

大脳基底核に発現する細胞接着分子 Caspr3 の
運動学習への関与

平田 晴菜

目次

第1章. 序論.....	5
1. 1. 脳と細胞接着分子	5
1. 2. 細胞接着分子 Caspr ファミリー	8
1. 3. 運動学習.....	14
1. 4. 大脳基底核	17
1. 5. 目的.....	24
第2章. マウス脳における Caspr3 の発現および局在解析.....	25
2. 1. 緒言.....	25
2. 2. 材料および方法	27
2. 2. 1. 実験動物.....	27
2. 2. 2. 抗体.....	27
2. 2. 3. Western blotting による発現解析.....	29
2. 2. 3. 1. マウス脳ホモジネートサンプルの調製.....	29
2. 2. 3. 2. SDS-PAGE	29
2. 2. 3. 3. Western blotting (セミドライ式)	29
2. 2. 4. 免疫組織染色による局在解析.....	30
2. 2. 4. 1. 灌流固定.....	30
2. 2. 4. 2. 切片の作製.....	30
2. 2. 4. 3. DAB を用いた免疫組織染色.....	31
2. 2. 4. 4. 免疫蛍光組織染色	31
2. 2. 4. 5. データ解析および定量	32
2. 2. 5. 線条体初代培養神経細胞を用いた Caspr3 の発現解析	32
2. 2. 5. 1. 線条体初代培養神経細胞の培養および免疫蛍光細胞染色	32
2. 2. 6. Caspr3 KO マウスの形態学的解析	33
2. 2. 6. 1. Nissl 染色	33
2. 2. 7. 統計解析.....	33
2. 3. 結果.....	35
2. 3. 1. 発達に伴う Caspr3 の発現変化.....	35
2. 3. 2. マウス脳における Caspr3 の発現解析	37
2. 3. 3. マウス大脳基底核における Caspr3 の局在解析	44

2. 3. 4. Caspr3 KO マウスの形態学的解析およびタンパク質発現.....	64
2. 4. 考察.....	68
第3章 Caspr3 KO マウスの行動解析.....	71
3. 1. 緒言.....	71
3. 2. 材料および方法.....	73
3. 2. 1. 実験動物.....	73
3. 2. 2. 行動テストバッテリー.....	73
3. 2. 2. 1. ホームケージアクティビティテスト.....	73
3. 2. 2. 2. オープンフィールドテスト.....	74
3. 2. 2. 3. 高架式十字迷路テスト.....	75
3. 2. 2. 4. Y字迷路テスト.....	75
3. 2. 2. 5. 加速式ロータロッドテスト.....	76
3. 2. 2. 6. 居住者-侵入者テスト.....	77
3. 2. 2. 7. 恐怖条件付けテスト.....	77
3. 2. 2. 8. 驚愕反応および PPI テスト.....	78
3. 2. 2. 9. ホットプレートテスト.....	78
3. 2. 2. 10. テールフリックテスト.....	79
3. 2. 3. ホイールランニングテスト.....	79
3. 2. 4. 統計解析.....	79
3. 3. 結果.....	81
3. 3. 1. 行動テストバッテリー.....	81
3. 3. 1. 1. ホームケージアクティビティテストによる活動量および活動パターンの評価.....	84
3. 3. 1. 2. オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路による不安様行動の評価.....	86
3. 3. 1. 3. Y字迷路テストによる自発交替行動および作業記憶の評価.....	90
3. 3. 1. 4. 加速式ロータロッドテストによる運動協調性および運動学習の評価.....	92
3. 3. 1. 5. 居住者-侵入者テストによる攻撃行動の評価.....	95
3. 3. 1. 6. 恐怖条件付けテストによる恐怖条件付け学習の評価.....	97
3. 3. 1. 7. 驚愕反応および PPI テストによる感覚運動ゲート制御の評価.....	99

3. 3. 1. 8. ホットプレートテストおよびテールフリックテストによる痛覚感受性の評価	103
3. 3. 2. ホイールランニングテストによる運動学習の評価	105
3. 4. 考察	107
第 4 章 Caspr3 の運動学習における役割	112
4. 1. 緒言	112
4. 2. 材料および方法	113
4. 2. 1. 実験動物	113
4. 2. 2. 加速式ロータロッドテスト	113
4. 2. 3. 灌流固定	113
4. 2. 4. 切片の作製	113
4. 2. 5. DAB を用いた免疫染色	113
4. 2. 6. 画像解析およびデータの定量化	114
4. 2. 7. 統計解析	114
4. 3. 結果	115
4. 3. 1. 加速式ロータロッドテストを用いた運動による神経細胞活性化の比較 ..	115
4. 4. 考察	123
第 5 章. 最終討論	126
略称	131
参考文献	133
謝辞	148

第1章. 序論

1. 1. 脳と細胞接着分子

私たちの日常生活において運動、呼吸、睡眠、学習、記憶、感覚さらに感情や理性など、これらが正常に機能するためには、脳を構成する巨大な神経回路が正常に働く必要がある。

神経細胞は、情報を他の神経細胞へ伝える軸索と他の神経細胞から情報を受け取る樹状突起を持っている。軸索と樹状突起が情報交換を行う場をシナプスと呼び、軸索側をプレシナプス、樹状突起側をポストシナプスと呼ぶ。軸索内を伝わってきた電気信号が末端に届くと、プレシナプスにあるシナプス小胞に含まれた神経伝達物質が、エキソサイトーシスにより細胞外に放出され、ポストシナプス側にある受容体を介して相手側の神経細胞に情報を伝える。

中枢神経系の神経細胞の軸索には、オリゴデンドロサイトが巻き付き、ミエリンと呼ばれる脂質に富んだ構造を形成している。ミエリンが巻き付いている部分は電氣的に絶縁されており、軸索を伝わる電気信号は、ミエリンとミエリンの間（ノードまたはランビエ絞輪）を飛び飛びに伝わる。これを跳躍伝導と呼び、跳躍伝導により神経回路内での速い情報伝達が実現されている。

この巨大な神経回路が正常に働くためには、脳の発生過程から正確な神経回路網を形成し、維持していくことが必要であり、これには細胞接着分子の関与が重要である。細胞接着分子は細胞の集合や移動、また細胞内へのシグナル伝達を担うだけでなく、細胞の分化や増殖などを制御する役割を持つものも存在する。特に神経系で働く細胞接着分子は細胞移動、軸索伸長、軸索誘導、シナプス形成、シナプス可塑性などにおいて重要な役割を持つ。

神経系で機能する細胞接着分子には **cadherin** スーパーファミリー、

immunoglobulin スーパーファミリー、integrin ファミリー、neurexin スーパーファミリーなどが挙げられる (Yoshihara et al., 1991; Ushkaryov et al., 1992; Sano et al., 1993)。その中でも neurexin スーパーファミリーはプレシナプスに局在しており、ポストシナプス側に局在する neuroligin と結合することで、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスおよび抑制性の GABA 作動性シナプスの形成や、シナプス末端での神経伝達物質の放出に重要であることが知られている (Graf et al., 2006; Craig and Kang, 2007; Kang et al., 2008; Südhof, 2008)。

近年、細胞接着分子と自閉スペクトラム症 (ASD) または統合失調症など、精神疾患との関連が注目を浴びている。ASD は①社会的相互関係およびコミュニケーションの障害、②過剰なこだわりによる活動と興味の限局を特徴としている。2003 年、Jamain らが ASD を発症している兄弟 36 組の遺伝子解析を行ったところ、スウェーデン家系の兄弟から neuroligin4 のフレームシフト変異を発見した (Jamain et al., 2003)。また同じくスウェーデン家系の兄弟から、neuroligin3 の 451 番目のアルギニンがシステインに変異していることを見出した (Jamain et al., 2003)。neuroligin3 と neuroligin4 の遺伝子欠損型 (KO) マウスでは、ASD 様症状である社会行動や超音波発生の異常が観察されている (Jamain et al., 2008; Südhof, 2008; Radyushkin et al., 2009; Etherton et al., 2011)。一方 neurexin1 および 2 についても、ミスセンス変異や一塩基多型などの変異が、ASD 患者および統合失調症患者から発見されている (Feng et al., 2006; Gauthier et al., 2011; Gauthier et al., 2011; Ikeda et al., 2010; Yue et al., 2011; Sun et al., 2011; Liu et al., 2012)。このことから、neurexin と neuroligin が持つシナプス形成や神経伝達物質の調整機能が、ASD または統合失調症において重要な役割を持つと考えられている。

このように細胞接着分子は細胞レベルだけでなく、個体の脳機能レベルにおいて

重要な役割を担っていることが明らかになってきた。しかし、脳機能との関係が明らかになっている細胞接着分子は、まだ多くない。細胞接着分子が担う脳機能を明らかにすることは、様々な疾患の発症原因や脳機能の分子メカニズムを突き止めるために重要であると考えられる。

1. 2. 細胞接着分子 Caspr ファミリー

contactin associated protein (Caspr) ファミリーは、neurexin スーパーファミリーに属している細胞接着分子で Caspr、Caspr2、Caspr3、Caspr4、Caspr5 の 5 つの分子が同定されている (Bellen et al., 1998; Peles et al., 1997; Poliak et al., 1999; Spiegel et al., 2002; Traut et al., 2006)。Caspr ファミリー分子は、いずれも N 末端にシグナル配列をもち、細胞外領域に 4 つの Laminin G 様ドメイン、1 つの Discoidin 様ドメイン、1 つの Fibrinogen 様ドメイン、2 つの Epidermal growth factor (EGF) ドメインを共通の構造として持つ、一回膜貫通型タンパク質である (図 1: Poliak et al., 1999; Spiegel et al., 2002; Traut et al., 2006)。Caspr5 に関しては、ヒト遺伝子では 1 つのみだが、マウスでは Caspr5.1、Caspr5.2、Caspr5.3 の 3 つの相同遺伝子が同定されている (Traut et al., 2006)。Caspr ファミリー分子間のアミノ酸配列の相同性は、表 1 および表 2 に示した通りである (Spiegel et al., 2002; 表 1, 表 2)。特に Caspr3 と Caspr4 は、ヒトでは 70% (表 1)、マウスでは 63% (表 2) と高い相同性を示す。

Caspr ファミリーの中でも Caspr と Caspr2 は、有髄神経の軸索に局在し、ミエリンの形成に重要であることが明らかにされている (Poliak et al., 1999; 2003; Rios et al., 2000)。図 2 に示したように、有髄神経の軸索は 4 つの領域 (ノード、パラノード、ジャクスタパラノード、インターノード) に分けられている (図 2: Peles and Salzer, 2000)。パラノードには Caspr が局在しており、contactin と neurofascin-155 と複合体を形成している (図 2; Rios et al., 2000; Sherman et al., 2005)。この複合体はミエリン膜と軸索膜の密な結合部位であるパラノードルジャンクションを形成し、軸索膜のノード部位とノード間部を電気的および生化学的に仕切る役割を担う。また、パラノードの隣にあるジャクスタパラノードには Caspr2

が局在しており、TAG-1/contactin2 との相互作用が、K⁺チャンネルの局在化に必要であると報告されている (図 2; Traka et al., 2003; Poliak et al., 2003)。Caspr KO マウスでは、パラノードルジャンクションが崩壊し、ミエリン形成の異常やそれによる神経伝達速度の低下が生じる (Bhat et al., 2001)。その結果、Caspr KO マウスは多動や振戦などの重篤な運動障害を引き起こし、生後約 1 ヶ月で死亡する

(Bhat et al., 2001)。一方 Caspr2 KO マウスでは、相互作用相手の TAG-1 や K⁺チャンネルの局在に異常が見られる (Traka et al., 2003; Poliak et al., 2003)。近年 Caspr2 は、ASD 原因候補遺伝子の 1 つとして特に注目を浴びている (Arking et al., 2008; Jackman et al., 2009; Poot et al., 2010; O’Roak et al., 2011)。Caspr2 KO マウスを用いた行動解析では営巣行動の減少、過剰な毛づくろいや他者への接近の低下といった不安様行動および社会行動の障害が報告された (Peñagarikano et al., 2011)。

また Caspr4 も Caspr2 と同様に、ASD 原因候補遺伝子の 1 つとして挙げられており、Caspr4 KO マウスでは過剰な毛づくろいを含む不安様行動の増加とプレパルスインヒビション (PPI) の異常が見られる (Karayannis et al., 2014)。Caspr4 は、2002 年に Spiegel らによって同定され、マウスの髄質、脳梁、黒質、視床下部で Caspr4 の mRNA が強く発現していることが報告された (Spiegel et al., 2002)。その他にも Caspr4 は、感覚神経のプレシナプスにおいて NB-2/contactin5 とシス型の相互作用をしており、GABA 作動性シナプスの形成に関与していることが報告されている (Ashrafi et al., 2014)。

一方 Caspr3 は、Caspr4 と共に、2002 年に Spiegel らによって同定された (Spiegel et al., 2002)。Caspr3 は、ヒトの脳と脊髄に特異的に発現していることが報告された (Spiegel et al., 2002)。さらに 2015 年にはクローン病患者の大腸で

Caspr3 の mRNA が増加することが報告され、消化器系での発現も示唆されている (Qiao et al., 2015)。このことから Caspr3 は、神経系および消化器系において何らかの役割を担っている可能性が考えられる。しかし、Caspr3 の詳細な局在あるいは Caspr3 と脳機能の関連については報告がない。Spiegel らによれば、Caspr3 は 大脳 の 広 い 範 囲 に 発 現 し て い る こ と か ら、Caspr3 が 高 次 脳 機 能 に お い て 重 要 な 役 割 を 担 っ て い る 可 能 性 が 考 え ら れ る (Spiegel et al., 2002)。

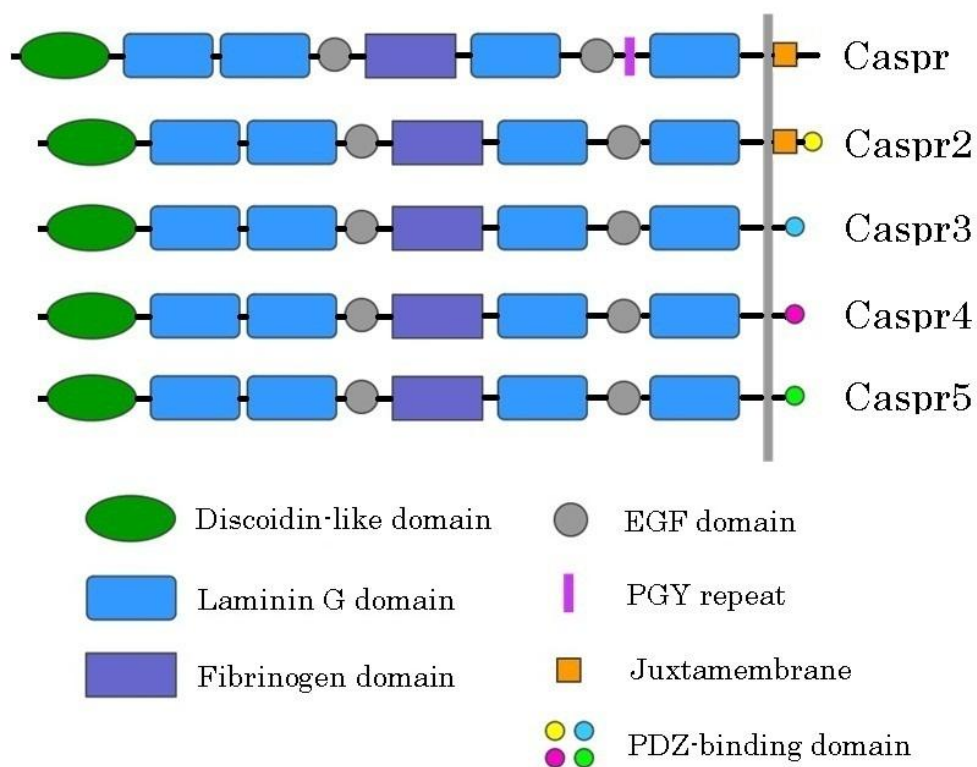


図1 細胞接着分子 Caspr ファミリー

(Poliak et al., 1999; Spiegel et al., 2002; Traut et al., 2006)

表1 ヒトにおける Caspr ファミリー分子の相同性 (Spiegel et al., 2002)

	Caspr	Caspr2	Caspr3	Caspr4	Caspr5
Caspr		43%	37%	38%	38%
Caspr2			47%	48%	49%
Caspr3				70%	53%
Caspr4					58%
Caspr5					

%は、Blast-alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によりアミノ酸配列を比較した時の相同性を示す。比較に用いたアミノ酸配列の GenBank Accession No.は次の通り。human Caspr, NM_003632; human Caspr2, NM_01414; human Caspr3, AF_333769; human Caspr4, AF_463518; human Caspr5, AK_056528。

表2 マウスにおける Caspr ファミリー分子の相同性

	Caspr	Caspr2	Caspr3	Caspr4	Caspr5.1	Caspr5.2	Caspr5.3
Caspr		44%	36%	38%	39%	37%	38%
Caspr2			47%	48%	50%	48%	49%
Caspr3				63%	52%	49%	51%
Caspr4					54%	53%	54%
Caspr5.1						87%	88%
Caspr5.2							86%
Caspr5.3							

%は、Blast-alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によりアミノ酸配列を比較した時の相同性を示す。比較に用いたアミノ酸配列の GenBank Accession No.は次の通り。mouse Caspr, NM_016782; mouse Caspr2, NM_001004357; mouse Caspr3, NM_001081129; mouse Caspr4, NM_130457; mouse Caspr5.1, NM_001077425; mouse Caspr5.2, NM_172851; mouse Caspr5.3, NM_001081653。

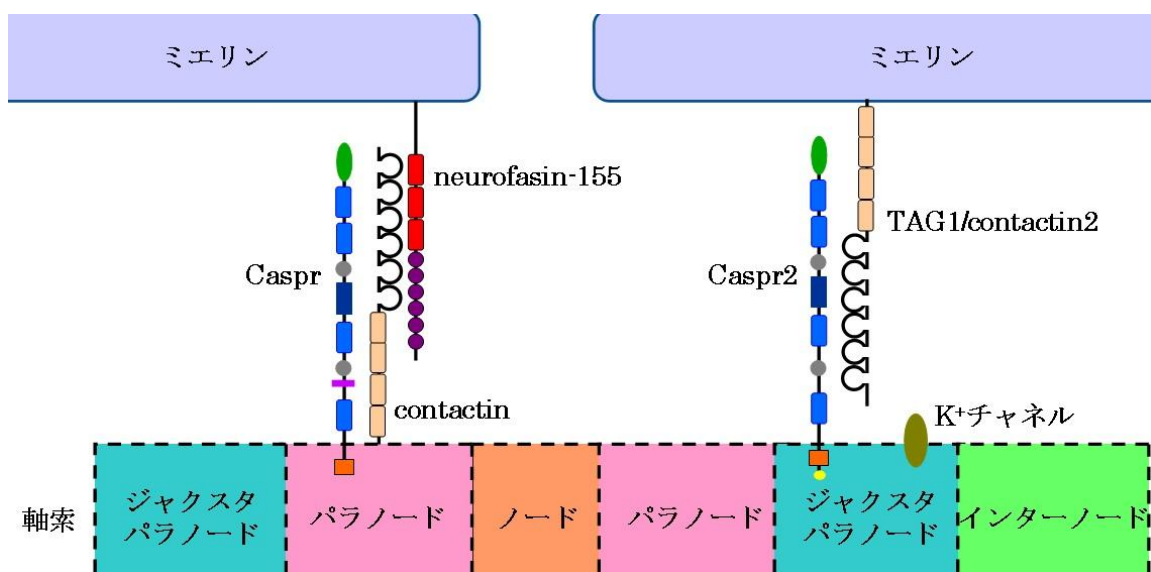


図2 有髄神経の軸索における Caspr および Caspr2 の局在

(Peles and Salzer, 2000; Rios et al., 2000; Poliak et al., 2003; Sherman et al., 2005)

1. 3. 運動学習

学習と記憶には短期記憶と長期記憶があり、長期記憶はさらに宣言的記憶と非宣言的記憶の2つに分けられる (Tulving and Craik, 2000)。宣言的記憶は、ある出来事に関するエピソード記憶や一般的な知識としての意味記憶であり、一言で言うと「言葉やイメージで表現することができる、事実に関する記憶」である。これに対して非宣言的記憶は、「一定の認知行動や行動に組み込まれている記憶」であり、言葉では説明できないが、身体が動作として表現できる記憶を指す (橋本, 2007)。例として宣言的記憶には読み書き、計算があり、非宣言的記憶には自転車の乗り方、海やプールでの泳ぎ方、精密機器の操作などが挙げられる。非宣言的記憶は手続き記憶とも呼ばれ、運動学習はこの手続き記憶に属する。宣言的記憶には、海馬の関与が必須だが、手続き記憶は海馬依存ではないことが知られている (Markowitsch, 2000 ; Shacter et al., 2000 ; Fujiwara et al., 2006)。

運動の技術には、日常生活における軽作業から、スポーツや芸術など専門的な技術まで様々なものが挙げられ、それぞれの技術向上において運動学習は重要な役割を担う。従って、運動学習メカニズムの解明は、技術を遂行する者または技術を教える者にとって、効率的な技術習得方法、指導方法の開発に役立つものであると考えられる。

運動学習の研究は主にヒトを対象として行われており、指を使ったタッピング課題が、Jenkinsらの研究グループまたはCostaらの研究グループによって行われていた (Jenkins et al., 1994; Karni et al., 1995)。この課題は、親指以外の4本の指それぞれに、数字や異なる音を対応させる。そして提示した数字または音に合わせて、対応する指でいかに正確に、かつ早くキーを押すことができるかという課題である。この課題中の被験者の脳血流量または脳の活動を、PETあるいはfMRIで測定した。

