, J. & Fukuyama, H.: Validity and limitation of manual rotational test to detect impaired visual-vestibular interaction due to cerebellar disorders. *Auris Nasus Larynx*. 32, 23-28 (2005).
31. Ashida, G., Abe, K., Funabiki, K. & Konishi, M.: Passive soma facilitates submillisecond coincidence detection in the owl's auditory system. *J. Neurophysiol.* 97, 2267-2282 (2007).
32. Funabiki, Y. & Funabiki, K.: Song retuning with tutor model by adult zebra finches. *Dev. Neurobiol.* 68, 645-655 (2008).
33. Takahashi, H., Iwanaga, T., Kaieda, S., Fukuda, T., Kumagami, H., Takasaki, K., Hasebe, S. & Funabiki, K.: Mastoid obliteration combined with soft-wall reconstruction of posterior ear canal. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 264, 867-871 (2007).
34. Murai, N., Oda, N., Hori, I., Shabana, M., Kurozawa, Y. and Funabiki, K.: The relationship between cerebral T2 hyperintensity and fixation suppression of vestibulo-ocular reflex in elderly patients with dysequilibrium symptoms. *Auris Nasus Larynx*. 34, 165-171 (2007).
35. Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T. & Furukawa T.: Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.* 11, 923-931(2008).
36. 船曳和雄: 遺伝子操作マウスでの眼運動と神経活動記録でおこなうシステム解析 *Equilibrium Res.* 64, 176-179 (2005).

【横井グループ】

37. Nagai, Y., Sano, H & Yokoi, M.: Transgenic expression of Cre recombinase in mitral/tufted cells in the olfactory bulb. *Genesis* 43, 12-16 (2005).
38. Sano, H., Nagai, Y. & Yokoi, M.: Inducible expression of retrograde transynaptic genetic tracer in mice. *Genesis* 45, 123-128 (2007).
39. Sano, H. & Yokoi, M.: Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J. Neurosci.* 27, 6948-6955 (2007).
40. Yonekura, J. & Yokoi, M.: Conditional genetic labeling of mitral cells of the mouse accessory olfactory bulb to visualize the organization of their apical dendritic tufts. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 708-718 (2008).
41. Sano, H., Nagai, Y., Miyakawa, T., Shigemoto, R. & Yokoi, M.: Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J. Neurochem.* 105, 546-556 (2008).

【亀山グループ】

42. Kakegawa, W., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Kameyama, K & Ozawa, S.: Input- and subunit-specific AMPA receptor trafficking underlying long-term potentiation at hippocampal CA3 synapses. *Eur. J. Neurosci.* 20, 101-110 (2004).
43. Lee, H. K., Takamiya, K., Kameyama, K., He, K., Yu, S., Rossetti, L., Wilen, D. & Huganir, R. L.: Identification and characterization of a novel phosphorylation site on the GluR1 subunit of AMPA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 86-94 (2007).
44. Ochiishi, T., Futai, K., Okamoto, K., Kameyama, K. & Kosik, K. S.: Regulation of AMPA receptor trafficking by delta-catenin. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 499-507 (2008).

(2) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内 12 件、国際 2 件)

