

小脳抑制性シナプス可塑性の 運動学習への寄与

田中進介

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻
生物物理学系機能統合学講座機能構造認識分野

目次

目次	• • • • •	1
要旨	• • • • •	2-3
序論	• • • • •	4-11
結果	• • • • •	12-26
考察	• • • • •	27-30
材料と方法	• • • • •	31-35
参考文献	• • • • •	36-41
謝辞	• • • • •	42

要旨

神経細胞間での情報伝達効率は神経活動の履歴に依存して変化し、この現象はシナプス可塑性と呼ばれる。そして、小脳におけるシナプス可塑性は運動学習の基盤と考えられている。特に、小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞上の興奮性シナプスにおける可塑性は、運動学習の主要細胞機構と推測され、多くの研究が行われてきた。プルキンエ細胞上には抑制性シナプスも形成され、プルキンエ細胞で強い脱分極が起こると、この抑制性シナプスでの伝達効率が長時間増強される可塑性が起こる。この可塑性は、Rebound Potentiation (RP) と呼ばれ、興奮性シナプスにおける可塑性とともに運動学習に関与する可能性が考えられたが、その正否は不明であった。そこで、私はRPが選択的に障害されるトランスジェニックマウスを作製し、その運動学習能力を調べることにより、RPの運動学習への関与を検討することにした。

GABARAP分子とGABA_A受容体との相互作用が、RPの発現に必要であることが報告されていた。そこで、GABARAPとGABA_A受容体との結合を阻害するペプチドを小脳プルキンエ細胞特異的に発現させることにより、RPを選択的に障害したトランスジェニックマウスを作製することにした。トランスジェニックマウス作成後、RPが障害されていることを確認した。次に、小脳皮質構造・プルキンエ細胞の受ける興奮性・抑制性シナプス入力・プルキンエ細胞の発火頻度とパターン等の電気生理学的特性を調べ、それらはトランスジェニックマウスと野生型マウスで同様であることを確認した。そこで、トランスジェニックマウスの運動制御能力を評価する目的で、前庭動眼反射 (VOR) 及び視運動性眼球運動 (OKR) の計測を行った。これらの反射性眼球運動は定量性に優れ、小脳を含む比較的単純な神経回路により制御されている。トランスジェニックマウスのVOR、OKRの基礎動特性は、野生型マウスと同様であった。VORとOKRは状況に応じて、それらの動特性を適応的に変化させることが知られており、こうした適応は運動学習のモデルとなっている。最後に、VOR及びOKRの適応能力を調べた。トランスジェニックマウスでは、VORの適応変化が野生型マウスと比較して有意に障害されてい

た。一方、OKRの適応については、異常が認められなかった。以上の結果は、小脳皮質プルキンエ細胞における興奮性シナプス可塑性だけでなく、抑制性シナプスで起こる可塑性の一つであるRPも、運動学習に寄与することを示している。

序論

小脳

哺乳類の小脳は、大脳の尾側、脳幹の背側に位置している（図1）。ヒトの小脳の重量は大脳の1/10で、表面積は約1/2だが、神経細胞数については、大脳が約140億個に対して小脳は約1000億個と推定されている。小脳に疾患があると、運動失調を示すことから、小脳は古くから運動の制御・学習に関与すると考えられてきた。しかし、最近では小脳が認知機能等、高次な精神活動に関与することも報告されている(Allen et al., 1997)。

小脳は髄質と呼ばれる白質と皮質と呼ばれる灰白質からなり、シート状の小脳皮質が折りたたまれ、中心の髄質を包み込んでいる。小脳髄質には、一对の歯状核・球状核・栓状核・室頂核が存在し、それらは小脳核と総称される。小脳皮質は一様な3層構造を示し、表面側から分子層・プルキンエ層・顆粒細胞層と呼ばれている。また、小脳皮質を構成する主要な神経細胞は、プルキンエ細胞・顆粒細胞・籠状細胞・星状細胞・ゴルジ細胞の5種類であり、このうち

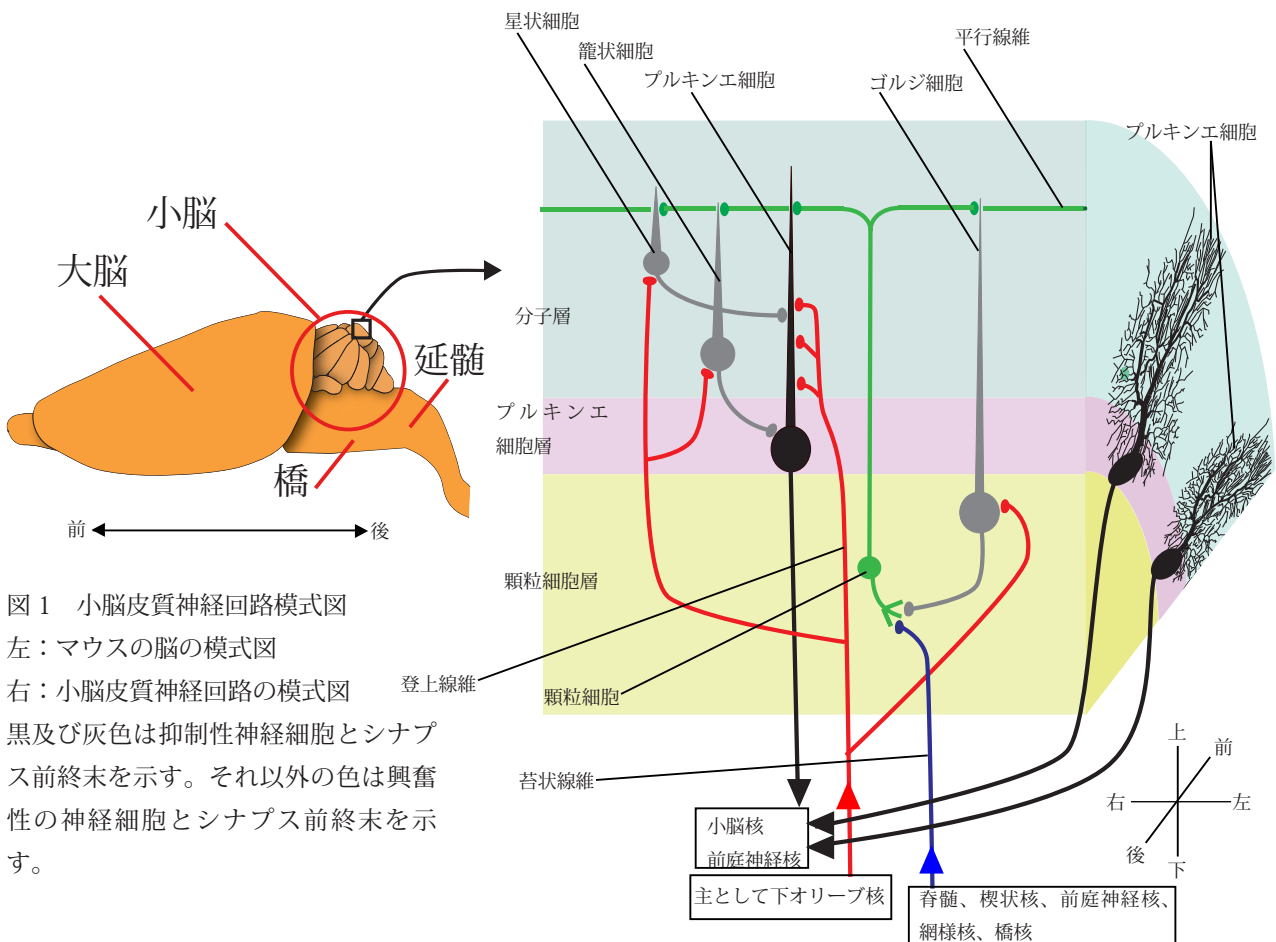


図1 小脳皮質神経回路模式図
左：マウスの脳の模式図
右：小脳皮質神経回路の模式図
黒及び灰色は抑制性神経細胞とシナプス前終末を示す。それ以外の色は興奮性の神経細胞とシナプス前終末を示す。

興奮性の神経細胞は、グルタミン酸を神経伝達物質として放出する顆粒細胞のみで、残りの4種の細胞は γ -アミノ酪酸(GABA)を放出する抑制性の神経細胞である(Ito, 2001)。顆粒細胞の樹状突起及び細胞体は顆粒細胞層に位置し、その軸索は分子層へと上行する。分子層に達した軸索は、左右方向にT字型に分岐して平行線維となり、他の4種の抑制性神経細胞に投射している。プルキンエ細胞は小脳皮質における唯一の出力細胞であり、その細胞体は一層のプルキンエ細胞層に規則正しく並び、樹状突起は分子層において前後軸と平行な平面内で扇型に広がっている。星状細胞、籠状細胞は分子層に位置し、両者ともにプルキンエ細胞、ゴルジ細胞に投射しているが、プルキンエ細胞においては、星状細胞は細胞体から遠位に、籠状細胞は細胞体から近位に投射している。ゴルジ細胞の細胞体は顆粒細胞層に位置しており、その樹状突起は分子層にまで伸長している。ゴルジ細胞の軸索は数多く分岐しており、数千個の顆粒細胞に投射している。小脳外からの入力線維として苔状線維と登上線維があり、両者ともに興奮性である。登上線維は脳幹腹側部にある下オリーブ核神経細胞の軸索で、苔状線維は脊髄・脳幹網様体・前庭神経核・橋核等の神経細胞の軸索である。登上線維は、4種の抑制性神経細胞に、苔状線維は顆粒細胞に投射している。

このように、小脳皮質は一様で規則正しい層構造を示し、細胞種が中枢神経系では比較的に少ないため、各細胞を形態的に容易に同定できる。また、各細胞間の神経結合がよく研究されており、細胞・分子レベルの現象から行動発現までを統一的に理解し得る系になるのではないかと期待される(Ito, 2001)。

シナプス可塑性

カナダの心理学者Donald Hebbは記憶形成機構について、後にHebb則と呼ばれる仮説を提唱した(Hebb, 1949)。その仮説は「シナプス前細胞が伝える信号がシナプス後細胞を繰り返し持続的に興奮させた時、そのシナプスの伝達効率が強化されるとともにシナプス後細胞の出力が強まる」というものである。そして、BlissとLomo (1973)によってこのような現象が、哺乳類の海馬で実際に起こることが示された。神経細胞活動に依存してシナプスの伝達効率が

変化する現象は、シナプス可塑性と呼ばれている。シナプス可塑性は中枢神経系のいたるところで観察されており (Kleppisch and Feil, 2009)、中枢神経系の機能にとって重要な現象と考えられている。海馬でのシナプス可塑性は、阻害薬を用いた実験及び可塑性が阻害されたミュータントマウスを用いた解析などから、記憶形成と学習に重要な役割を担うことが示唆されている。

小脳においてもシナプス可塑性が報告されており、運動学習の細胞レベルでの基礎過程と考えられてきた。小脳で最もよく研究されてきたシナプス可塑性は、プルキンエ細胞-平行線維間興奮性シナプスにおける長期抑圧 (Long Term Depression : LTD) である。各プルキンエ細胞には、約15万本の平行線維が遠位樹状突起状に投射しているが (Ito, 2002)、個々のシナプス入力は弱く、1回の活動ではプルキンエ細胞を発火させるに至らない。それに対して、登上線維は1つのプルキンエ細胞に対して1本のみが投射している。登上線維は、樹状突起の近位に数百の興奮性シナプスを形成し、1回の入力で強力な脱分極を引き起こす (Wadiche and Jahr, 2001)。プルキンエ細胞において、登上線維入力が引き起こすような強い脱分極と平行線維入力が同期すると、同期した平行線維シナプス特異的に伝達効率が減弱する。この現象は小脳LTDと呼ばれ、このLTDを阻害する薬剤やミュータントマウスを用いた実験から、LTDが運動学習に関与することが示唆されてきた (Ito, 2001)。小脳LTDの運動学習への関わりについて、「平行線維は主要な感覚及び、運動指令情報を伝達し、登上線維は誤差情報を伝える。そして、LTDは誤差情報と同期した平行線維信号を減弱させ、より適切な運動の制御信号を送るようになる。」という仮説が提唱された (Ito, 2001)。しかし、近年、LTDが障害された動物が正常な運動学習を示す例が報告され (Schonewille et al., 2011)、LTDの運動学習への寄与に関して疑問が生じた。小脳では、LTD以外にも多種のシナプス可塑性が報告されており (Hansel et al., 2001; Jörntell and Hansel, 2006; Dean et al., 2010; Gao et al., 2012)、それらも運動学習に寄与するのではないかと示唆されたが、その正否は明らかでない。

Rebound Potentiation

小脳皮質の分子層の星状細胞及び籠状細胞がプルキンエ細胞に形成する抑制性シナプスでも、可塑性が報告されている(Kano et al., 1992)。

これらのシナプスでは、プルキンエ細胞が登上線維入力により強く脱分極すると、イオン透過型GABA_A受容体(GABA_AR)を介する抑制性シナプス応答が長期間増強される。

このシナプス可塑性は Rebound Potentiation (RP) と呼ばれている。

強い脱分極により電位依存性Ca²⁺チャンネルが開き、細胞内Ca²⁺濃度が上昇、それがCa²⁺/Calmodulin (Ca²⁺/CaM) 複合体を形成し、Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase II (CaMKII)を活性化する。このCaMK II活性化がRP発現に必要であると報告された(図2)(Kano et al., 1996)。

CaMK IIは、GABA_ARをリン酸化してその応答を増強することが知られて

いる(Houston et al., 2007)。一方、CaMKIIの働きによるGABA_A Receptor Associated Protein (GABARAP)の変化がRP発現に必要であることも報告されている(Kawaguchi and Hirano, 2007)。RPは登上線維の入力に依存して抑制性シナプス入力を増強し、LTDと同様にプルキン