その結果、被殻（マウスでは線条体に相当する）、運動皮質、小脳、前頭前野など様々な脳領域が、学習中に関与していることが明らかになった。

一方、マウスやラットを用いた運動学習の研究には、前足を使った到達課題や加速式ロータロッドテストがよく用いられる（Bury and Jones, 2002; Costa et al., 2004）。前足を使った到達課題は、実験動物を片手が通せる幅の隙間があるチャンバーに入れて行う。チャンバーの外には餌が置かれ、実験動物は隙間から手を伸ばして、チャンバーの中から外の餌を獲得できるか、その成功率の増加具合を運動学習として評価する（Bury and Jones, 2002）。ロータロッドテストは、回転する棒の上を、マウスまたはラットがどれくらい長い時間歩いていられるかで、運動パフォーマンスを評価するテストである。棒の回転を徐々に加速する設定にし、これを繰り返し行うことで、マウスまたはラットは棒の上をより長く歩けるようになり、その時間が延びていく過程を運動学習の指標としている。これまでの研究では運動皮質、背側線条体、小脳などが、加速式ロータロッドテストでの運動学習において重要な役割を担っていることが報告されている（Costa et al., 2004; Bureau et al., 2010; Kakegawa et al., 2011）。

運動学習にはシナプス可塑性が重要であり、小脳においては、免疫関連分子の C1ql1 と G タンパク質共役受容体 BAI3 の結合が、小脳のシナプス形成や除去に関わることが報告されている（Kakegawa et al., 2015）。またこれらの KO マウスでは、小脳の登上線維におけるシナプス形成や除去に異常が起き、運動学習および記憶に障害をきたすことが明らかにされた（Kakegawa et al., 2015）。

一方線条体における運動学習について以下のようなことが明らかになっている。Wächter らは、ラットの背側線条体にタンパク質合成阻害剤を注入して到達課題を行ったところ、課題を行う前にタンパク質阻害剤を注入した場合は、成功率が有意

に低くなったことを報告した (Wächter et al., 2010) 。しかし、到達課題を事前に数日行い、ある程度成功するようにさせてからタンパク質合成阻害剤を注入した場合は、この課題における成功率に影響は出なかった。従って、背側線条体におけるタンパク質合成は、運動学習において重要であるということが明らかにされた (Wächter et al., 2010) 。

また Costa らは、加速式ロータロッドテストを用いた運動学習の解析を行った (Costa et al., 2004) 。彼らはマウスの脳に微小電極プローブを挿入し、運動中の単一神経細胞の活動を、マウスが生きのまま記録することに成功した。その結果、運動皮質で 55%、背側線条体においては 57%の神経細胞がこの運動に関与し、運動中に神経活動の上昇あるいは減少といった変化を見せたと報告した (Costa et al., 2004) 。さらに彼らは同様の解析方法で、8 日間の加速式ロータロッドテストを行い、背側線条体の神経活動を内側と外側に分けて記録した (Yin et al., 2009) 。その結果、初期段階 (運動初日) には主に背内側線条体の神経活動に関与し、後期 (8 日目) では主に背外側線条体の神経活動に関与していることを報告した (Yin et al., 2009) 。

このように背側線条体が運動学習に重要であることが報告されているが、線条体が担う運動学習の分子メカニズムはまだ明らかにされていない。

1. 4. 大脳基底核

線条体は、淡蒼球（外節、内節）、視床下核、黒質（緻密部、網様部）と合わせて、大脳基底核と呼ばれる非常に大きく複雑な神経回路を構成している（図3）。線条体は、大脳皮質と視床からグルタミン酸作動性の入力を受けている。大脳皮質には、運動皮質や帯状皮質など様々な領域が存在するが、ほとんど全ての領域が線条体へ投射している。線条体に入った入力情報は、最終的に内節淡蒼球あるいは黒質網様部から視床へ出力する。線条体からは、最終的な情報の出力部位である内節淡蒼球あるいは黒質網様部へ直接投射する経路と、外節淡蒼球と視床下核を経由して内節淡蒼球あるいは黒質網様部へ投射する経路があり、それぞれを直接路、間接路と呼んでいる。そして大脳基底核内は GABA による抑制性の入力为主要だが、もう1つ重要なのが黒質緻密部から線条体へのドーパミンの入力である。ドーパミン作動性の入力は直接路に対しては興奮性、間接路には抑制性と異なる作用を持ち、線条体の神経活動のバランスを調整していると考えられている。線条体が大脳基底核の入力部、内節淡蒼球と黒質網様部が出力部に相当するという概念は、1981年に DeLong の総説ですでに始まっていた。その後様々な議論がなされ、1990年頃に Albin らと DeLong らの研究グループによって、図5に示した神経回路の基になる直接路、間接路という概念が提唱された（Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990; DeLong, 1990）。さらに2000年頃には、大脳皮質－視床下核－内節淡蒼球というハイパー直接路も広く知られるようになった（Nambu et al., 2000）。しかし、線条体は縫線核からセロトニン、青斑核からノルアドレナリンの入力も受けていることから、図3のような直接路・間接路モデルというのは簡略化しすぎているとの批判もあり、詳細な神経回路はまだ明らかになっていない。

線条体の投射神経細胞は中型有棘神経細胞 (medium spiny neuron : MSN) と呼ばれており、GABA 作動性神経細胞で、マウスにおいては線条体神経細胞の 95% 近くを占めている (Graveland and DiFiglia, 1985)。MSN は発現するタンパク質で、2 つのタイプの MSN に分けることができる。直接路 (線条体-内節淡蒼球/黒質網様部) の MSN は dopamin receptor 1 (D1R) と substance P を持ち、間接路 (線条体-外節淡蒼球) の MSN は、dopamin receptor 2 (D2R) と enkephalin を持つことが知られている (図 3、図 4)。しかし一部では、D1R と D2R の両方を有する MSN も存在するとの報告もある (Aizman et al., 2000 ; Perreault et al., 2011) 、

また線条体には、MSN 以外に少なくとも 4 種類のインターニューロンが存在する (図 4)。1 つはアセチルコリンを伝達物質とするアセチルコリン作動性インターニューロン。それ以外の 3 つは全て GABA 作動性インターニューロンで、それぞれ parvalbumin、calretinin、somatostatin を持つものに分類される。その中でもアセチルコリン作動性インターニューロンは、長径 50~60 μm の細胞体を持つ大型の神経細胞で、線条体の 2% を占める (Bolam et al., 1984; Phelps et al., 1985; Wilson et al., 1990)。アセチルコリンはドーパミンと拮抗関係にあり、この 2 つのバランスが崩れることで、様々な運動疾患を引き起こすことが考えられている (Ding et al., 2006)。また parvalbumin を持つ GABA 作動性インターニューロンは、同じ神経細胞同士でギャップ結合を形成し、MSN の抑制に重要な役割を持っていると考えられている (Kawaguchi et al., 1995)。またこのインターニューロンが減少している動物が発見されており、著名なディストニア症状を示すことが報告されている (Gernert et al., 2000)。一方、残りの 2 つのインターニューロンは、げっ歯類ではほとんど存在しておらず、詳細な機能などは明らかになっていない。

直接路と間接路という概念以外に、線条体には matrix と striosome という発生学的

に異なる2つのコンパートメントが存在する (図5)。線条体は、大脳皮質のようなきれいな層構造を持たず、matrixとstriosomeは線条体の中でランダムに散在している (図5)。発生段階の線条体ではstriosomeが占める割合が多いが、発達に伴ってその割合は逆転し、最終的にはmatrixが線条体の85%を占めるようになる

(Johnston et al., 1990)。各コンパートメントからの出力には様々な説が出されていたが、その投射様式はFujiyamaらが行った単一神経細胞のトレーシング解析により明らかにされた (Fujiyama et al., 2011)。matrixとstriosomeは、どちらにおいてもD1R陽性のMSNが内節淡蒼球あるいは黒質網様部 (直接路) に投射し、D2R陽性のMSNが外節淡蒼球 (間接路) に投射している。しかし線条体から黒質緻密部への投射は、striosomeのD1R陽性のMSNのみであった。一方各コンパートメントへの入力について、matrixは主に運動系皮質、体性感覚野・頭頂葉など広範囲な大脳新皮質に由来し、ラット脳では大脳皮質の第5層からの入力を受けることが報告されている (Kincaid et al., 1996)。一方、striosomeは辺縁系に由来し、ラット脳では大脳皮質の第5層と第6層からの入力を受ける (Kincaid et al., 1996)。さらに大脳皮質からの入力はmatrixとstriosomeで特に差は見られないが、視床からstriosomeへの入力は、matrixの3分の1程度であることが明らかにされている (Fujiyama et al., 2006)。

1. 3. 運動学習で触れた加速式ロータロッドテストについて、背側線条体の直接路または間接路のMSNを薬理的に破壊した場合は、どちらも運動パフォーマンスが低下する (Durieux et al., 2012)。脳領域は正中線を基準に、正中線により近い領域を内側、遠い領域を外側と呼ばれている。特に直接路MSNの場合は背外側線条体、間接路MSNは背内側線条体が、加速式ロータロッドテストでの運動パフォーマンス

ンスに重要であることが報告された (Durieux et al., 2012)。この他にも、背内側線条体の直接路MSNは、視覚由来の弁別課題における実行速度に関わることが報告されている (Fukabori et al., 2012)。一方背外側線条体の間接路MSNは、聴覚由来の弁別課題における実行精度に関与することが示されている (Nishizawa et al., 2012)。このように、大脳基底核の中でも投射ニューロンMSNは、線条体の中のどの領域に由来する細胞かによって、担う役割が異なると考えられる。

また大脳基底核は運動や学習以外にも、感情、動機づけなど様々な機能を担う。主な機能は運動調節機能で、大脳基底核の損傷はパーキンソン病、ハンチントン病、注意欠如多動性障害、バリズムなどの不随意運動が引き起こされる (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Obeso et al., 2000; Sieradzan ad Mann et al., 2001)。パーキンソン病は振戦、無動、姿勢保持反射障害などの運動障害を中心とする進行性の神経変性症で、黒質緻密部あるいはのドーパミン作動性神経細胞の変性により引き起こされる。またハンチントン病は、不随意運動をはじめとし、認知障害または被害妄想などの精神症状を伴う遺伝性の疾患である。これは、原因遺伝子Huntingtinの第1エクソンにあるCAG (グルタミンをコードする) の異常な繰り返し配列によって、線条体のMSNが優先的に影響を受けることが原因とされている。

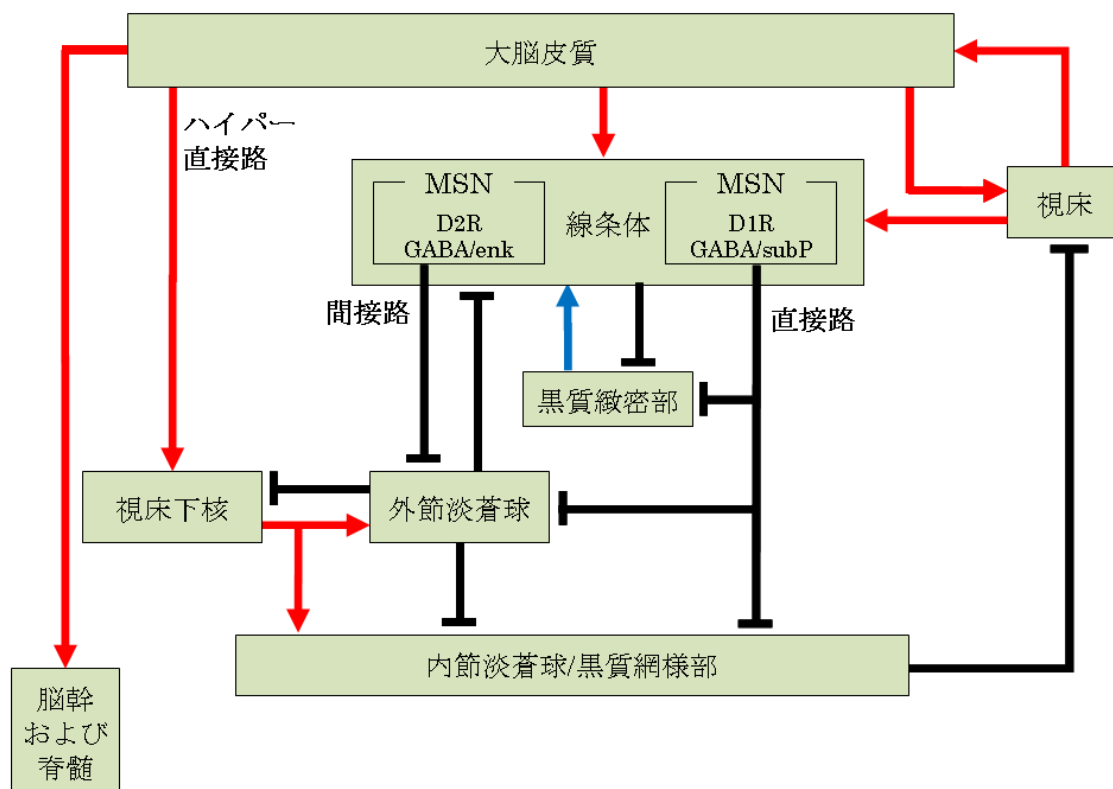


図3 大脳基底核の神経回路

(Bevan et al., 2002; BRAIN and NERVE より)

- ➔ : グルタミン酸作動性
- ⊥ : GABA 作動性
- ➔ : ドーパミン作動性

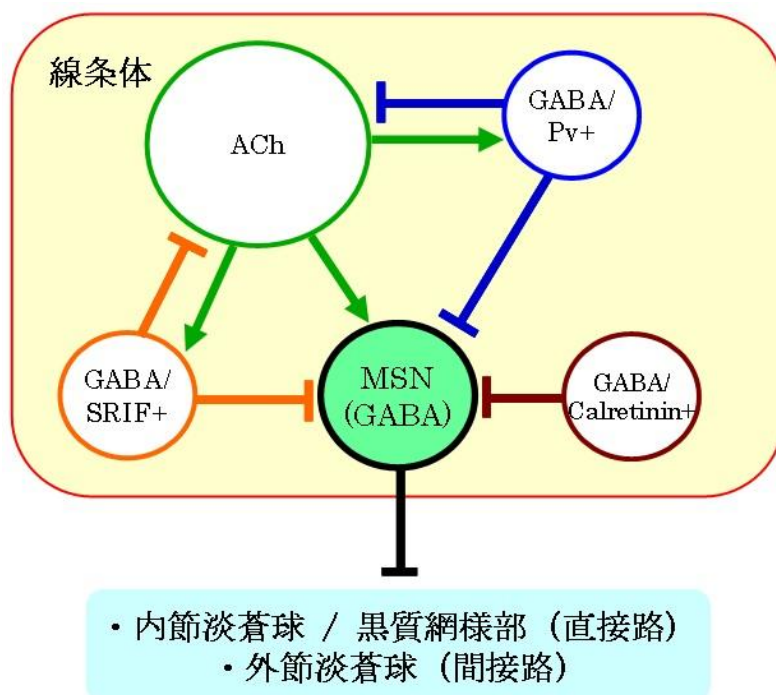


図4 線条体の神経細胞

(BRAIN and NERVE より)

ACh : アセチルコリン、Pv : parvalbumin、SRIF : somatostatin release inhibiting factor (somatostatin) 。

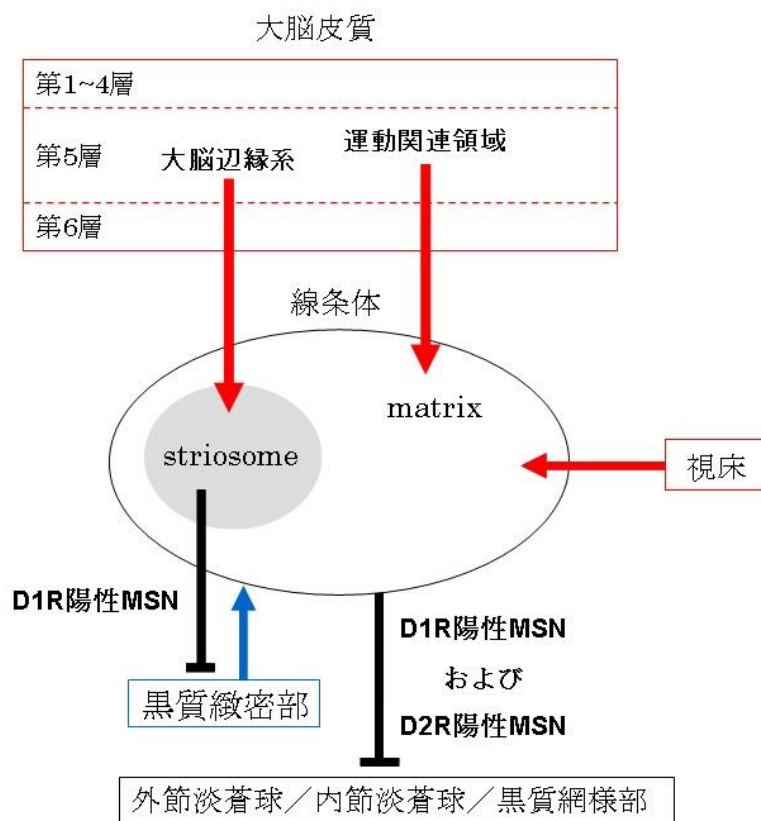


図5 線条体におけるコンパートメント構造

(BRAIN and NERVE より)

➡ : グルタミン酸作動性 ⊥ : GABA 作動性

➡ : ドーパミン作動性

1. 5. 目的

先述したように、近年 neurexin、neuroligin、Caspr2、Caspr4 などの細胞接着分子と精神疾患との関連についての報告が相次ぎ、細胞接着分子が持つ機能的役割に注目が集まっている。このことから、まだ脳機能との関連が明らかにされていない、Caspr3 の脳における機能的意義を明らかにすることは、高次脳機能の分子メカニズムを解明する手掛かりとなることが期待できる。

本研究は、Caspr3 のマウス脳内における機能的役割を明らかにすることを目的とした。これを明らかにするために、マウス脳内における Caspr3 の発現領域と、Caspr3 KO マウスに見られる行動学的異常を調べる必要がある。

第2章では、免疫組織学的手法を用いて、マウス脳における Caspr3 の発現領域、発現細胞の同定を行った。その結果、Caspr3 は胎生期から成体まで一貫して大脳基底核に強く発現していることが明らかになった。

第3章では、第2章で明らかにした Caspr3 の局在を基に、主に運動機能の評価を中心とした行動テストバッテリーを組み、Caspr3 KO マウスの行動解析を行った。その結果 Caspr3 KO マウスは、加速式ロータロッドテストによる初期の運動学習が低下していることが明らかになった。運動学習には脳の様々な領域が関与していることが知られていることから、続いて Caspr3 KO マウスの運動学習の低下要因を探ることに焦点を当てた。

第4章では、神経細胞活性化マーカーc-Fos に対する抗体を用いた免疫組織染色により、Caspr3 KO マウスの運動関連領域における運動前後での神経細胞の活性化について検討した。この結果から、Caspr3 が運動による背内側線条体の神経活性化に影響を与えていることを示唆する結果を得た。

最後に第5章では、この得られた結果からの最終討論を行っている。

第2章. マウス脳における Caspr3 の発現および局在解析

2. 1. 緒言

Caspr3は1. 2. 細胞接着分子Casprファミリーでも触れたように、2002年に Spiegelらによって同定された (Spiegel et al., 2002)。彼らの報告によれば、Caspr3はヒトにおいて3つのスプライシングバリエーションが同定されており、図1に示した構造の他に、N末端側のEGFとFibrinogen-likeドメインの一部が欠損した膜結合型のCaspr3-TMと、分泌型Caspr3Sが存在する。またNorthern blottingによりヒトCaspr3のRNAは、脳と脊髄特異的に発現が見られており、脳内では髄質、前頭葉、側頭葉、脳梁、扁桃体および海馬に強く、尾状核被核、黒質、視床や視床下核などに発現していることが明らかされた (Spiegel et al., 2002)。また健常者の死後脳を用いたin situ hybridizationによる、ヒトCaspr3のmRNA発現解析では、脊髄、前角の運動神経、海馬、そして脳梁のオリゴデンドロサイトなどに発現が見られたと報告されている (Spiegel et al., 2002)。さらにSpiegelらは、Caspr3に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫組織染色により小脳バスケット細胞の軸索や脳梁のオリゴデンドロサイトの細胞体で、Caspr3タンパク質の発現が見られたと報告している (Spiegel et al., 2002)。

このようにCaspr3は、ヒト大脳の広い範囲で発現が見られていることから運動、認知、記憶、情動など様々な脳機能に関わっている可能性が考えられる (Spiegel et al., 2002)。そこで、マウスを用いてCaspr3と脳機能との関係を明らかにするために、まずはマウス脳内におけるCaspr3の発現領域を明らかにする必要がある。

当研究室では為房が、マウスCaspr3の細胞外ドメインを認識するCaspr3特異的なモノクローナル抗体を作製した (為房, 2010)。また国立遺伝学研究所、マウス開発研究室の小出 剛准教授らによってCaspr3 KOマウスが作製された。本章では、こ

第2章. マウス脳における Caspr3 の発現および局在解析

れら作製されたモノクローナル抗体と Caspr3 KOマウスを用いて、Caspr3のマウス脳における発現時期や領域、細胞の同定を行った結果について述べる。

2. 2. 材料および方法

2. 2. 1. 実験動物

実験には、C57BL/6JmsSlc (B6) 系統のマウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。Caspr3 KO マウスは国立遺伝学研究所 マウス開発研究室で作製された。Caspr3 をコードする遺伝子 Cntnap3 の exon 1 を含む 6.058 bp のゲノム領域を、ネオマイシン耐性遺伝子で置き換え、Cntnap3 を欠損した対立遺伝子を作製した。Cre-loxP システムを用いてネオマイシンを除去した対立遺伝子を、エレクトロポレーション法で ES 細胞に遺伝子導入し、相同組み換えが起きた細胞をクローニングした。クローニングした細胞を ICR 系統の雌マウスに移植し、キメラマウスを得た。雄のキメラマウスを、B6 系統の雌マウスと 12 世代戻し交配して得たマウスを、本研究で使用した。Caspr3 KO マウスを用いる場合は、littermate である Caspr3 野生型 (WT) マウスをコントロールとして用いた。本章で扱う動物の管理および実験は、神経科学会の実験動物の適正な実施ガイドラインに従って行われた。マウスの飼育環境は、温度 25°C、湿度 50% で管理されており、12 時間毎の明暗サイクル (明期: 9~21 時, 暗期: 21~9 時) が設けられている。実験動物の管理や取り扱い方法については、長岡技術科学大学の動物実験委員会で承認を得ている。また動物の解剖の際には、適切な麻酔化で行い、動物への苦痛を最小限にする努力をしている。