【平野グループ】

1. Hirano, T.: Motor control and learning mechanism revealed using mutant mice. The 2nd MCCS (Molecular and Cellular Cognition Society) -Asia Symposium “Unraveling higher brain functions: recent progress with animal models II”. 2007 年 9 月, Yokohama
2. Hirano, T.: Regulation of synaptic transmission and motor learning. International symposium on hierarchy and holism: Bridging across different hierarchies in natural sciences. 2008 年 2 月, Okazaki
3. 平野丈夫: グルタミン酸受容体デルタ 2 サブユニット欠損マウスにおける運動制御異常. 第 27 回神経科学大会第 47 回日本神経化学会大会合同大会シンポジウム, 2004 年 9 月, 大阪
4. 平野丈夫: 哺乳類における行動制御機構を分子・細胞・神経回路のレベルを縦断して理解するためのアプローチ. 第 27 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2004 年 12 月, 神戸
5. 平野丈夫: 小脳の学習機構: 分子から個体まで. 戦略的創造研究推進事業「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」研究領域第一回公開シンポジウム, 2005 年 11 月, 東京
6. Hirano, T.: Mechanism of cerebellar function studied using mutant mice.Symposium “Motor control mechanism by the cerebellum” in the 83rd annual meeting of the Physiological Society of Japan. 2006 年 3 月, Gunma
7. 平野丈夫: ミュータントマウスを用いた小脳による反射性眼球運動制御機構の解析 日本めまい平衡医学会, 夏季セミナー 特別講演, 2006 年 7 月, 東京
8. Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Regulatory mechanism of inhibitory synaptic transmission in the cerebellum. Symposium “Regulatory mechanism of GABAergic synaptic transmission” in the 29th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2006 年 7 月, Kyoto
9. 平野丈夫: 体で覚える小脳のしくみ: 小脳の運動学習メカニズム、戦略的創造研究推進事業「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」研究領域第 3 回公開シンポジウム, 2007 年 11 月, 東京

10. Tagawa, Y., Mizuno, H. & Hirano, T.: Activity-dependent cortical wiring in vivo: formation of interhemispheric connections requires presynaptic and postsynaptic neuron activity. Workshop “Mechanism of activity-dependent neural circuit formation – which is essential, pre- or postsynaptic mechanisms?” in the 31st annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2008 年7月, Tokyo
11. 平野丈夫: 小脳: 学習の基盤となるシナプスの変化. 戦略的創造研究推進事業「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」研究領域第4回公開シンポジウム, 2008 年 11 月, 東京

【黒田グループ】

12. 黒田真也, 浦久保秀俊: Biophysical and biochemical model of bidirectional long-term synaptic plasticity. 第27回日本分子生物学会大会, 2004 年 12 月, 神戸国際会議場
13. 浦久保秀俊, 相原威: 実験とシミュレーションによる Spike-timing dependent plasticity (STDP) の理解. 日本神経回路学会平成 17 年度時限研究会 プラットフォームシミュレータを用いた分子から神経回路までの統合的理解, 2005 年 9 月, 東京
14. 黒田真也, 浦久保秀俊, 本田稔, Robert C. Froemke: Systems biology of spike-timing dependent synaptic plasticity. 85 回日本生理学会大会, 2008 年 3 月, 東京

② 口頭講演 (国内 13 件 国際 3 件)

【平野グループ】

1. Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Molecular mechanism of inhibitory synaptic plasticity in the cerebellum. 30th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2007 年 9 月, Yokohama
2. Mizuno, H., Hirano, T. & Tagawa, Y.: Activity dependent development of interhemispheric connections in mouse visual cortex. 31st annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2007 年 7 月, Tokyo

【黒田グループ】

3. Kuroda, S.: Systems analysis of spike-timing dependent synaptic plasticity. Seventh international conference on systems biology, 2006 年 10 月, Yokohama

4. 相原威, 浦久保秀俊, 西山誠: スパイクタイミング依存性可塑性のデンドライト場所依存性. 電子情報通信学会 NC 研究会, 2005 年 3 月, 東京
5. 紫雲大輔, 浦久保秀俊, 相原威, 塚田稔: NEURON シミュレータによるデンドライトの情報処理機構. 電子情報通信学会 NC 研究会, 2006 年 3 月, 東京
6. 篠崎隆志, 加藤英之, 浦久保秀俊, 岡田真人: 抑制性入力による Synfire chain の制御. 電子情報通信学会 NC 研究会, 2006 年 10 月, 奈良
7. 浦久保秀俊: スパイクタイミングシナプス可塑性のタイミング検知メカニズム. シナプス研究会「シナプスの形成と成熟の分子機序」, 2007 年 11 月, 岡崎
8. 浦久保秀俊, 本田稔, Robert C. Froemke, 黒田真也: スパイクタイミング依存シナプス可塑性をコードする NMDA 受容体のアロステリック効果. 第 46 回日本生体医工学学会大会, 2008 年 4 月, 仙台

