記憶学習機構研究チーム

Laboratory for Memory and Learning

チームリーダー 伊藤 正 男
ITO, Masao

当研究チームの伊藤チームリーダーらは1982年に小脳皮質で起こるユニークなシナプス可塑性を初めて記載し、長期抑圧 (LTD) と名付けた。これは顆粒細胞とプルキンエ細胞の間のシナプスに起こる持続的な伝達効率の低下であって、顆粒細胞の軸索束と登上線維と呼ばれるもう一種類の入力を同時に刺激することにより起こすことができる。以来、長期抑圧は、運動学習やある種の認知学習を含む小脳の非陳述型学習におけるニューロン活動レベルの実体として確立してきた。当研究チームは長期抑圧の細胞分子機序を解明し、その機能的な役割を探索することを目指している。これまで長期抑圧をおこす化学的信号伝達の重要な要素を特定し、長期抑圧の遮断が運動学習に及ぼす効果を明らかにすることに力を注いできており、来年度にはまた新たな知見を加えた。

1. 長期抑圧の化学信号伝達

これまでの研究により、長期抑圧の生起には30種類以上の分子が関与することが知られている。本研究チームでは酸化窒素、サイクリックGMP、タンパクキナーゼG、G基質、タンパクホスファターゼPP2A、コルチコトロピン放出ホルモン、デルタ2型および代謝型グルタミン酸受容体の役割を明らかにしてきたが、本年度においては、下記の事項について新たな知見を得た。

(1) ホスホリパーゼA2

いわゆるリピッドシグナリングの主役として広範な役割を担う酵素であるが、プルキンエ細胞における局在や働きについてはこれまで殆ど知られるところがなかった。本年度においては次の諸点を明らかにした。

(a) 小脳に局在する亜型 (白井, 伊藤 (正))

免疫組織化学と *in situ* ハイブリダイゼーションにより、小脳には5種の亜型があり、そのうち3種 (cPLA2 α , sPLA2IIA, iPLA2) がプルキンエ細胞に局在する。樹状突起から細胞体にかけて豊富に存在するのはcPLA2 α で、sPLA2は核膜に、iPLA2は核内に局在する。

(b) 長期抑圧の生起に必要な亜型 (Tung, 白井, 清水 *1, 伊藤 (正))

もともとsPLA2IIAを欠如するマウスと、遺伝子操作によりsPLA2IIaとcPLA2 α を欠如するマウスのうち、後者においてだけ長期抑圧が起こらないことが明らかになった。このことは、小脳の長期抑圧において特異的な役割を演じているのはcPLA2 α であることを示している。

(c) ホスホリパーゼ活性化タンパク (PLAP) (白井, 山森 *1, 伊藤 (正), 小野)

PLAPの分子構造をきめ、そのポリクローナル抗体を作成した。PLAPが小脳、特にプルキンエ細胞に局在することを示した。PLAPのシナプス内での働きを解明している。

(2) 最初期遺伝子JunB (Karachot, Vigot *1, 木津川 *1, 山森 *2, 伊藤 (正); 鈴木, 遠藤 (BSI 遠藤研究ユニット))

長期抑圧の生起に際してJunBが発現することは前に報告したが、これは小脳プルキンエ細胞における長期抑圧の生起に必要なタンパク合成を制御するトランスクリプシ

ンファクターであると考えられる。この可能性をJunBのアンチセンスおよびconditional knockoutマウスを用いる実験により検証した。

(3) FMRP1 (山口, De Zeeuw *1, 伊藤 (正))

脆弱X染色体精神遅滞タンパク1の欠損した遺伝子操作マウスではプルキンエ細胞の樹状突起が異常に細長くなることがDe Zeeuwらにより見いだされているが、このマウスにおいては、長期抑圧がむしろ増強することを見いだした。

2. 小脳プルキンエ細胞におけるAMPA受容体安定化プールの調節とシナプス可塑性 (山口, 立川 *2, 小野寺 *1, Shantanu, Dharmaraj)

プルキンエ細胞の平行線維シナプスでは、AMPA受容体をエクソサイトーシスとエンドサイトーシスによりリサイクルする仕組みがあることをこれまで示してきた。この仕組みにより常時リサイクルされているAMPA受容体のプールと、より安定なプールが存在している。本年度は、この安定化プールの大きさがF-actinの重合状態と関連して変化することを見いだした。

3. 長期増強の化学信号伝達 (Launey, 坂井 *3, 本山)

プルキンエ細胞では長期抑圧と対になって長期増強が起こるが、その化学信号伝達を調べた。長期抑圧に際して働くものを含む幾つかのタンパクキナーゼが長期増強に際して働くことを見いだした。G基質の役割についても研究を続けている。長期抑圧において、AMPA受容体と相互作用をするタンパクの変化をプロテオミクスを用いて分析した。同じ手法をアルツハイマー病のチームとの共同研究に用いた。