2. 2. 2. 抗体

一次抗体には rat anti-Caspr3 抗体 (clone 1G6E2 腹水; 1: 4,000) 、 rat anti-Caspr3 抗体 (3A2C4 腹水; DAB を用いた免疫染色 1: 2,000; 免疫蛍光染色 1: 1,000) 、 mouse anti- β -tubulin 抗体 (Sigma, St. Louis, MO, Cat. #T4026; 1: 5,000) 、 mouse anti-calbindin 抗体 (Diagnostic Biosystems, Pleasanton,

CA, Cat. #Mob295; 1: 500) 、 rabbit anti-Caspr2抗体 (ポリクローナル抗体 (小林, 2004) ; 1: 2,000) 、 rabbit anti-Caspr4抗体 (clone 4D4 腹水 (酒井, 2009) ; 1: 3,000) 、 goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) 抗体 (Millipore, Billerica, MA, Cat. #AB144P; 1: 200) 、 rabbit anti-enkephalin (Immunostar, Hudson, WI, Cat. #20065; 1: 400) 、 rabbit anti-dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of Mr. 32,00 (DARPP-32) 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Cat. #2302; Western blotting 1: 500; 免疫蛍光染色 1: 50) 、 mouse anti-glutamic acid decarboxylase (GAD) 67抗体 (Millipore, Cat. #MAB5406; 1: 1,500) 、 mouse anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Sigma, Cat. #G3893; 1: 500) 、 mouse anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) (Millipore, Cat. #MAB1567; 1: 200) 、 rabbit anti- μ -opioid receptor (MOR) 抗体 (Millipore, Cat. #AB5511; 1: 500) 、 mouse anti-neurofilament抗体 (Millipore, Cat. #MAB5262; 1: 500) 、 mouse anti-parvalbumin抗体 (Sigma, Cat. #P3088; 1: 400) 、 rabbit anti-substance P (Millipore, Cat. #AB1566; 1: 500) 、 rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (Millipore, Cat. #AB152; Western blotting 1: 2,000; 免疫蛍光染色 1: 1,000) 、 guinea pig anti-vesicular GABA transporter (VGAT) 抗体 (Synaptic Systems, Gottingen, Germany, Cat. #131004; 1: 700) 、 guinea pig anti-vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) 抗体 (Millipore, Cat. #AB5905; 1: 2,000) を用いた。

二次抗体には、horseradish peroxidase (HRP) 標識rabbit anti-rat抗体 (Dako, Carpinteria, CA, Cat. #P0450; 1: 1,000) 、 HRP標識sheep anti-mouse抗体 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Cat. #NA931; 1: 5,000) 、 biotin標識rabbit anti-rat IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Cat. #BA-4001; 1: 250) 、 Alexa

Fluor 488標識goat anti-rat抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat. #A11006; 1: 2,000) 、Alexa Fluor 546標識goat anti-mouse抗体 (Invitrogen, Cat. #A11030; 1: 2,000) 、Alexa Fluor 546標識goat anti-rabbit抗体 (Invitrogen, Cat. #A11035; 1: 2,000) 、Alexa Fluor 546標識goat anti-guinea pig抗体 (Invitrogen, Cat. #A11074; 1: 2,000) 、Alexa Fluor 555標識donkey anti-rat抗体 (Invitrogen, Cat. #A21432; 1: 2,000) 、Alexa Fluor 405標識goat anti-mouse抗体 (Invitrogen, Cat. #A31553; 1: 1,000) を使用した。

2. 2. 3. Western blotting による発現解析

2. 2. 3. 1. マウス脳ホモジネートサンプルの調製

マウスを断頭して脳を取り出し、脳の重量を測定した。脳の9 倍量の2×SDS Sample Buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 0.002% bromophenol blue, 0.002% methylblue) を加え、氷上で冷やしながらホモジナイズした。ホモジナイズした試料を、100℃で5 分間加熱した。4℃、15,000 rpmで10 分間遠心し、上清を回収した物をwestern blottingに用いる試料とした。

2. 2. 3. 2. SDS-PAGE

7.5% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。分子量マーカールには Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, Cat. #161-0374) を用いた。

2. 2. 3. 3. Western blotting (セミドライ式)

転写後のニトロセルロース膜を、TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM

NaCl, 0.1% Tween-20) に浸し 5 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄後、blocking buffer (5% skim milk / TBS-T) で 1 時間 blocking を行った。続いて、blocking buffer で希釈した一次抗体を室温で 1 時間反応させた。Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) で 4 分間の洗浄を 4 回行った後、blocking buffer で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 4 分間、4 回洗浄した後、ECL Western blotting Detection System (GE Healthcare, Cat. #RPN1209) および ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Cat. #RPN2232) を使用し、Luminescent Image Analyzer LAS-1000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

2. 2. 4. 免疫組織染色による局在解析

2. 2. 4. 1. 灌流固定

マウスをジエチルエーテルで麻酔し、冷却した灌流用 phosphate buffered saline (PBS) (10 mM PB (0.2 M NaH₂PO₄, 0.8 M NaHPO₄), 0.15 M NaCl) で脱血した後、冷却した固定液 (4 % paraformaldehyde (PFA), 50 mM PB) を流し、灌流固定した。脳を取り出し、バイアル瓶に入れ 4 °C で 12 ~16 時間ローテーターで回転させながら浸漬固定した。固定後は 15% sucrose / 0.1 M PB、20% sucrose / 0.1 M PB、25% sucrose / 0.1 M PB、30% sucrose / PB で置換し、脳が沈むまで 4°C のローテーターで回転させた。

2. 2. 4. 2. 切片の作製

免疫蛍光染色用の切片は、Cryostat HM 550 (Zeiss) を用いて 14 μm の厚さで作製した。DAB 染色用の切片は、凍結マイクロトーム (Zeiss) を用いて 50 μm の厚さで作製した。

2. 2. 4. 3. DAB を用いた免疫組織染色

Vectastain Elit ABC Standard Kit (Vector Laboratories, Cat. #PK6100) を用いて染色を行った。脳切片を、0.3% H₂O₂/PBS-T (0.067 M PB pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100) 中で 30 分間室温で振盪した。PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、blocking buffer (10% bovine serum albumin (BSA) , 1.5% normal rabbit serum (NRS) /PBS-T) で 1 時間ブロッキングを行った。0.2% BSA/PBS-T で希釈した一次抗体を用いて、4°Cで一晩反応させた。PBS-T で 5 分間の洗浄を、室温で 3 回行った後、二次抗体として 1.5% NRS/PBS-T で希釈した二次抗体を加え、1 時間振盪した。PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、ABC reagent 中で 30 分間振盪した。次に、0.1 M PB で 5 分間の洗浄を 3 回行い、0.05% *p*-dimethylaminoazobenzene (DAB) /0.1 M PB 中で 30 分間振盪した。その後、1 %H₂O₂を加えた後、遮光して 10 分間発色させた。0.1 M PB で 5 分間の洗浄を 4 回行った。洗浄後、切片を ammonium persulfate (APS) コートしたスライドガラスに載せ、室温で一晩乾燥した。乾燥後、100% エタノールに 5 分間ずつ 2 回、キシレンに 5 分間ずつ 2 回浸し、脱水した。Permount (Fischer Scientific) で封入後、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-8100, Keyence, Osaka, Japan) で観察を行った。

2. 2. 4. 4. 免疫蛍光組織染色

スライドに貼り付けた脳切片に、PBS-T (組成は 2. 2. 4. 3. DAB を用いた免疫組織染色を参照) を加え、5 分間の洗浄を 3 回行った後、5 % normal goat serum (NGS) /PBS-T で 1 時間ブロッキングを行った。1 % NGS (ChAT の染色が含まれる場合には Fetal Bovine Serum (FBS) を使用) を含む PBS-T で希釈し

た一次抗体を加え、4 °Cで一晩反応させた。反応後、PBS-T で10 分間の洗浄を3 回行った後、1 % NGS/PBS-T で希釈した二次抗体を、遮光しながら室温で1 時間反応させた。反応後、PBS-T で10 分間の洗浄を3 回行った。洗浄後、Perma-Fluor (Thermo Scientific, Waltham, MA) で封入し、共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) で観察・撮影を行った。

2. 2. 4. 5. データ解析および定量

Western blotting の定量は、Multi Gage (Fujifilm) を用いて行った。免疫蛍光染色での細胞数のカウントは、共焦点顕微鏡の100 倍レンズを用いて、1 切片につき、片半球の内側線条体と外側線条体からそれぞれランダムに2 枚ずつ画像を取得した。1 個体から3 切片、3 個体分のデータを解析に用いた。

2. 2. 5. 線条体初代培養神経細胞を用いた Caspr3 の発現解析

2. 2. 5. 1. 線条体初代培養神経細胞の培養および免疫蛍光細胞染色

生後0~1 日のマウスから脳を取り出し、Hank's balanced salt solution (HBSS ; Gibco, BRL, Cat. 21250-014) 中で線条体を単離し、孔径140 μm のステンレスメッシュを用いて分離した。パスツールピペットを用いて懸濁した細胞を、孔径70 μm のセルストレイナー (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) に通して篩にかけた。直径60 mmの培養皿に0.1 mg/mL poly-L-lysine (PLL; ICN, Cat. #194544) コートしたカバーガラスを敷き、その上に細胞が $\sim 1.5 \times 10^4$ cells/cm²になるようにまいた。細胞は、B27サプリメント (Invitrogen) と0.5 mM L-グルタミン (Invitrogen) を含むNB培地 (Gibco, Cat. #21103) 中で培養し、37°C、5% CO₂中で維持した。培養液、5日おきに半分量を交換した。

培養7日目の細胞をカバーガラスごと取り出し、PBS で3 回洗浄を行った。洗浄

後、4% PFA/PBS を加えて室温で 15 分間細胞を固定した。固定後、必要に応じて 0.1% TritonX を含む PBS を加え、氷上で 10 分間透過処理をおこなった。PBS で 5 回洗浄した後、blocking buffer (0.5% BSA, 10% NGS/PBS) で希釈した一次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で 5 回洗浄した。洗浄後、blocking buffer で希釈した二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で 5 回洗浄し、Perma-Fluor (Thermo) で封入した。封入後、共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) で観察・撮影を行った。

2. 2. 6. Caspr3 KO マウスの形態学的解析

2. 2. 6. 1. Nissl 染色

脳切片が張り付いたスライドガラスをドライヤーで風乾した後、MilliQ 水に 1 分間浸し、切片を水和させた。次に 90% エタノールに 1 分間浸した後、100% エタノールに 1 分間浸した。Chloroform-Ether-Alcohol 溶液 (80% Chloroform, 10% Ethylether, 10% Ethanol) に 3 分間浸し、100% エタノールに 1 分間、95% エタノールに 1 分間、70% エタノールに 1 分間浸した。MilliQ 水に 1 分間浸した後、クレシルバイオレット溶液 (0.1% クレシルバイオレット, 8.4% acetic acid, 1.88% sodium acetate) に 10 分間浸して、染色した。染色後、70% エタノールで 2 分間脱色した後、90% エタノールに 1 分間、95% エタノールに 1 分間、100% エタノールに 1 分間を 2 回、キシレンに 1 分間浸し、脱水した。Permunt で封入後、オールインワン蛍光顕微鏡で観察を行った。

2. 2. 7. 統計解析

統計解析には、EZR (Saitama, Medical Centre, Jichi Medical University ; <http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>; Kanda, 2013)

を用いた。統計解析を行う前に、各データが正規性および等分散性の従うかどうかを検討した。正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用い、等分散性の検定には F-test を使用した。データが正規性かつ等分散性に従う場合には、Student's t-test による 2 群間比較を行った。p < 0.05 の場合に有意差があるとみなした。各グラフは全て、平均値 ± 標準誤差を表したものである。

2. 3. 結果

2. 3. 1. 発達に伴う Caspr3 の発現変化

Caspr3 の局在や機能を調べるにあたって、Caspr3 タンパク質が脳のどの時期に強く発現しているのかを知ることは重要である。当研究室では 2009 年度に為房が、Western blotting に使用できる Caspr3 抗体 1G6 を作製した（為房, 2010）。そこで、Caspr3 WT および KO マウス脳ホモジネートサンプルを用いた Western blotting により、Caspr3 抗体 1G6 が Caspr3 特異的に反応することを確認した（図 6A）。Caspr3 WT マウス脳サンプルからは、約 160 kDa にバンドが見られ、Caspr3 KO マウス脳サンプルからはバンドは検出されなかった（図 6A）。このことから、抗体 1G6 が、Caspr3 に特異的に反応していることが確認できた。次に胎生期から成体までの各週齢のマウス全脳ホモジネートサンプルを用いて、発達過程における Caspr3 の発現変化を調べた（図 6B）。Caspr3 は胎生期からすでに発現しており、生後 7~14 日で発現ピークを迎えることが明らかになった。その後は徐々に減少し、成体ではほとんど発現していなかった（図 6B）。以上のことから、Caspr3 は発達期に強く発現していることが明らかになった。

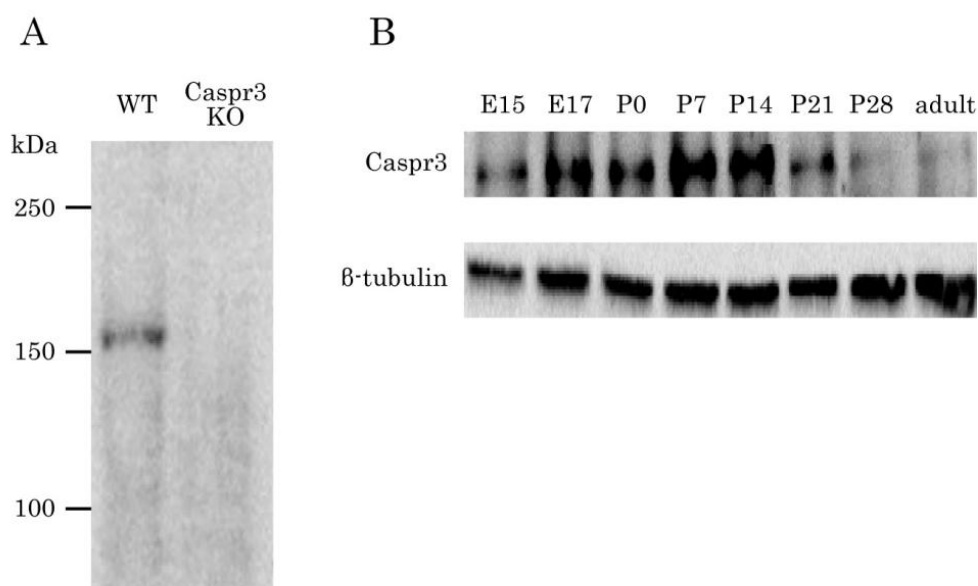


図6 マウス脳における発達に伴う Caspr3 の発現変化

A : Caspr3 WT および KO マウス脳ホモジネートサンプルを用いた、Caspr3 抗体 1G6 の特異性の検証。WT マウス脳サンプルでは約 160 kD にバンドが見られ、Caspr3 KO マウス脳サンプルからはバンドが検出されなかった。B : 各週齢のマウス全脳ホモジネートサンプルを用いた Caspr3 タンパク質発現の経時変化。Caspr3 は胎生期 (embryonic stage : E) から発現しており、生後 (postnatal stage : P) 7~14 日で発現ピークを迎えた。その後は徐々に減少し、成体ではほとんど発現していなかった。β-tubulin は、ローディングコントロールとして用いた。

2. 3. 2. マウス脳における Caspr3 の発現解析

Caspr3 が脳内のどの領域に局在しているかを明らかにすることは、Caspr3 の機能を調べる上で重要である。2009 年度に為房が作製した Caspr3 抗体 1G6 は、Western blotting には適用できるが免疫組織染色では反応しなかった（為房, 2010）。そこで為房は、免疫組織染色に使用できる Caspr3 モノクローナル抗体として、clone 3A2 を得た（為房, 2010）。そこで、生後 21 日目の Caspr3 WT および KO マウス脳切片を用いて、Caspr3 抗体 3A2 の特異性を検証したところ、WT マウス脳でのみシグナルが得られ、Caspr3 KO マウス脳からはシグナルが検出されなかった（図 7A）。このことから、抗体 3A2 が Caspr3 特異的に反応していることが確認できた。そして Caspr3 の発現は脳の広い範囲で見られ大脳皮質、嗅球、海馬などでシグナルが検出された（図 7A）。特に線条体、外節淡蒼球、黒質、そして線条体-黒質間をつなぐ繊維上に強いシグナルが検出され、Caspr3 が大脳基底核に強く発現していることが明らかになった（図 7A）。Western blotting で Caspr3 の発現が強かった、生後 14 日目の脳切片を用いた免疫染色でも同様の結果が得られた（図 7B）。脳領域は正中線を基準に、正中線により近い領域を内側、遠い領域を外側と呼ばれている。線条体における Caspr3 の発現は、外側よりも内側の領域で強い傾向にあった（図 7B）。また海馬では歯状回分子層にシグナルが強く、視床の様々な領域にも Caspr3 が発現している結果が得られた（図 7B）。Western blotting の結果では、胎生期の脳でも Caspr3 の発現が認められた（図 6B）。そこで、胎生 17.5 日目の脳切片を用いた Caspr3 の免疫蛍光染色を行ったところ、線条体や淡蒼球に強いシグナルが検出された（図 7C 左、中）。一方神経細胞の産生に関与し、神経幹細胞が存在する脳室下帯には Caspr3 の発現は見られなかった（図 7C 左）。また黒質線条体路にも Caspr3 の強いシグナルが得られた（図 7C 右）。以上

のことから Caspr3 は胎生期、発達期共に、大脳基底核に強く発現していることが明らかになった。

生後 14 日の線条体において、Caspr3 のタンパク質発現は外側より内側が強いという濃度勾配が見られた (図 7B)。また Western blotting による Caspr3 タンパク質発現の結果を受けて、線条体における Caspr3 発現の濃度勾配が発達に伴って変化をする可能性を考えた。そこで発達期のマウス線条体を同時に染色して比較したところ、生後 21、28 日では全体的にシグナルが弱まっているが、Caspr3 の発現が外側より内側が強いという傾向は生後 7~28 日の線条体で一貫していることが明らかになった (図 8A)。また 6 層の層構造を持つ大脳皮質では、生後 7、14 日目のマウスでは特に第 5 層に Caspr3 の強いシグナルが検出されたが、21 日目以降では全体的にシグナルは弱くなっていた (図 8B)。

図 6 で示した Western blotting の解析によれば、Caspr3 は主に発達期に発現が強く、成体脳ではほとんど発現が見られなかった (図 6)。しかし、Caspr3 の脳機能への関与を調べていくにあたって、成体脳での Caspr3 の発現領域も明らかにしておく必要がある。10 週齢の成体マウス脳切片を用いて、Caspr3 抗体を用いた DAB による免疫染色を行ったところ。成体脳における Caspr3 の発現は、全体的にシグナルは弱いですが、主に線条体と黒質での発現が見られ、発達期と同様に大脳基底核に発現していることが明らかになった (図 9A)。さらに冠状切片での染色像から、線条体における Caspr3 の発現は、発達期と同様に外側よりも内側が強い傾向にあることが明らかになった (図 9B)。

以上の結果から、Caspr3 が発達期の大脳基底核に特に強く発現しており、その発現は胎生期から成体まで一貫していることが明らかとなった。また線条体では外側より内側での発現が強く、濃度勾配が存在することが示唆された。