【船曳グループ】

9. Funabiki, K. & Konishi, M.: Intracellular study of auditory coincidence detector neurons in owls. International congress in acoustics, 2004 年 4 月, Kyoto
10. Funabiki, K.: Biophysical mechanisms for detection of interaural time difference in owl's auditory coincidence detector neurons. 2006 年 2 月, University of Maryland, College Park, MD, USA
11. 船曳和雄: 遺伝子操作マウスでの眼運動と神経活動記録でおこなうシステム解析. 日本めまい平衡医学会シンポジウム, システムニューロサイエンスとめまい, 2004 年 11 月
12. 船曳和雄: シナプスにより再現された音波形の一致検出で行う両聴耳間時差検出. 日本音響学会, 2005 年 9 月, 仙台
13. Ashida, G., Abe, K. & Funabiki, K.: On a sodium channel distribution enabling high frequency signal processing. 日本神経科学学会, 2006 年 7 月, 京都
14. Funabiki, K. & Konishi, M.: In vivo intracellular recording from owl's auditory coincidence detectors. 日本神経科学学会, 2006 年 7 月, 京都

15. Funabiki, K. & Konishi, M.: Intracellular study of auditory coincidence detector neurons in owls. 日本神経科学会, 2006年7月, 京都
16. 扇田秀章, 船曳和雄, 三浦誠, 伊藤寿一: 前庭機能低下例における受動的頭部回転検査の検討. 京滋めまいカンファレンス, 2007年10月, 京都

④ ポスター発表 (国内 38 件、国際 29 件)

【平野グループ】

1. Yoshida, T., Funabiki, K. & Hirano, T.: Enhanced climbing fiber inputs disrupt oculomotor control in the glutamate receptor $\delta 2$ subunit knock-out mouse. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月, Washington
2. Tsuruno, S. & Hirano, T.: Transient activation of PKC α in the induction of cerebellar LTD. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月, Washington
3. Yawata, S., Tsumura, K. & Hirano, T.: Membrane proximal C-terminal residues of GluR $\delta 2$ is essential for the cerebellar LTD. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月, Washington
4. Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Integrin $\alpha 3\beta 1$ suppresses inhibitory synaptic potentiation in a cerebellar Purkinje neuron. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月, Washington
5. Seki, S., Kawaguchi, S. & Hirano, T.: mGluR1 regulates rebound potentiation through PKA in a cerebellar Purkinje neuron. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005年11月, Washington
6. Ohtsuki, G. & Hirano, T.: Bidirectional plasticity at developing climbing fiber – Purkinje neuron synapses. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2006年10月, Atlanta
7. Kawaguchi, S. & Hirano, T.: Critical role of GABARAP in long-term potentiation at inhibitory synapses on a Purkinje neuron. 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2007年11月, San Diego
8. Mizuno, H., Hirano, T & Tagawa, Y.: Formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2007年11月, San Diego