4. 小脳、延髄、橋ブロック標本における構造と機能 (荒田, 藪中, 伊藤 (正))

長期抑圧は個々のプルキンエ細胞からガラス電極を使って活動を記録することにより検出されるが、生後5日目のラットから切り出した小脳・延髄・橋を含むブロック標本

において、平行線維、登上線維の同時刺激により、長期抑圧が生起する様子を光学的測定法を用いて可視化することに成功した。なお、この標本は小脳組織の構造と機能が生後発達する様子を調べるのに適しており、これまでに、平行線維、登上線維の発達の様子を明らかにした。

5. 小脳片葉の心臓血管制御作用 (西丸 *1, 伊藤 (正), 伊藤 (真))

これまでのウサギでの実験において偶発的に見いだしたことであるが、小脳片葉のプルキンエ細胞の中にはインパルス発射の頻度が平均動脈血圧の変化と連動して変化するものがある。最近の実験で、これらのプルキンエ細胞は片葉の中のホリウム p と呼ばれる小さな部分に局在していることが判明した。視床下部および中心灰白質の防御領域を電気刺激すると平均動脈血圧が一過性に上昇するが、そのときにホリウム p プルキンエ細胞には興奮ないし抑制が起こる。ホリウム p は防御領域の心臓血管制御作用を助けるモジュールを形成していると思われる。

6. 小脳におけるニューレグリンの機能的役割 (尾崎, 那波 *1, 水野 *1)

ニューレグリンは小脳の神経回路形成と機能発達に関与した神経栄養因子の1つであり、統合失調症関連遺伝子の候補でもある。ニューレグリン $\beta 1$ のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの解析を行い、特に橋・小脳路系の投射と苔状線維・顆粒細胞間シナプスの形状と数の異常が顕著であり、運動協調機能にも異常があることを観察した。また、驚愕反応にも異常がみられることから、これらのマウスは統合失調症モデル動物としての可能性が示唆された。

7. 小脳形態形成異常・行動学的異常の網羅的解析 (尾崎; 若菜 (GSC マウス変異開発研究チーム))

ゲノムセンターとの共同研究により、行動異常を示す変異マウスの小脳の形態学的解析を網羅的に行った。その結果、プルキンエ細胞の形態異常とその異常が観察される小脳部位と運動障害との関係を分類した。

*1 所外研究協力者, *2 研修生, *3 非常勤研究者

Cerebellar Purkinje cells exhibit a unique type of synaptic plasticity, long-term depression (LTD), that is thought to be a memory process of learning function in the cerebellum. LTD is represented by a persistent reduction of synaptic efficacy between granule cells and Purkinje cells, which occurs when a set of granule cell axons is stimulated in conjunction with climbing fibers, another input to Purkinje cells. Our laboratory aims at clarifying the cellular and molecular mechanisms of LTD and explores its roles in the functions of the cerebellum. We so far have revealed the involvement of a nitric oxide (NO)/cyclic GMP/Protein kinase G/G substrate cascade, protein phosphatase 2A, corticotropin-releasing hormone (CRF), $\delta 2$ and metabotropic glutamate receptors, and rapidly turned over protein(s) in LTD induction. In 2004, we continued to investigate the roles of phospholipase A2, immediate early gene/*Jun*-B, and fragile-X mental retardation protein in

LTD induction. The signal transduction underlying LTP was also investigated. We studied the endocytosis and exocytosis processes regulating AMPA receptors in Purkinje cells and distinguished a recycling pool and a stabilized pool of AMPA receptors. While LTD is usually revealed in Purkinje cells in cerebellar slices or culture, we successfully visualized LTD with an optical recording from a cerebellum-medulla-pons preparation dissected from newborn rats. We identified a novel cardiovascular center in the flocculus that is involved in the defense reactions originating from the hypothalamus and periaqueductal gray.

Research Subjects

1. Characterization of LTD
2. Signal transduction underlying LTD
3. Roles of LTD in learning functions of the cerebellum

Staff

Laboratory Head

Dr. Masao ITO

Deputy Laboratory Head

Dr. Kazuhiko YAMAGUCHI

Research Specialist

Dr. Laddawan KARACHOT

Staff Scientists

Dr. Thomas LAUNEY

Dr. Miwako OZAKI

Dr. Yoshinori SHIRAI

Research Scientists

Dr. Akiko ARATA

Dr. Takahiko CHIMURA

Research Associates

Dr. Dharmaji GIREESH

Dr. Shantanu SUR

Dr. Le Dinh TUNG

Mr. Atsuo YABUNAKA

Technical Staff

Mr. Masahiro ITOH

Ms. Azumi MATSUMOTO

Ms. Yumiko MOTOYAMA

Ms. Hiroko ONO

Assistants

Ms. Akiko HARA

RIKEN/BSI Collaborators

Dr. Shogo ENDO (Endo Res. Unit, BSI)
Dr. Shigeharu WAKANA (Lab. Mutat. Resour. Explor.
Team, GSC)