第2章. マウス脳における Caspr3 の発現および局在解析

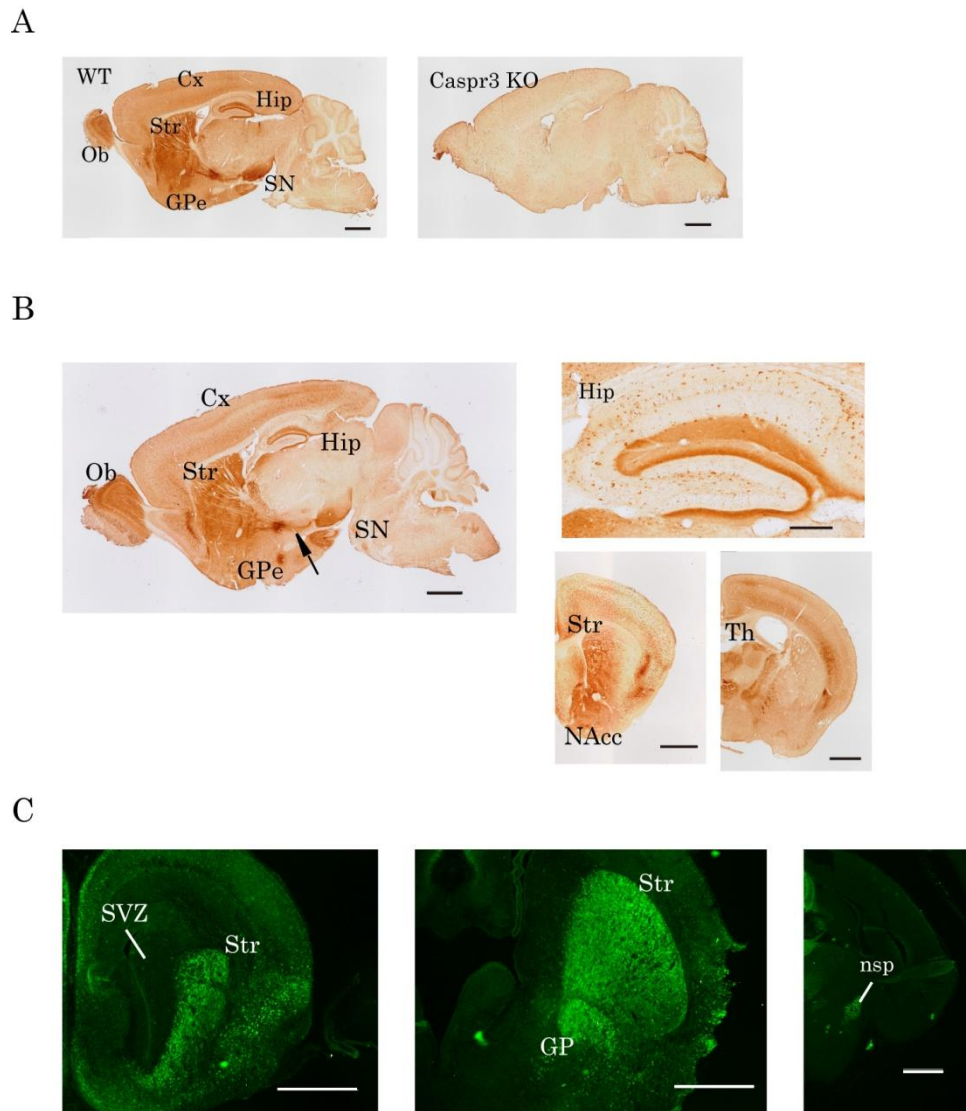


図7 免疫組織染色による Caspr3 のマウス脳内における発現領域

A : 生後 21 日 (P21) の Caspr3 WT および KO マウス脳を用いた、Caspr3 抗体 3A2 の特異性の検証。WT マウス脳において、Caspr3 は大脳皮質 (cerebral cortex : Cx) 、嗅球 (olfactory bulb : Ob) 、海馬 (hippocampus : Hip) など大脳の広い範囲でシグナルが得られ、Caspr3 KO マウス脳ではシグナルが検出されなかったことから、抗体の特異性を確認できた。Scale bars : 1 mm。B : P14 マウス脳を用いた Caspr3 の免疫染色。Caspr3 は線条体 (striatum : Str) 、側座核 (nucleus accumbens : NAcc) 、外節淡蒼球 (external segment of the globus pallidus : GPe) 、黒質 (substantia nigra : SN) 、さらに線条体-黒質をつなぐ織

維上など大脳基底核に強く発現していた（矢印）。線条体では外側より内側が強い傾向にあった。脳の正中線を基準に正中線に近い領域を内側、遠い領域を外側とする。Caspr3 は海馬の歯状回分子層に強く発現しており、視床にも局在していた。

Scale bars : 矢状切片および冠状切片 ; 1 mm。海馬拡大図 ; 250 μm 。C : 胎生期

(E17.5) マウス脳を用いた Caspr3 の免疫染色。Caspr3 は、線条体 (Str) や淡蒼球 (GP) に強く発現していた。神経幹細胞が存在する脳室下帯 (subventricular zone : SVZ) には発現していなかった。黒質線条体路 (nigrostriatal pathway : nsp) にも強いシグナルが検出された。Scale bars : 500 μm 。

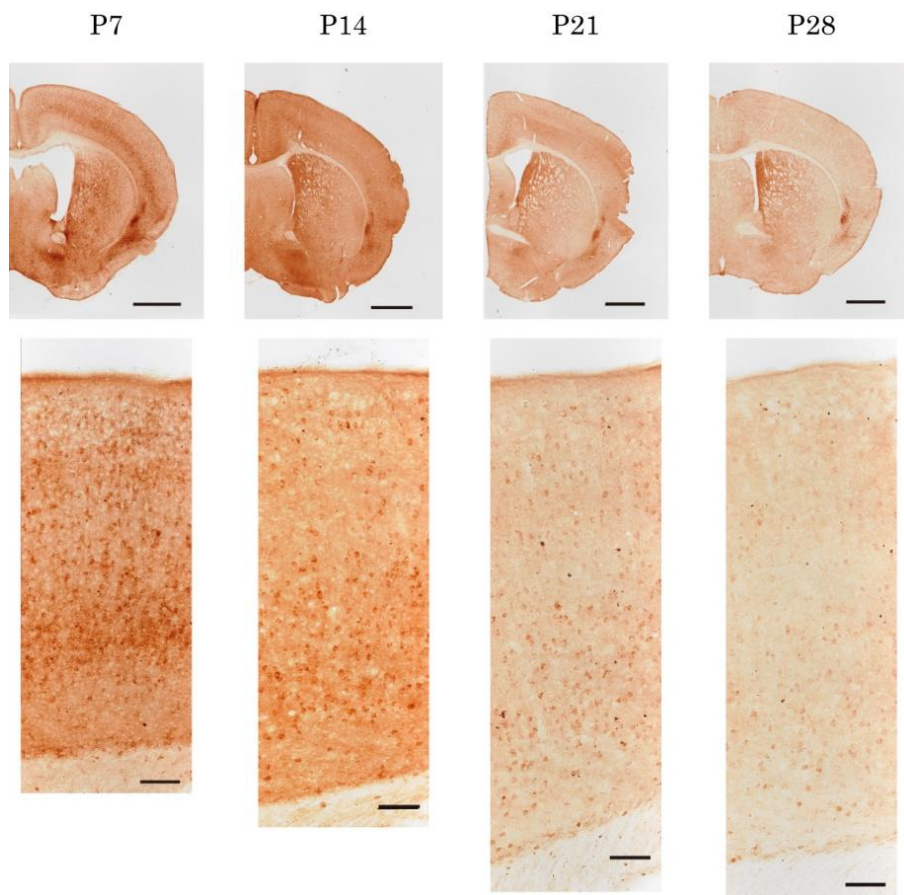


図8 生後 (P) 7~28日マウス脳の線条体および大腦皮質の Caspr3 発現パターン
線条体 (上段) における、Caspr3 発現の濃度勾配は生後 (P) 7~28 日まで変わらずに外側より内側が強かった。大腦皮質 (下段) における Caspr3 の発現は P7、P14 では主に第5層に強かったが、P21、P28 の大腦皮質では全体的に Caspr3 の発現が弱くなっていた。Scale bars : 線条体 ; 1 mm、大腦皮質 : 100 μ m

A



B

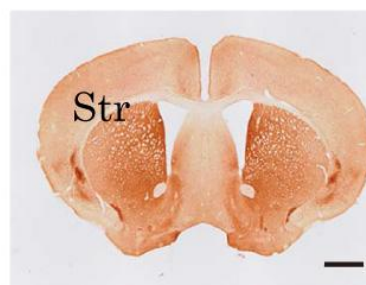


図9 成体マウス脳での Caspr3 の発現解析

A : 成体マウス脳 (10 週齢) の矢状切片における Caspr3 の免疫組織染色。Caspr3 は線条体 (Str) と黒質 (SN) に強く発現していた。B : 冠状切片における Caspr3 の免疫組織染色。線条体での Caspr3 の発現は、外側より内側での発現が強かった。
Scale bars : 1 mm。

2. 3. 3. マウス大脳基底核における Caspr3 の局在解析

Western blotting および DAB を用いた免疫組織染色により、Caspr3 が発達期の
大脳基底核において、特に強く発現していることが明らかになった。そこで Caspr3
のマウス大脳基底核における局在をより詳細に明らかにするために、Caspr3 の発現
が最も強い生後 7 日目のマウス脳を用いて、大脳基底核における Caspr3 の発現細
胞の同定を行った。

まず初めに、DAB を用いた免疫染色で Caspr3 のシグナルが線条体と黒質をつな
ぐような繊維上に検出されたこと (図 7A, B)、胎生期脳を用いた免疫蛍光染色で
は黒質線条体路に Caspr3 の発現が見られた (図 7C) ことから、線条体の投射神経
細胞 MSN に注目した (図 10)。染色の結果、線条体において Caspr3 は細胞体で
の発現が見られた。さらに MSN のマーカーである DARPP-32 との蛍光二重染色か
ら、Caspr3 と DARPP-32 との共局在が見られた (図 10 Striatum, 矢印)。しかし
Caspr3 と DARPP-32 が共局在するのは一部であり、Caspr3 を発現しない MSN も
存在した (図 10 Striatum, 矢頭)。また逆に、Caspr3 を発現しているが、
DARPP-32 を発現しない細胞もいることから、Caspr3 は線条体のインターニュー
ロンにも発現していることが示唆された (図 10 Striatum, アスタリスク)。また腹
側線条体の一部である側座核においても同様に、Caspr3 と DARPP-32 が共局在し
ている細胞、Caspr3 もしくは DARPP-32 のどちらかのみを発現している細胞が観
察された (図 10 NAcc)。また黒質や外節淡蒼球でも、Caspr3 は細胞体に発現して
いることが明らかとなった (図 10 SN, GPe)。これらの領域において、Caspr3 は
細胞体での発現だけでなく、ドット状のシグナルも多く観察された (図 10)。MSN
が投射している黒質や外節淡蒼球には、MSN の軸索末端と思われる DARPP-32 の
シグナルが観察された (図 10 SN, GPe)。しかし、線条体や側座核では Caspr3 が

MSN に発現していたにも関わらず、黒質や外節淡蒼球で見られた Caspr3 のドット状シグナルは、DARPP-32 のシグナルとオーバーラップしていなかった (図 10 SN, GPe)。

Caspr3 と DARPP-32 の蛍光二重染色の結果から、Caspr3 が線条体の細胞体に発現し、一部の MSN に局在していることが明らかになった (図 10)。また線条体における Caspr3 の発現は、外側よりも内側が強かった (図 7B)。このことから線条体における Caspr3 発現細胞が、外側のより内側の細胞に多いのではないかと考えた。MSN のマーカーである DARPP-32 は、出生時には発現量はまだ少なく、生後 1~3 週間にかけて増加し、ラットの場合では生後 3 週間で成体と同等の発現レベルに達する (Hemmings et al., 1992; Masuda et al., 2011)。そのため、Caspr3 の発現が強い生後 7 日目と 21 日目のマウス線条体を用いて、Caspr3 と DARPP-32 の発現細胞の割合を調べた (図 11A)。その結果、Caspr3 陽性細胞数は生後 7 日 ($33.2 \pm 2.1\%$) と 21 日 ($27.6 \pm 4.8\%$) で有意差はなく、線条体細胞の 30%前後であった (図 13A)。一方、DARPP-32 は生後 7 日 ($45.7 \pm 1.6\%$) から 21 日 ($75.8 \pm 2.0\%$) にかけて陽性細胞の割合が増加していた ($p < 0.0001$; 図 11A)。そして Caspr3 と DARPP-32 を共発現している細胞の割合は、7 日目 ($23.6 \pm 1.6\%$) と 21 日目 ($22.1 \pm 4.0\%$) で特に差はなかった。さらに DAB 染色の結果では、線条体における Caspr3 の発現には濃度勾配があり、外側に比べて内側が強かった (図 7B) が、線条体における Caspr3 の陽性細胞数の割合は、7 日目と 21 日目どちらも内側と外側で有意差がなかった (図 11B, C)。

Caspr3 が MSN に局在していることが明らかになったが、大脳基底核で重要なもう 1 つの主要な神経細胞として、黒質のドーパミン作動性神経細胞がある。Caspr3 がドーパミン作動性神経細胞に発現しているかを調べるため、マーカーである TH

と Caspr3 の蛍光二重染色を行った (図 12)。黒質緻密部において、ドーパミン作動性神経細胞の細胞体に TH のシグナルが検出でき、その周囲に Caspr3 のドット状のシグナルが観察されたが、Caspr3 と TH のシグナルはオーバーラップしていなかった (図 12 SNc)。また Caspr3 は黒質網様部や線条体でも多くのドット状シグナルが検出されているが、TH のシグナルとオーバーラップすることはなかった (図 12 SNr, Striatum)。続いて Caspr3 が発現していた黒質線条体路についても観察を行ったところ、Caspr3 と TH のシグナルとは全く異なる線維上に発現していた (図 13A)。一方 Caspr3 と DARPP-32 は同じ繊維の束に発現が見られたが、それぞれのシグナルは異なるドット状シグナルで、オーバーラップはしていなかった (図 13B)。

線条体において、Caspr3 は MSN 以外の細胞体にも発現が見られたことから、線条体インターニューロンでの発現が示唆された (図 12 Striatum, NAcc, アスタリスク)。図 10 の線条体で見られた Caspr3 のみを発現する細胞は、MSN に比べて大きいことから、大型の細胞体を持つアセチルコリン作動性インターニューロン (Bolam et al., 1984 ; Phelps et al., 1985 ; Wilson et al., 1990) ではないかと予想した。そこでアセチルコリン作動性インターニューロンのマーカーである ChAT と Caspr3 の蛍光二重染色を行ったところ、Caspr3 と ChAT は共局在していた (図 14A)。一方、parvalbumin 含有 GABA 作動性インターニューロンのマーカーである parvalbumin との蛍光二重染色では、Caspr3 は parvalbumin と共局在していなかった (図 14B)。また Spiegel らの報告では、Caspr3 はオリゴデンドロサイトでの発現も見られている (Speigel et al., 2002)。そこで、グリア細胞での Caspr3 の発現も検討したが、Caspr3 はオリゴデンドロサイトおよびアストロサイトには発現していなかった (図 15)。以上の結果から、Caspr3 は発達期の線条体において、

アセチルコリン作動性インターニューロンと一部の MSN に局在していることが示唆された。

1. 4. 大脳基底核でも述べたように、大脳基底核は非常に複雑な神経回路を持つ。線条体からは直接路（線条体—黒質網様部）と間接路（線条体—外節淡蒼球）といった2つの経路がある。さらには線条体には matrix と striosome と呼ばれる発生学的に異なる2つのコンパートメントが存在し、MSN はそれぞれの経路およびコンパートメントに存在している。Caspr3 が一部の MSN に発現していることから、次はその発現が経路特異的あるいは、コンパートメント特異的なものかどうかについて調べた（図 16, 17）。

まずこれまでの結果から、Caspr3 が黒質線条体路に発現していることが明らかになっており、少なくとも直接路の MSN には Caspr3 が発現していることが予想された。直接路 MSN のマーカーである substance P と Caspr3 の蛍光二重染色では、Caspr3 と substance P のシグナルがオーバーラップしており、Caspr3 が直接路の MSN に発現していることが示唆された（図 16A）。一方、間接路の MSN のマーカーである enkephalin とも Caspr3 は共発現しており（図 16B）、Caspr3 は両方の経路の MSN に発現している可能性が考えられた。

次に、matrix および striosome の MSN における Caspr3 の発現を調べた（図 17）。matrix の MSN のマーカーとして、calbindin があり、Caspr3 と DARPP-32 と併せて蛍光三重染色を行ったところ、3つのタンパク質が共局在していた（図 17A 矢印）。しかし中には、Caspr3 と DARPP-32 を発現しているが calbindin を発現していない細胞も存在し（図 17A 矢頭）、Caspr3 が striosome の MSN にも発現している可能性が示唆された。そこで striosome の MSN のマーカーである MOR と Caspr3 の蛍光二重染色を行ったところ、これらの共局在が観察された（図 17B

矢印)。従って、Caspr3は matrix と striosome 両方の MSN に発現している結果が得られた。以上のことから、Caspr3 の発現は経路やコンパートメント特異的ではないことが示唆された。

Caspr3 の発現は細胞体での発現だけでなく、多くのドット状のシグナルも観察されている (図 10, 図 12, 図 13)。DARPP-32 や TH との蛍光二重染色では、MSN やドーパミン作動性神経細胞の末端と思われるシグナルについても観察を行っていたが、どれも Caspr3 と共局在しなかった (図 10, 図 12)。そこで、Caspr3 のドット状シグナルについて、シナプスマーカーとの蛍光二重染色を行った (図 18~20)。大脳基底核は、主に GABA 作動性神経細胞で構成されており、大脳皮質と視床からグルタミン酸作動性神経細胞の入力を受けている。まず GABA 作動性神経細胞のプレシナプスマーカーとして、GAD67 を用いて Caspr3 との蛍光二重染色を行った (図 18)。外節淡蒼球において、Caspr3 と GAD67 は一部の細胞体で共局在していたが、それぞれのドット状シグナルはオーバーラップしなかった (図 18 GPe)。また視床下部や黒質においても GABA 作動性神経細胞の入力があるが、Caspr3 と GAD67 のシグナルはオーバーラップしなかった (図 18 STN, SN)。次に GAD67 とは別の GABA 作動性神経細胞のプレシナプスマーカーとして VGAT を用いて、Caspr3 と蛍光二重染色を行った (図 19)。ここでは大脳基底核だけでなく、大脳皮質や海馬歯状回なども観察し、至る所で Caspr3 のドット状シグナルを検出したが、VGAT と Caspr3 が共局在することはなかった (図 19)。最後にグルタミン酸作動性神経細胞のプレシナプスマーカーである VGluT1 と Caspr3 の免疫二重染色を行ったが、GAD67 や VGAT と同様、Caspr3 と共局在する結果は得られなかった (図 20)。

Caspr3 と同じファミリー分子である Caspr や Caspr2 は、有髄神経の軸索上に発

現し、ミエリンと密に接するパラノード領域やその隣のジャクスタパラノード領域に局在していることが明らかになっている (Rios et al., 2000 ; Poliak et al., 2003 ; Traka et al., 2003) 。このことから、Caspr3 のドット状シグナルがパラノードやジャクスタパラノード領域に局在しているものである可能性を考えた。そこでミエリンの観察が容易であるマウス脊髄を用いて、Caspr3 とミエリンのパラノード領域のマーカである Caspr の蛍光二重染色を行った (図 21) 。脊髄において、Caspr3 はドット状のシグナルが検出されたが、Caspr と Caspr3 の共局在は観察されなかった (図 21) 。またこれらのシグナルは隣り合うこともなく、Caspr3 はパラノードの隣にあるジャクスタパラノード領域にも局在していないことが示唆された (図 21) 。以上の結果から、Caspr3 のドット状シグナルはシナプスやミエリンに局在するものではないことが考えられる。

黒質線条体路における Caspr3 と DARPP-32 との二重染色で、これらドット状シグナルは同じ線維上に発現はしているようだが、オーバーラップはしていなかった (図 13B) 。また Spiegel らの報告でも、領域は異なるが、脳梁や脊髄などで軸索に沿った Caspr3 のシグナルを検出しており、このシグナルは輸送小胞ではないかと述べている (Spiegel et al., 2002) 。このことから、黒質線条体路で観察された Caspr3 と DARPP-32 のシグナルは、異なる小胞で輸送されているものではないか考えた。そこで、Caspr3 が細胞内に多く局在するかどうかを検証するため、生後 0 日のマウスから線条体を取り出し、培養 7 日目の線条体初代培養神経細胞を用いた解析を行った (図 22) 。Caspr3 は膜貫通タンパク質であり、細胞表面に出ていることが予想されるため、界面活性剤処理を行わなくても Caspr3 抗体での染色は可能であると考えられる。そこで線条体の初代培養神経細胞に界面活性剤処理を行った場合と、行わなかった場合の Caspr3 抗体での染色を行い、Caspr3 のシグナルを

比較した。その結果、界面活性剤処理を行った場合、MSN マーカー-DARPP-32 と軸索マーカー-pNeurofilament で染められた MSN の軸索上に、Caspr3 のシグナルが検出された (図 22A)。それに対して界面活性剤処理を行わなかった場合には、Caspr3 のシグナルはほとんど検出されなかった (図 22B)。以上の結果から、Caspr3 は細胞内に多く存在している可能性が示唆された。

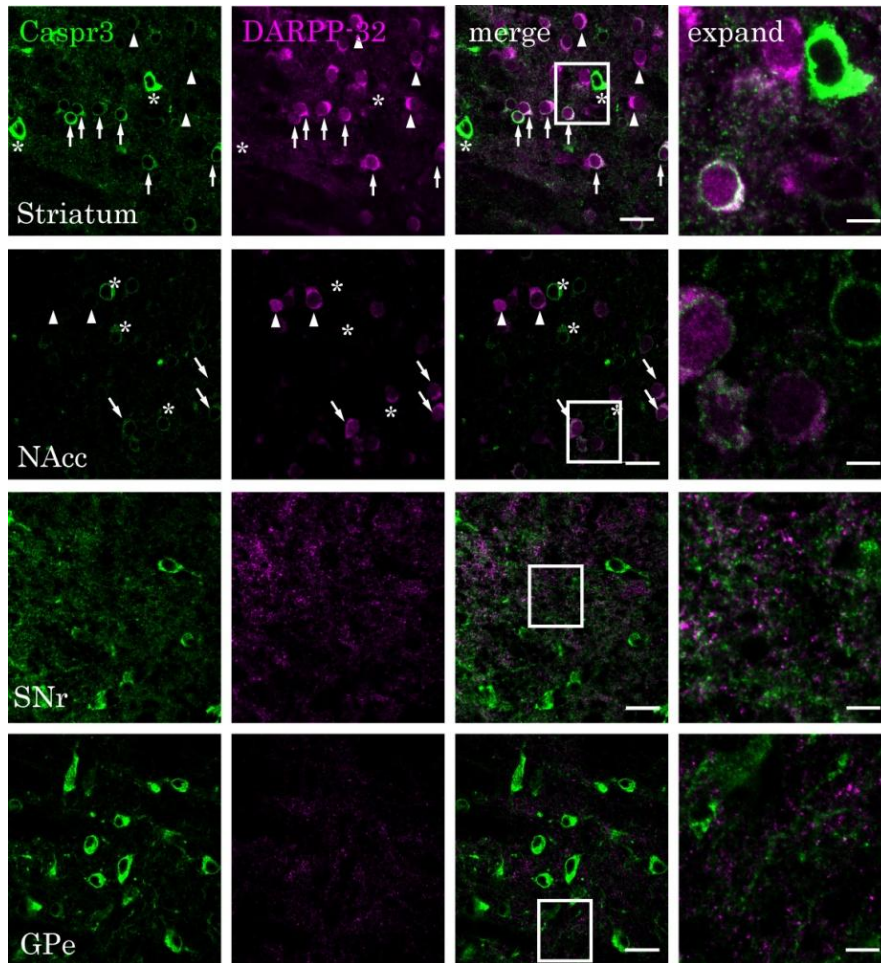


図 10 生後 7 日のマウスにおける Caspr3 と DARPP-32 の免疫蛍光二重染色
 線条体 (Striatum) において、Caspr3 は一部の投射神経細胞 MSN のマーカー
 DARPP-32 と一部共局在しており (Striatum, 矢印)、矢頭で示した細胞では
 DARPP-32 のみを発現していた (Striatum, 矢頭)。また DARPP-32 を発現して
 いない細胞にも Caspr3 の発現が見られた (Striatum, アスタリスク)。側座核
 (NAcc) でも同様に、Caspr3 と DARPP-32 が共局在している細胞 (NAcc, 矢
 印)、DARPP-32 のみ発現している細胞 (NAcc, 矢頭)、Caspr3 のみを発現して
 いる細胞 (NAcc, アスタリスク) が存在した。MSN の投射先である黒質網様部
 (subventricular zone : SNr) や外節淡蒼球 (GPe) で DARPP-32 のドット状のシ
 グナルが検出されたが、Caspr3 のシグナルとはオーバーラップしなかった。Scale
 bars ; merge : 20 μ m、expand : 5 μ m。