9. Kuroyanagi, T. & Hirano, T.: Induction of presynaptic differentiation by glutamate receptor $\alpha 2$ subunit. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008 年 11 月, Washington
10. Mizuno, H., Hirano, T & Tagawa, Y.: Differential effects of presynaptic and postsynaptic activity-blockade on interhemispheric connection development in mouse cerebral cortex. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008 年 11 月, Washington
11. 川口真也, 平野丈夫: インテグリンを介した小脳抑制性シナプス可塑性の長期抑制. 第 81 回日本生理学会大会, 2004 年 6 月, 札幌
12. 吉田盛史, 加藤明, 姫島由布子, 大槻元, 船曳和雄, 平野丈夫: GluR $\delta 2$ 欠損マウスにおける眼球運動異常への登上線維活動の関与. 第 81 回日本生理学会大会, 2004 年 6 月, 札幌
13. 大槻元, 川口真也, 平野丈夫: グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスにおける小脳抑制性シナプス伝達の亢進. 第 81 回日本生理学会大会, 2004 年 6 月, 札幌
14. 吉田盛史, 加藤明, 姫島由布子, 大槻元, 船曳和雄, 平野丈夫: GluR $\delta 2$ 欠損マウスにおける下オリーブ核破壊の反射性眼球運動への効果. 第 27 回神経科学大会第 47 回日本神経化学会大会合同大会, 2004 年 9 月, 大阪
15. 関優子, 川口真也, 鶴飼健, 平野丈夫: 小脳抑制性シナプス可塑性の mGluR1 による cAMP を介した制御. 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」, 2004 年 11 月, 岡崎
16. 鶴野瞬, 平野丈夫: 小脳プルキンエ細胞における活動依存性 PKC 制御. 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」, 2004 年 11 月, 岡崎
17. 鶴野瞬, 平野丈夫: Activity dependent regulation of PKC α in the cerebellar Purkinje cells. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 6 月, 横浜
18. 川口真也, 平野丈夫: Long-term regulation of inhibitory synaptic plasticity by integrins in the cerebellum. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 6 月, 横浜
19. 梅嶋宏樹, 大島登志男, 平野丈夫, 見学美根子: Analysis of biphasic migration of cerebellar granule cells in p35-deficient mice. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 6 月, 横浜

20. 横山斉輔, 福田徹子, 永楽元次, 平野丈夫, 見学美根子: Mechanisms for polarized sorting of DNER into the dendrite. 第 28 回日本神経科学大会, 2005 年 6 月, 横浜
21. 渡辺聡史, 吉田盛史, 船曳和雄, 平野丈夫: Involvement of cerebellar NMDA receptors in adaptive modification of optokinetic response. 第 83 回日本生理学会大会, 2006 年 3 月, 前橋
22. 矢和多智, 平野丈夫: Interaction of GluR δ 2 and PICK1 implicated in the induction of cerebellar LTD. 第 83 回日本生理学会大会, 2006 年 3 月, 前橋
23. 関優子, 川口真也, 平野丈夫: 小脳プルキンエ細胞における mGluR1 による PKA を介した抑制性シナプス可塑性の調節. 第 29 回神経科学大会, 2006 年 7 月, 京都
24. 北川雄一, 川口真也, 平野丈夫: 小脳抑制性シナプス可塑性における分子ネットワークのシステム解析 第 29 回神経科学大会, 2006 年 7 月, 京都
25. 北川雄一, 川口真也, 平野丈夫: 小脳プルキンエ細胞における抑制性シナプス可塑性を制御するシグナル経路のシミュレーション解析. 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月, 横浜
26. 水野秀信, 平野丈夫, 田川義晃: マウス大脳皮質視覚野の脳梁軸索投射形成におけるシナプス前・後細胞の神経活動の役割. 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月, 横浜
27. 畔柳智明, 平野丈夫: グルタミン酸受容体 α 2 サブユニットは小脳顆粒細胞のシナプス前終末の分化を誘導する. 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月, 横浜
28. 梅嶋宏樹, 平野丈夫, 見学美根子: 小脳顆粒細胞の移動における微小管骨格の動態. 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月, 横浜