Outside Collaborators

Prof. Takao SHIMIZU (Fac. Medicine, Univ. Tokyo)
Dr. Takashi KIKKAWA (Natl. Inst. Basic Biol.)
Dr. Rejan VIGOT (CNRS Lab. Gif-sur-Yvette, France)
Prof. Chris DE ZEEUW (Erasmus Univ. Rotterdam,
The Netherlands)
Dr. Kayoko ONODERA (CREST)

Visiting Scientists

Assoc. Prof. Naoko NISIMARU (Oita Univ.)
Dr. Rieko SAKAI (Tokyo Women's Med. Coll.)
Prof. Tetsuo YAMAMORI (Natl. Inst. Basic Biol.)
Dr. Ken-ichiro MOGI (Sony Comput. Res. Lab.)
Dr. Hiroyuki NAWA (Nigata Univ.)
Dr. Makoto MIZUNO (Nigata Univ.)

Trainees

Mr. Morimitsu FUJII (Fac. Sci. Technol., Dept. Appl.
Chem., Keio Univ.)
Mr. Tetsuya TATSUKAWA (Dept. Life Sci., Grad. Sch.,
Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- Rhee J. W., Arata A., Selleri L., Jacobs Y., Arata S.,
Onimaru H., and Cleary M. L.: "Pbx3 deficiency re-
sults in central hypoventilation", *Am. J. Pathol.* **165**,
1343–1350 (2004). *
- Michishita M., Ikeda T., Nakashiba T., Ogawa M., Tashiro
K., Honjo T., Doi K., Itohara S., and Endo S.: "Expres-
sion of *Btcl2*, a novel member of *Btcl* gene family, during
development of the central nervous system", *Dev. Brain
Res.* **153**, 135–142 (2004). *
- Onimaru H., Arata A., Arata S., Shirasawa S., and Cleary
M. L.: "In vitro visualization of respiratory neuron ac-
tivity in the newborn mouse ventral medulla", *Dev.
Brain Res.* **153**, 275–279 (2004). *
- Yoshida K., Furuya S., Osuka S., Mitoma J., Shinoda Y.,
Watanabe M., Azuma N., Tanaka H., Hashikawa T.,
Itohara S., and Hirabayashi Y.: "Targeted disruption
of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene
causes severe neurodevelopmental defects and results in
embryonic lethality", *J. Biol. Chem.* **279**, 3573–3577
(2004). *
- Shirai Y. and Ito M.: "Specific differential expression of
phospholipase A₂ subtypes in rat cerebellum", *J. Neu-
rocytol.* **33**, 297–307 (2004). *
- Planel E., Miyasaka T., Launey T., Chui D., Tanemura
K., Sato S., Murayama O., Ishiguro K., Tatebayashi Y.,

and Takashima A.: "Alterations in glucose metabolism
induce hypothermia leading to tau hyperphosphoryla-
tion through differential inhibition of kinase and phos-
phatase activities: implications for Alzheimer's disease",
J. Neurosci. **24**, 2401–2411 (2004). *

Ikeda K., Onimaru H., Yamada J., Inoue K., Ueno
S., Onaka T., Toyoda H., Arata A., Ishikawa T.,
Tateto M., Fukuda A., and Kawakami K.: "Malfunc-
tion of respiratory-related neuronal activity in Na⁺, K⁺-
ATPase $\alpha 2$ subunit-deficient mice is attributable to ab-
normal Cl⁻ homeostasis in brainstem neurons", *J. Neu-
rosci.* **24**, 10693–10701 (2004). *

Cheng L., Arata A., Mizuguchi R., Qian Y., Karunaratne
A., Gray P. A., Arata S., Shirasawa S., Bouchard
M., Luo P., Chen C. L., Busslinger M., Goulding M.,
Onimaru H., and Ma Q.: "*Tlx3* and *Tlx1* are post-
mitotic selector genes determining glutamatergic over
GABAergic cell fates", *Nat. Neurosci.* **7**, 510–517 (2004).
*

Fujii M., Umezawa K., and Arata A.: "Dopaminergic mod-
ulation on respiratory rhythm in rat brainstem-spinal
cord preparation", *Neurosci. Res.* **50**, 355–359 (2004).
*