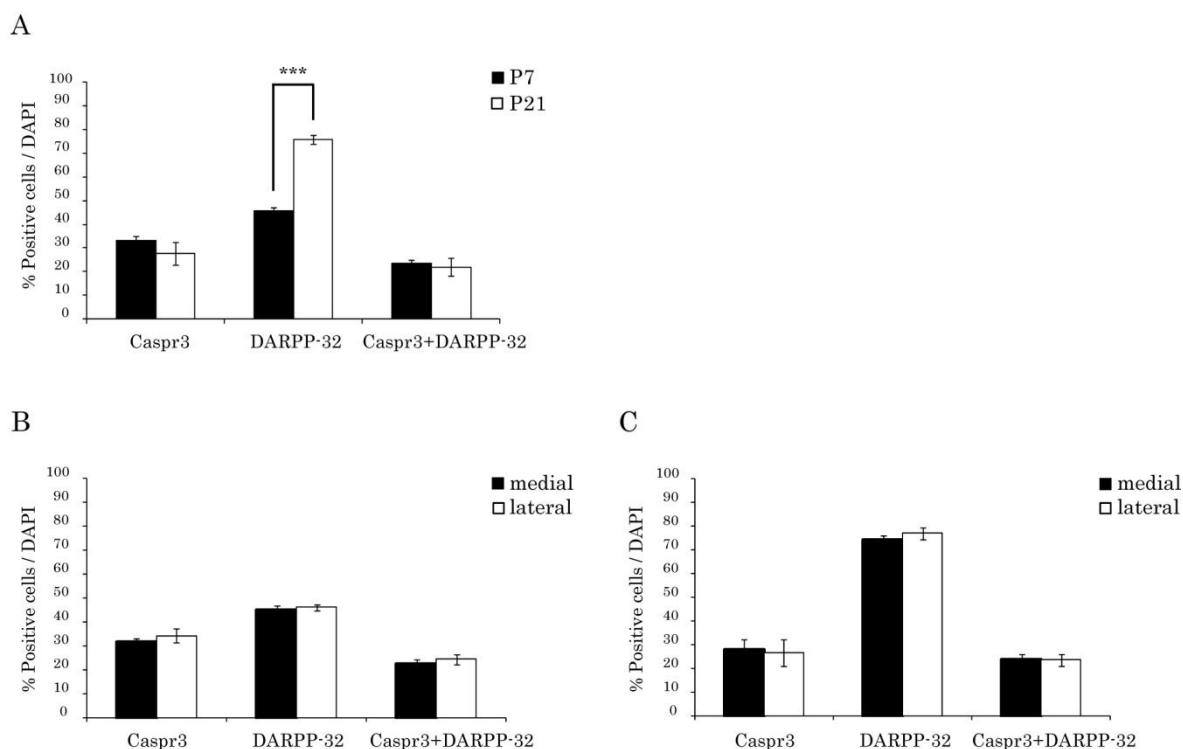


図 11 線条体における Caspr3 と DARPP-32 の陽性細胞数の割合

A : 線条体における Caspr3 と DARPP-32 の発現細胞数の割合。Caspr3 発現細胞数の割合は、生後 (P) 7 日目と 21 日目では有意な差はなかった。一方、DARPP-32 発現細胞数は P7 から P21 にかけて有意に増加した。また Caspr3 と DARPP-32 を共発現している細胞は、発達に伴う増加は見られなかった。B、C : 線条体の内側と外側における、Caspr3 と DARPP-32 の発現細胞数の割合。これら発現細胞数の割合は、P7 (B) と P21 (C) どちらにおいても有意差はなかった。*** $p < 0.001$, t-test. $n = 3$ 。

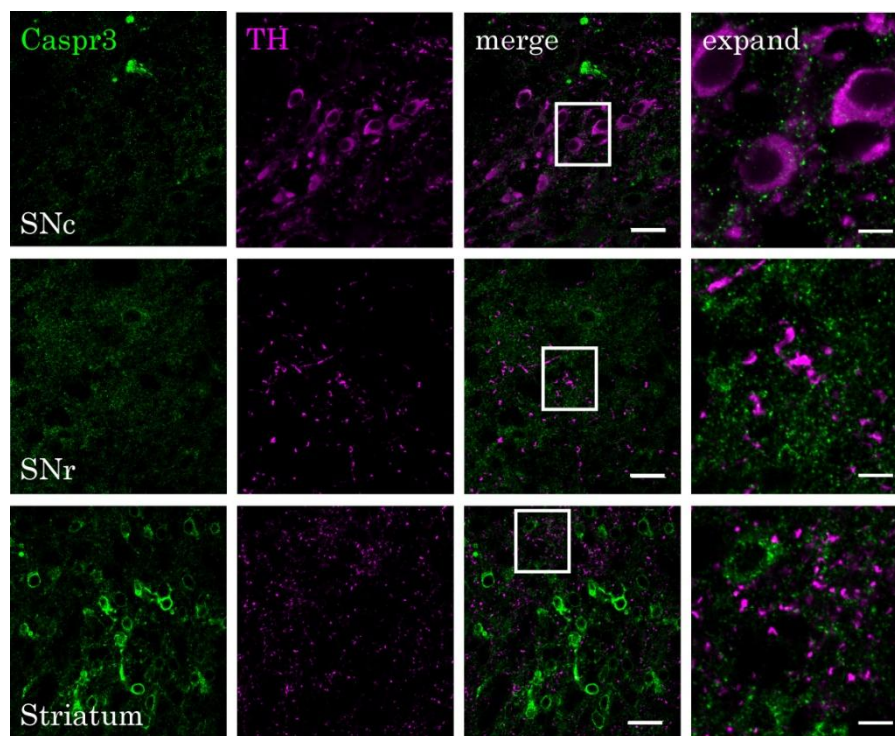
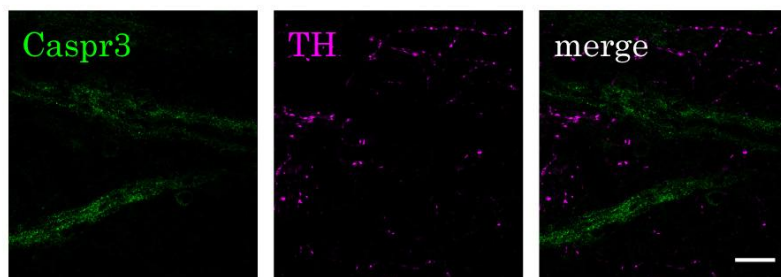


図 12 生後 7 日のマウスにおける Caspr3 と TH の免疫蛍光二重染色

黒質緻密部 (substantia nigra pars compacta : SNc) においては、ドーパミン作動性神経細胞のマーカー TH の発現がドーパミン作動性神経細胞の細胞体見られた。その周囲に、Caspr3 のドット状のシグナルが検出されたが、Caspr3 と TH は共局在しなかった。黒質網様部 (SNr) においては、Caspr3 は細胞体での発現とドット状のシグナルが検出され、TH はドット状のシグナルが検出されたが、Caspr3 と TH のシグナルはオーバーラップしなかった。線条体 (Striatum) においても SNc から投射されたドーパミン作動性神経細胞の末端と思われる TH のシグナルが見られたが、Caspr3 と TH は共局在していなかった。Scale bars ; merge : 20 μm 、expand : 5 μm 。

A



B

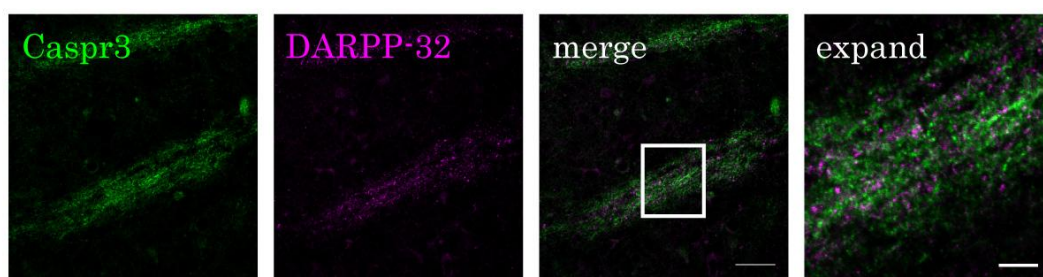
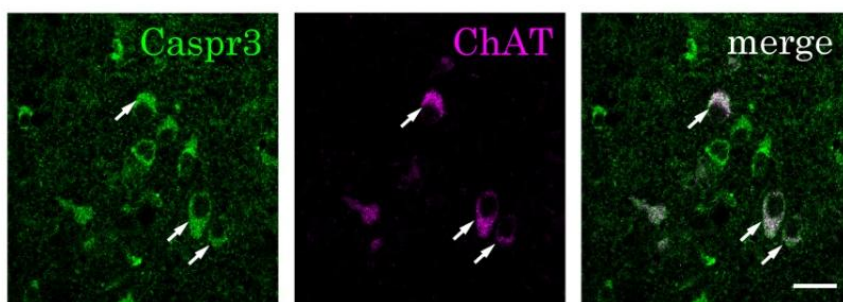


図 13 黒質線条体路における Caspr3 の発現解析

A : 生後 7 日マウスの黒質線条体路における、Caspr3 とドーパミン作動性神経細胞のマーカ-TH の蛍光二重染色。Caspr3 と TH は異なる線維上に発現が見られた。

B : Caspr3 と MSN のマーカ-DARPP-32 の蛍光二重染色。Caspr3 と DARPP-32 は同じ線維上に発現はしているようだが、2 つのシグナルはオーバーラップしていなかった。Scale bars ; 20 μm 、expand : 5 μm 。

A



B

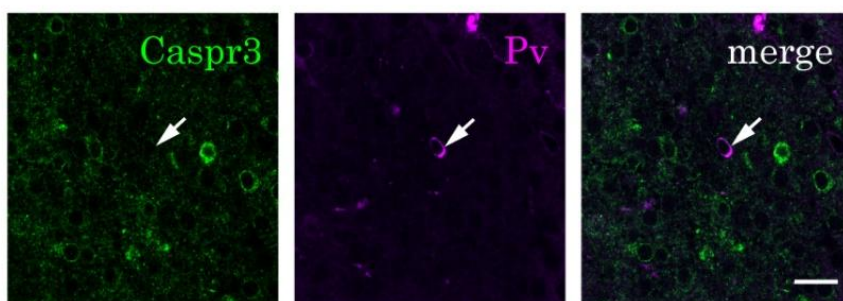


図 14 線条体インターニューロンにおける Caspr3 の発現解析

A : 生後 7 日マウス線条体における、Caspr3 とアセチルコリン作動性インターニューロンのマーカー ChAT の蛍光二重染色。Caspr3 は ChAT と共局在していた (矢印) 。 B : Caspr3 とパルブアルブミン含有 GABA 作動性インターニューロン parvalbumin (Pv) の蛍光二重染色。Caspr3 と parvalbumin は共局在していなかった (矢印) 。 Scale bars ; 20 μ m。

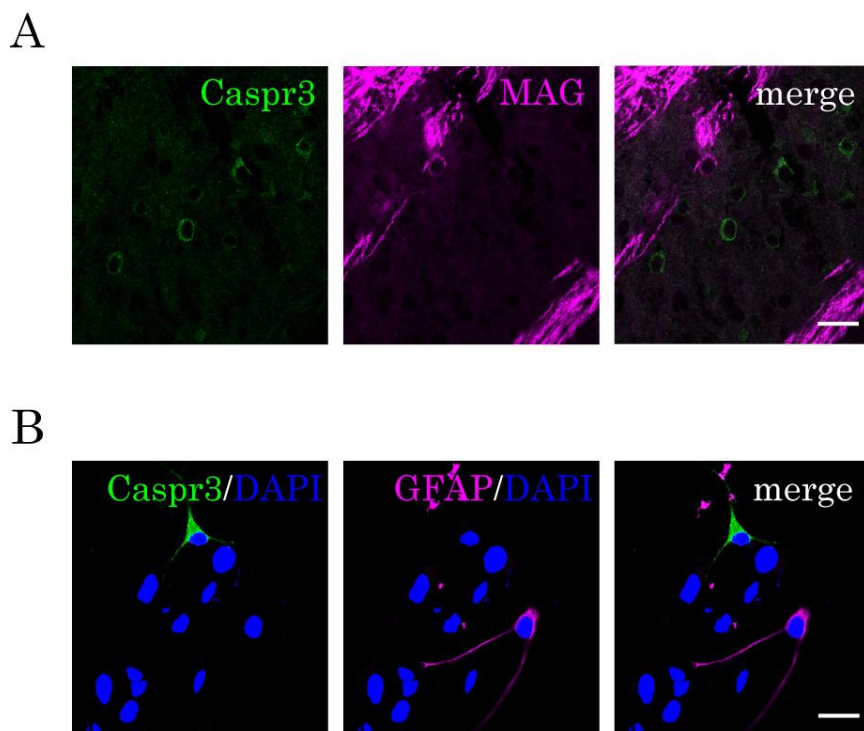
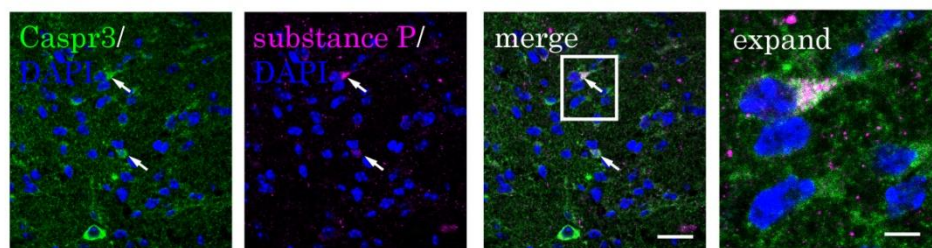


図 15 グリア細胞における Caspr3 の発現解析

A : 生後 7 日目マウス線条体における、Caspr3 とオリゴデンドロサイトのマーカー MAG との蛍光二重染色。Caspr3 と MAG のシグナルはオーバーラップしなかった。

B : 生後 0 日目のマウス線条体から取り出した、培養 7 日目の線条体初代培養神経細胞の Caspr3 とアストロサイトのマーカー GFAP との蛍光二重染色。Caspr3 と GFAP は、共局在はしなかった。Scale bars ; 20 μm 。

A



B

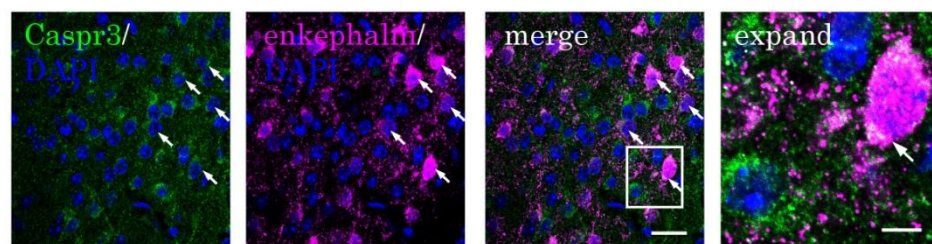
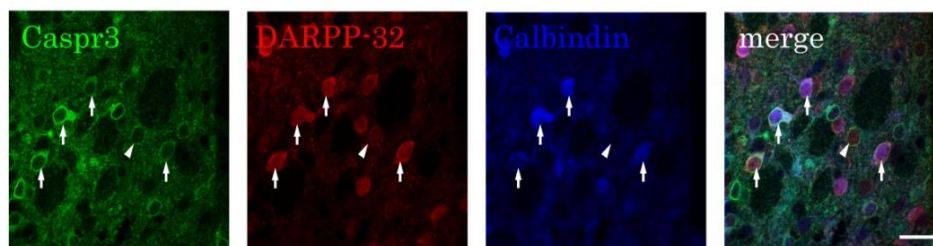


図 16 直接路および間接路 MSN における Caspr3 の発現解析

A : 生後 7 日目のマウス線条における、Caspr3 と直接路（線条体－黒質網様部）MSN のマーカー substance P の蛍光二重染色。Caspr3 は substance P、と共局在していた（矢印）。 B : Caspr3 と間接路（線条体－外節淡蒼球）MSN のマーカー Enkephalin の蛍光二重染色。Caspr3 は enkephalin と共局在していた（矢印）。
Scale bars ; merge : 20 μm 、expand : 5 μm 。

A



B

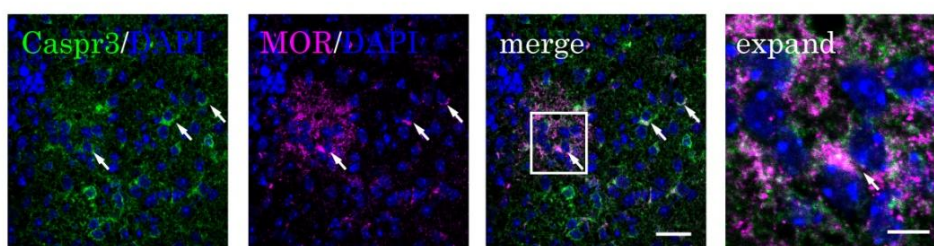


図 17 matrix および striosome の MSN おける Caspr3 の発現解析

A : 生後 7 日目のマウス線条における Caspr3 と MSN のマーカー-DARPP-32、matrix の MSN のマーカー-calbindin の蛍光三重染色。一部の細胞で Caspr、DARPP-32、calbindin の共局在が見られた (矢印)。一方、Caspr3 と DARPP-32 を発現しているが、calbindin を発現していない細胞も存在した (矢頭)。B : Caspr3 と striosome の MSN マーカー-MOR の蛍光二重染色。Caspr3 と MOR は共局在していた (矢印)。Scale bars ; merge : 20 μm 、expand : 5 μm 。

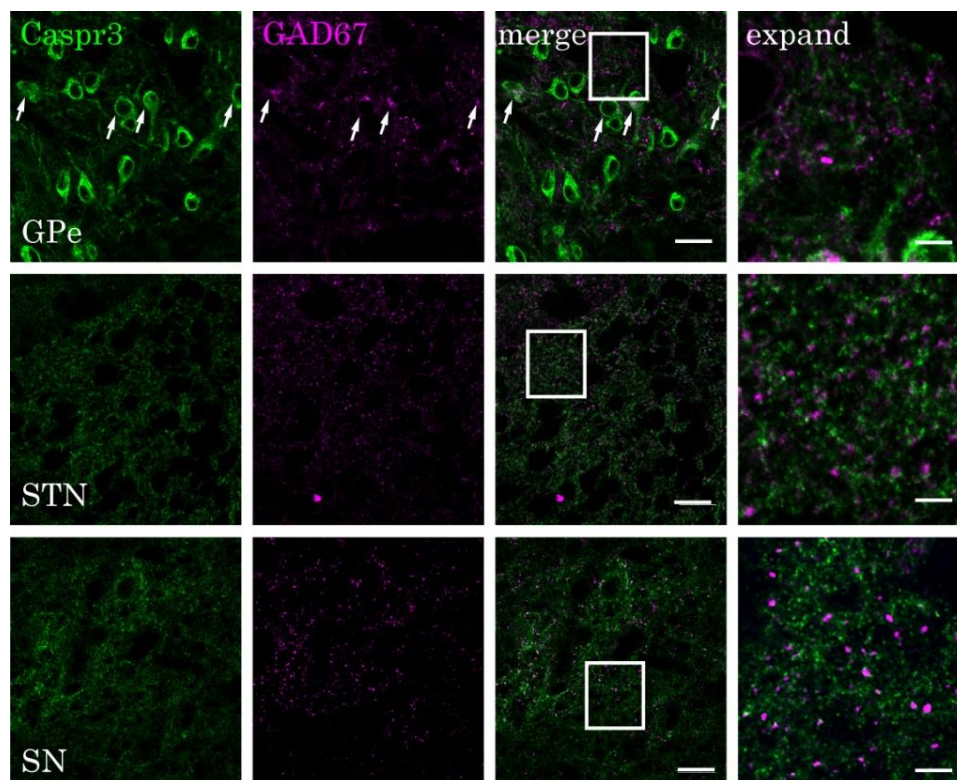


図 18 生後 7 日目のマウス脳における Caspr3 と GAD67 の免疫蛍光二重染色

外節淡蒼球 (GPe) の細胞体において一部、Caspr3 と GABA 作動性神経細胞のマーカー GAD67 の共局在が見られた (GPe, 矢印)。しかし、それぞれのドット状シグナルはオーバーラップしなかった。また視床下核 (subthalamic nucleus : STN) や黒質 (SN) においても、Caspr3 と GAD67 のドット状シグナルはオーバーラップしなかった。Scale bars ; merge : 20 μm 、expand : 5 μm 。