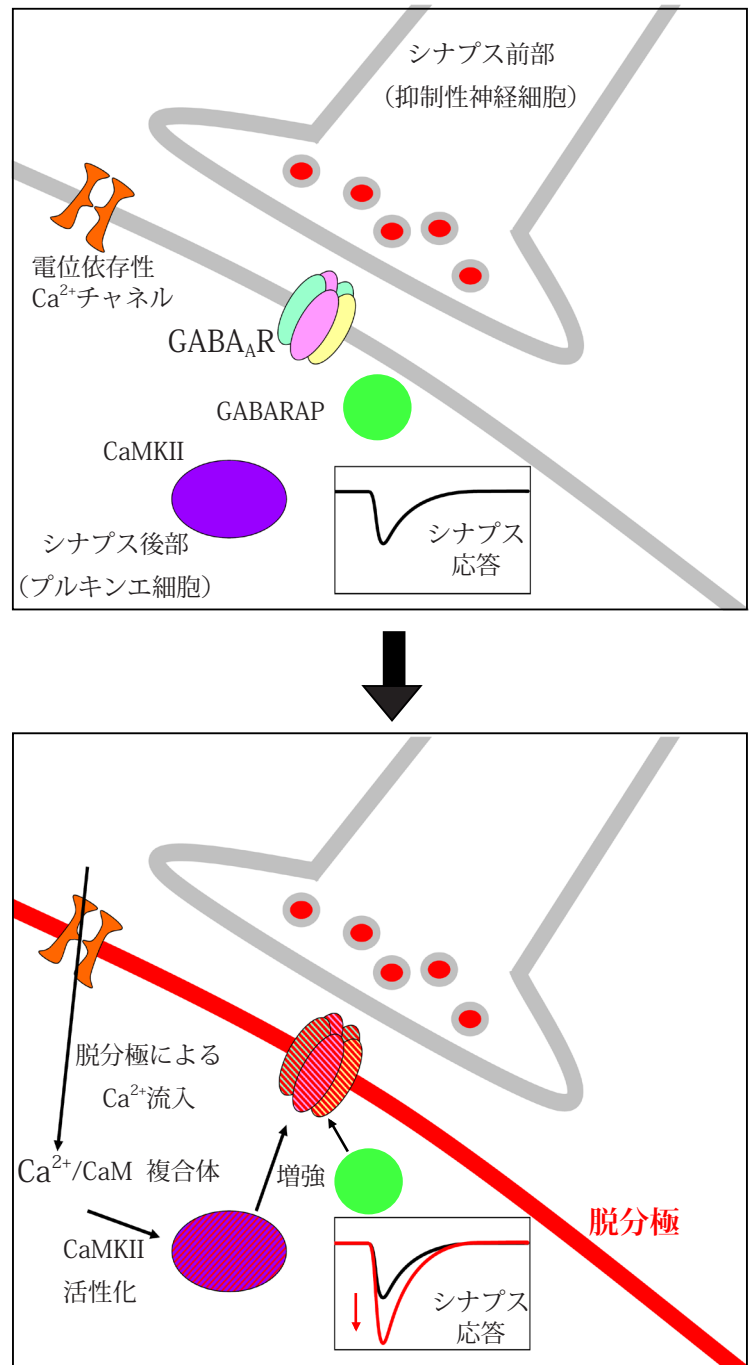


図2 RPの模式図

プルキンエ細胞の脱分極により電位依存性Ca²⁺チャンネルが開き細胞内Ca²⁺濃度が上昇する。その結果Ca²⁺/CaM 複合体が形成されてCaMK IIを活性化する。活性化CaMK IIはGABARAP等の変化を介してGABA_AR応答を増強する。

エ細胞の活動を下げる方向に作用する。そのため、RPはLTDと協調して運動学習に寄与する可能性がある。

GABA_ARとGABARAP

GABA_ARは5量体の膜タンパク質で、サブユニットとして、 $\alpha 1-6 \cdot \beta 1-4 \cdot \gamma 1-3 \cdot \delta \cdot \varepsilon \cdot \theta \cdot \rho 1-3$ の19種類が知られている(Barnard et al., 1998)。脳内のGABA_ARの多くは、 α サブユニットが2つ、 $\beta 2/3$ サブユニットが2つ、 $\gamma 2$ が1つで構成されている(Olsen and Sieghart, 2009)。また、GABA_ARのGABA結合領域は β サブユニットに存在する(Malherbe et al., 1990)。GABA_ARは塩化物イオンを選択的に通し、多くの場合、膜電位を過分極させて神経細胞活動を抑える。細胞質側でGABA_ARと結合するタンパク質がいくつか同定されているが、本研究ではGABARAPに着目した。

GABARAPは、ユビキチンと相同性が高く(Chen and Olsen, 2007)、生体内に広く発現が認められ(Okazaki et al., 2000)、GABA_AR $\gamma 2$ サブユニット(GABA_AR $\gamma 2$)及び微小管の構成タンパク質であるチューブリン、更にGABARAP自体と結合することが知られている。またGABARAPはGABA_ARの細胞内輸送に関与することも報告されている(Chen and Olsen, 2007)。分散培養したプルキンエ細胞において、GABARAPとGABA_AR $\gamma 2$ の結合は、抑制性シナプス伝達自体に影響は与えないが、RP発現に必要であることが報告された(Kawaguchi and Hirano, 2007)。GABARAPは強い脱分極刺激によってその構造が変化する。GABARAPの構造変化とGABA_AR $\gamma 2$ の結合がRP発現に必要であることも示されている。

前庭動眼反射と視運動性眼球運動

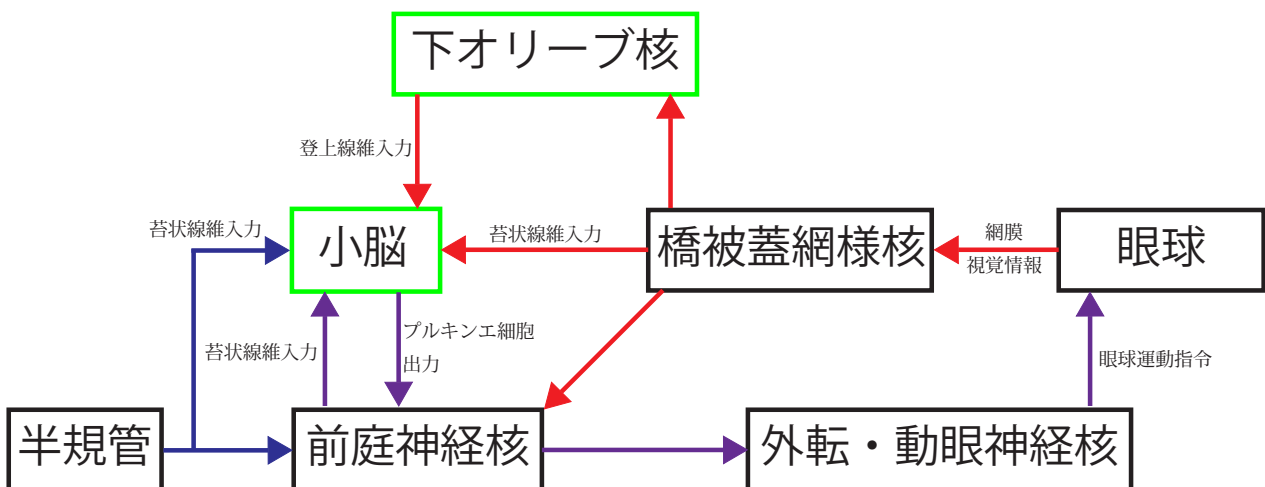
本研究では、マウスの運動制御・運動学習の評価を行った。それらの評価にあたっては、反射性眼球運動の計測を用いた。私たちが生活する上で、移動したり首を動すと頭部も動く。この頭部の動きに伴って視野のブレが生じるが、私たちはそれをほとんど意識することなく、歩行中でも安定した視野を確保している。こうしたことができるのは、頭部の動きにより生じる

視野のブレを補正する反射性の眼球運動があるからである。そうした反射性眼球運動として、前庭動眼反射(vestibule-ocular reflex : VOR)と視運動性眼球運動(optokinetic response : OKR)が知られている。VORは頭部の回転を前庭の半規管が検知することにより生じ、頭部回転と逆方向に眼球を動かす反射である。一方、OKRは視覚刺激によって誘導され、ゆっくりとした視野全体の動きを眼球が追従する応答である。

小脳は運動制御・学習に関わる脳部位であり、VORとOKRの計測は小脳による運動制御・学習の評価に用いられてきた(Ito, 1982; du Lac et al., 1995; Boyden et al., 2004; Ito, 2012)。それは、反射性眼球運動出力が2次元的な眼球の動きであるため、定量的に反射運動を評価できるためである。また、VOR及びOKRを制御する神経回路も詳細に調べられており、他の運動を制御する神経回路と比較して単純であるという利点もある(図3)(Robinson, 1981; du Lac et al., 1995)。VORでは、頭部回転情報は半規管から前庭神経核ニューロンへ、そして外転神経核あるいは動眼神経核の運動ニューロンへと伝わり、眼筋の収縮・弛緩により眼球運動が引き起こされる。一方、小脳は副経路を形成する。半規管からの求心性線維・前庭神経核ニューロンが苔状線維を介して顆粒細胞へと投射し、プルキンエ細胞は一部の前庭神経核ニューロン

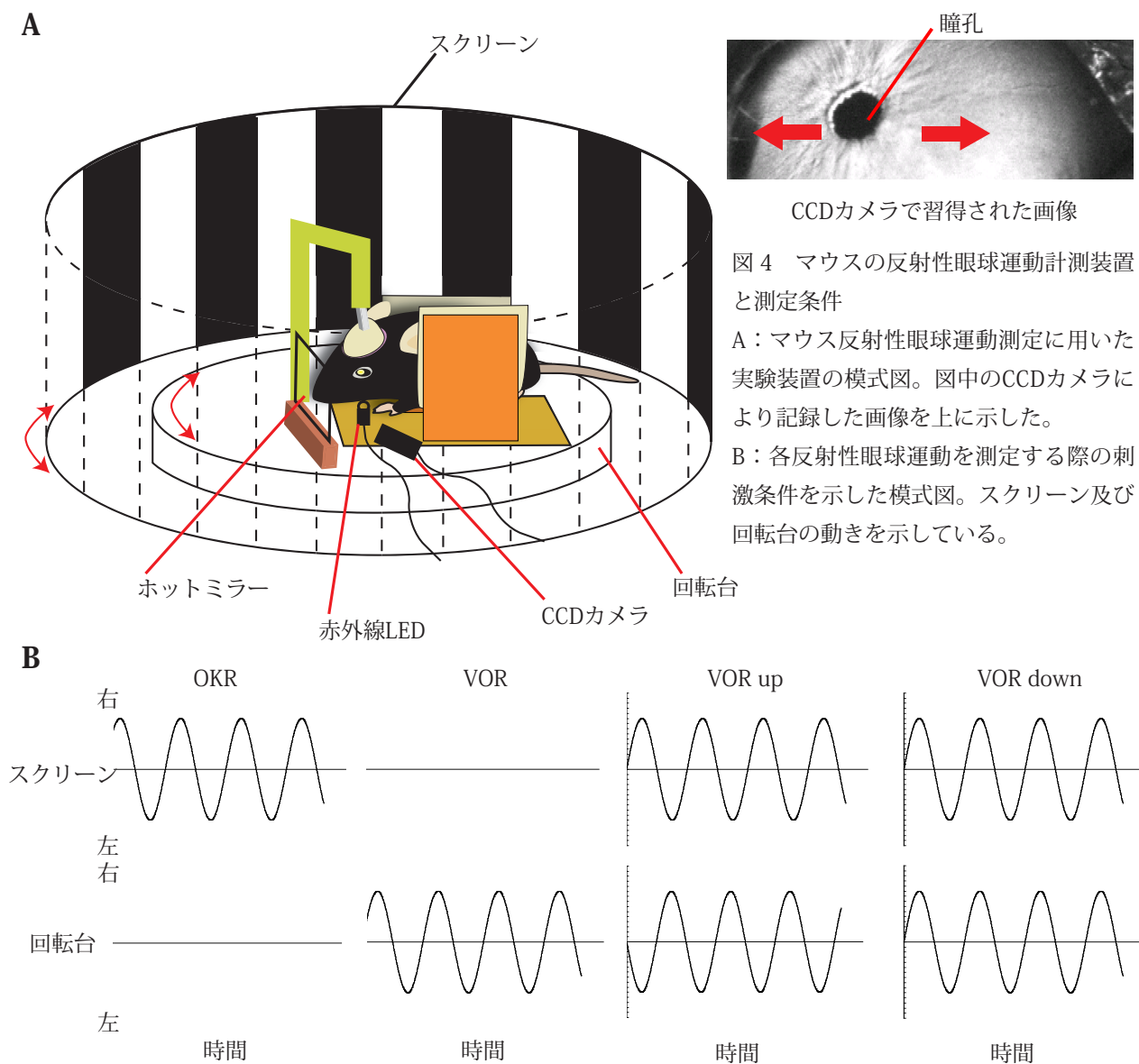
図3 OKR 及び VOR の神経回路

■ はOKRのみにかかわる経路 ■ はVORのみにかかわる経路 ■ は両者にかかわる経路を示す。
 ■ で囲った領域は副経路を示す。



へ投射する。OKRでは、網膜からの視覚情報は視索核を経て下オリーブ核及び橋被蓋網様核へと伝わる。橋被蓋網様核は、直接あるいは間接的に前庭神経核ニューロンへ入力する。橋被蓋網様核からの苔状線維が小脳へ入力する経路もある。また、下オリーブ核からは、登上線維による小脳プルキンエ細胞への投射がある。さまざまな動物で、小脳を破壊しても、VOR・OKRは消失しないが、前庭神経核の破壊によってはVOR・OKRに重篤な障害が生じる。そのため、VOR・OKRの主情報伝達経路は脳幹の経路であって、小脳経路は調節的な副経路と考えられている (Robinson, 1981; du Lac et al., 1995)。

また、VOR・OKRには適応と呼ばれる現象がある (Ito, 2001)。恒常的に視野のブレが生じる状況では、より眼球を早く動かすようになるなど、反射性眼球運動の特性を変化させてブレを小



さくする。この眼球運動の特性変化を適応と呼ぶ。例えば、加齢により筋力が弱くなると、眼球を動かす際に視野のズレが生じる。このような場合、筋肉に送る信号を強くし、眼球が以前と同様に動くようにする必要がある。このように適応は、加齢・損傷などによる筋力の変化に伴う眼球運動の変化を補正する時に働くと考えられる。実験的には、頭部回転刺激と視覚刺激を組み合わせて人工的に視野のズレを生じさせることによって、VOR適応を引き起こすことができる(図4)。例えば、頭部回転刺激と動物を囲むスクリーンの回転刺激を逆方向で与えると、視野の動きは大きくなる。このような状況で、視野のズレを防ぐためには、通常より大きく眼球を回転させることが必要となる。逆に頭部回転刺激とスクリーン回転刺激を同じ大きさで同方向に与えると、視野の動きはなくなり、眼球を動かす必要がなくなる。このような刺激を数時間与え続けることによって、VORの適応を誘導することができる。そして、こうした適応には小脳が必要である(Robinson, 1981)。

本研究の目的

本研究では、小脳における抑制性シナプス可塑性であるRPが運動学習に寄与するのか否かを明らかにすることを目指し、RPが障害された遺伝子改変マウスを作製して、そのマウスを用いて運動学習能力を検討することにした。

結果

RPが障害されたトランスジェニックマウスの作製

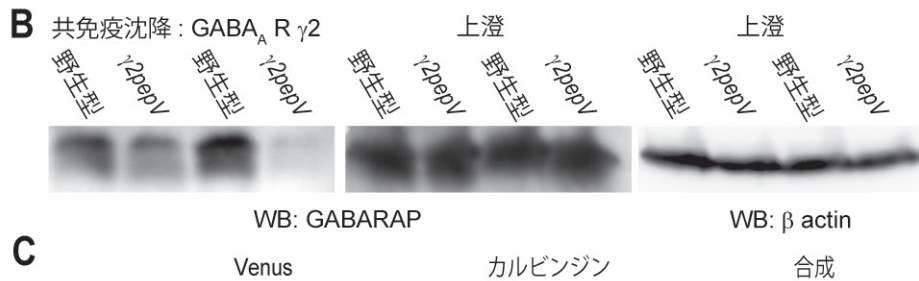
GABA_ARとGABARAPの結合がRPの誘導及び維持に必要であることが報告されている (Kawaguchi and Hirano, 2007)。この論文では、GABA_AR γ 2サブユニットの結合部位と相同なペプチドと蛍光タンパク質であるVenusとの融合タンパク質が、GABA_ARとGABARAPの結合を競合的に阻害し、RP発現を阻害することが示された。そこで、この融合タンパク質を、L7プロモーターを用いてプルキンエ細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス (γ 2pepVマウス)

