

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21530781

研究課題名（和文） マウス瞬目反射条件づけに関与する神経回路の解明

研究課題名（英文） Neuronal circuit of eyeblink conditioning in mice

研究代表者

坂本 敏郎（SAKAMOTO TOSHIOU）

筑波大学・教育イニシアティブ機構・准教授

研究者番号：40321765

研究成果の概要（和文）：

一連の研究から、強い音条件刺激（CS）を用いた場合、マウスの瞬目反射条件づけには、小脳に加え扁桃体が重要であることが示された。さらに、瞬目反射条件づけにおいて2種類の音 CS（1kHz, 10kHz）を用いて小脳核を損傷したマウスに音周波数弁別課題を行ったところ、この課題に障害を持つことが示された。小脳は単純な瞬目反射条件づけではなく、より複雑な認知機能を必要とする弁別課題に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Amygdala is critical for eyeblink conditioning in mice when the salient conditioned stimulus (CS) was used. Furthermore, we conducted the tone frequency discrimination task using deep cerebellar nuclei (DCN) lesioned mice. DCN lesioned mice could not acquire the discrimination task, and the results indicate that cerebellum is critically involved in the complicated cognitive task in eyeblink conditioning.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験心理学、行動神経科学

科研費の分科・細目：実験心理学、生理

キーワード：瞬目反射条件づけ、小脳、扁桃体、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

瞬目反射条件づけは、個体の記憶・学習の過程を調べるための優れた実験モデルであり、ウサギを用いた研究で小脳回路の重要性が指摘されてきた(Thompson, 2005)。しかし、様々な遺伝子欠損マウスの解析の基礎となる“マウス”の神経回路は不明である。

また最近、この条件づけにおいて、小脳以外の脳部位の関与が報告されている(Nilaweera, et al. 2006; Lee & Kim, 2004)。

瞬目反射条件づけに関わる分子機構を解明するためには、それを担う神経回路を同定する必要がある。近年の遺伝子組み換えマウスの作出により、瞬目反射条

件づけに関わる分子機構を調べることが可能になった。しかしマウスの瞬目反射条件づけの神経回路を詳細に調べた研究は少なく、本申請で解析するマウスの小脳核、赤核、扁桃体がこの条件づけに果たす役割はこれまでに調べられてこなかった。そこで、本研究では、行動学的・薬理的・分子生物学的手法を融合して用い、マウス瞬目反射 Delay 条件づけに関与する神経回路、脳部位を包括的に解明する。申請者がこれまでに明らかにしてきた小脳核の役割 (sakamoto & Endo, 2008) に加え、小脳皮質唯一の出力部位であるプルキンエ細胞が瞬目反射条件づけに果たす役割を検討する。また小脳以外の脳部位として、赤核、扁桃体の役割を明らかにする。

## 2. 研究の目的

### (1) 扁桃体が瞬目反射条件づけに果たす役割

ラットの瞬目反射条件づけの学習過程は2段階に分かれており、訓練の前半では扁桃体が、訓練の後半では小脳が重要な役割を持つ (Lee & Kim, 2004)。扁桃体は、ラットやマウスの瞬目反射条件づけでは、US(無条件刺激)として侵襲刺激である電気ショックを用いることから、この学習に扁桃体が関与している可能性が高い。本研究では、マウスの瞬目反射条件づけの獲得と保持に扁桃体が果たす役割を明らかにする。

### (2) 小脳が瞬目反射条件づけに果たす役割

瞬目反射 Delay 条件づけにおいて、小脳皮質と小脳核が担う役割は明らかにされていない。本研究では、プルキンエ細胞を特異的に欠損させた条件的遺伝子欠損マウスと小脳核を電気的、薬理的に損傷したマウスを用いて、小脳皮質と小脳核が瞬目反射条件づけに果たす役割を明らかにする。