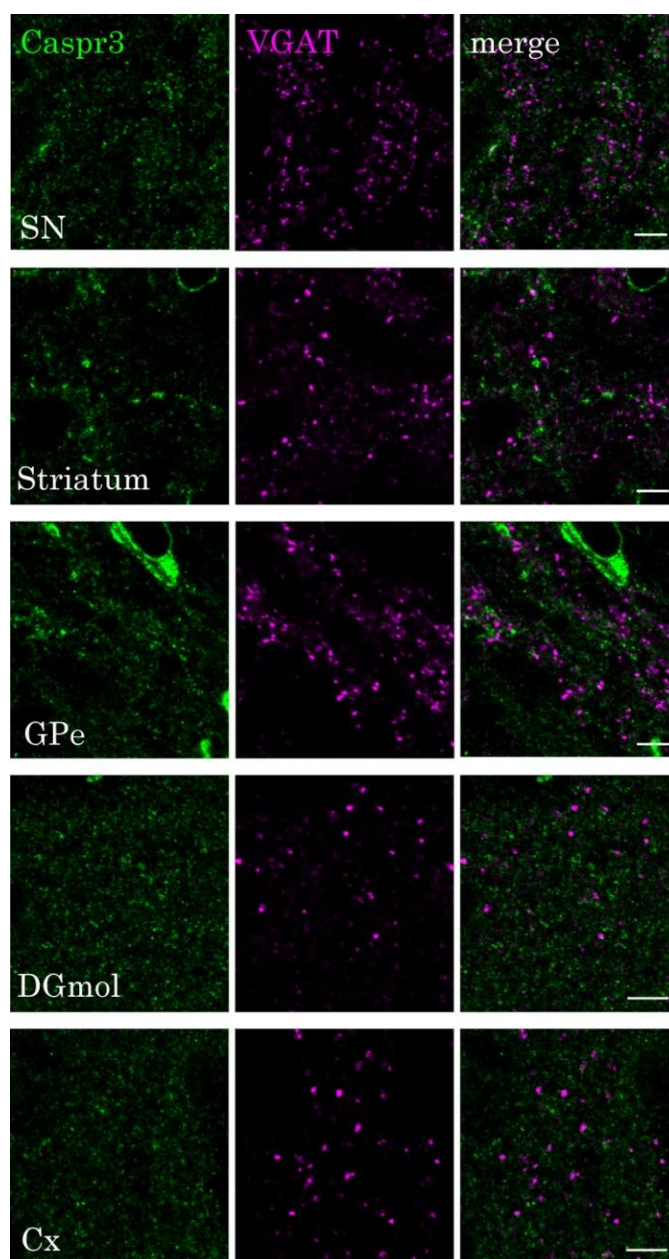


図 19 生後 7 日目のマウス脳における Caspr3 と VGAT の免疫蛍光二重染色
黒質 (SN)、線条体 (Striatum)、外節淡蒼球 (GPe)、海馬歯状回
(DGmol)、大脳皮質 (Cx) それぞれにおいて、Caspr3 と GABA 作動性神経細胞
のプレシナプスマーカー-VGAT のドット状シグナルが得られたが、共局在は見られ
なかった。Scale bars ; 5 μ m。

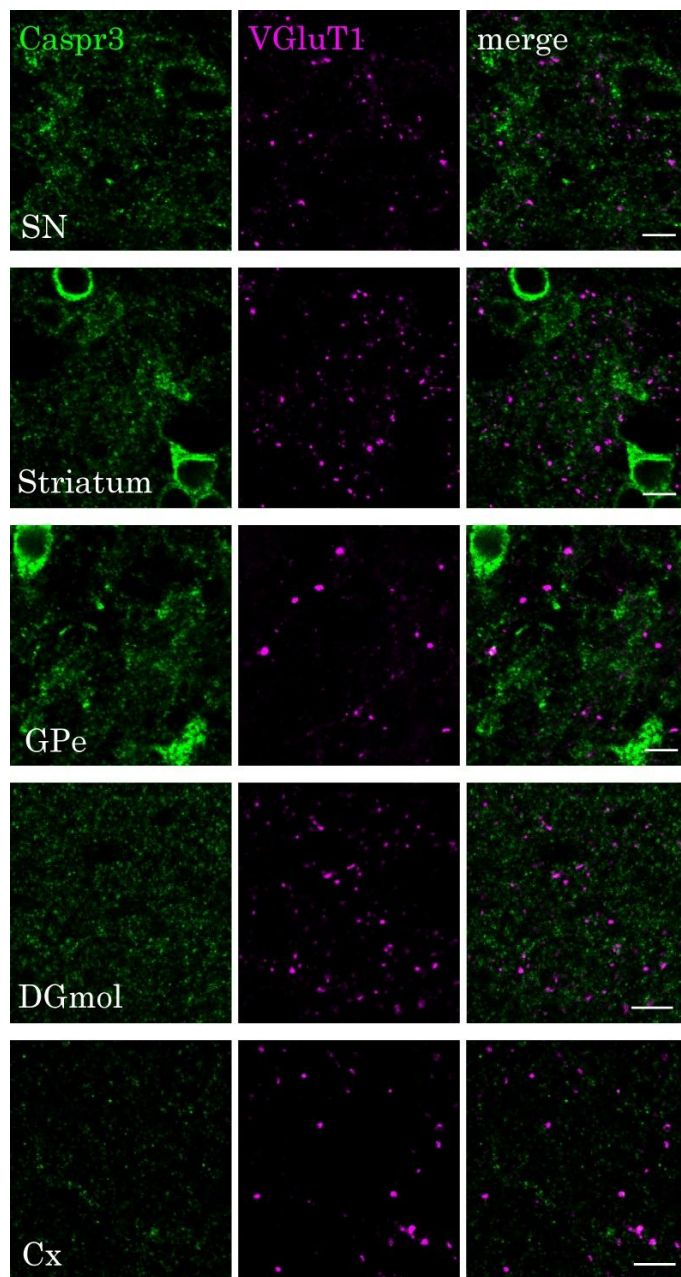


図 20 生後 7 日目のマウス脳における Caspr3 と VGluT1 の免疫蛍光二重染色
黒質 (SN)、線条体 (Striatum)、外節淡蒼球 (GPe)、海馬歯状回
(DGmol)、大脳皮質 (Cx) のそれぞれにおいて、Caspr3 とグルタミン酸作動性
神経細胞のプレシナプスマーカーVGluT1 のドット状シグナルが得られたが、共局
在は見られなかった。Scale bars ; 5 μ m。

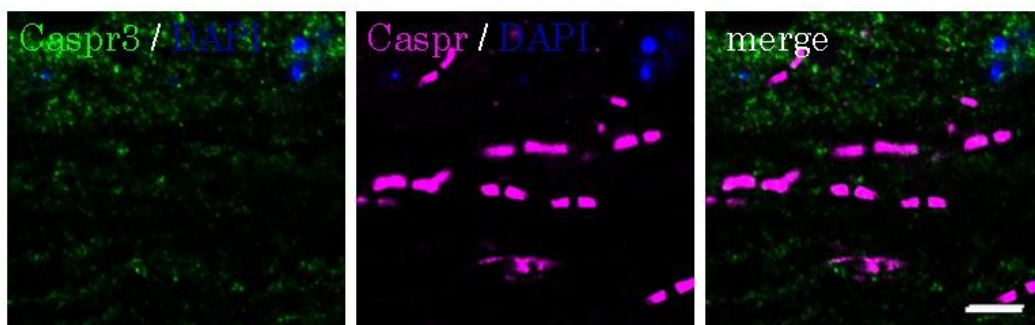
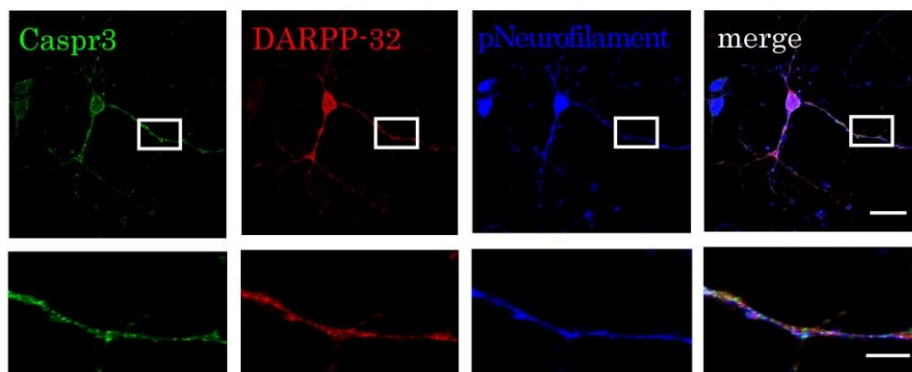


図 21 マウス脊髄における Caspr3 の発現解析

生後 14 日のマウス脊髄を用いた Caspr3 とミエリンのパラノード領域のマーカー Caspr との蛍光二重染色。Caspr3 はドット状のシグナルが検出されたが、Caspr と共局在せず、シグナルが隣り合うこともなかった。Scale bars ; 5 μ m。

A



B

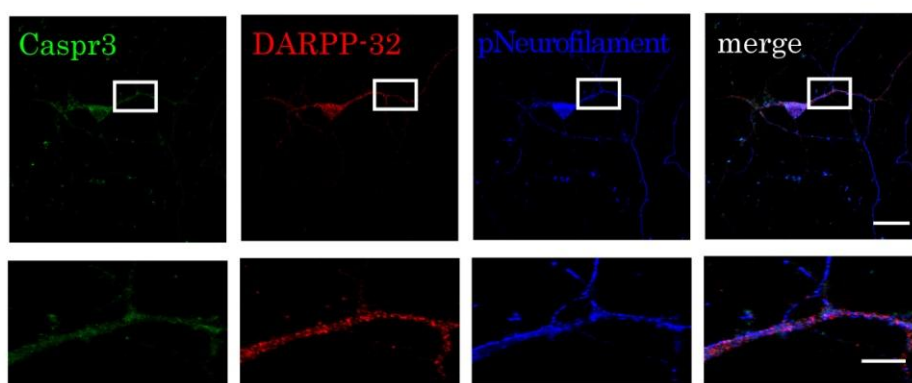


図 22 線条体初代培養神経細胞を用いた Caspr3 の局在解析

生後 0 日目のマウス線条体から取り出した、培養 7 日目の初代培養神経細胞を用いた、Caspr3 と MSN のマーカー-DARPP-32、軸索のマーカー-pNeurofilament の蛍光三重染色。界面活性剤 (0.1% Triton-X) 処理をした場合の Caspr3 の染色 (A) と、界面活性剤処理をしなかった場合の Caspr3 の染色 (B) を比較した。界面活性剤処理が施さなかった時 (B) に比べて、界面活性剤処理を施した初代培養神経細胞 (A) の方が、Caspr3 の強いシグナルが検出された。Scale bars ; merge : 20 μm , expand : 5 μm 。

2. 3. 4. Caspr3 KO マウスの形態学的解析およびタンパク質発現

これまで、マウス脳における Caspr3 の発現時期、領域、細胞について同定を行ってきた。その結果 Caspr3 は発達期の大脳基底核に特に強く発現していた。また線条体においては、Caspr3 はアセチルコリン作動性インターニューロンと一部の MSN に局在していることが明らかとなった。Caspr3 が発達期の大脳基底核に強く発現することから、Caspr3 の欠損が大脳基底核の構造に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこでまずは、Nissl 染色により Caspr3 KO マウスの大脳基底核の全体的な形態の観察を行った (図 23)。Caspr3 の発現が強い生後 14 日目のマウス脳矢状切片を用いて、Caspr3 WT および KO マウスの線条体、外節淡蒼球、黒質の全体的な様子を観察した。その結果、Caspr3 KO マウスの領域には、領域全体の歪みや萎縮といった構造的な異常は見られなかった (図 23)。

また Caspr3 が発達期に強く発現することから、大脳基底核内の細胞の発達に影響が出ている可能性を考えた。大脳基底核で特に重要な細胞は線条体の MSN や黒質のドーパミン作動性神経細胞であり、Caspr3 は発達期の MSN に発現している。Caspase3 の免疫染色ではアポトーシスを確認できなかったが、Caspr3 の欠損が MSN の変性を引き起こしている可能性が考えられる。またシナプスを作れない細胞は細胞死によって除去されることから、MSN の変性によって、MSN に投射してシナプスを作るドーパミン作動性神経細胞も影響を受ける可能性が考えられる。そこで、これらの細胞のマーカーである DARPP-32 や TH のタンパク質発現量が、Caspr3 の欠損によって影響を受けて減少していないかを調べることを考えた。それに加えて、Caspr ファミリー分子はどれも似た構造を持っている (図 1)。このことから Caspr3 欠損により同じファミリー分子が Caspr3 の機能を補償する可能性が

あり、Caspr3 KO マウス脳では Caspr ファミリー分子の発現量が増加するのではないかと考えた。そこで、生後7日目の Caspr3 WT および KO マウス全脳ホモジネートサンプルを用いた Western blotting により、関連タンパク質の発現量を比較した (図24)。しかし、Caspr3 WT および KO マウス脳においては DARPP-32、TH、Caspr2、Caspr4 のタンパク質発現量に有意差はなかった。

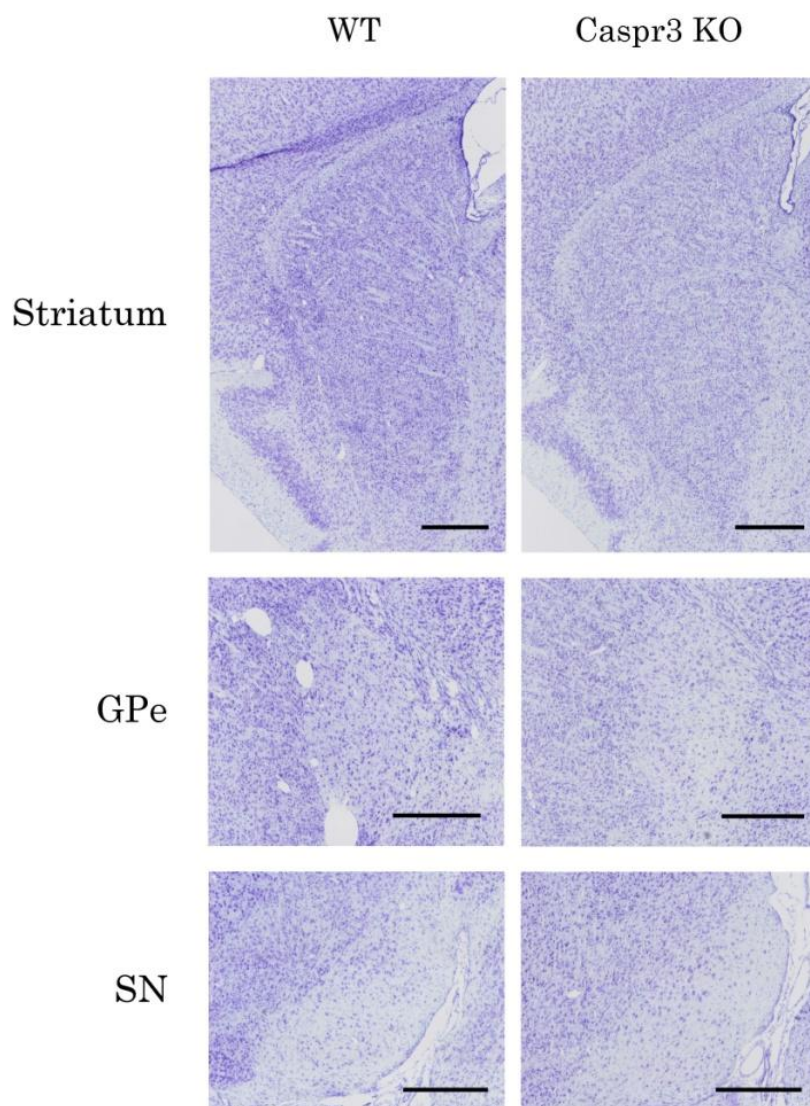


図 23 Nissl 染色による Caspr3 KO マウスの形態学的解析

生後 14 日目の Caspr3 WT および KO 脳切片を用いて Nissl 染色を行い、線条体 (Striatum)、黒質 (SN)、外節淡蒼球 (GPe) の全体的な構造を比較した。Caspr3 KO マウス脳では、これらの領域に歪みや萎縮などは見られなかった。Scale bars ; 500 μ m。

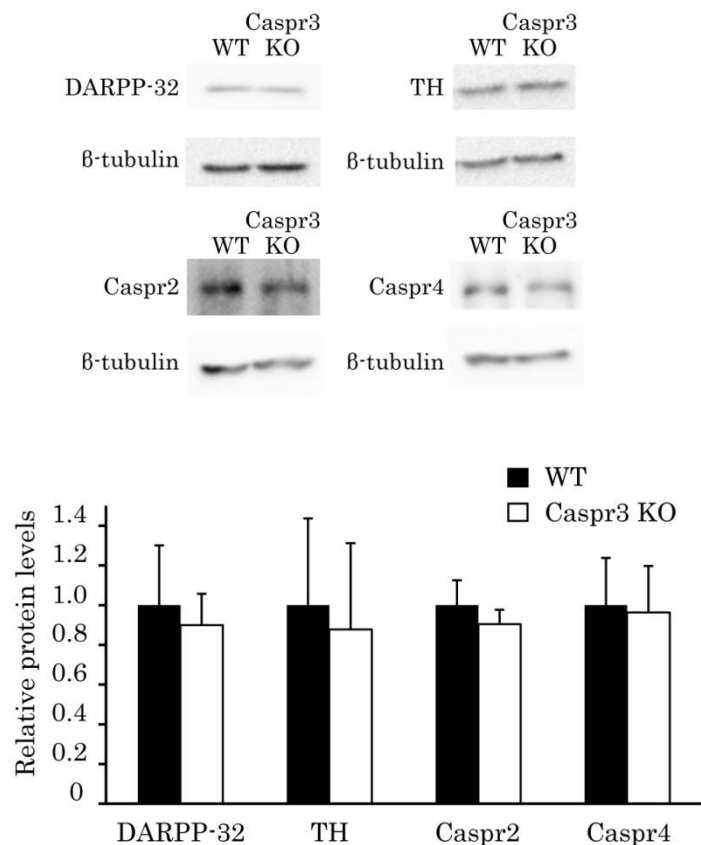


図 24 Western blotting による Caspr3 KO マウス脳でのタンパク質発現の比較
 生後 7 日目の Caspr3 WT および KO 脳ホモジネートサンプルを用いて DARPP-32、TH、Caspr2、Caspr4 の発現量を比較した。Caspr3 KO マウスにおけるこれらタンパク質発現量は、WT マウスと比べて特に有意差はなかった。WT ; n = 4、Caspr3 KO ; n = 4。

2. 4. 考察

Western blotting と免疫染色による解析から、Caspr3 が発達期の大脳基底核に強く発現していることが明らかになった (図 6、図 7)。また Western blotting の結果では、胎生期や発達期に比べると成体脳での発現はかなり弱かった (図 6) が、成体脳切片を用いた免疫染色の結果では、Caspr3 は成体脳においても大脳基底核強く発現していた (図 9)。Spiegel らの報告では、ヒト成体脳では Northern blotting により前頭葉、側頭葉、海馬、脳梁に強い発現が見られた (Spiegel et al., 2002)。またヒト成体脳では、大脳基底核にもシグナルは見られるものの、発現はそれほど強くはない。それ対してマウス脳では、胎生期から成体脳まで一貫して大脳基底核での発現が目立って強かった。Western blotting ではタンパク質、Northern blotting では RNA の発現解析という違いから、マウス脳とヒト脳での Caspr3 の発現を正確に比較することはできないが、マウス脳における Caspr3 は、ヒト脳とは異なる役割を持つ可能性が示唆された。また Caspr3 が、胎生期から成体脳まで一貫して大脳基底核に強く発現していることから、マウスにおいて Caspr3 は、運動制御に関与している可能性が考えられる。

Caspr3 は線条体の中でも、一部の投射神経細胞 MSN に局在していた (図 10)。線条体における Caspr3 の発現は、発達期から成体まで一貫して外側より内側が強かった (図 8、図 9B)。しかし、線条体における Caspr3 の発現細胞の割合は、内側と外側で有意な差がなかった (図 10)。マカクザルでは逆行性トレーサーを用いた解析により、大脳皮質の各運動野から線条体への入力には由来する領野によって入力様式が異なることが報告されている (Takada et al., 1998)。一次運動野からは線条体の外側に投射するのに対して、Caspr3 の発現が強い内側は、補足運動野からの投射を受ける。これらのことから線条体での Caspr3 発現の濃度勾配は、線条

体細胞での発現に由来するものではなく、大脳皮質の各領野からの投射の違いによるものであることが示唆される。このことから Caspr3 が、ある特定の大脳皮質—線条体路に発現している可能性が考えられる。Caspr3 は直接路の MSN と間接路の MSN それぞれのマーカーとも共局在していた (図 16) 。ただし一部では、直接路の MSN や間接路の MSN のマーカーは、1 つの MSN に複数発現していることも報告されており (Aizman et al., 2000 ; Perreault et al., 2011) 、今回報告した発現細胞の結果からは、Caspr3 が大脳基底核の経路特異的に発現している可能性は排除できない。一方、Caspr3 の matrix や striosome の MSN での発現は、それぞれのマーカーとの共局在が見られた (図 17) 。このことから Caspr3 の発現は、コンパートメント特異的な発現ではないことが考えられる。今後は、トレーシング解析を用いて Caspr3 発現細胞の正確な投射経路を明らかにする必要があると考えられる。

今回、Caspr3 は脳の至るところでドット状シグナルが検出されたが、これらはミエリンやシナプスマーカーとは共局在しなかった (図 18~21) 。今回用いたシナプルマーカーは全てプレシナプスマーカーであり、ポストシナプス側での局在は調べていない。Caspr3 のドット状シグナルがポストシナプスに局在している可能性も考えられることから、今後はポストシナプスマーカーと Caspr3 との蛍光二重染色も検討する必要があると考えられる。

また線条体の初代培養神経細胞を用いた免疫蛍光染色からは、Caspr3 は細胞内に多く存在するという結果を得た (図 22) 。Spiegel らの報告でも、Caspr3 は軸索に沿ったシグナルが検出されており、輸送小胞ではないかと予想している (Spiegel et al., 2002) ことから、今後は Caspr3 と輸送小胞マーカーとの蛍光二重染色も検討する必要がある。