【黒田グループ】

29. Urakubo, H. & Kuroda, S.: Biophysical and biochemical model of bidirectional long-term synaptic plasticity. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2004 年 10 月, San Diego
30. Urakubo, H., Robert C. Froemke, R.C. & Kuroda, S.: A novel allosteric effect of NMDA receptors as a spike-timing detector for synaptic plasticity. Japan-Germany Symposium on Computational Neuroscience, 2006 年 2 月, Tokyo
31. Uchikune, U., Shiun, D., Urakubo, H., Kitajima, T., Tsukada, M. & Aihara, T.: The relation of information processing at the proximal and distal dendrite in the hippocampal CA1 network. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2006 年 10 月, Atlanta
32. Urakubo, H., Robert C. Froemke, R.C. & Kuroda, S.: Prediction and validation of a timing-detection mechanism for spike timing-dependent plasticity. Seventh International Conference on Systems Biology, 2006 年 10 月, Yokohama
33. Kuroda, S., Urakubo, H. & Robert C. Froemke, R.C.: Prediction and validation of a novel timing-detection mechanism as a spike-timing detector. Computational and systems neuroscience 2007, 2007 年 2 月, Salt lake city
34. Shinozaki, T., Cateau, H., Urakubo, H. & Okada, M.: Controlling synfire chain by inhibitory synaptic input. Computational and systems neuroscience 2007, 2007 年 2 月, Salt lake city
35. Urakubo, H., Honda, M., Froemke, R. C. & Kuroda, S.: An allosteric kinetics of NMDA receptors required for spike timing-dependent plasticity. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2007 年 11 月, San Diego
36. Honda, M., Urakubo, H. & Kuroda, S.: Model simulation of neuronal plasticity -molecular mechanism of STDP and roles of STDP in visual neuronal network-. Japan-Taiwan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology 2008, 2008 年 3 月, 台湾, HsinChu
37. 黒田真也, 浦久保秀俊: 双方向性長期シナプス可塑性の電気生理・生化学反応モデル. 日本分子生物学会, 2004 年 12 月, 神戸

38. 篠崎隆志, 浦久保秀俊, 加藤英之, 岡田真人: Synfire chain に対する抑制性入力の効果. 日本神経回路学会, 2006年9月, 名古屋
39. 篠崎隆志, 加藤英之, 浦久保秀俊, 岡田真人: 抑制性入力による Synfire chain の制御. 脳と心のメカニズム 第7回冬のワークショップ, 2007年1月, 北海道
40. 篠崎隆志, 加藤英之, 浦久保秀俊, 岡田真人: 抑制性入力による Synfire chain の制御. 日本物理学会 2007年春季大会, 2007年3月, 鹿児島
41. 浦久保秀俊, 本田稔, Robert C. Froemke, 黒田真也: スパイクタイミング依存シナプス可塑性のタイミング検知メカニズム. 生命科学ネットワークシンポジウム, 2007年9月, 東京

【船曳グループ】

42. Funabiki, K. & Konishi, M.: Intracellular study of auditory coincidence detector neurons in owls. International Congress on Acoustics, 2004年4月, Kyoto
43. Funabiki, K. & Konishi, M.: Intracellular study of auditory coincidence detector neurons in owls. Association for Research in Otolaryngology, 2005年2月, New Orleans
44. Ashida, G., Abe, K. & Funabiki, K.: Passive soma facilitates sub-millisecond coincidence detection in owl's auditory neurons. Midwinter meeting of Association for research in Otolaryngology, 2005年2月, New Orleans
45. Ashida, G., Abe, K. & Funabiki, K.: Biophysical reasons for computational advantages of passive soma structure in owl's auditory coincidence detector neurons. Association for Research in Otolaryngology, 2006年2月, Washington
46. Ashida, G., Abe, K. & Funabiki K.: Biophysical Mechanisms for Forming Sound-Analogue Membrane Potentials by Phase-Locked Synaptic Inputs in Owl's Auditory Neuron. Association for Research in Otolaryngology (ARO), 2007年2月, Denver
47. 船曳和雄, 小西正一: 面フクロウでの両聴耳間時差計算のための神経機構. 聴覚研究会, 2004年5月, 京都