### (3) 赤核が瞬目反射条件づけに果たす役割

赤核は小脳から顔面神経に至る中継地点で、瞬目反射条件づけの表出 (expression) を担う脳部位である (Krupa, et al. 1993)。また大脳皮質運動野からの出力も赤核を経由する。最近、ウサギを用いた研究で、小脳核と赤核の中継地点である小脳脚が瞬目反射条件づけの獲得や保持に重要であることが報告されている (Nilaweera, et al. 2006)。本研究では、小脳-小脳脚-赤核経路に着目し、マウスの瞬目反射条件づけの獲得と保持に赤核が果たす役割を明らかにする。

(4) 小脳が瞬目反射条件づけの音周波数弁別課題に果たす役割

小脳核を電気的に損傷したマウスを用いて、1 kHzの条件刺激 (CS) には無条件刺激である電気ショック (US) を提示し、10 kHzのCSに対しては (US) を提示しない条件の瞬目条件づけの音弁別パラダイムを実施する。これまでの研究で、それぞれのCSに対して、小脳核を損傷したマウスは瞬目反射条件づけを獲得することが明らかになっている。本研究では、小脳の果たす高次認知機能の役割を明らかにする。

(5) 神経軸索形成に関与する新奇なタンパク質 Draxin の行動学的役割を明らかにするために、遺伝子欠損マウスに行動テストバッテリーを行った。本研究では、活動性、情動性、社会性、記憶学習機能に関わる Draxin の役割を検討する。

## 3. 研究の方法

(瞬目反射の基本的な実験手続き) 条件刺激 (CS) に音 (10Khz, 70dB, 600ms) を用い、無条件刺激 (US) には電気ショック (100Hz, 100ms) を用い、装置馴致の後、1日50試行の瞬目反射条件づけを7-10日間実施した。

### (1) 扁桃体が瞬目反射条件づけに果たす役割

マウスの扁桃体に GABA<sub>A</sub> アゴニスト Muscimol を投与し、瞬目反射条件づけを実施した。また、扁桃体を電気的に損傷したマウスを用いて、同様の瞬目反射条件づけを実施した。

### (2) 小脳が瞬目反射条件づけに果たす役割

本研究で用いるマウスでは、脂質合成酵素である spt1c2 が、生後2週齢からプルキンエ細胞特異的に欠損していく。本研究では、このプルキンエ細胞特異的 spt1c2 欠損マウスに瞬目反射条件づけを実施した。さらに、小脳核を電気的に損傷したマウス、小脳核に Muscimol を投与したマウスを用いて、瞬目反射条件づけを実施した。

### (3) 赤核が瞬目反射条件づけに果たす役割

マウスの赤核に Muscimol 投与し、瞬目反射条件づけを実施した。訓練経験のないマウスに薬物を投与して、課題の獲得を調べる獲得実験と、訓練後のマウスに薬物を投与して課題の保持を調べる保持実験を

行った。

(4) 小脳が瞬目反射条件づけの音周波数弁別課題に果たす役割

小脳核を電氣的に損傷したマウスを用いて、瞬目反射条件づけの音弁別課題を実施した。異なる周波数の条件刺激を2種類（1kHz, 10kHz）用いて、どちらかのCSが無条件刺激（US）である電気ショックと対提示された。小脳が、この2つのCSを用いた弁別課題に関与するか否かが調べられた。

(5) Draxin 遺伝子欠損マウスの行動解析

Draxin 欠損マウスは、海馬および脳梁に障害を持つことが知られており、そのマウスの行動解析を行った。オープンフィールドテスト、明暗箱往来テスト、Y迷路テスト、社会的認知テスト、恐怖条件づけを実施し、Draxin の欠損が、活動性、情動性、社会認知、記憶学習の機能に果たす役割を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 扁桃体の役割

扁桃体を損傷したマウスは、訓練を20日間行ったにもかかわらず、瞬目反射条件づけを獲得できなかった。さらに、扁桃体にMuscimolを投与したマウスも、同様にこの条件づけの獲得及び遂行に障害を示した。これらの結果から、強いCSを用いた時、マウス瞬目反射条件づけに、扁桃体は重要な役割を持つことが示された。