今回の Caspr3 KO マウスを用いた Nissl 染色での形態学的解析では、大脳基底核の全体的な構造に異常は見られなかった (図 23)。また、Caspr3 KO マウスにおける大脳基底核の重要なタンパク質および Caspr ファミリー分子の発現量も、WT マウス脳と比較して有意な差は見られなかった (図 24)。今回、Caspr3 欠損によるアポトーシスへの影響を考え、生後 14 日および 1 ヶ月齢の Caspr3 KO マウス脳を用いて、アポトーシスのマーカーである Caspase3 で免疫蛍光染色を行ったが染まらなかった (データ無し)。この Caspase3 の染色では、DNase 処理によるアポトーシスのポジティブコントロールを用意しなかったため、Caspr3 KO マウス脳ではアポトーシスが起きていないのか、Caspase3 の免疫染色が失敗しているのかが判断できない。今後は、DNase 処理によりアポトーシス起こさせたサンプルをポジティブコントロールとして用意し、Caspr3 KO マウス脳でのアポトーシスを検証する必要がある。

また、大脳基底核の損傷は、様々な不随意運動を引き起こすことが知られており (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Obeso et al., 2000; Sieradzan ad Mann et al., 2001)、Caspr3 が運動機能に関与している可能性が考えられる。しかし、Caspr3 KO マウスを当研究室で飼育管理している限りでは、目立った運動異常は認められない。このことから、Caspr3 KO マウスの運動に関する表現型を調べるために、基本的な活動量や行動の性質を評価する行動解析を行う必要があると考えられる。

第3章 Caspr3 KO マウスの行動解析

3. 1. 緒言

第2章では Caspr3 のマウス脳における発現時期、領域、細胞の同定を行い、Caspr3 が発達期のマウス大脳基底核に発現し、特に線条体投射神経細胞 MSN の一部とアセチルコリン作動性インター神経細胞に発現していることを明らかにした。

1. 4. 大脳基底核でも述べたように、大脳基底核は主に運動調節機能に関与しており、損傷するとパーキンソン病やハンチントン病、注意欠如多動性障害、バリズムなどの不随意運動を引き起こすことが知られている (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Obeso et al., 2000; Sieradzan ad Mann et al., 2001)。特に黒質緻密部にあるドーパミン神経細胞は、線条体の D1R と D2R を介して直接路と間接路の神経活動のバランスを調節するのに重要とされており (Keefe and Gerfen, 1995)、D1R および D2R KO マウスでは、それぞれホームケージ内における活動性が増加または減少することが知られている (Xu et al., 1994; Jung et al., 1999)。また D1R および D2R KO マウスは、加速式ロータロッドテストやステップホイールシステムなどいくつかの運動テストにおいても運動パフォーマンスの異常が報告されている (Nakamura et al., 2014)。

Caspr ファミリー分子に関してもいくつかの行動学的異常が報告されている。Caspr KO マウスは、振戦や重篤な運動失調を引き起こし、1ヶ月以内に死亡する (Bhat et al., 2001)。Caspr2 および Caspr4 は ASD 原因候補遺伝子として挙げられおり、Caspr2 KO マウスでは脳波形の異常や営巣行動の減少、過剰な毛づくろいや他者への接近の低下といった社会行動の異常が報告されている (Peñagarikano et al., 2011)。また Caspr4 KO マウスでも、過剰な毛づくろいを含む不安様行動や PPI の異常が報告されている (Karayannis et al., 2014)。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

Caspr3 はマウス脳において、胎生期から成体まで一貫して大脳基底核に強く発現していたことから、Caspr3 KO マウスも活動量や運動機能、学習、不安様行動、社会行動などの行動学的異常が見られるのではないかと考えた。

第3章では、運動機能の評価を中心とした行動テストバッテリーを組み、Caspr3 遺伝子型マウスの行動解析した結果について報告する。この章で述べる解析は、Caspr3 KO マウスを作製した国立遺伝学研究所マウス開発研究室の小出 剛准教授らとの共同研究により行ったものである。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

3. 2. 材料および方法

3. 2. 1. 実験動物

行動実験には、10~13 週齢の雄個体を使用した。マウスは全て、国立遺伝学研究所の動物飼育実験施設にて飼育管理されており、飼育環境は、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ で管理されており、12 時間毎の明暗サイクル（明期: 6~18 時、暗期: 18~6 時）が設けられている。個体は、行動テスト開始まで littermate と集団飼育（2 個体以上）した。littermate 死亡により、ケージ内に 1 個体のみとなった場合や、1 個体のみが生まれて littermate がいなかった場合は、生育環境の違いを考慮し、行動テストには使用しなかった。テスト開始後は、各個体は個別飼育した。飼育ケージは通常のマウス用ケージ（ $19.5 \times 29.5 \times 15 \text{ cm}$ ）を使用し、水および餌は自由に摂取することができる。本章で扱う動物の管理および実験は、日本学術会議の実験動物の適正な実施ガイドラインに従って行われた。実験動物の管理や取り扱い方法については、国立遺伝学研究所の動物実験委員会の承認を得ている。また動物の解剖の際には、適切な麻酔化で行い、動物への苦痛を最小限にする努力をしている。

3. 2. 2. 行動テストバッテリー

行動テストバッテリーは、11 種類の行動テストから成る（表 3）。Caspr3 の局在を基に自発活動、不安様行動、社会性行動、攻撃行動、運動機能、作業記憶、恐怖学習、感覚運動ゲート制御および痛覚を調べる構成とした。マウスの体重は、テストバッテリー開始直前に測定した。行動テストは連日行い、Home cage activity 以外のテストは明期（6:00~18:00）に行った。

3. 2. 2. 1. ホームケージアクティビティテスト

ホームケージアクティビティテストは、参考文献に従って行った（Kato et al.,

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

2014)。自発活動量は、各個体をホームケージに入れて、赤外線センサー (Activity Sensor; Ohara Co. Ltd., Tokyo, Japan) により測定した。センサーによるデータ取得は1分間ごとに自動的に行われる。測定期間は4日間で、初日はホームケージ内での順応期間とした。総活動量は、1分間辺りの活動量を3日間分合計した。活動時間は、1分間に1 count 以上あれば活動したとみなし、活動した時間を計測し、3日間分を合計した。

3. 2. 2. 2. オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストは、参考文献をもとに行った (Takahashi et al., 2006; 2008)。テスト環境はライトを用いて、明るい状態を保った (365 lux)。白い箱 (60 × 60 × 40 cm) の中にマウスを入れて、10分間マウスを自由に箱の中を行き来させた。スタート位置は、実験者から見て左手前の隅で、マウスが壁方向を向くように置くことを統一した。記録は箱の真上に設置したビデオカメラで撮影し、その動画を解析ソフト (Image OF; Ohara Co. Ltd.) を用いて移動距離を測定した。また解析ソフトによってエリアを9つに区切り、中心エリアでの滞在時間を算出した。さらに10分間のテスト中、以下に記した探索行動および不安様行動を、tanaMove ver.0.07 (<http://www.nig.ac.jp/labs/MGRL/tanaMove.html>) を用いてカウントした。

Locomotion : エリア内を3歩以上歩く

Leaning : 前足を壁に触れながら、後ろ足で立つ

Rearing : 前足を壁や床から離れた状態で、後ろ足で立つ

Grooming : 身体の毛づくろい

Pausing : 動きが止まった状態

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

Stretching : 後ろ足を固定下状態で、身体を伸ばす

3. 2. 2. 3. 高架式十字迷路テスト

高架式十字迷路テストは、参考文献に従って行った (Takahashi et al., 2008) 。装置は、中央エリア (5 × 5 cm) から伸びる 2 つのプラスチック製の壁が設けられた closed arm (30 × 5 × 15 cm) と、2 つの壁がない open arm (30 × 5 × 0.25 cm) が十字型になった構造のもので、地面から 60 cm の高さになるものを用いた。実験者から見て左右に closed arm、前後に open arm があるように装置を配置した。テスト環境は、ライトにカバーをしてやや薄暗い状態 (150 lux) を保った。マウスを、実験者から見て左の closed arm に向くように中央エリアに置き、10 分間自由に各 arm を行き来させた。記録は、中央エリア真上に設置したビデオカメラで撮影し、その動画を解析ソフト (Image EPM; Ohara Co. Ltd.) を用いて、移動距離、各 arm へのエントリー回数、滞在時間を測定した。

3. 2. 2. 4. Y 字迷路テスト

Y 字迷路テストは、参考文献に従って行った (Sarnyai et al., 2000) 。装置 (Ohara Co. Ltd.) は 3 つの arm (37.5 × 3.5 × 12 cm) を持ち、各 arm 間が 120 度の角度を持ち、Y 字型になった構造である。テスト環境はライトにカバーをしてやや薄暗い状態 (150 lux) を保った。このテストでは、以下に記した自発的交替行動と作業記憶の 2 つを測定した。ただし参考文献に従って、装置や環境への不安に対する順応状態の影響を避けるために、この 2 つの測定の間には 7 日間のインターバル (この間に加速式ロータロッドテストおよび居住者-侵入者テストを行った) を設けた。arm へのエントリーは、マウスが arm の 1/3 以上に進んだ時点で arm に侵入したとみなした。テストは全て、中央エリア真上に設置したビデオカメラで

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

撮影した。

自発的交替行動：

実験者から見て Y 字になるように装置を置き、全ての arm を開放し、手前の arm を start arm として統一した。マウスを start arm に入れて、6 分間自由に各 arm を行き来させた。記録したビデオから、tanaMove ver.0.07

(<http://www.nig.ac.jp/labs/MGRL/tanaMove.html>) を用いて各 arm へ進入した順番、侵入回数、侵入時間を測定した。連続で 3 回異なる arm へ侵入した回数を交替行動数とし、次の式に従って交替行動率 (% Alternations) を算出した

$$\text{交替行動率 (\% Alternations)} = \text{交替行動数} / \text{総侵入回数} \times 100$$

作業記憶：

実験者から見て Y 字になるように装置を置き、手前の arm を start arm として統一した。残った 2 つの arm のどちらか 1 つを閉じた状態で、マウスを start arm に入れ、15 分間、2 つの arm を自由に行き来させた (training trial)。マウスを一旦装置から出し、飼育ケージに戻した。1 時間後、全ての arm を開放した状態にし、再びマウスを start arm に入れ、5 分間、各 arm を自由に行き来させた (test trial)。5 分間の test trial 中の各 arm への侵入回数、滞在時間、そして 1 番最初に入った arm を tanaMove で記録した。training trial で閉じる arm は、交互に変えた。

3. 2. 2. 5. 加速式ロータロッドテスト

加速式ロータロッドテストは、参考文献に基づいて行った (French et al., 2011; Kanno et al., 2014)。装置 (Ohara Co. Ltd.) は、直径 3 cm の回転棒が 20 cm の高さにあるものを用いた。初速 6 rpm、終速 60 rpm の 5 分間加速式に設定した。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

初速 6 rpm の一定速度で回転する棒の上にマウスを乗せ、姿勢が安定したことを確認して、加速を開始した。加速開始から、マウスが棒から落ちるまでの時間を計測した。ただし、マウスが棒にしがみついて一回転した場合は、落ちたものと同等とみなし、そこで trial を終了した。テストは、1日 10 trials、5日間連続で行った。各 trial 間には、5分間のインターバルを設けた。運動学習率は、以下の式に従って算出した。

$$\text{運動学習率} = \{ (\text{trial 1 と trial 2 の平均タイム}) - (\text{trial 9 と trial 10 の平均タイム}) \} / 9$$

3. 2. 2. 6. 居住者—侵入者テスト

侵入者としてのマウスには、遺伝学研究所で飼育管理されているB6マウスで、居住者マウスよりも若い週齢のマウスを使用した。居住者マウスの飼育ケージの中に侵入者マウスを入れ、1日15分間の観察を2日間連続で行った。この観察は全てビデオカメラで記録した。侵入者マウスは尻尾にマジックで印をつけて区別し、2日間とも居住者—侵入者ペアが同じになるようにした。15分間の中で、居住者マウスが侵入者マウスに対してとる行動をtanaMove ver.0.07

(<http://www.nig.ac.jp/labs/MGRL/tanaMove.html>) を用いて記録した。行動は、非攻撃性の社会行動（匂い嗅ぎおよび追跡）と攻撃行動（噛み付きおよび攻撃的な毛づくろい）の2項目を観察した。

3. 2. 2. 7. 恐怖条件付けテスト

恐怖条件付けテストは、条件付け用装置（30 × 10 × 15 cm, Ohara Co. Ltd.）の中で行われた。装置の中にマウスを入れてから1分30秒後、条件刺激として4秒間

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

の音刺激（1 kHz, 55 dB）の後に電気刺激（75 V, 0.3 mA 以下）を1秒間与えた。条件刺激は、1日連続3回、2日間で与えた。次の日、マウスを床敷きの入っていない新しい飼育ケージに移し、1時間順応させた。順応後、音刺激のみを5分間与えて、その間のフリーズ時間を測定した。このテストは全てビデオカメラで記録し、フリーズ時間は tanaMove ver.0.07

(<http://www.nig.ac.jp/labs/MGRL/tanaMove.html>) を用いて記録した。

3. 2. 2. 8. 驚愕反応および PPI テスト

驚愕反応および PPI テストは、参考文献に従って行った (Kanno et al., 2014)。テストは、背景音として 65 dB のホワイトノイズ存在下で、アクリル製のチューブ (San Diego Instruments, San Diego, CA) 内にマウスを閉じ込めた状態、反応を記録した。このテストは habituation trials、startle trials (40 msec, 120 dB)、prepulse trials (20 msec, 70, 75, 80 dB; 70 msec interval; 30 msec, 120 dB)、刺激がない no stimulus trials の全部で 38 回の刺激から構成されている。habituation trials は最初と最後に 4 回ずつ設定されており、それ以外の刺激は 6 回ずつランダムに与えた。各刺激に対する反応（振幅および時間）を平均し、PPI 率の算出および統計解析に用いた。PPI 率は以下の式に従って算出した。

$$\text{PPI 率} = (1 - [\text{prepulse trials}] / [\text{startle trials}]) \times 100$$

3. 2. 2. 9. ホットプレートテスト

参考文献に従って、ホットプレート装置 (Muromachi kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan, MK-350A) を用いた痛覚評価を行った (Koide et al., 2000)。テスト中、アクリル製の壁に囲まれたホットプレートは 52°C に保った。マウスをプレート上に

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

置き、後ろ足を舐める、もしくは揺さぶるまでの時間を計測した。マウスがプレート上で飛び跳ねた場合は、舐める・揺さぶる動作と同様に、熱に反応したとみなしてテストを終了した。

3. 2. 2. 10. テールフリックテスト

参考文献に基づき、テールフリックテストを行った (Koide et al., 2000)。マウスを布で包み、装置 (Muromachi kikai Co. Ltd., MK-330A) の上に固定した。尻尾の表面に放射熱を当て、マウスが尻尾を振り払うまでの時間を計測した。尻尾の位置をずらし、放射熱を当てる場所を変えて合計 3 回計測を行い、中央値を統計解析に用いた。反応時間の測定は、センサーにより自動的に行われる。

3. 2. 3. ホイールランニングテスト

ホイールランニングテストは参考文献に基づいて行った (Willuhn and Steiner, 2006)。ホイール装置 (Ohara Co. Ltd.) は直径 15 cm、幅 5 cm の金属製の回転輪を用いた。マウスを装置の中に入れ、入口は金属製の板で封鎖した。テスト中、マウスは装置の中で自由にホイールを回すことができるが、装置の外には出ることはできない。テストは 1 日 1 時間、6 日間連続で行い、ホイールの回転数をカウンター (Ohara Co. Ltd.) で自動的に計測した。テストは全てビデオカメラで撮影した。撮影した動画から、ホイールの回転中にマウスがスリップし、ホイール内でスウィングした回数をランニングエラーとして tanaMove ver.0.07

(<http://www.nig.ac.jp/labs/MGRL/tanaMove.html>) を用いて記録した。

3. 2. 4. 統計解析

統計解析には、Statview 5.0J software (SAS Institute, Cary, NC) を用いた。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

また統計解析の前に、EZR (Saitama, Medical Centre, Jichi Medical University; <http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>; Kanda, 2013) を用いて正規性および等分散性の検討を行った。正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用い、等分散性の検定には F-test または Bartlett test を用いた。データが正規性かつ等分散性に従う場合は、t-test または 2 要因分散分析 (ANOVA) を行った。ANOVA が有意であった場合の多重比較検定には、t-test with Bonferroni correction を用いた。またデータが正規性あるいは等分散性に従わない場合は Mann-Whitney test を行い、必要であれば Bonferroni correction で補正した。Y 字迷路テストの作業記憶 (図 29B) には、カイ二乗検定を用いた。p < 0.05 の場合に有意であるとみなした。各グラフは全て、平均値 ± 標準誤差を表したものである。

3. 3. 結果

3. 3. 1. 行動テストバッテリー

Caspr3 KO マウスの行動学的異常を網羅的に調べるため、様々な行動テストから成る行動テストバッテリーを組み、行動解析を行った（表 3）。この行動テストバッテリーは、Caspr3 が発達期の脳基底核に強く発現することから、主に運動機能を中心に評価する内容とした。結果として、Caspr3 KO マウスの活動量や探索行動、作業記憶、攻撃および社会行動、PPI、恐怖条件付け学習、痛覚感受性などの機能には異常はなかった（表 3）。唯一、Caspr3 KO マウスで異常が見られたのは、3. 3. 1. 4. 加速式ロータロッドテストによる運動協調性および運動学習の評価での、運動学習であった。この結果を受けて、Caspr3 の運動学習能力への影響の妥当性を検討するため、行動テストバッテリーとは別に 3. 3. 2. ホイールランニングテストによる運動学習の評価を行った。

また行動テストバッテリー開始前に Caspr3 WT マウスと KO マウスの体重を比較したが、両者の間に有意な差はなかった（図 25）。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

表3 行動テストバッテリースケジュール

日程	行動テスト	評価内容	有意差
Day 1-4	ホームケージアクティビティテスト	活動量および活動パターン	無
Day 5	オープンフィールドテスト	活動量および不安様行動	無
Day 6	高架式十字迷路テスト	活動量および不安様行動	無
Day 7	Y字迷路テスト	自発交替行動	無
Day 8-12	加速式ロータロッドテスト	運動協調性および運動学習	有
Day 13-14	居住者-侵入者テスト	攻撃行動および社会行動	無
Day 15	Y字迷路テスト	作業記憶	無
Day 16-18	恐怖条件付けテスト	恐怖条件付け学習	無
Day 19	驚愕反応および PPI テスト	感覚運動ゲート制御	無
Day 20	ホットプレートテスト	痛覚感受性	無
Day 21	テールフリックテスト	痛覚感受性	無

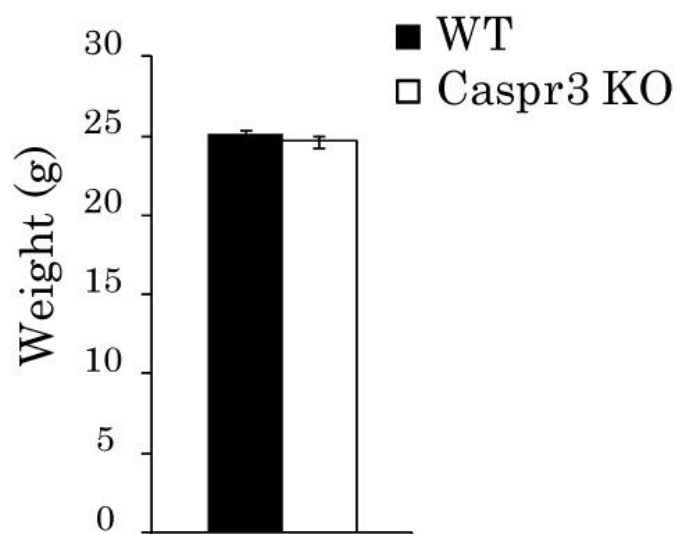


図 25 Caspr3 WT および KO マウスの体重

行動テストバッテリーを開始する前に、各個体の体重を測定した。両遺伝子間の体重に有意差はなかった。n = 17 ; WT、n = 17 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 1. ホームケージアクティビティテストによる活動量および活動パターンの評価

Caspr3 KO マウスの通常の活動量、活動パターンを調べるために、ホームケージアクティビティテストを行った (図 26)。このテストは、通常の飼育ケージ内でのマウスの動きを、飼育ケージの真上にある赤外線センサーによって計測されるもので、今回は 3 日間計測を行った。まず、3 日間の合計活動量および活動時間を比較したところ、Caspr3 KO マウスの活動量と活動時間は、WT マウスとの有意な差は見られなかった (図 26A, B)。次に、1 日の活動パターンを 1 時間ごとに 3 日間で平均した値をプロットした (図 26C, D)。マウスは夜行性のため、明期 (6~18 時) にはほとんど活動せず、主に暗期 (18~6 時) に活動する。また B6 系統マウスは暗期に加えて、暗期から明期に変わる直前に活動するという 2 相性の活動パターンが見られることが知られている (Nishi et al., 2010)。戻し交配により遺伝的背景が B6 系統マウスとなるように作製された Caspr3 WT および KO マウスの活動パターンは、先述したような 2 相性を示しており、両遺伝子間の活動パターンに差はなかった (図 26C, D)。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