48. Funabiki, K. & Konishi, M.: Intracellular study of auditory coincidence detector neurons in owls. 日本生理学会大会, 2004年6月, 札幌
49. 船曳和雄: 実験動物の平衡機能検査. 日本耳科学会 ランチョンセミナー, 2004年10月, 京都
50. 船曳和雄: 遺伝子操作マウスの眼運動・神経活動同時記録で行うシステム解析. 日本めまい平衡医学会シンポジウム, 2005年2月, 高崎
51. Hayashi, Y., Nabeshima, Y., Nabeshima, Y., Miyakawa, T. & Funabiki, K.: Place cell properties of the dentate gyrus-specific NMDA receptor mutant mice. 日本神経科学会, 2006年7月, 京都
52. Abe, K., Ashida, G. & Funabiki, K.: Biophysical mechanisms to recreate sound waveforms by synaptic potentials. 日本神経科学会, 2006年7月, 京都
53. 渡辺聡史, 平野丈夫, 船曳和雄: 小脳NMDA受容体の視運動性眼球運動適応への関与. 日本めまい平衡医学, 2006年11月, 東京
54. 扇田秀章, 船曳和雄, 三浦誠, 伊藤寿一: 前庭機能低下例における受動的頭部回転検査の検討. 日本めまい平衡医学会, 2007年11月, 大阪
55. 船曳和雄, 林勇一郎: In vivo 単一神経活動記録に用いるガラス電極からの一細胞蛍光励起とその検出の試み. 日本めまい平衡医学会, 2008年10月, 秋田

【横井グループ】

56. Sano, H., Nagai, Y. & Yokoi, M.: Striatal specific phosphodiesterase, PDE10A2, regulates social interaction. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006年6月, Kyoto
57. Sano, H., Nagai, Y. & Yokoi, M.: Phosphodiesterase 10A2 (PDE10A2) regulates social interaction through striatal cAMP signaling. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2006年10月, Atlanta
58. Yokoi, M.: Transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase in mitral/tufted cells of the olfactory bulb. Gordon Research Conferences. 2007年7月, Newport
59. Yokoi, M. & Sano, H.: PDE10A2, a striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase, regulates

social interaction. 20th ECNP Congress, 2007 年 10 月, Vienna , Austria

60. Sano, H. & Yokoi, M.: Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin concentrating hormone-containing neurons. Keystone Symposia, 2008 年 2 月, Banf, Canada
61. Ochiishi, T., Witt, A., Martinez, M. C., Majewski, M., Medina, M. & Kosik, K. S.: delta-catenin induces filopodial elaboration by dynamic interactions with its PDZ domain targets. 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2004 年 10 月, San Diego
62. 横井峰人: 嗅球 Mitral/tufted cell での選択的な遺伝子操作を可能にするゲノムフラグメントの同定. 日本味と匂学会第 40 回大会, 2006 年 7 月, 福岡
63. 米倉淳一郎, 横井峰人: Transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase in mitral/tufted cells of the olfactory bulb. 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月, 横浜
64. 佐野裕美, 横井峰人: Inducible expression of retrograde transynaptic genetic tracer in mice. 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月, 横浜
65. 佐野裕美, 横井峰人: 線条体投射ニューロンは外側視床下部の特定の領域に投射する. BMB2007, 2007 年 12 月, 横浜
66. Ochiishi, T., Witt, A., Martinez, M. C., Majewski, M., Medina, M. & Kosik, K. S.: 海馬神経細胞の樹状突起形成における delta-catenin の役割. 第 27 回日本神経科学学会, 2004 年 9 月, 大阪
67. Ochiishi, T., Futai, K., Okamoto, K., Kameyama, K., Hayashi, Y., & Kosik, K. S.: Regulation of AMPA receptor trafficking by delta-catenin. 日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月, 福岡

(3) 特許出願

①国内出願 (1 件)

発明の名称: 微細プローブおよびそれを用いた計測装置と計測方法

発明者: 林勇一郎、船曳和雄

出願人：大阪バイオサイエンス研究所

出願日：2008年2月18日

出願番号：2008-035812

②海外出願 (0件)