図5 γ 2pepVマウスにおけるトランスジーン発現。

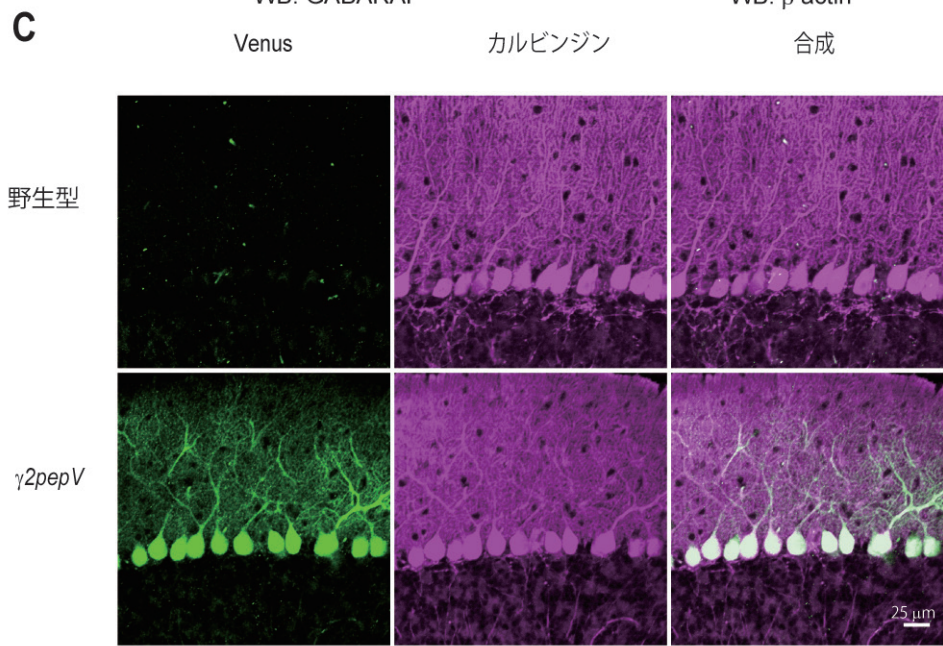
A、GABA_AR γ 2サブユニットとGABARAPの結合模式図 (左)、トランスジーン発現の模式図 (上) とPCRによるトランスジーン発現の検出 (下)。プライマーは横棒で表した。トランスジーンを注入した



マウスが16匹得られたが、そのうち、トランスジーンを検出できたのは2・8・16番の3匹であった。B、小脳から抽出したタンパク質におけるGABARAPとGABA_ARの結合。GABA_AR γ 2サブユニットに対する抗体を用いて共免疫沈降し、SDS-PAGE後、GABARAP抗体を用いてウェスタンブロッティングした。



野生型マウスで共免疫沈降されたGABARAPのシグナルは、 γ 2pepVマウス2番 (A系統) より有意に強かった。上澄のGABARAPシグナル (中央) 及び β アクチンシグナル (右) も示した。C、野生型及び γ 2pepVマウスの小脳スライスにおけるVenus及びカルビンジンに対する免疫蛍光染色画像。



ウス) を作製した (図5A) 。3系統のトランスジェニックマウス (2, 8, 16) (図5A) が得られたが、8番のマウスは、その子孫がトランスジーンを発現しなかった。そこで、本研究では主に2番 (A系統) を用いて研究を行い、一部の重要な点は16番 (B系統) で確認した。

まず、 $\gamma 2pepV$ マウスA系統におけるGABA_ARとGABARAPの結合を検討するために、GABA_AR $\gamma 2$ に対する抗体を用いて共免疫沈降実験を行なった。その結果、 $\gamma 2pepV$ マウスでは、抗GABA_AR $\gamma 2$ 抗体により共沈降してきたGABARAPのシグナルが野生型マウスと比べ有意に少なかった (図5B, $53 \pm 0\%$, $n = 5$ ずつ, $p=0.001$, unpaired t test) 。この結果は、 $\gamma 2pepV$ マウスA系統においてGABA_ARとGABARAPの結合が阻害されていることを示している。

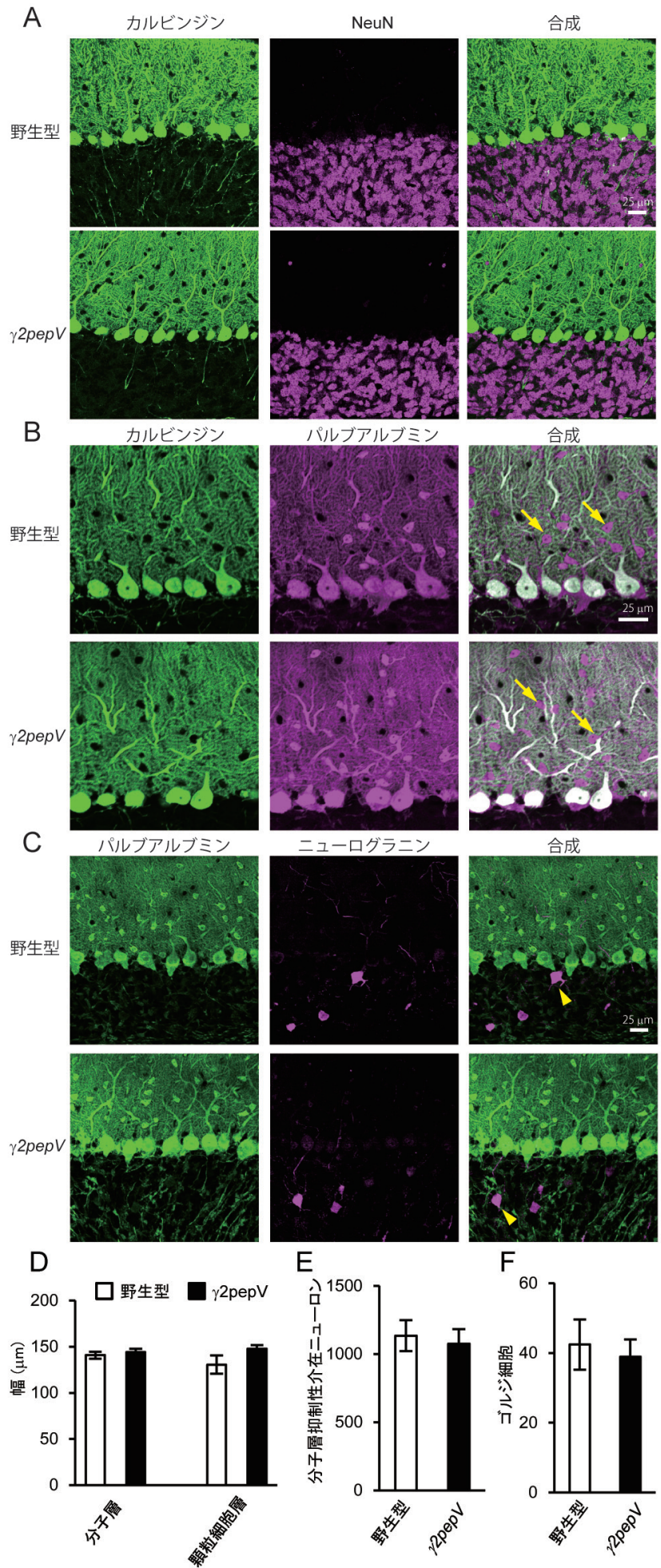
また、A系統のヘテロトランスジェニックマウスにおいて、プルキンエ細胞特異的なVenusのシグナルが認められ、小脳皮質構造に明らかな異常は認められなかった (図5C) 。顆粒細胞マーカーであるNeuN、プルキンエ細胞及び分子層の星状細胞・籠状細胞のマーカーであるパルブアルブミン、ゴルジ細胞のマーカーであるニューログラニンに対する抗体を用いた染色を行ったところ、小脳皮質の分子層・プルキンエ細胞層・顆粒細胞層の幅及び各介在性神経細胞の数・形態に有意な差は認められなかった (図6) 。

次に、 $\gamma 2pepV$ マウスにおける抑制性シナプス後電流とRPを調べた。野生型及び $\gamma 2pepV$ から作製した小脳切片標本 (14-18日齢) から、微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)及び誘発性IPSCを測定した。得られたmIPSCの振幅 (図7A, 野生型 33 ± 8 pA, $n=5$; $\gamma 2pepV$, 28 ± 3 pA, $n=6$, $p=0.54$, unpaired t test)、頻度 (図7B, 6.0 ± 2.4 Hz, $n=5$; $\gamma 2pepV$, 5.8 ± 1.5 Hz, $n=6$, $p=0.99$, unpaired t test) に有意な差は認められなかった。また、各刺激強度での誘発性IPSCの振幅も、野生型マウスと $\gamma 2pepV$ マウスで有意な差を示さなかった (図7C, $p=0.36$, ANOVA) 。以上から、抑制性シナプス伝達特性は、野生型とトランスジェニックマウスで変わらないと判断した。

次に、強い脱分極刺激によりRP誘導を試みた (図7D-F) 。その結果、野生型マウスにおいてはmIPSCの振幅が長期間増大したが (図7D,E,G,H, $175 \pm 22\%$, $n=5$, $p=0.042$, paired t test) 、 $\gamma 2pepV$ マウスでは同様の増大は認められなかった ($90 \pm 7\%$, $n=6$, $p=11$, paired t

図6小脳皮質の形態

小脳スライスでカルビンジン（プルキンエ細胞マーカー、緑）と NeuN（顆粒細胞マーカー、マゼンダ）（A）、カルビンジン（緑）とパルプアルブミン（プルキンエ細胞と分子層抑制性介在ニューロンのマーカー、マゼンダ）（B）、もしくはパルプアルブミン（緑）とニューログラニン（ゴルジ細胞マーカー、マゼンダ）（C）を二重染色した。矢印と矢頭は、各々分子層抑制性介在ニューロンとゴルジ細胞を指示している。D-F各層の幅（D）と分子層抑制性介在ニューロン（E）及びゴルジ細胞（F）の密度（細胞個数/mm²）を示す。



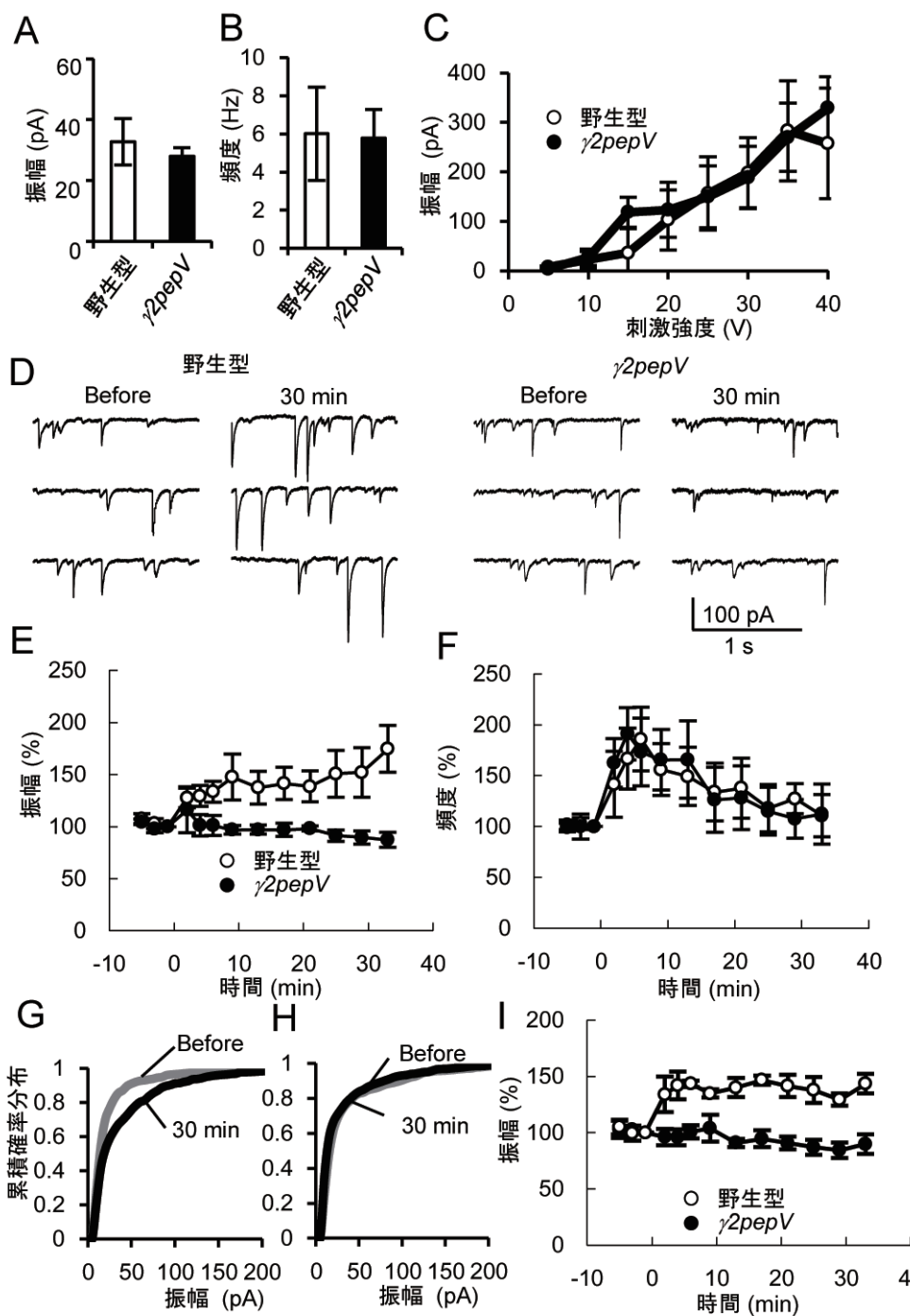


図7 $\gamma 2pepV$ マウスにおけるIPSCとRP障害
 A,B野生型 (n=5) 及び $\gamma 2pepV$ マウス (n=6) のプルキンエ細胞から記録されたmIPSCの振幅の平均値 (A) と平均頻度 (B)。C,刺激により引き起こされたIPSCの振幅と刺激強度の相関関係 (各々n=8)。D-F、RP脱分極誘導刺激 (0分) 前後の野生型 (n=5) 及び $\gamma 2pepV$ マウス (n=6) における代表的なmIPSCのトレース (D)、IPSCの振幅 (E) と頻度 (F) の時間経過。RPは $\gamma 2pepV$ マウスA系統において有意に障害されていた。G,H野生型 (G,誘導刺激前, 1041 mIPSC; 誘導刺激後, 1051 mIPSC, 5細胞) 及び $\gamma 2pepV$ マウス (H, 誘導刺激前, 1372 mIPSC; 誘導刺激後, 1401 mIPSC, 6細胞) から得たmIPSCの振幅の確率密度分布。野生型マウスにおいては、RP誘導刺激前と33分後では有意差が認められた。I