Arata A. and Ito M.: "Purkinje cell functions in the in
vitro cerebellum isolated from neonatal rats in a block
with the pons and medulla", *Neurosci. Res.* **50**, 361–367
(2004). *

Okada D., Yap C. C., Kojima H., Kikuchi K., and Nagano
T.: "Distinct glutamate receptors govern differential lev-
els of nitric oxide production in a layer-specific manaaer
in the rat cerebellar cortex", *Neuroscience* **125**, 461–472
(2004). *

Tsunekawa N., Arata A., and Obata K.: "Development of
spontaneous mouth/tongue movement and related neu-
ral activity, and their repression in fetal mice lacking glu-
tamate decarboxylase 67", *Eur. J. Neurosci.* **21**, 173–178
(2005). *

(総 説)

Ito M.: "Bases and implications of learning in the cerebel-
lum: adaptive control and internal model mechanism",
Prog. Brain Res. **148**, 95–109 (2005).

Arata A. and Ito M.: "Synaptic transmission and long-
term depression in Purkinje cells in an *in vitro* block
preparation of the cerebellum isolated from neonatal
rats", *Prog. Brain Res.* **148**, 113–123 (2005).

加藤忠史, 伊藤正男: "「脳を育む」研究とは何か", *分子精
神医学* **4**, 265–270 (2004).

□ 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nakai J.: "Development and application of a Ca²⁺-
sensitive-fluorescent protein based on GFP (G-CaMP)",
4th Forum of European Neuroscience (FENS Forum
2004), Lisbon, Portugal, July (2004).

Tsunekawa N., Arata A., and Obata K.: "GABA mod-

- ulates the generation of spontaneous motor activity in fetal mouse”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).
- Arata A. and Ito M.: “Purkinje cell functions in the *invitro* cerebellum-pons-medulla preparation isolated from neonatal rats”, 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).
- (国内会議)
- 山口和彦, 小野寺加代子: “ラット小脳プルキンエ細胞におけるグルタミン酸受容体 (GluR2)C 末端ペプチドによる平行線維 EPSC の増強”, 第 81 回日本生理学会大会, 札幌, 6 月 (2004).
- 濱裕, 宮脇敦史, 山口和彦, 原央子: “アストロサイトの接触によって誘発された神経細胞内のシグナリング: 局所から細胞全体へ”, 第 81 回日本生理学会大会, 札幌, 6 月 (2004).
- 立川哲也, 工藤佳久, 山口和彦: “小脳プルキンエ細胞 AMPA 受容体の構成性トラフフィッキングにおける PKC の関与”, 第 81 回日本生理学会大会, 札幌, 6 月 (2004).
- 高橋雄大, 小林徹, 尾崎美和子, 高松幸男, 太田光明, 山本秀子, 伊藤正男, 池田和隆: “フルオキセチンによる生体内 GIRK チャンネルの阻害: ウィーバーマウスにおける異常の改善”, 第 34 回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 7 月 (2004).
- 荒田晶子, 藪中厚生, 伊藤正男: “摘出小脳-橋-延髄標本における下オリーブ核および橋核から小脳への投射様式の発達”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 常川直子, 荒田晶子, 小幡邦彦: “GAD67 遺伝子欠損マウス胎仔における頭部と舌の自発運動と神経発射”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 藤井盛光, 梅澤一夫, 荒田晶子: “ドパミンによる呼吸リズムの調節: 新生ラット摘出脳幹標本を用いた解析”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 尾崎美和子, 大須賀壮, 大嶋恵理子, 平林義雄: “ErbB neuregulin receptors are localized to lipid rafts”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 中山孝, 百木智子, 山口和彦, 鈴木豊, 近藤靖, 祭友昭, 井上順雄: “ES 細胞から神経幹細胞および神経細胞の分化誘導”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 山口和彦, 立川哲也, 小野寺加代子: “ラット小脳プルキンエ細胞平行線維シナプスにおける構成性エンドサイトーシス阻害による AMPA 受容体表面発現の増強”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 中井淳一: “GFP を用いたカルシウムプローブ G-CaMP による平滑筋カルシウムの解析”, 平成 16 年度生理学研究所研究会「バイオ分子センサー研究会」, 岡崎, 9 月 (2004).
- 白井良憲, 小野弘子, 伊藤正男: “ラット小脳における Phosphatase A2 activating protein (PLAP) の機能解析”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).
- 中井淳一, Ji G., Feldman M. E., Deng K., Greene K., Wilson J., Lee J. C., Johnston R. C., Rishniw M., Tallini Y., Zhang J., Wier W. G., Blaustein M. P., Xin H., Kotlikoff M. I.: “Ca²⁺ sensing transgenic mice: postsynaptic signaling in smooth muscle”, 第 78 回日本薬理学会年会, 横浜, 3 月 (2005).