(4) 受賞等

①受賞 なし

②新聞報道

【平野グループ】

1. 生命科学は今「小脳による運動学習」. 京都新聞(朝刊) 科学8面, (2007年12月20日)
2. 体で覚える学習 阻害たんぱく質発見. 日本経済新聞(夕刊), (2008年5月28日)
3. 運動学習 小脳で情報処理 特定タンパク質が調整. 京都新聞(朝刊), (2008年5月29日)
4. 小脳シナプス可塑性と運動学習が促進. 科学新聞 (2008年6月13日)
5. 神経細胞の連結部分シナプス. 京都新聞(夕刊) (2009年3月3日)
6. 神経伝達のシナプス形成 受容体たんぱく質関与. 日刊工業新聞 (2009年3月4日)
7. 神経細胞「シナプス」の形成 新たなタンパク質発見. 産経新聞 (2009年3月5日)

③その他

当 CREST 研究の紹介記事「運動学習のメカニズム」. *JST News* Vol. 5, No. 7 P08-09, 2008年10月

(5) その他特記事項

<その他の著作物>

【平野グループ】

1. Hirano, T.: Cerebellar regulation mechanisms learned from studies on GluR δ 2, a unique glutamate-receptor-related molecule specifically expressed at parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Mol. Neurobiol.* 33, 1-16 (2006).
2. Hirano, T., Yoshida, T. & Funabiki, K.: Mechanism of cerebellar function studied using mutant mice. *Cerebellum* 5, 299-300 (2006).
3. 矢和多智, 平野丈夫: グルタミン酸受容体の働き. *実験医学* 24, 673-678 (2006).
4. Tagawa, Y., Mizuno, H. & Hirano T.: Activity-dependent development of interhemispheric connections in the visual cortex. *Rev.Neurosci.* 19, 19-28 (2008) .
5. Kawaguchi, S. & Hiranno, T.: Regulatory mechanism of plasticity at GABA_A receptor-mediated synapse. In “Amino Acid Receptor Research.” Nova Science Publishers, Inc., in press (2009).
6. Tsuruno, S. & Hirano, T.: Synaptic plasticity and motor learning in the cerebellum. In “Synaptic Plasticity: New Research.” Nova Science Publishers, Inc., in press (2009).
7. 平野丈夫: 小脳シナプスの可塑性と運動学習. *蛋白質 核酸 酵素* 53, 549-554 (2008).

【黒田グループ】

8. Urakubo, H., Watanabe, M. & Kondo, S.: Interaction of neuronal I/O functions with STDP. *Syst. Comput. Jpn.* 38, 41-50 (2007) .
9. 浦久保秀俊、黒田真也、相原威: NEURON/GENESIS シミュレータから迫る神経科学～スパイクタイミング依存シナプス可塑性の計算論的解析～. *シミュレーション学会誌* 25, 4-12(2006).

【亀山グループ】

10. Kosik, K. S., Donahue, C. P., Israely, I., Liu, X. & Ochiishi, T.: Delta-catenin at the synaptic-adherens junction. *Trends. Cell. Biol.* 15, 172-178 (2005).

§7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2004年9月 14日～15日	研究チーム会議	京都大学 芝蘭会館	22人	CREST 研究グループ内での情報交換
2006年8月 30日	研究チーム会議	京都大学 理学研究科	24人	CREST 研究グループ内での情報交換。 研究チーム外から、中西重忠大阪バイオサイエンス研究所長および藤吉好則 京都大学大学院理学研究科教授が参加。