前後のmIPSCの振幅の時間経過。データは平均±標準誤差で示した。

test)。脱分極後のmIPSCの振幅は、野生型と比ベトランスジェニックマウスで有意に小さかった ($p < 0.01$, unpaired t test)。なお、RPはより成熟した8-10週齢のA系統マウスにおいても障害されていた (図7I, 野生型 $143 \pm 9\%$: 脱分極刺激から33分後, n=4, $p = 0.026$; $\gamma 2pepV$, $90 \pm 9\%$, n=5, $p = 0.44$, paired t test)。

mIPSCの頻度はシナプス前部の性質を反映していると考えられ、脱分極刺激後一時的に上

昇することが知られている (Duguid and Smart, 2004)。この現象は depolarization γ nduced potentiation of suppression (DPI) と呼ばれている。DPI は、14-16 日齢において、野生型、 $\gamma 2pepV$ マウス双方において認められたが (図 7F, $167 \pm 30\%$: 脱分極刺激から 5 分後, $n=5$, $p=0.047$; $\gamma 2pepV$, $191 \pm 26\%$, $n=6$, $p=0.015$, paired t test)、野生型とトランスジェニックマウス間に有意な差はなかった ($p=0.55$, unpaired t test)。また、8-10 週齢においては、いずれでも脱分極後の mIPSC の頻度の有意な上昇は認められなかった (野生型, 98.8% : 脱分極刺激から 5 分後, $n=4$, $p=0.25$; $\gamma 2pepV$, $96 \pm 4\%$, $n=5$, $p=0.45$, paired t test)。これらの結果は、 $\gamma 2pepV$ マウスの抑制性シナプスは、RP は障害されていたが、他の性質は野生型と同様であることを示している。

$\gamma 2pepV$ マウスにおける興奮性シナプスとその他の電気生理学的特性

プルキンエ細胞における GABA 作動性の入力、登上繊維の投射選択制御に関わることが報告されている (Nakayama et al., 2012)。そこで、次に 22-24 日齢の $\gamma 2pepV$ マウスにおいて、プルキンエ細胞における登上線維の投射パターンを調べた。野生型マウスにおいては、1本の登上線維だけが 1 つのプルキンエ細胞に投射することが知られている (Kano and Hashimoto,

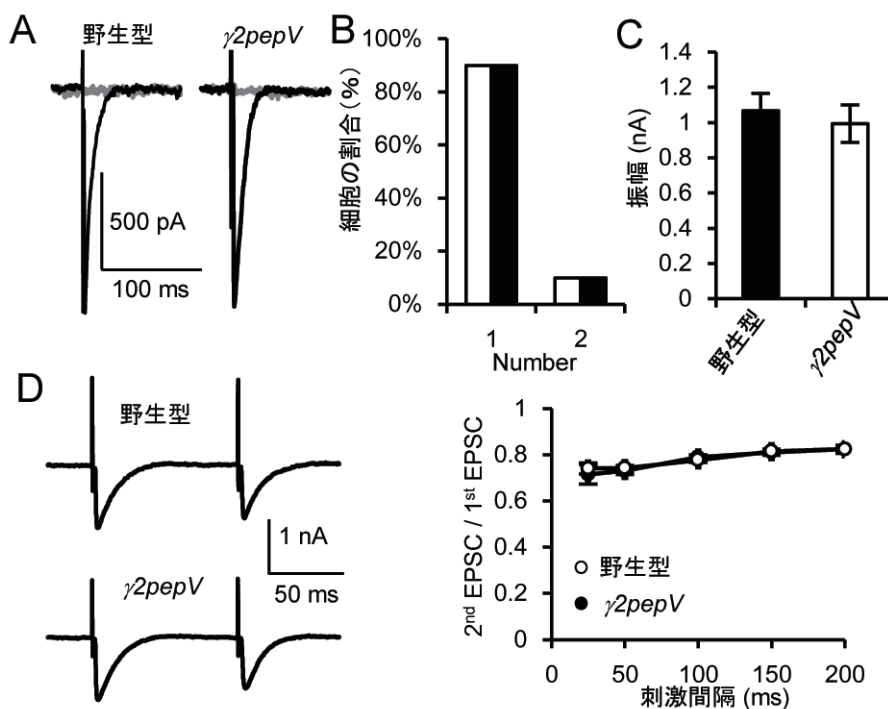
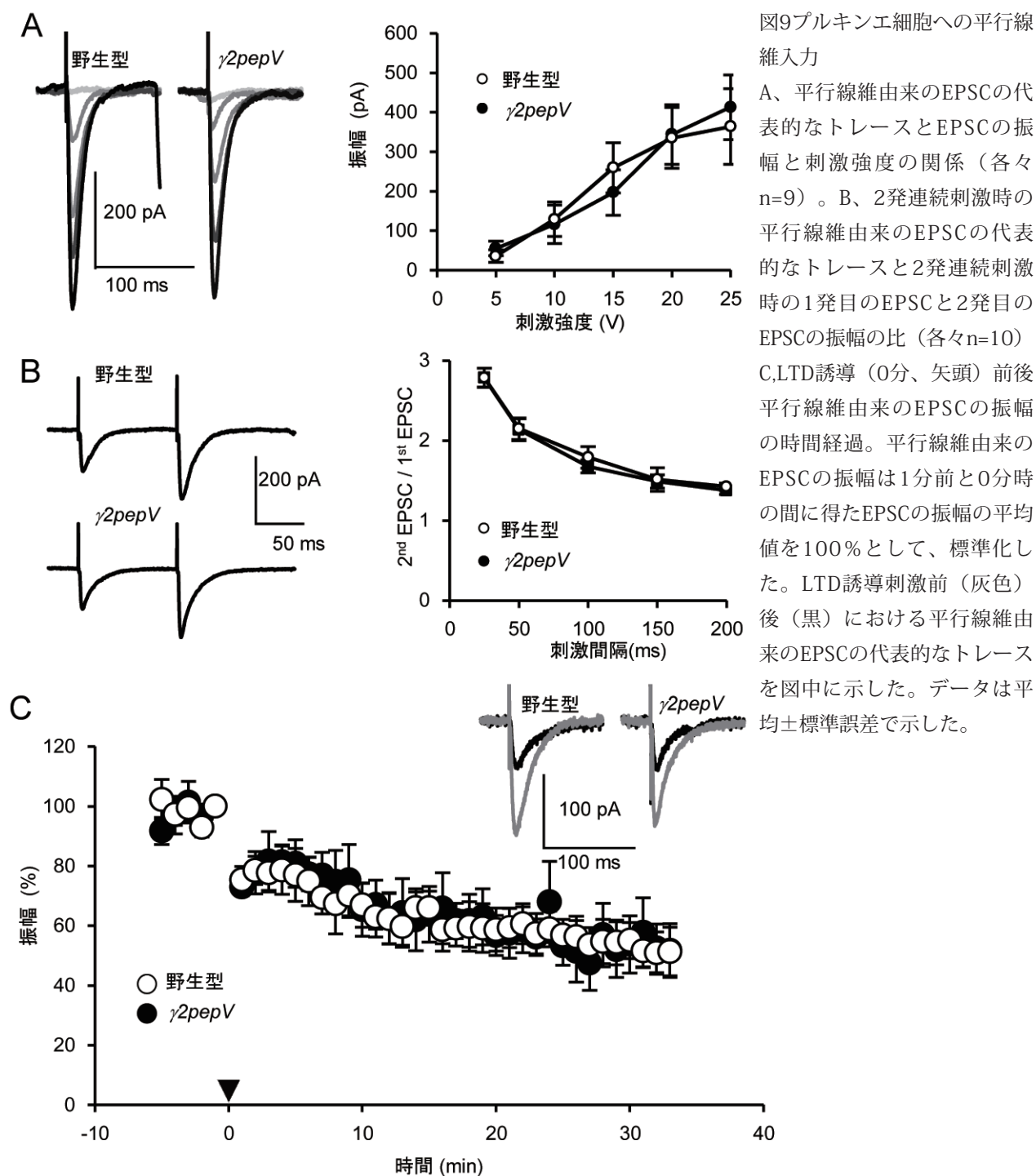


図8プルキンエ細胞への登上線維入力

A-C、プルキンエ細胞から記録して登上線維由来のEPSCの代表的なトレース (A)、EPSCの振幅のステップ数 (B)、及びEPSCの最大値 (各々 $n=20$) (C)。D、2発連続刺激時の登上線維由来のEPSCの代表的なトレースと2発連続刺激時の1発目のEPSCと2発目のEPSCの振幅の比 (各々 $n=10$)。データは平均 \pm 標準誤差で示した。

2012)。登上線維を刺激して興奮性シナプス後電流（EPSC）を記録したところ、EPSCを引き起こす刺激強度の閾値（野生型 $15.9 \pm 3.6V$, $n=10$; $\gamma 2pepV$, $14.4 \pm 3.0V$, $n=10$, $p=0.75$, unpaired t test）、EPSCの振幅のステップ数（図8A,B, $p=1.0$, Fisher's exact probability test）、観測されたEPSCの最大値（図8C, $p=0.61$, paired t test）及び、2連続刺激に対するEPSCの振幅の比（図8D, $p=0.65$, ANOVA）に有意な差は認められなかった。

次に平行線維入力を調べた。平行線維に対する刺激強度とEPSCの振幅の相関（図9A, $p=$



0.65, ANOVA) 及び、2連続刺激に対するEPSCの振幅の比(図9B, $p = 0.45$, ANOVA)は野生型とトランスジェニックマウス間で同様だった。次に、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスLTDを調べたが、 $\gamma 2pepV$ マウスでも野生型と同様のLTDが誘導され(図9C, $52 \pm 9\%$: 誘導刺激後33分, $n=5$, $p=0.001$; $\gamma 2pepV$ $52 \pm 8\%$, $n=5$; $p=0.022$, paired t test)、LTD誘導刺激後33分後における平行線維由来のEPSCの振幅に有意な差は認められなかった($p=0.98$, unpaired t test)。以上から、 $\gamma 2pepV$ マウスのプルキンエ細胞上の興奮性シナプス伝達は野生型と同等であることが分かった。

プルキンエ細胞の他の電気生理学的特性についても検討した。プルキンエ細胞の自発的発火頻度(図10A, B)、そのパターン(図10C, D)、プルキンエ細胞に注入した電流量とその時の発火頻度の相関について有意な差は認められなかった(図10E, $p=0.27$, ANOVA)。細胞内記録法による影響を検証するために、自発的発火頻度は、パッチクランプ法のセルアタッチモードでも測定したが、ホールセル状態と同様であった。また、活動電位の振幅、立ち上がり

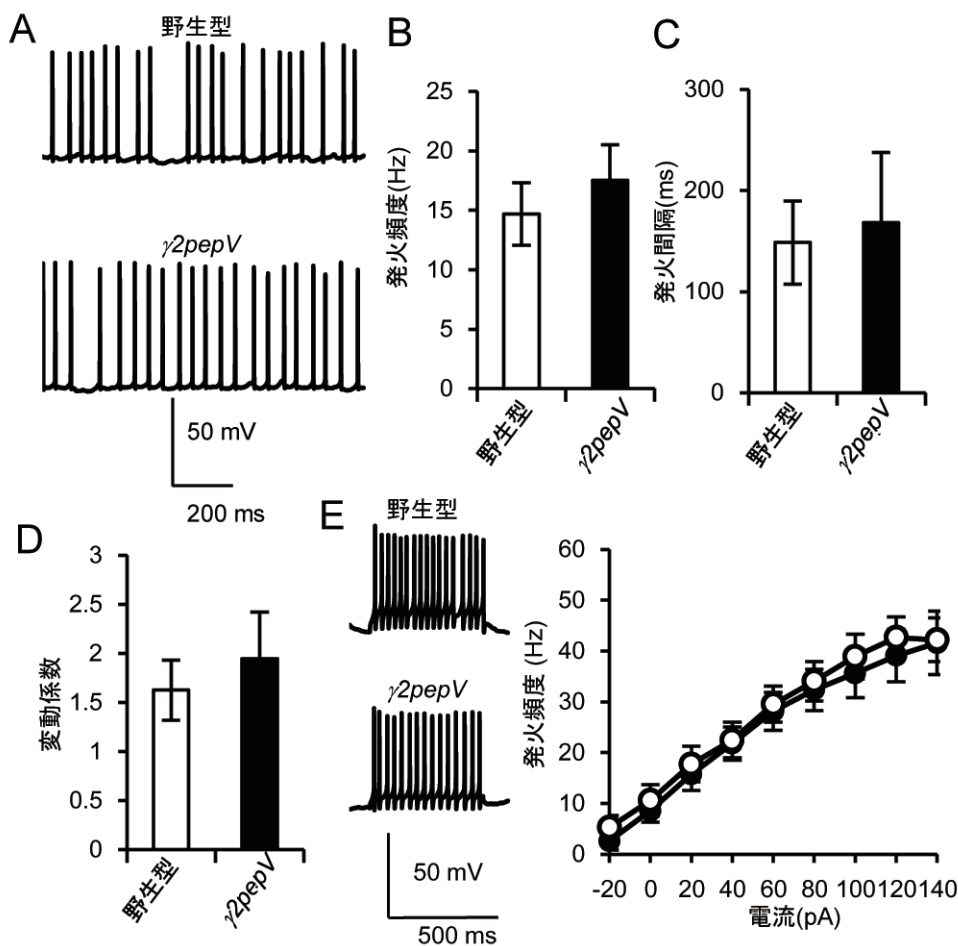


図10プルキンエ細胞の発火特性。
A、単純スパイクの代表的なトレース。B-D、電流固定方によって記録した自発的な活動電位頻度(B)、発火間隔(C)とその変動係数(D)。E、140pA、500msの電流を注入した時の膜転移変化の代表的なトレースと、注入電流量と発火頻度の関係($n=10$ づつ)。データは平均±標準誤差で示した。

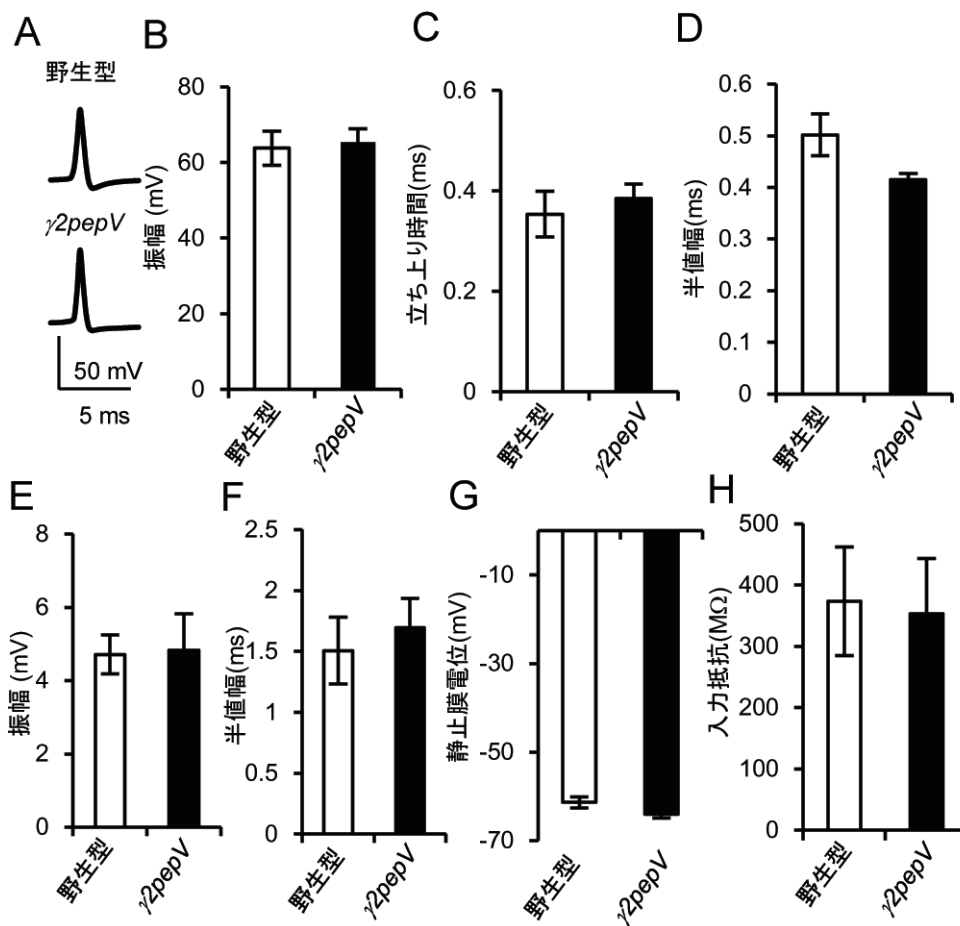


図11プルキンエ細胞の電気生理学的特性。
 A-H、活動電位の代表的なトレース (A)、活動電位振幅 (B)、10-90% 立ち上り時間 (C)、半値幅 (D)。A、各々の活動電位のトレースは10回のイベントを平均化したものである。E,F、後過分極の振幅 (E)と半値幅 (F)。L,M、プルキンエ細胞の静止膜電位 (G)及び入力抵抗 (H) (各々n=7)。各値については、平均±標準誤差で示した。また、ここで示したデータにトランスジェニックマウス・野生型マウス間で有意な差は認められなかった。(unpaired t test)。データは平均±標準誤差で示した。