(2) 小脳の役割

プルキンエ細胞欠損マウスは、条件づけの前半では、課題の獲得に障害を示したが、訓練後半では、この課題を獲得した。小脳核にMuscimolを投与したマウスも、同様に、訓練後半ではこの課題を獲得した。小脳核を電氣的に損傷したマウスは、訓練の前半から、擬似手術群と同様にこの課題を習得した。これらの結果から、強いCSを用いた時、小脳はそれほど必要な役割をもたないことが示された。

(3) 赤核の役割

赤核にMuscimolを投与したマウスは、課題の獲得に障害を示さなかったが、課題の遂行に障害を示した。これらの結果は、赤核が課題の学習ではなく遂行に重要な役割を持つ事を示しており、ウサギで示されてきた従来からの研究と一致するものである。

(4) 音周波数弁別課題における小脳核の役割

強いCSを2種類（1kHz, 10kHz）用いて、従来の瞬目反射条件づけを行ったところ、小脳損傷マウスはその課題を遂行できた。しかし、一方のCSだけ無条件刺激（US）を提示する弁別課題では、小脳損傷マウスはCS+だけでなくCS-にも瞬目反応を示し、この課題を遂行できなかった。この結果より、小脳は瞬目反射条件づけにおいてより複雑な認知機能を必要とする課題に関与することが示された。

(5) Draxin 欠損マウスの行動解析

Draxin 欠損マウスの行動解析を実施したところ、欠損マウスは、オープンフィールドテスト、明暗箱往来テスト、Y迷路テスト、社会的認知テスト、恐怖条件づけテストにおいて、野生型マウスと異なる表現型を示した。これらの結果よりDraxin の欠損は、活動性、情動・社会性、学習・記憶機能に障害を示すことが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計4件）

(1) H. J. Lee, J. K. Lee, H. Lee, J. Shin, J. E. Carter, T. Sakamoto, H. K. Jin, J. Bae, The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 481, 30-35, 2010

(2) T. Sakamoto & S. Endo: Amygdala, deep cerebellar nuclei and red nucleus contribute to delay eyeblink conditioning in C57BL/6 mice. *European Journal of Neuroscience* 32, 1537-1551, 2010

(3) S. Endo, F. Shutoh, T. L. Dinh, T. Okamoto, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Kawahara, D. Yanagihara, Y. Sato, K. Yamada, T. Sakamoto, Y. Kirino, N. A. Hartell, K. Yamaguchi, S. Itoharu, A. C. Nairn, P. Greengard, S. Nagao, & M. Ito: Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion. *Proceedings of the National Academic Sciences of the U.S.A.* 106, 3525-3530, 2009

(4) 坂本敏郎・遠藤昌吾 小脳核の GABA 受容体 生体の科学, 60: Pp 380-381, 2009

〔学会発表〕（計5件）

(1) Sakamoto, T., Shinmyo, Y., Tanaka, H., & Ogawa, S. Impairment of socio-emotional behavior and memory function in Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein) knockout mice. 39<sup>th</sup> Annual meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C. 2011. 11.14

(2) T. Sakamoto, Y. Shinmyo, H. Tanaka, & S. Ogawa. Impairment of socio-emotional behavior and memory function in Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein) knockout mice. 33<sup>th</sup> Annual meeting of Japan Neuroscience Society, Kobe, 2010.

(3) 佐越祥子・坂本敏郎・小川園子 社会的認知及び空間認知機能におけるオキシトシン受容体の役割 日本動物心理学会 第70回大会 帝京大学（東京都）2010年8月

(4) 坂本敏郎・小川園子・遠藤昌吾 扁桃体はマウス瞬目反射条件づけに重要な役割を持つ 日本動物心理学会 第69回大会 岐阜大学(岐阜県)2009年9月

(5) T. Sakamoto, S. Ogawa & S. Endo Lateral Amygdala plays important roles in acquisition and retention of delay eyeblink conditioning in mice. 31<sup>th</sup> Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2009.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ogawalab/?category=11>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本敏郎 (SAKAMOTO TOSHIRO)

筑波大学・教育イニシアティブ機構・

准教授

研究者番号：40321765