§8 結び

本研究では、分子・細胞・組織・個体の各レベルでの研究を関連付け、小脳による学習機構全体のしくみを包括的に解明することをめざした。学習の基盤と考えられるシナプス可塑性の発現・維持・制御の分子機構解明と、シナプス可塑性が小脳神経回路における情報処理および個体の運動制御・学習においていかなる役割をはたしているか、を明らかにすることを目標とした。今回の一連の分子・細胞レベルの研究により、小脳のプルキンエ細胞上シナプスで起こる可塑性に関して幾多の新知見を報告し、またシナプス可塑性の精妙な制御分子機構の理解が大いに深まったと考えている。またモデルを使用したコンピューターシミュレーションによるシステムバイオロジー研究によって得られた理論予測と実験による検証、分子生物学手法で作成した蛍光分子融合タンパク質を利用した FRET イメージングと電気生理学実験の組み合わせ等、分子・細胞神経科学分野の研究を大きく進展させる手法を確立できたとも考えている。ところで、小脳におけるシナプス可塑性の分子機構研究単独では、直接的な社会への波及効果は限られよう。この点について本研究では、遺伝子改変マウスの利用により、長期抑圧が起りやすくなったデルフィリン欠損マウスで運動学習が亢進されること等を示すことができた。この結果は、長期抑圧の起りやすさが運動学習の効率と相関することを示し、一般にシナプス可塑性の起りやすさが学習スピードと連関しうること、シナプス可塑性の微妙な調節が学習能力に相当の影響をおよぼすこと、を明示できたと考えている。シナプス可塑性の分子メカニズムに関する正確・詳細な

知見は、学習メカニズムの根源的解明に寄与し、学習効率の向上・リハビリテーションの効率向上・神経疾患の治療・予防の改善に貢献するとともに、より長期的には人の個性・能力の多様性の起源の理解にも有用な情報を提供できるのではないかと期待している。

今後は、今回注目した長期抑圧・RPに限らず、その他のシナプス可塑性に関しても研究を進めることが必要であろう。さらに、シナプス可塑性に限らずに、特定ニューロン欠損マウスおよび特定シナプス伝達欠損マウス等の利用も進めることにより、小脳皮質のニューロン・シナプス・シナプス可塑性等各機能ユニットの役割を明らかにして、小脳の神経回路が全体としてどのようにはたらくかについて、より包括的な理解を得ることが大きな目標になる。そうした研究にあたっては、神経回路のはたらきについても、細胞内分子情報伝達系に関して構築したようなモデルを作成して、システム全体のはたらきをコンピューターシミュレーションにより理論的・定量的に解析し、それと動物個体を用いた研究を組み合わせることが有効になると考えており、今後はそのような研究にも取り組んで研究を進展させたい。

今回のCREST研究には多くの研究者・大学院生が参加し、最先端の研究に参加することにより、研究者として成長したと考えている。代表者の研究室では、延べ26人の大学院生が参加し、博士課程修了者は国内外の研究機関等で活躍している。また、共同研究者の黒田氏は本研究期間中に東京大学教授に就任し、また新たなCREST研究チームの代表になった。また、船曳氏は京都大学の特任准教授から大阪バイオサイエンス研究所の副研究部長に移動し、船曳チームの研究員であった林氏は2008年度にさきがけ研究の代表者になった。このように、参加者が研究面等で発展されたことを喜ばしく思っている。一方で、近年の大学等研究機関の予算減により常勤のポストが減少し、若手研究者が採用期間のかなり限定された不安定なポスドク等の研究職を長い間渡り歩かざるをえなくなっている現状は懸念している。また今回の研究を実施してみて、すぐに応用できるような研究よりも純粋な好奇心を大事にして物事の本質を突き止めようという立場を重視する研究者・大学院生が、私の周りには多いことを再認識した。2008年にノーベル化学賞を受賞された下村先生の業績等のように、好奇心に基づく研究成果が時間を経たからその有用性を認識されることも多い。CREST研究領域の設定等に際しては、今後も中長期的視点から重要な基礎的研究と応用的な研究のバランスにも配慮して、我国の科学研究・技術開発・研究者育成の調和のとれた進展に大きな寄与をするような運営をお願いしたい。



平野研10周年記念

平成19年 3月2日 合歓の郷