り時間、半値幅、閾値 (49 ± 2 mV; $\gamma 2pepV$, 48 ± 1 mV, $p=0.73$, unpaired t test) も、野生型とトランスジェニックマウス間で差は認められなかった (図11A-H)。また、活動電位の後過分極の振幅と時間経過も同様であった (図11E,F)。さらに、静止膜電位・入力抵抗もトランスジェニックマウスに異常は認められなかった (図11G,H)。以上から、 $\gamma 2pepV$ マウスにおいては、電気生理学特性も野生型と同等と判断した。

反射性眼球運動の動特性

RP障害の運動制御への影響を定量的に評価するために、反射性眼球運動であるVORとOKRを調べた。VORとOKRは頭部回転時に眼球の回転を制御し、視野のブレを防ぐ反射である。VORとOKRはマウスを固定した回転台、または白黒の縦縞模様のあるスクリーンの水平面での正弦波状回転によって誘導した。VORとOKRの動特性は、2種のパラメーター、利得と位相を測定して定量化した (図12)。利得は眼球回転の最大角速度を、頭部回転もしくはスクリーン回

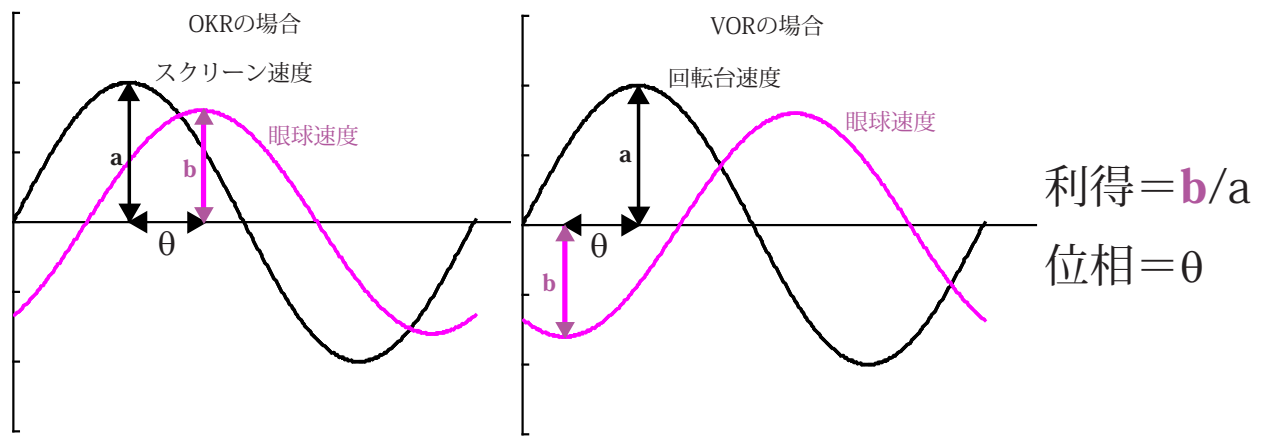


図12 VORとOKRの利得と位相

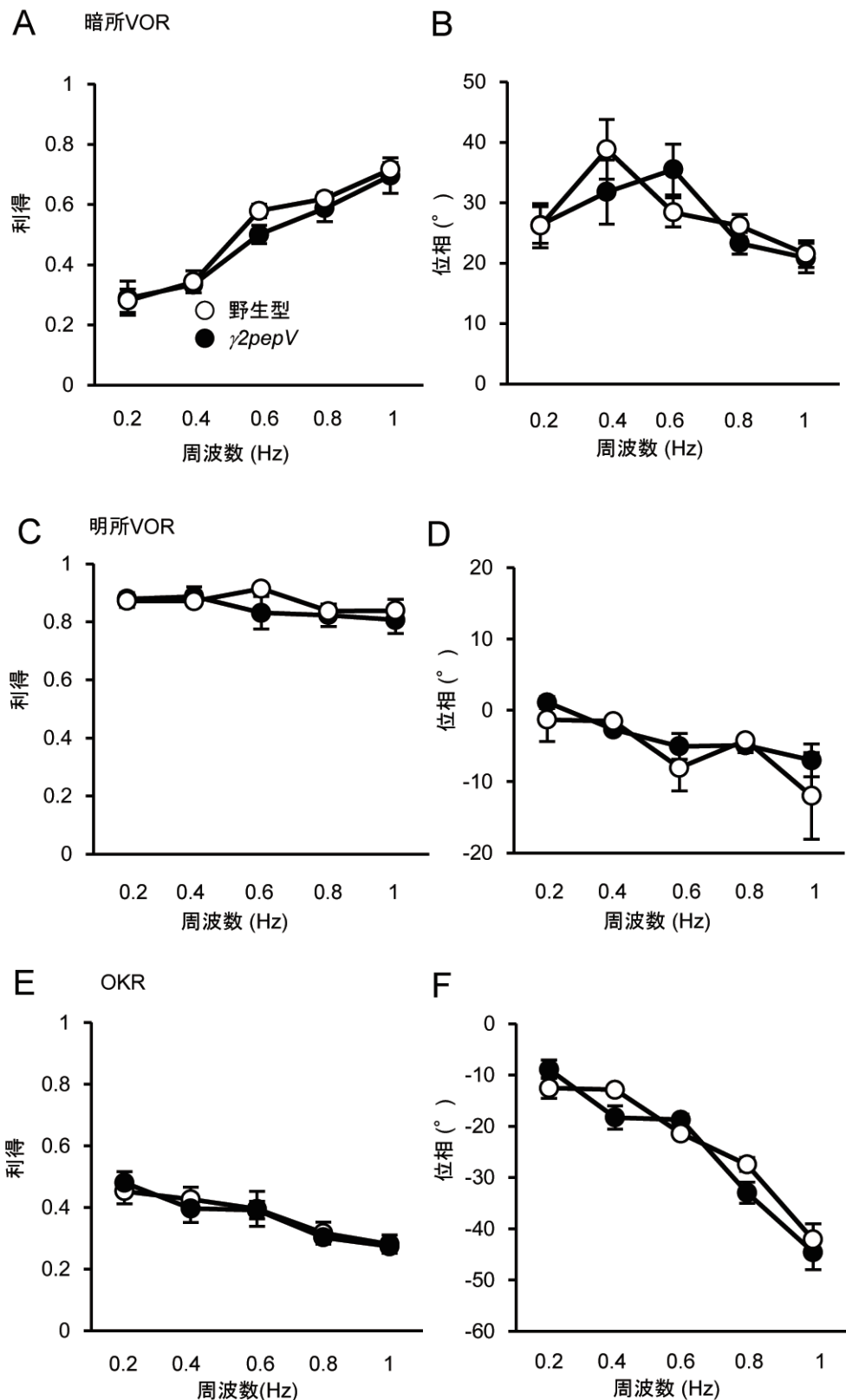
VORとOKRの利得・位相を示す模式図。OKRではスクリーン回転とほぼ同位相に眼球は回転し、VORでは眼球は回転台とほぼ逆位相に回転する。記録したスクリーン・回転台および眼球の速度を正弦関数で近似して、利得及び位相の2つのパラメータを求めた。利得はスクリーン・回転台速度と眼球速度の振幅の比、位相はスクリーン・回転台速度と眼球速度の位相差である。OKRの位相は、同位相の最大値同士の位相差を、VORでは逆位相の位相差を計算した。位相はスクリーン・回転台に対して眼球が遅れる場合に負の値とし、早まる場合には正の値とした。

転の最大角速度で除算することで求めた。位相は眼球運動と頭部回転もしくはスクリーン回転の位相差として求めた。最大角速度は 10° /秒に固定し、正弦波状の回転刺激の周波数を変化させ、利得と位相を暗所VOR・明所VOR・OKRについて測定した。回転刺激の周波数を増やすと利得は暗所VORにおいて増加（図13A, $p = 0.28$, ANOVA）、明所VORにおいて変化は小さく（図13C, $p=0.32$, ANOVA）、OKRでは減少した（図13E, $p=0.82$, ANOVA）。この動特性はトランスジェニックマウスでも野生型マウスでも同様であった。位相の特性についても、両者間に有意な差は認められなかった（図13B,D,E, 暗所VOR, $p=0.76$; 明所VOR, $p=0.30$; OKR, $p=0.28$, ANOVA）。

$\gamma 2pepV$ マウスにおけるVOR適応の障害

VORは小脳依存的に適応を示すことが知られている (Robinson, 1981; du Lac et al., 1995; Boyden et al., 2004; Ito, 2012)。正弦波状頭部回転刺激を、スクリーン回転刺激と反対方向もしくは同方向に動かすことで、VORの利得を増加または減少させることができる。これらの変化は視野のブレを防ぐ方向に働くため、適応現象とみなせる。このVOR適応は、小脳依存的な運動学習の例としてよく研究されてきた。そこで、 $\gamma 2pepV$ マウスにおけるVOR適応を調べた。

図13 $\gamma 2pepV$ マウスにおけるVORとOKRの動特性。
 野生型 (n=5) 及び $\gamma 2pepV$ マウス (n=5) での暗所VOR (A, B)・明所VOR (C, D)・OKR (E, F) の動特性。頭部回転もしくはスクリーン回転刺激の周波数の変化に対する利得 (A, C, E) と位相 (B, D, F) を示した。データは平均±標準誤差で示した。



正弦波状の回転台とスクリーン回転の逆位相組み合わせ刺激を1時間与えると (VOR利得上昇訓練)、野生型のマウスでは、暗所VORの利得は 0.62 ± 0.03 から 0.80 ± 0.04 へと増加し (図14A, B, n=5, p=0.023, paired t test)、位相はわずかではあるが $27 \pm 2^\circ$ から $23 \pm 2^\circ$ まで減少した (図14C, n=5, p<0.01, paired t test)。一方、 $\gamma 2pepV$ マウスにおいては、VOR利

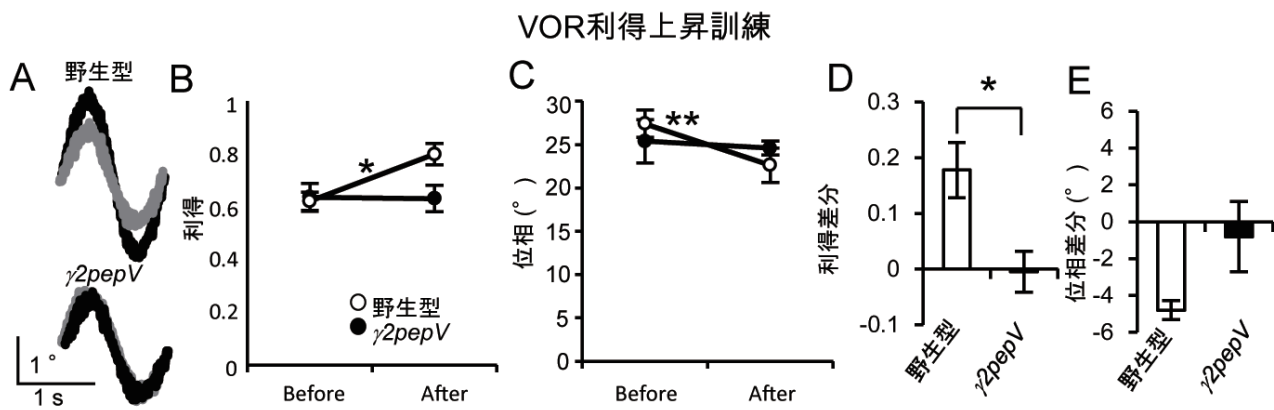


図14 $\gamma2pepV$ マウスにおけるVOR利得上昇適応の障害

眼球位置のトレースの代表例 (A) は10周期分を平均化し、訓練前を灰色で後を黒で示した。VOR適応訓練前後における利得 (B) と位相 (C) の変化を示した (各々n=5)。野生型においてVOR利得上昇訓練後、利得は有意に増加し (B)、位相は有意に減少したが (C)、 $\gamma2pepV$ マウスはそのような変化を生じなかった。訓練前後の利得の変化量は、トランスジェニックマウスと野生型マウス間で有意な差があったが (D)、位相の変化量にはそのような差は認められなかった (E)。データは平均±標準誤差で示した。B, C, *p<0.05 (訓練前後での有意差) **p<0.01 (訓練前後での有意差) D, *p<0.05 (トランスジェニックマウスと野生型マウス間での有意差)。

利得上昇訓練後、暗所VORの利得は 0.64 ± 0.05 から 0.63 ± 0.05 になり (図14A,B, n=5, p =0.90, paired t test)、位相は $25 \pm 3^\circ$ から $25 \pm 1^\circ$ となった (図14C, p=0.78, paired t test)。そのため、VOR利得上昇訓練による暗所VORの利得の変化量はトランスジェニックマウスの方が野生型マウスより小さかった (図14D, 野生型, 0.18 ± 0.05 ; $\gamma2pepV$, 0.01 ± 0.04 ; p=0.018, unpaired t test)。一方、位相の変化量には有意差は認められなかった (図14E, 野生型, $5 \pm 1^\circ$; $\gamma2pepV$, $1 \pm 2^\circ$; p= 0.19, unpaired t test)。一般的に、VORの利得増加もしくは減少は位相先行の減少、増加がそれぞれ伴って起こる傾向があるが、利得と位相は独立に制御され得ることが報告されている (Kato et al., 2008)。

次に、回転台とスクリーン回転の同方向組み合わせ刺激によるVOR利得下降訓練を調べた。この訓練により野生型マウスにおいては、暗所VORの利得が 0.60 ± 0.03 から 0.38 ± 0.02 まで減少し (図15A,B, n=5, p<0.001, paired t test)、位相は $28 \pm 2^\circ$ から $42 \pm 4^\circ$ まで増加した (図15C, p<0.01, paired t test)。一方、 $\gamma2pepV$ マウスにおいては、暗所VORの利得は 0.60 ± 0.03 から、 0.38 ± 0.02 へと減少し (図15A,B, n=5, p<0.001, paired t test)、位相は $28 \pm 2^\circ$ から $42 \pm 4^\circ$ に増加した (図15C, p<0.01, paired t test)。しかし、この訓練による暗所VORの利得の変化量は $\gamma2pepV$ マウスが野生型と比べて、優位に小さかった (図15D, 野生型, 0.34

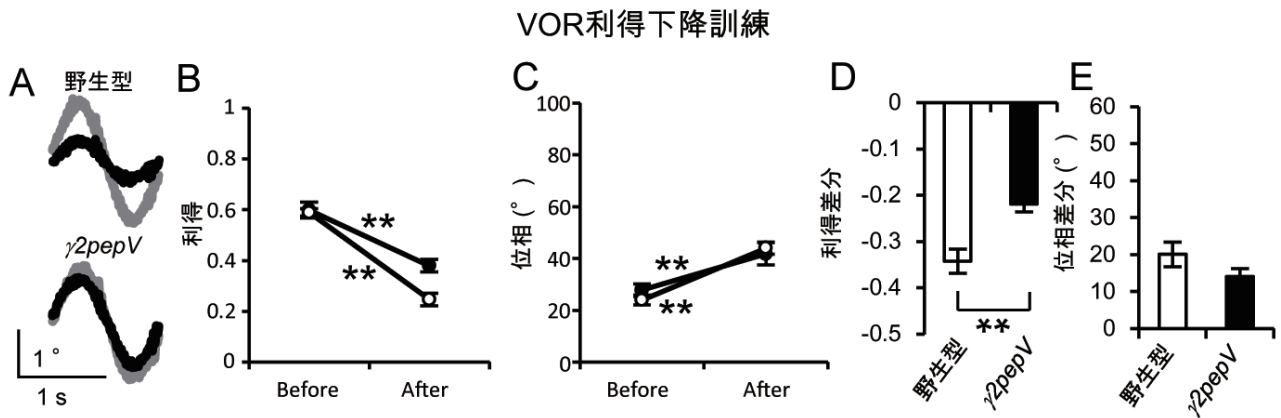


図15 $\gamma2pepV$ マウスにおけるVOR利得下降適応の障害

眼球位置のトレースの代表例 (A) は10周期分を平均化し、訓練前を灰色で後を黒で示した。VOR適応訓練前後における利得 (B) と位相 (C) の変化を示した (各々n=5)。野生型と $\gamma2pepV$ マウスにおいて、VOR利得下降訓練後、利得は有意に減少し (B)、位相は有意に増加した (C)。しかし、訓練前後の利得の変化量は、トランスジェニックマウスと野生型マウス間で有意な差があったが (D)、位相の変化量にはそのような差は認められなかった (E)。データは平均±標準誤差で示した。B, C, **p<0.01 (訓練前後での有意差) D, **p<0.01 (トランスジェニックマウスと野生型マウス間での有意差) を示した。

±0.03; $\gamma2pepV$, 0.22 ± 0.02, p<0.01, unpaired t test)。一方、位相の変化量については有意な差は認められなかった (図15E, 野生型, 20 ± 3° ; $\gamma2pepV$, 14 ± 2° , p=0.17, unpaired t test)。以上の結果から、 $\gamma2pepV$ マウスでは、VOR利得増加、減少の適応の両者が障害されていることが分かった。一方、位相の適応には差が認められなかった。

$\gamma2pepV$ マウスのOKR適応

OKRでも適応応答現象が起こる。正弦波状のスクリーン回転刺激を与え続けることで、OKRの利得は増加し、位相の遅れは減少する。この変化により、マウスはスクリーンの動きをより良く追従できるようになる。1時間のOKR訓練により、OKRの利得は野生型において、0.26 ± 0.03から0.52 ± 0.06まで増加し (図16A,B, n=7, p<0.01, paired t test)、その位相は-27 ± 2° から-18 ± 7° まで変化した (図16C, p<0.01, paired t test)。 $\gamma2pepV$ マウスはOKRの利得が0.28 ± 0.02から0.53 ± 0.02に増加し (図16A,B, p<0.001, paired t test)、その位相は-27 ± 2° から-19 ± 1° に変わった (図16C, p<0.01, paired t test)。これらの利得の変化量 (図16D, 野生型, 0.26 ± 0.06; $\gamma2pepV$, 0.25 ± 0.03, p=0.86) 及び位相の変化量 (図16E, 野生型, 9 ± 2° ; $\gamma2pepV$, 8 ± 2° , p=0.67, unpaired t test)は、野生型とトランスジェニックマウス間で有

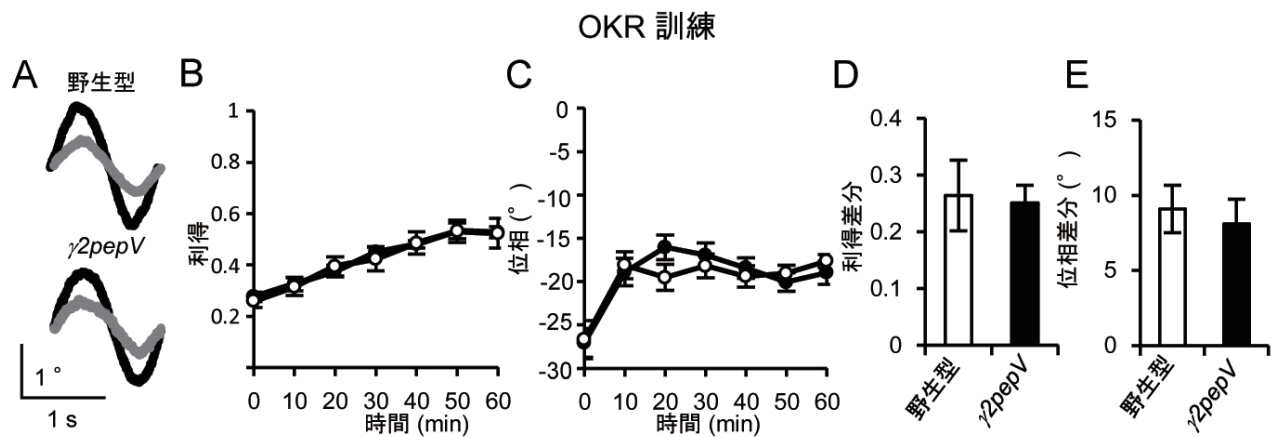


図16 $\gamma 2pepV$ マウスにおけるOKR適応

眼球位置のトレースの代表例 (A) は10周期分を平均化し、訓練前を灰色で後を黒で示した。OKR適応訓練前後における利得 (B) と位相 (C) の変化を示した (各々n=7)。野生型マウスと $\gamma 2pepV$ マウスにおいて、OKRの訓練後の利得と位相は有意に増加した (B,C)。しかし、訓練前後の利得と位相の変化量は、トランスジェニックマウスと野生型マウス間に有意な差は認められなかった (D,E)。データは平均±標準誤差で示した。

意な差がなかった。以上から、RPを特異的に障害されたトランスジェニックマウスは、VOR適応は障害されているが、OKRは正常に起こると判断した。

もう1系統のトランスジェニックマウス

トランスジェニックマウスの表現系は、トラスジーンの挿入部位に依存して異なる可能性がある。そこで、B系統のトランスジェニックマウスについても表現系を調べた。B系統のマウスは、A系統と比べて、融合タンパク質の発現が弱かったため (図17A)、ホモ接合型マウスを用いて検討した。

RP誘導刺激により、mIPSCの振幅は野生型では $144 \pm 7\%$ (図17B, n=5, $p < 0.01$, paired t test) まで増加したのに対し、B系統マウスでは $103 \pm 5\%$ (図17B, n=5, $p = 0.14$, paired t test) になった。従って、B系統マウスにおいてもRPが障害されていることが確認できた。RP誘導刺激前のmIPSCの振幅・頻度及びRP誘導刺激による頻度の変化は、野生型とトランスジェニックマウス間で同様であった (表1)。

B系統のマウスを用いて、反射性眼球運動も調べた。A系統のマウスと同様に、B系統トランスジェニックマウスの反射性眼球運動の基本動特性も野生型と同様であった (表1)。VOR利得上昇訓練により、野生型では暗所VORの利得が 0.67 ± 0.03 から 0.84 ± 0.06 まで増加

したが (n=10, p= 0.01, paired t test)、B系統トランスジェニックマウスにおいては、VOR利得上昇訓練前後の利得は、 0.68 ± 0.03 と 0.69 ± 0.07 であった (n=10, p=0.90, paired t test)。従って、A系統と同様にB系統でもVOR利得上昇適応を示さなかった (図18A, 表1)。VOR利得下降訓練によって、野生型では利得が 0.77 ± 0.03 から 0.39 ± 0.04 まで減少したが (n=8, p<0.001, paired t

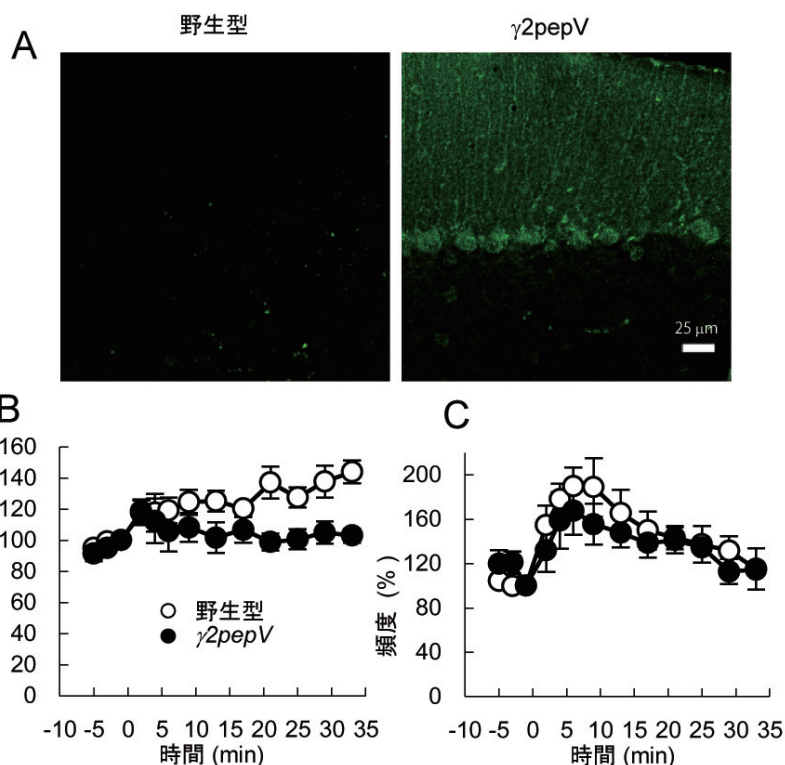


図17 $\gamma 2pepV$ マウスB系統の融合タンパク質の発現とRP障害
A, Venusに対する免疫染色画像 (緑)。B,Cプルキンエ細胞から得られたmIPSCの振幅の平均 (A) と平均頻度 (B) (各々n=5)。RP誘導刺激は0分時に与えた。データは平均±標準誤差で示した。

Experiments	野生型	$\gamma 2pepV$	p value
mIPSCの振幅	32 ± 9 pA (n = 5)	24 ± 4 pA (n = 5)	0.47
mIPSCの頻度	3.9 ± 0.7 Hz	3.5 ± 1.0 Hz	0.76
VOR 利得-increase 訓練 (利得, 訓練前)	0.67 ± 0.03 (n = 10)	0.68 ± 0.026 (n = 10)	0.87
VOR 利得-increase 訓練 (利得, 訓練後)	0.84 ± 0.06 (n = 10)	0.71 ± 0.07 (n = 10)	0.08
VOR 利得-increase 訓練 (利得差分)	0.17 ± 0.04 (n = 10)	0.04 ± 0.06 (n = 10)	0.03
VOR 利得-increase 訓練 (位相, 訓練前)	18 ± 1 degrees (n = 10)	18 ± 1 degrees (n = 10)	0.85
VOR 利得-increase 訓練 (位相, 訓練後)	15 ± 1 degrees (n = 10)	17 ± 2 degrees (n = 10)	0.44
VOR 利得-increase 訓練 (位相差分)	-2.4 ± 1.3 degrees (n = 10)	-0.84 ± 1.5 degrees (n = 10)	0.45
VOR 利得-decrease 訓練 (利得, 訓練前)	0.76 ± 0.03 (n = 10)	0.68 ± 0.03 (n = 10)	0.07
VOR 利得-decrease 訓練 (利得, 訓練後)	0.39 ± 0.04 (n = 8)	0.47 ± 0.04 (n = 8)	0.20
VOR 利得-decrease 訓練 (利得差分)	-0.34 ± 0.05 (n = 8)	-0.19 ± 0.04 (n = 8)	0.03
VOR 利得-decrease 訓練 (位相, 訓練前)	16 ± 3 degrees (n = 8)	17 ± 2 degrees (n = 8)	0.77
VOR 利得-decrease 訓練 (位相, 訓練後)	24 ± 3 degrees (n = 8)	27 ± 3 degrees (n = 8)	0.51
VOR 利得-decrease 訓練 (位相差分)	8.2 ± 1.8 degrees (n = 8)	9.7 ± 1.5 degrees (n = 8)	0.54
OKR 訓練 (利得, 訓練前)	0.33 ± 0.02 (n = 10)	0.33 ± 0.02 (n = 10)	0.96
OKR 訓練 (利得, 訓練後)	0.53 ± 0.03 (n = 10)	0.6 ± 0.03 (n = 10)	0.15
OKR 訓練 (利得差分)	0.15 ± 0.06 (n = 10)	0.26 ± 0.03 (n = 10)	0.16
OKR 訓練 (位相, 訓練前)	-28 ± 1 degrees (n = 10)	-28 ± 1 degrees (n = 10)	0.86
OKR 訓練 (位相, 訓練後)	-19 ± 1 degrees (n = 10)	-18 ± 1 degrees (n = 10)	0.88
OKR 訓練 (位相差分)	10 ± 2 degrees (n = 10)	11 ± 3 degrees (n = 10)	0.83

表1 野生型と $\gamma 2pepV$ マウスB系統での各種計測値の比較
データは平均±標準誤差で示した。

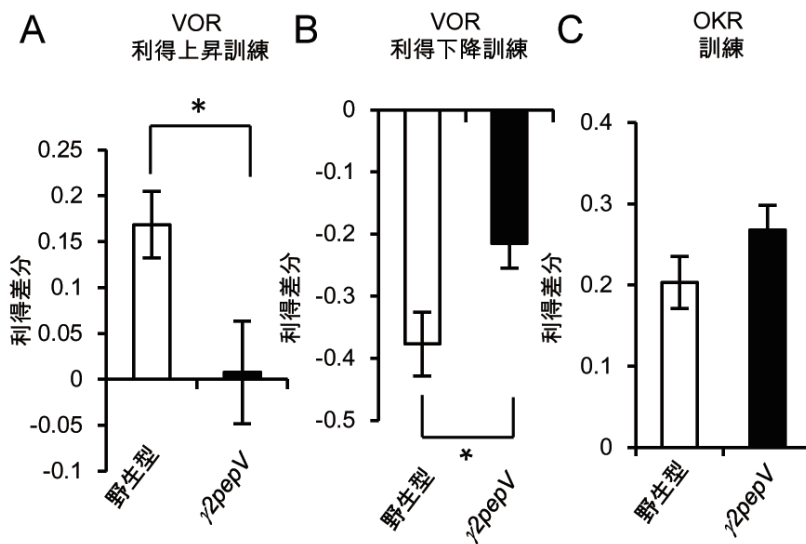


図18 $\gamma 2pepV$ マウスB系統の反射性眼球運動の適応変化

A-C VOR利得上昇訓練（各々n=10）（A）、VOR利得下降訓練（各々n=8）（B）、OKR適応訓練（各々n=10）（C）前後の利得の変化量。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ を表す。

test)、B系統トランスジェニックマウスにおいては 0.68 ± 0.03 から 0.47 ± 0.04 まで減少した (n = 8, $p < 0.001$, paired t test)。VOR利得下降適応はトランスジェニックマウスでも起こったことになるが、VOR利得下降訓練による暗所VORの利得の変化量は、野生型マウスと比べB系統で優位に小さかった(図18B, 表1)。位相の変化に関しては、野生型とトランスジェニックマウス間で有意な差は認められなかった。また、OKR適応に関しても、野生型マウスとB系統トランスジェニックマウスで同程度に起こった(図18C, 表1)。

これらの結果から、 $\gamma 2pepV$ トランスジェニックマウスでは、RPが特異的に阻害され、VOR適応に障害をきたすが、OKR適応は正常であることが分かった。以上の結果を総合して、RPは一部の運動学習に寄与することが判明した。

考察

RPの動物個体内での役割を調べるために、Venusと融合した $\gamma 2$ ペプチドを小脳プルキンエ細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。この $\gamma 2pepV$ マウスにおいて、RPの障害を確認した。プルキンエ細胞の電気生理学的特性及び小脳皮質構造に異常がないことも確認した。また、 $\gamma 2pepV$ マウスは正常なVOR、OKRの基本動特性を示し、またOKR適応も正常であった。しかしながら、 $\gamma 2pepV$ マウスでは、VOR利得上昇適応とVOR利得下降適応の両者が抑制されていた。これらの結果から、小脳抑制性シナプス可塑性であるRPはある種の運動学習に重要な寄与をすることが明らかになった。

小脳シナプス可塑性と運動学習

小脳皮質・小脳核もしくは前庭核で起こるシナプス可塑性は、運動学習に重要な寄与をされると考えられてきた(Hansel et al., 2001; Boyden et al., 2004; Dean et al., 2010; Gao et al., 2012; Ito, 2012; Hirano, 2013)。特に、グルタミン酸作動性である平行線維-プルキンエ細胞間興奮性シナプスで起こるLTDは、運動学習のシナプスメカニズムの有力な候補として、多くの神経科学者の興味を引いてきた。LTDが障害されたまたは亢進した遺伝子改変マウスの運動学習は、抑制または促進されると報告されている(Aiba et al., 1994; De Zeeuw et al., 1998; Hansel et al., 2006; Kina et al., 2007; Takeuchi et al., 2008)。しかしながら、LTDが障害されていながらも、正常な運動学習を示す例が報告され(Welsh et al., 2005; Schonewille et al., 2011)、運動学習におけるLTDの役割について疑問符が付けられた。LTD以外の小脳シナプス可塑性として、平行線維-プルキンエ間LTP、平行線維-分子層介在ニューロン間で起こるLTPとLTD、プルキンエ細胞上の抑制性シナプスでの可塑性が知られている。それらの運動学習への寄与が示唆されたが、一部を除いて実験的な明確な根拠は報告されていない(Boyden et al., 2004; Dean et al., 2010; Gao et al., 2012; Hirano, 2013)。登上線維の入力は、RPとLTD両者を誘導し、両者はともにプルキンエ細胞の活動を下げる方に働くため、RPはLTDと共に運動学習に

寄与する可能性がある。プルキンエ細胞が抑制性出力を投射する小脳核または前庭核におけるシナプス可塑性も運動学習に寄与するのではないかと示唆されている。(du Lac et al., 1995; Pugh and Raman, 2006)。

プルキンエ細胞上の抑制性シナプス伝達

プルキンエ細胞は、平行線維からの投射を受ける分子層介在ニューロン（星状細胞及び籠状細胞）から抑制性シナプス入力を受ける。そのため、星状細胞及び籠状細胞は、プルキンエ細胞にフィードフォワード抑制回路を形成していることになる。これら抑制性シナプス伝達を、プルキンエ細胞特異的にGABA_AR γ 2サブユニットをノックアウトすることで阻害すると、ある種のVOR適応が抑えられることが報告されている(Wulff et al., 2009)。したがって、この抑制性シナプス伝達は正常な運動学習に必須である。この抑制シナプスでは、depolarization-induced suppression of inhibition (DSI)、DPI、RPの3種類の可塑性が報告されている。DSIはエンドカンナビノイドを介して、シナプス前部からのGABA放出が短期間抑えられる可塑性である(Yoshida et al., 2002)。DPIは、シナプス前部にあるNMDAグルタミン酸受容体を介して、GABAの放出が上昇する可塑性である。DPIはRPと共に抑制性シナプス伝達効率を上昇させるが、RPほど持続しない(Duguid and Smart, 2004)。RPは追従眼球運動の適応に関して理論モデルに組み込まれた例はあるが(Yamamoto et al., 2002)、その運動制御と学習への関与を実験的に示した報告はない。

本研究によって、 γ 2ペプチドのプルキンエ細胞特異的発現によるRPの障害が、VOR利得の適応に影響を及ぼすことが示された。 *γ 2pepV*マウスは、RP以外の電気生理学的特性と小脳皮質構造には明らかな異常を引き起こさず、DPI及びLTDにも影響を与えなかった。これらの結果から、 *γ 2pepV*マウスではRPは特異的に障害されており、RPが運動学習に寄与することを示せたと考えている。

RP障害によるVOR適応とOKR適応に対する異なる影響

VOR適応は、運動学習のモデルとして数種の実験動物で研究されてきた(Robinson, 1981; Ito, 1982; du Lac et al., 1995; Boyden et al., 2004; Ito, 2012)。VOR適応へのLTDの関与が示唆されているが、平行線維—プルキンエ細胞間LTPや前庭核内のシナプス可塑性など、他のシナプス可塑性の関与を示唆する報告もある(Miles and Lisberger, 1981; Boyden and Raymond, 2003; Schonewille et al., 2010)。本研究では、RPが障害された $\gamma 2\text{pepV}$ マウスでVOR利得適応が障害されていることを示し、RPもVOR適応に何らかの寄与をしていることが示唆される。しかしながら、VOR利得下降適応に関しては、 $\gamma 2\text{pepV}$ マウスにおいてもある程度の適応が起こり、他のシナプス可塑性も関与していると考えられる。

OKR適応はウサギ及び齧歯類で主に研究されてきた(Collewijn and Grootendorst, 1979; Nagao, 1988; Katoh et al., 2000; Shutoh et al., 2002; Hansel et al., 2006; Endo et al., 2009)。LTD誘導に関わる分子である一酸化窒素合成酵素・1型代謝型グルタミン酸受容体・カルシウムカルモジュリン依存性リン酸化酵素II α ・Gサブストレートのノックアウトマウスで、OKR適応が阻害されることが報告されている。また、デルフィリンノックアウトマウスではLTD誘導がされやすくなっており、OKR適応も亢進すると報告されている(Takeuchi et al., 2008)。これらの報告は、OKR適応とLTDの相関を示している。本研究で用いたPR障害トランスジェニックマウスではOKR適応が正常に起こった。この結果は、RPはVOR適応には関わるが、OKR適応へは関与していないことを示唆する。VOR適応とOKR適応で、関与するシナプス可塑性が異なる可能性が考えられる。これまでも、複数のシナプス可塑性がVOR適応とOKR適応の各々に関わることが示唆されている(Faulstich et al., 2006)。LTD等小脳皮質の可塑性は、VOR適応やOKR適応において、数日間の長期な学習より、数時間程度のより短期の学習に重要であることも報告されている(van Alphen and De Zeeuw, 2002; Okamoto et al., 2011)。本研究では、短期間の学習についてのみ検討したため、長期の学習へのRPの寄与は不明である。OKRの長期の学習には、前庭核内のシナプス可塑性が重要な働きをしていることが示唆されている(Okamoto et al., 2011)。

哺乳類中枢神経系における抑制性シナプス可塑性の役割

哺乳類中枢神経系において興奮性シナプス可塑性の果たす役割はよく研究されてきているが、抑制性シナプス可塑性に関する研究はあまり行われていない。抑制性シナプス可塑性は、神経回路機能の安定性の維持、高いダイナミックレンジの確保、情報演算の柔軟性に寄与すると考えられている(Castillo et al., 2011; Maffei, 2011; Kullmann et al., 2012)。発生過程の視覚野では、抑制性シナプス伝達の亢進が眼優位円柱の形成に重要であると報告されている(Hensch, 2005)。また、神経病理学的な疾患や中毒行動に、抑制性シナプス可塑性が関与することも報告されている(Nugent and Kauer, 2008)。

材料と方法

トランスジェニックマウスの作製

L7プロモーターを用いたプルキンエ細胞特異的な発現コンストラクトの作製は、以前の報告に従って行った(Smeyne et al., 1995)。L7遺伝子は垣塚博士から譲り受けた(Ikeda et al., 1996)。また、以前報告された $\gamma 2pepV$ 発現ベクター(Kawaguchi and Hirano, 2007)からコード領域をEcoRIとXhoIによって切り出し、T4ポリメラーゼによってその末端を平滑化、pL7 Δ AUGベクター(Smeyne et al., 1995)内のBamHIサイトに挿入した。このL7- $\gamma 2pepV$ 領域は、HindIIIとEcoRIを用いて切り出し、C57BL/6N系統のマウス受精卵へマイクロインジェクションして、トランスジェニックマウスを得た (Accession no. CDB0485T: <http://www.cdb.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html>)。トランスジーンの有存在は、5-GGCACTTCTGACTTGCACTTTCCTTGGTCC-3 と 5-ATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3のプライマーを用いてPCRによって確認した。

免疫抗体染色

8-10週齢の雄マウスをソムノペンチル (50mg/kg, Kyoritsu Pharmacy) で麻酔し、4%ホルムアルデヒドを含むPBSを用いて還流固定した。その後脳を取出し、4%ホルムアルデヒドを含むPBS内で4℃で一晩固定し、さらに30%スクロースを含むPBS内で一晩保管した。矢状断面スライス (50 μ m) は、凍結した小脳からマイクロトームを用いて切り出した。免疫抗体蛍光染色は、以前に報告されている手法に従った(Jiao et al., 1999)。染色には以下の抗体を用いた。ウサギ由来の抗GFP抗体 (Invitrogen)、ウサギ及びマウス由来の抗カルビンジン抗体 (Millipore Bioscience Research Reagents)、マウス由来の抗ニューログラニン抗体 (Millipore Bioscience Research Reagents)、ウサギ由来の抗パルブアルブミン抗体 (Abcam)、Alexa488もしくはAlexa568と結合したヤギ由来の抗マウスもしくはウサギIgG抗体 (Invitrogen)。蛍光画像は共焦点顕微鏡を用いて取得した (FV1000, Olympus)。小

脳皮質の分子層及び顆粒細胞層の幅は、ImageJを用いて1つの切片標本につき10か所で計測した (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)。神経細胞の密度は、神経細胞の個数を細胞を数えた領域の面積で除算することにより求めた。定量には、異なる3個体から切り出した小脳切片を用いた。

共免疫沈降法

免疫沈降実験は、以前に報告された方法に従って行った(Mizokami et al., 2007)。8-10週齢の雄マウスから取り出した小脳を、150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.2% BSA, 0.5% Triton X-100, 1% protease inhibitor mixture (Nacalai), 20mM HEPES-NaOH, pH7.4を含むA緩衝液内でホモジェナイズした。その後、2.5mM 3,3'-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate] と 2.5mM dithiobis[succinimidylpropionate] (Pierce)を含む架橋溶液を加えた後、膜タンパク質を1% Na-deoxycholateを用いて、4℃で30分かけて溶出した。架橋反応は室温で30分間行い、50mM Tris-HCl, pH7.5を加えることで反応を停止した。その後、得られたタンパク質抽出液に約10μgの抗γ2抗体 (Millipore Bioscience Research Reagents) を加え、さらに、プロテインAセファロースビーズ (GE Healthcare) が50%になるように加え総量を20μlにした。このビーズをPBSで2度洗い、20μlの50mM glycine, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100 を含みHClによってpH2.5に調整したglycine bufferに溶出した。glycine buffer内に溶出した液に0.8μl、pH9.0の1M Tris-HClを加えた後、SDS-PAGE用の4% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue, 10mM dithiothreitolを含むSample Bufferを20μl加え、ウエスタンブロットティングを行った。この際に、抗GABARAP抗体 (MBL) ・抗βアクチン抗体 (Sigma) ・HRPの結合した二次抗体 (Millipore Bioscience Research Reagents) を用いた。また、シグナルはSuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce)とLAS-3000 plus gel documentation system (Fujifilm).を用いて検出した。

パッチクランプ記録

スライス標本からのホールセルパッチクランプ記録の方法は、ほぼ以前の報告に従って行った(Kashiwabuchi et al., 1995)。250 μ mの厚さの矢状面スライスを雄雌両者のマウスの小脳から切り出した。多くの実験でスライスは14–18日齢のマウスより切り出したが、一部の実験では22–24日齢または8–10週齢のマウスを用いた。14–18日齢及び22–24日齢のマウスで、130mM NaCl, 4.5mM KCl, 2mM CaCl₂, 5mM HEPES, 33mM glucose を含み NaOH を用いてpH7.4に滴定した溶液内でスライス標本を切り出したが、8–10週齢マウスでは、N-methyl-D-glucamine, 2.5mM KCl, 1.3mM NaH₂PO₄, 30mM NaHCO₃, 2.0mM thiourea, 5.1mM Na-ascorbate, 3.1mM Na-pyruvate, 0.5mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, 25mM glucose, 20mM HEPES を HClで pH7.4に滴定した溶液内でスライスを切り出した。その後、スライスは124mM NaCl, 1.8mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.3mM MgCl₂, 2.5mM CaCl₂, 26mM NaHCO₃, 10mM glucoseを含み、95% O₂と5% CO₂を注入したクレブス溶液内に移し、37度のヒートショックを45分から60分間与えた後、室温（22–24度）で保存して実験に用いた。

特記しない限り、150mM CsCl, 0.5mM EGTA, 10mM HEPES, 2mM Mg-ATP (Sigma), 0.2mM Na-GTP (Sigma)を含みCsOHでpH 7.3に滴定した溶液で満たしたガラス管を用いて、プルキンエ細胞を–70または–80 mVに膜電位固定した。電流記録を行う際には、ガラス電極内の溶液は、140mM D-glucuronic acid, 5mM EGTA, 10mM HEPES, 155mM KOH, 7mM KCl, 2mM Mg-ATP, 0.2mM Na-GTPを含む内液を用いた。ガラス電極は、抵抗が1–4 M Ω のものを用い、ガラス表面をシリコンで覆うことによって、電極の容量成分を減らした。クレブス溶液とK glucuronateを主成分とするガラス電極内容と細胞外液間の境界電位は14mVであり、記録時に補正した。実験は、入力抵抗が150M Ω 以上で直列抵抗が10–25M Ω の状態で行い、入力抵抗または直列抵抗を80ms、-10mVのパルスを与え、1分おきに与えることにより測定した。実験時に入力抵抗または直列抵抗の変化量が20%を超えた時には実験を停止した。IPSCはAMPA/カイニン酸受容体アンタゴニストである10 μ M NBQX (Tocris Bioscience) の存在下で記録した。mIPSCは1 μ MのTTX (Wako) 存在下で活動電位を阻害した状態で記録した。mIPSCはMini Analysis Software (Synaptosoft) を用いて解析し、7pA以上のイベントをmIPSCとし

た。mIPSCの振幅の平均値は、一つのプルキンエ細胞から200個以上のイベントを記録して求めた。RPは、0.5Hz・500 ms・0 mV・5回の脱分極誘導刺激により引き起こした。誘導IPSCは、水平面に切り出したスライス（250 μ m）のプルキンエ細胞を-20mVに電位固定した状態で、クレブス溶液で満たされたガラス管刺激電極を分子層に置き、50 μ sの電位パルスを用いて刺激し、記録した。

EPSCは20 μ MのGABA_ARのアンタゴニストであるbicuculline（Sigma）の存在下で記録した。平行線維由来のEPSCは、分子層に置いたガラス電極から50–200 μ sの電位パルスを加えて引き起こした。LTDを誘導する際に、50ms・0mVの脱分極パルスと脱分極パルスの開始から15ms後に平行線維入力を同期させる組み合わせ刺激を、1 Hzで10回与えた。平行線維由来のEPSCは0.05Hzで記録した。登上線維刺激は、22–24日齢のマウスから得たスライス of プルキンエ細胞細胞体から50 μ m以内の顆粒細胞層にガラス電極を置いて刺激を加えた。22–24日齢では、一つのプルキンエ細胞は一本の登上線維のみから入力を受けていることが報告されている(Nakayama et al., 2012)。登上線維由来のEPSCは - 20mVに電位固定したプルキンエ細胞から、200 μ sの電位パルスを加えて大きなEPSCの振幅と全か無か、もしくは段階的な振幅の変化を示すことで登上線維EPSCを同定した。

プルキンエ細胞の発火頻度は、電流固定記録法を用いることによって測定し、各パラメータは5秒の記録から求めた。注入電流量と発火頻度の相関関係を調べる際は、500msのパルス電流を加えて発火頻度を求めた。また、クレブス溶液に満たしたガラス電極を用いてセルアタッチによる発火頻度の測定も行った。電気生理学実験は室温（22–24 $^{\circ}$ C）で行った。

眼球運動の解析

反射性眼球運動の記録は、以前に報告した方法に従って行った(Iwashita et al., 2001; Yoshida et al., 2004)。8-10週齢の雄のマウスを、0.9% ketamine と 0.2% xylazineの混合溶液を用いて麻酔し、頭部固定金具を頭蓋骨にネジとデンタルセメントを用いて固定した。反射性眼球運動の記録は手術の2日後以降に行った。なお、手術後2–7日において、反射性眼球運動の特性が

変化しないことを確認した。回転可能な 14° 間隔の白黒の縦縞スクリーン（直径60cm）に囲まれた回転台にマウスの頭部を固定し、足は回転台につかないように胴体部分をラバーシートで支えた。また、回転台とスクリーンの動きはパーソナルコンピューターにより制御可能なDCサーボモーター（RH-14-3002-T, Harmonic Drive）によって独立に制御した。正弦波状の $0.2-1 \text{ Hz} \cdot 10^\circ / \text{秒}$ の繰り返し回転刺激により、反射性眼球運動を引き起こした。右目を赤外線LED（TLN201, Toshiba）により照明し、ホットミラー（DMR, Kenko）で反射した眼球正面からの画像を赤外線CCDカメラ（XC-HR50, Sony）で記録した。ホットミラーは赤外線以外の可視光を通すため、マウスの視界を妨げることなく、画像を取得できる。眼球の画像は200Hzで取得し、眼球の位置はGeteye software（Morita）により計算した瞳孔の重心により求めた。VORの記録に際しては、瞳孔の大きさを減少させるためにpilocarpine hydrochloride（Santen）をマウス眼球に滴下した。VORとOKRの利得と位相は、正弦波に近似した眼球の速度と、回転台及びスクリーンの速度を比較することによって求めた。位相は先行する場合に、正の値とした。VORでは回転刺激と眼球の動きが反対に動くため、眼球の速度の位相を 180° 反転して求めた。

VOR適応訓練は、正弦波状の頭部回転刺激を $0.8 \text{ Hz} \cdot \text{最大角速度} 10^\circ / \text{秒} \cdot 50 \text{ 秒}$ に固定し、10秒の間隔をあけて、60回繰り返した。また、同時にスクリーン回転刺激を加えたが、回転台とスクリーンが反対位相時（VOR利得上昇訓練）では、回転台の動きの半分の速度で、また同位相時（VOR利得下降訓練）には、回転台と同じ速度でスクリーンを回転した。訓練後の暗所VORの値は、この訓練から10分後に測定した。OKR適応は、スクリーン回転刺激を 0.8 Hz 、最大角速度 $10^\circ / \text{秒}$ 、50秒に固定し、10秒の間隔をあけて60回繰り返すことにより引き起こした。

すべての実験は、アメリカ国立衛生研究所及び、京都大学の実験動物取扱規定に基づき、京都大学理学研究科の許可を得て行った。

参考文献

- Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S (1994) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79:377-388.
- Allen G, Buxton R, Wong E, Courchesne E (1997) Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 275:1940-1943.
- Barnard E, Skolnick P, Olsen R, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson A, Langer S (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
- Boyden ES, Raymond JL (2003) Active reversal of motor memories reveals rules governing memory encoding. *Neuron* 39:1031-1042.
- Boyden ES, Katoh A, Raymond JL (2004) Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 27:581-609.
- Castillo PE, Chiu CQ, Carroll RC (2011) Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 21:328-338.
- Chen Z, Olsen R (2007) GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem* 100:279-294.
- Collewijn H, Grootendorst AF (1979) Adaptation of optokinetic and vestibulo-ocular reflexes to modified visual input in the rabbit. *Prog Brain Res* 50:771-781.
- De Zeeuw CI, Hansel C, Bian F, Koekkoek SK, van Alphen AM, Linden DJ, Oberdick J (1998) Expression of a protein kinase C inhibitor in Purkinje cells blocks cerebellar LTD and adaptation of the vestibulo-ocular reflex. *Neuron* 20:495-508.
- Dean P, Porrill J, Ekerot CF, Jörntell H (2010) The cerebellar microcircuit as an adaptive filter: experimental and computational evidence. *Nat Rev Neurosci* 11:30-43.

du Lac S, Raymond JL, Sejnowski TJ, Lisberger SG (1995) Learning and memory in the vestibulo-ocular reflex. *Annu Rev Neurosci* 18:409-441.

Duguid IC, Smart TG (2004) Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nat Neurosci* 7:525-533.

Endo S, Shutoh F, Dinh TL, Okamoto T, Ikeda T, Suzuki M, Kawahara S, Yanagihara D, Sato Y, Yamada K, Sakamoto T, Kirino Y, Hartell NA, Yamaguchi K, Itohara S, Nairn AC, Greengard P, Nagao S, Ito M (2009) Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3525-3530.

Faulstich M, van Alphen AM, Luo C, du Lac S, De Zeeuw CI (2006) Oculomotor plasticity during vestibular compensation does not depend on cerebellar LTD. *J Neurophysiol* 96:1187-1195.

Gao Z, van Beugen BJ, De Zeeuw CI (2012) Distributed synergistic plasticity and cerebellar learning. *Nat Rev Neurosci* 13:619-635.

Hansel C, Linden D, D'Angelo E (2001) Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 4:467-475.

Hansel C, de Jeu M, Belmeguenai A, Houtman SH, Buitendijk GH, Andreev D, De Zeeuw CI, Elgersma Y (2006) α CaMKII Is essential for cerebellar LTD and motor learning. *Neuron* 51:835-843.

Hebb DO (1949) *The organization of behavior : a neuropsychological theory*. New York: Wiley.

Hensch TK (2005) Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol* 69:215-237.

Hirano T (2013) Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. . *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*.

Houston CM, Lee HH, Hosie AM, Moss SJ, Smart TG (2007) Identification of the sites for CaMK-II-dependent phosphorylation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem* 282:17855-17865.

Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded

polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13:196-202.

Ito M (1982) Cerebellar control of the vestibulo-ocular reflex--around the flocculus hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 5:275-296.

Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81:1143-1195.

Ito M (2002) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci* 3:896-902.

Ito M (2012) *The cerebellum : brain for an implicit self*. Upper Saddle River, N.J.: FT Press.

Iwashita M, Kanai R, Funabiki K, Matsuda K, Hirano T (2001) Dynamic properties, interactions and adaptive modifications of vestibulo-ocular reflex and optokinetic response in mice. *Neurosci Res* 39:299-311.

Jiao Y, Sun Z, Lee T, Fusco FR, Kimble TD, Meade CA, Cuthbertson S, Reiner A (1999) A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *J Neurosci Methods* 93:149-162.

Jörntell H, Hansel C (2006) Synaptic memories upside down: bidirectional plasticity at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 52:227-238.

Kano M, Hashimoto K (2012) Activity-dependent maturation of climbing fiber to Purkinje cell synapses during postnatal cerebellar development. *Cerebellum* 11:449-450.

Kano M, Fukunaga K, Konnerth A (1996) Ca²⁺-induced rebound potentiation of gamma-aminobutyric acid-mediated currents requires activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13351-13356.

Kano M, Rexhausen U, Dreessen J, Konnerth A (1992) Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature* 356:601-604.

Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 81:245-252.

Katoh A, Chapman PJ, Raymond JL (2008) Disruption of learned timing in P/Q calcium channel mutants. *PLoS One* 3:e3635.

Katoh A, Kitazawa H, Itohara S, Nagao S (2000) Inhibition of nitric oxide synthesis and gene knockout of neuronal nitric oxide synthase impaired adaptation of mouse optokinetic response eye movements. *Learn Mem* 7:220-226.

Kawaguchi S, Hirano T (2007) Sustained structural change of GABA(A) receptor-associated protein underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J Neurosci* 27:6788-6799.

Kina S, Tezuka T, Kusakawa S, Kishimoto Y, Kakizawa S, Hashimoto K, Ohsugi M, Kiyama Y, Horai R, Sudo K, Kakuta S, Iwakura Y, Iino M, Kano M, Manabe T, Yamamoto T (2007) Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur J Neurosci* 26:2269-2278.

Kleppisch T, Feil R (2009) cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb Exp Pharmacol*:549-579.

Kullmann DM, Moreau AW, Bakiri Y, Nicholson E (2012) Plasticity of inhibition. *Neuron* 75:951-962.

Maffei A (2011) The many forms and functions of long term plasticity at GABAergic synapses. *Neural Plast* 2011:254724.

Malherbe P, Draguhn A, Multhaup G, Beyreuther K, Möhler H (1990) GABA_A-receptor expressed from rat brain alpha- and beta-subunit cDNAs displays potentiation by benzodiazepine receptor ligands. *Brain Res Mol Brain Res* 8:199-208.

Miles FA, Lisberger SG (1981) Plasticity in the vestibulo-ocular reflex: a new hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 4:273-299.

Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama K, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss S, Yamamoto T, Nabekura J, Hirata M (2007) Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface. *J Neurosci* 27:1692-1701.

Nagao S (1988) Behavior of floccular Purkinje cells correlated with adaptation of horizontal optokinetic eye movement response in pigmented rabbits. *Exp Brain Res* 73:489-497.

Nakayama H, Miyazaki T, Kitamura K, Hashimoto K, Yanagawa Y, Obata K, Sakimura K, Watanabe M, Kano M (2012) GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74:384-396.

Nugent FS, Kauer JA (2008) LTP of GABAergic synapses in the ventral tegmental area and beyond. *J Physiol* 586:1487-1493.

Okamoto T, Endo S, Shirao T, Nagao S (2011) Role of cerebellar cortical protein synthesis in transfer of memory trace of cerebellum-dependent motor learning. *J Neurosci* 31:8958-8966.

Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M (2000) Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res* 85:1-12.

Olsen R, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56:141-148.

Pugh JR, Raman IM (2006) Potentiation of mossy fiber EPSCs in the cerebellar nuclei by NMDA receptor activation followed by postinhibitory rebound current. *Neuron* 51:113-123.

Robinson DA (1981) The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Annu Rev Neurosci* 4:463-503.

Schonewille M, Gao Z, Boele HJ, Veloz MF, Amerika WE, Simek AA, De Jeu MT, Steinberg JP, Takamiya K, Hoebeek FE, Linden DJ, Huganir RL, De Zeeuw CI (2011) Reevaluating the role of LTD in cerebellar motor learning. *Neuron* 70:43-50.

Schonewille M, Belmeguenai A, Koekkoek SK, Houtman SH, Boele HJ, van Beugen BJ, Gao Z, Badura A, Ohtsuki G, Amerika WE, Hosy E, Hoebeek FE, Elgersma Y, Hansel C, De Zeeuw CI (2010) Purkinje cell-specific knockout of the protein phosphatase PP2B impairs potentiation and cerebellar motor learning. *Neuron* 67:618-628.

Shutoh F, Katoh A, Kitazawa H, Aiba A, Itohara S, Nagao S (2002) Loss of adaptability of horizontal optokinetic response eye movements in mGluR1 knockout mice. *Neurosci Res* 42:141-145.

Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, Sanlioglu S, S-Crisman S, Kunsch C, Lira SA, Oberdick J (1995) Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 6:230-251.

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 (2008) Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphilin. *PLoS One* 3:e2297.

van Alphen AM, De Zeeuw CI (2002) Cerebellar LTD facilitates but is not essential for long-term adaptation of the vestibulo-ocular reflex. *Eur J Neurosci* 16:486-490.

Wadiche J, Jahr C (2001) Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32:301-313.

Welsh JP, Yamaguchi H, Zeng XH, Kojo M, Nakada Y, Takagi A, Sugimori M, Llinás RR (2005) Normal motor learning during pharmacological prevention of Purkinje cell long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17166-17171.

Wulff P, Schonewille M, Renzi M, Viltono L, Sassoè-Pognetto M, Badura A, Gao Z, Hoebeek F, van Dorp S, Wisden W, Farrant M, De Zeeuw C (2009) Synaptic inhibition of Purkinje cells mediates consolidation of vestibulo-cerebellar motor learning. *Nat Neurosci* 12:1042-1049.

Yamamoto K, Kobayashi Y, Takemura A, Kawano K, Kawato M (2002) Computational studies on acquisition and adaptation of ocular following responses based on cerebellar synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 87:1554-1571.

Yoshida T, Katoh A, Ohtsuki G, Mishina M, 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, Hashimoto K, Zimmer A, Maejima T, Araishi K, Kano M (2002) The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 22:1690-1697.

謝辞

本研究を行うに当たり、研究室の平野丈夫教授、田川義晃講師、及び同志社大学の川口真也準教授には様々な指導・援助をして頂きました。心から感謝しております。また、研究室の先輩方、同輩、後輩には、共に研究を行い様々なことを学ぶことができたことを非常に有難く感じております。特に、九州大学の大槻元特任助教には研究の心構え、実験技術、様々な知識等を教えていただきました。それが、今日の私の研究活動を行う上での基礎となったと思っています。心から感謝申し上げます。同輩の山崎義人氏からも行動実験の技術等を伝授いただき、また、共に議論を通してより多く学ぶことができたと思っています。技術補佐をしてくださった石井貴美子氏、澤田真紀子氏、和田里美氏、さらに研究室で秘書をされていた堀彩氏、西山あゆみ氏、岡田美木氏、田中優子氏のおかげで、円滑に研究が行えたと思っており、感謝しております。また、エリザベス中島氏には、論文の英語構成のみならず、研究に必要な英語技術等をご教授いただきました。加えて、京都大学グローバルCOEプログラム及び卓越した大学院拠点形成プログラムにより、研究支援していただき、感謝しております。

理研CDB変異マウス開発ユニットの塩井剛氏にはトランスジェニックマウスのコンストラクトを受精卵へとインジェクションをしていただき、私と共同研究していただいたことを特に感謝申し上げたいと思います。

最後に、精神面、経済面を一番に支えていただいた家族に感謝しております。