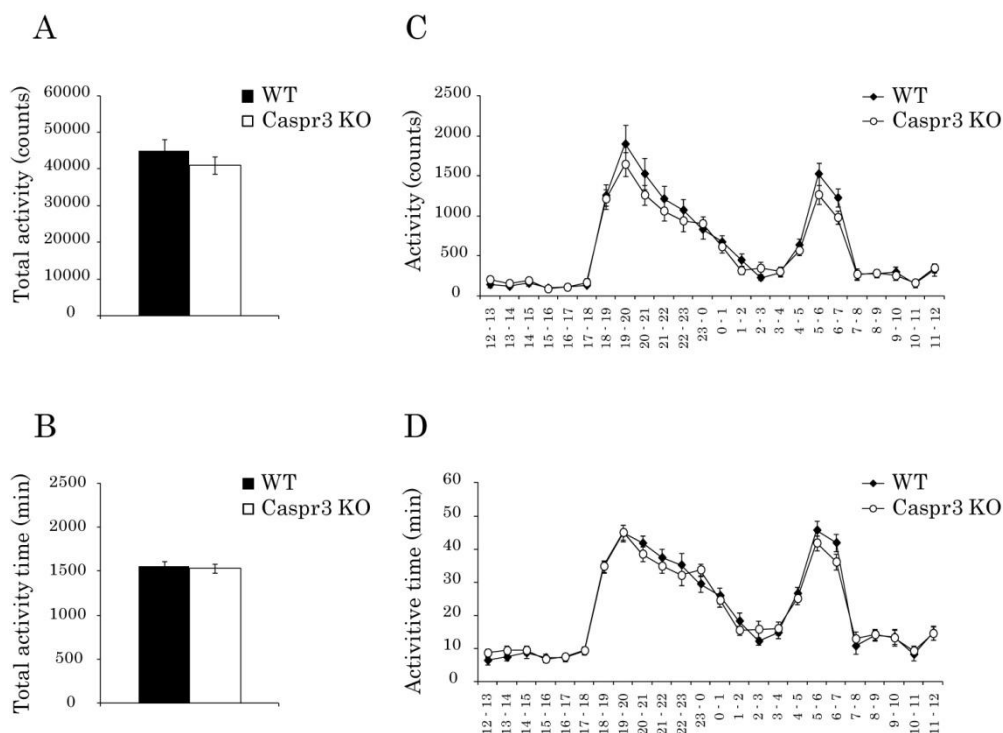


図 26 ホームケージアクティビティテストによる活動量および活動パターンの計測
 A、B : Caspr3 WT および KO マウスの、3 日間の合計活動量 (A) と合計活動時間 (B)。両遺伝子間に有意差は見られなかった。C、D : 1 時間ごとの活動量 (C) と活動時間 (D)。どちらも両遺伝子間で差はなく、Caspr3 KO マウスの活動パターンに異常はなかった。n = 17 ; WT、n = 17 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 2. オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路による不安様行動の評価

マウスの不安様行動を調べるテストとしてオープンフィールドテスト（図 27）と高架式十字迷路（図 28）を行った。まずオープンフィールドテストでは、マウスを新規的な環境（広く明るい箱の中）に置き、マウスが持つ探索性を利用した活動量（移動距離）の計測を行った（図 27A）。また暗く閉鎖的な環境を好むマウスが、テスト中にどの程度広く開放的な箱の中心エリアを探索するかを、不安性の指標として評価をした（図 27B）。測定の結果、Caspr3 WT 型マウスと KO マウスの活動量および中心エリアでの滞在時間には有意な差はなかった（図 27A, B）。またテスト中には観測者の目視によって、マウスが様々な探索および不安様行動をとる時間を計測した（図 27C）。Locomotion や Leaning、Rearing などは主に探索性に基づいた行動だが、壁や地面から前足を離す Rearing の出現は、壁に前足が触れている Leaning に比べると、接触性を好むマウスにとっては不安性の影響を受けやすい（Takahashi et al., 2006）。また Grooming、Pausing、Stretching は不安様行動の 1 つだが、特に Grooming は ASD のモデルマウスなどでよく見られるこだわり行動の指標としてもよく用いられている（Peñagarikano et al., 2011; Karayannis et al., 2014）。これらの項目について評価を行ったが、Caspr3 KO マウスの探索および不安様行動は、WT マウスとの有意差はなかった（図 27C）。

次に高架式十字迷路は、高く引き上げられた場所で、壁があり安全な走行路（closed arm）と壁がない不安定な走行路（open arm）を用意し、マウスがどの arm にどの程度滞在するか、また何回侵入するかによって不安性の高さを評価するテストである（Sharon et al., 1985）。テスト中の活動量は、Caspr3 WT マウスと KO マウスの間で有意な差は認められなかった（図 28A）。またどちらのマウスも、

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

主に不安定な open arm よりも安定な closed arm に滞在する時間が長く、両者の間に差はなかった (図 28B)。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

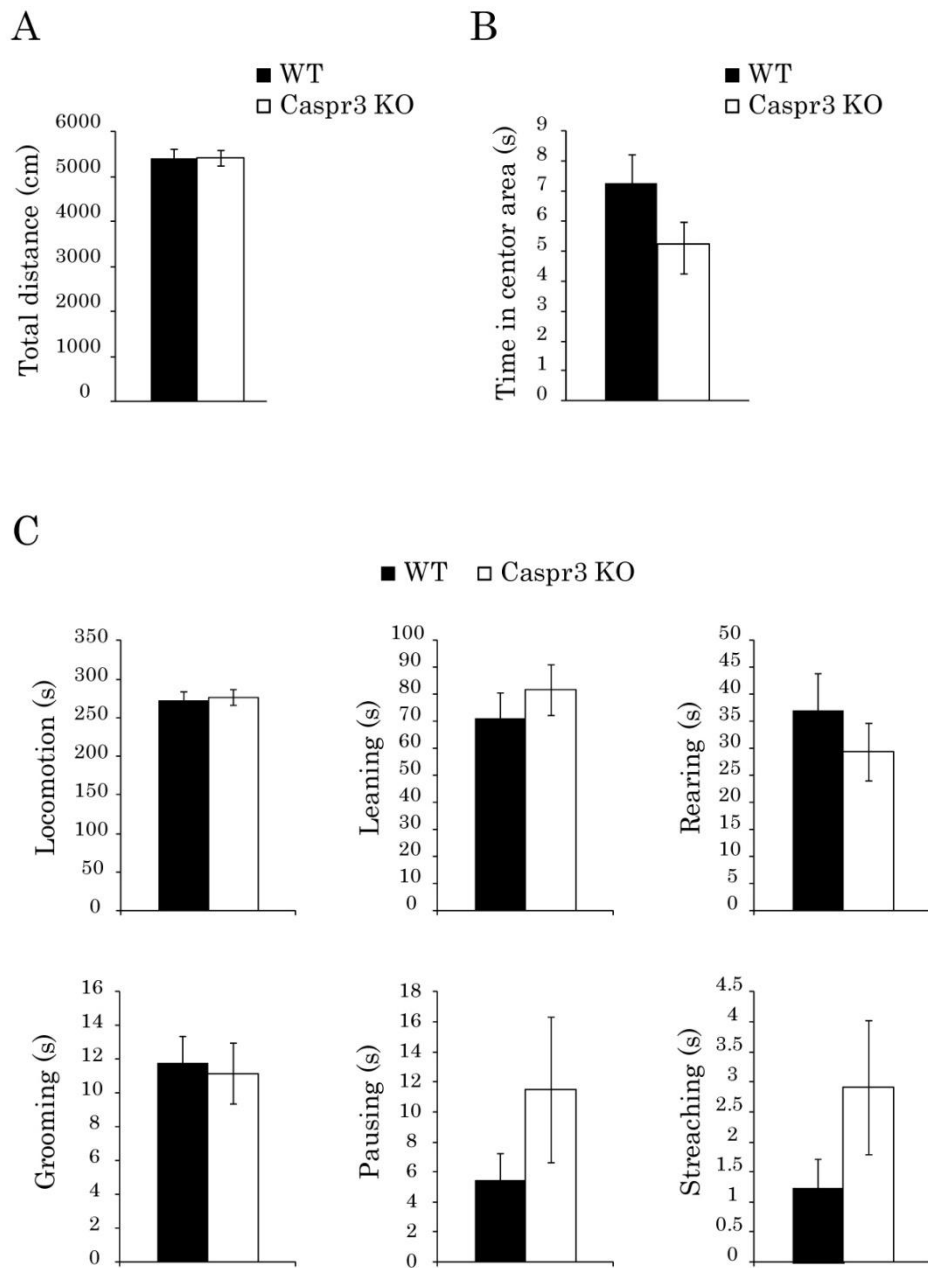


図 27 オープンフィールドテストによる活動量および不安様行動の評価

A : 10 分間の合計活動量（移動距離）。B : 中心エリアにおける滞在時間。C : 10 分間のテスト中に各探索性および不安様行動をとった時間。これら全て Caspr3 WT マウスと KO マウス間で有意差はなく、Caspr3 KO マウスの活動量および不安傾向に異常は見られなかった。n = 13 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

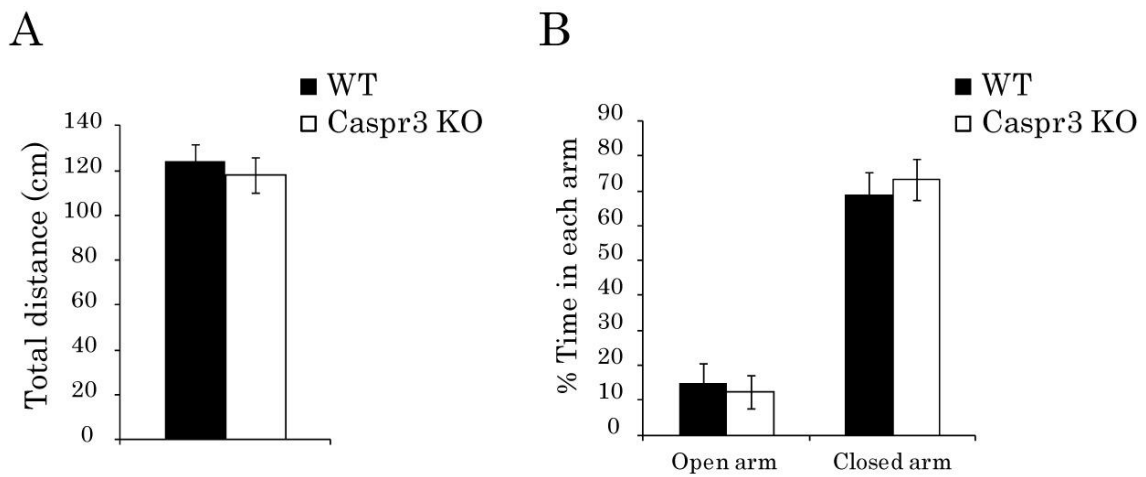


図 28 高架式十字迷路による活動量および不安様行動の評価

A : 10 分間のテスト中の活動量（移動距離）。B : Open arm と Closed arm それぞれでの滞在時間の割合。どちらの項目も Caspr3 WT マウスと KO マウスの間に差はなく、活動量および不安様行動に異常は見られなかった。n = 13 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 3. Y字迷路テストによる自発交替行動および作業記憶の評価

Y字迷路テストでは、自発交替行動（図 29A）と作業記憶（図 29B、C）の評価を行った。自発交替行動はマウスの探索行動を利用したもので、Y字の形をした3本の arm に対し、続けて異なる arm に入る割合を算出したものである。この自発交替行動について、Caspr3 WT および KO マウス間での有意な差はなかった（図 29A）。次に作業記憶は、始めは1本の arm が閉ざされている中で、残った2本の arm 内をマウスに自由に探索させる。その後飼育ケージに戻し、1時間後に今度は3本全ての arm を開放した状態でマウスに探索させる。1時間前に1本の arm が閉ざされていた状況を覚えていれば、マウスは新たに解放された arm に興味を示して探索する。そこでテスト開始後、1番最初に新たに開放された arm（novel arm）に入るマウスの割合とテスト中の novel arm で滞在時間を比較した（図 29B、C）。しかしこれらの項目について、Caspr3 WT マウスと KO マウス間での有意差は見られなかった。

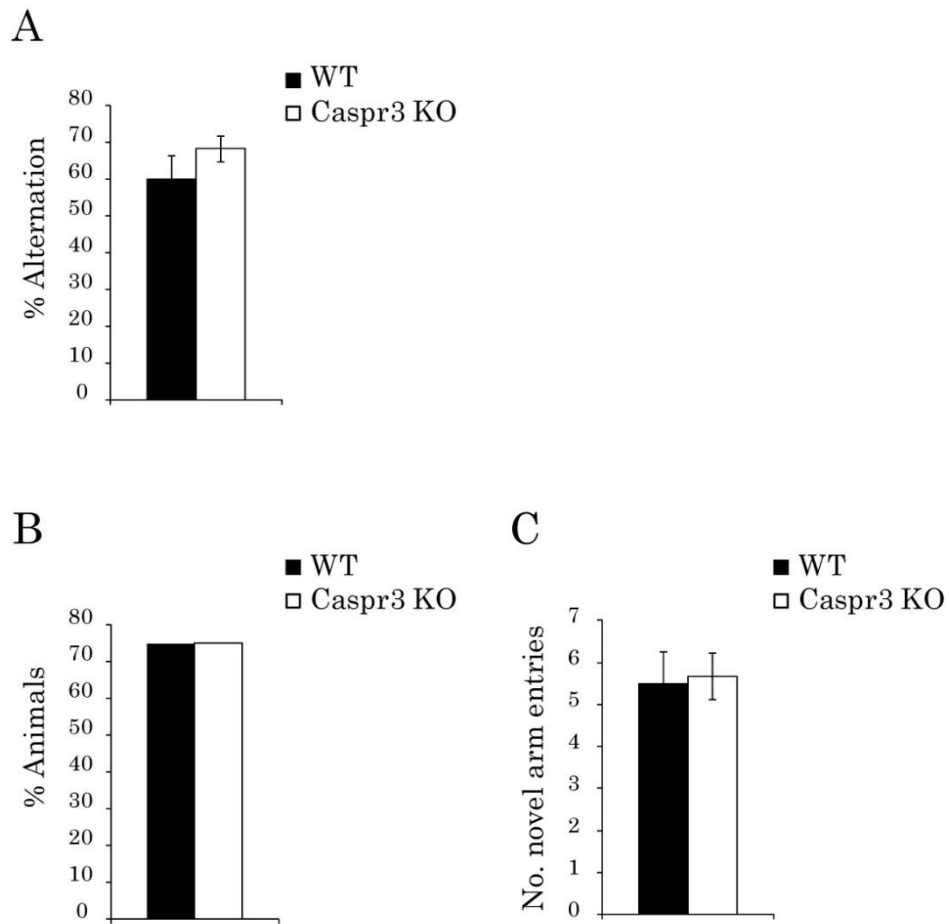


図 29 Y字迷路テストによる自発交替行動および作業記憶の評価

A : Caspr3 WT マウスおよび KO マウスの自発交替行動の割合。B : 作業記憶において、最初に novel arm を選ぶマウスの割合 C : novel arm への侵入回数。自発交替行動および作業記憶共に WT および Caspr3 KO 間に有意差はなく、異常は見られなかった。A : n = 13 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。B、C : n = 12 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 4. 加速式ロータロッドテストによる運動協調性および運動学習の評価

運動協調性を評価する有名なテストとしてロータロッドテストがある (Jones and Roberts, 1968)。マウスを回転する棒の上に乗せ、棒から落下するまでの時間を計測して、運動パフォーマンスを評価するという簡単なテストである。また棒の回転を加速式にして、繰り返し実験することで運動学習を評価することができ、運動学習の研究において広く用いられている (Buitrago et al., 2004 ; Costa et al., 2004 ; Bureau et al., 2010 ; French et al., 2012 ; Bergeron et al., 2014)。今回は 1 日 10 回のテストを 5 日間連続で行い、Caspr3 KO マウスの運動能力を検証した (図 30)。まずマウスは、初日に運動パフォーマンスの大きな改善を見せ、2 日目にもゆるやかなパフォーマンスの上昇を示した (図 30A)。3 日目にはパフォーマンスはプラトーに達し、その後は最後まで改善されたパフォーマンスを維持していた。各日のパフォーマンスに対して ANOVA を行った結果、最初の 2 日間のパフォーマンスに対する遺伝子型の主効果の有意性が得られた (Day 1 $F(1, 22) = 6.642, p = 0.0172$; Day 2 $F(1, 22) = 4.346, p = 0.0489$; 図 30A)。さらに初日の trial 9、10 におけるパフォーマンスは、Caspr3 WT マウスに比べて KO マウスの方が有意に低かった (trial 9 WT : 114 ± 6.2 s、Caspr3 KO : 73 ± 8.7 s、 $p = 0.0080$; trial 10 WT : 131.8 ± 9.9 , Caspr3 KO : 88.0 ± 8.0 s、 $p = 0.0230$; 図 30A)。一方 3、4、5 日目のパフォーマンスは遺伝子型および trial 回数による有意な効果は見られなかった。このことから、Caspr3 KO マウスの 3 日目以降の運動パフォーマンスは WT マウスと変わらず、運動協調性には異常はない可能性が示唆された。そこで各日のパフォーマンススコアから、1 日の運動学習率を算出した (図 30B)。その結果、初日における運動学習率は、WT マウスに比べて Caspr3 KO マウスが有意に劣っていた (WT : 7.73 ± 0.95 , Caspr3 KO : 3.24 ± 0.84 s、 $p = 0.038$; 図 30B)。また

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

その他の日の運動学習率に有意差はなかった。以上のことから、Caspr3 が初期の運動学習に関与している可能性が考えられた。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

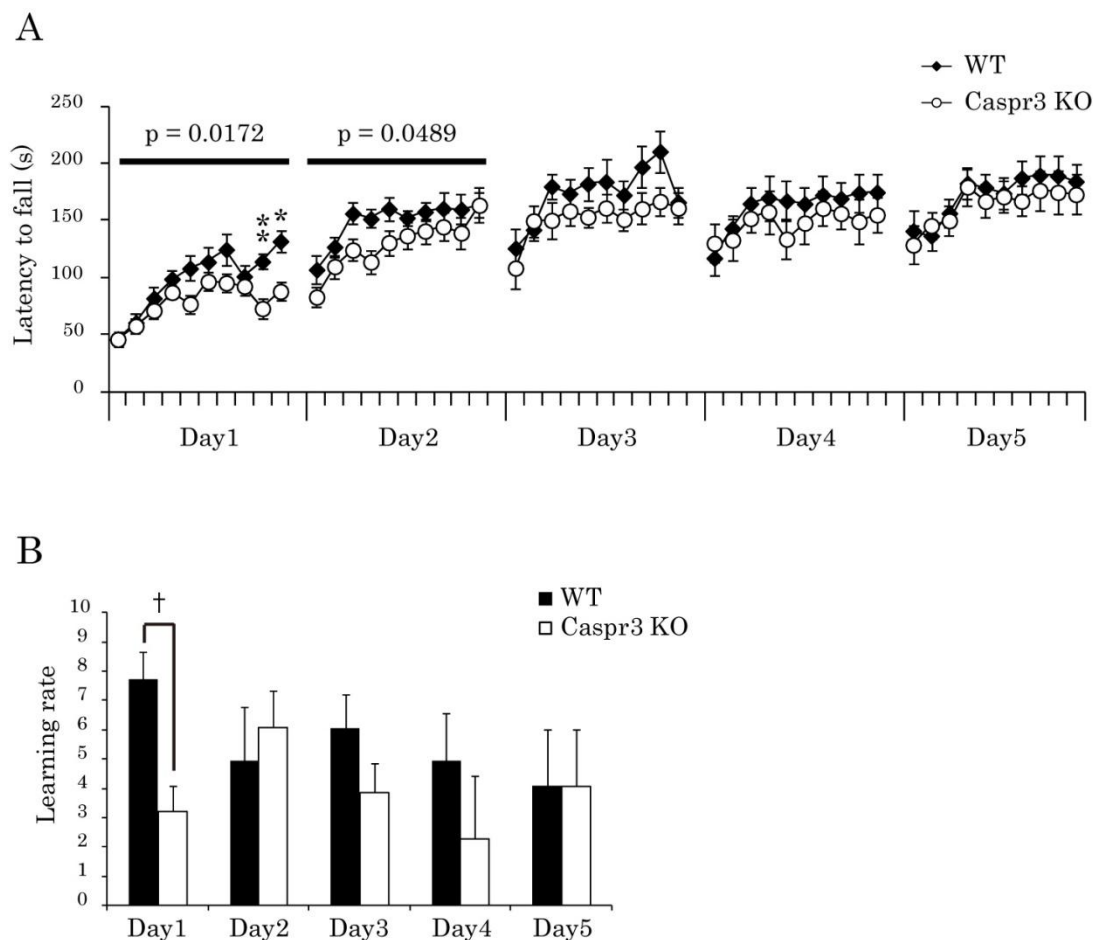


図 30 加速式ロータロッドテストによる運動協調性および運動学習の評価

A : 各 trial の落下時間。初めの 2 日間において、Caspr3 KO マウスの落下時間は、WT マウスに比べて有意に短く、3~5 日目では両遺伝子間に有意差はなかった。グラフに示されている p 値は、ANOVA における遺伝子型の主効果の有意確率を示す。

B : trial ごとの落下時間から算出した各日の運動学習率。初日のみ、Caspr3 KO マウスの学習率は WT マウスに比べて有意に劣っていた。運動学習率 = { (trial 1 と trial 2 の平均タイム) - (trial 9 と trial 10 の平均タイム) } / 9。A : *p < 0.05、

**p < 0.01、t-test with Bonferroni correction (比較数は 10) 。B : †p < 0.05、

Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction (比較数は 5) 。n = 12 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 5. 居住者－侵入者テストによる攻撃行動の評価

攻撃行動を中心とする社会性行動を、居住者－侵入者テストで検証した（図 31）。マウスは自分の生育環境の中で自らの縄張りを形成し、餌や交配相手を獲得、守るために攻撃行動（噛みつきや攻撃的な毛づくろい）をとる。このテストでは、Caspr3 WT および KO マウスに各飼育ケージ内で縄張りを形成させる。そしてその飼育ケージ内に外から別のマウス（侵入者）が入ってきた際に、どの程度の攻撃行動を示すかを 2 日間連続で評価した（図 31A）。Caspr3 WT マウスと KO マウスの攻撃行動は、1 日目より 2 日目の方が高くなっているが、有意な差は認められなかった。またこのテストは攻撃行動だけでなく、非攻撃性の社会行動（匂い嗅ぎや追跡）なども評価することができる（図 31B）。しかしこの社会行動についても、両遺伝子間での差はなかった。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

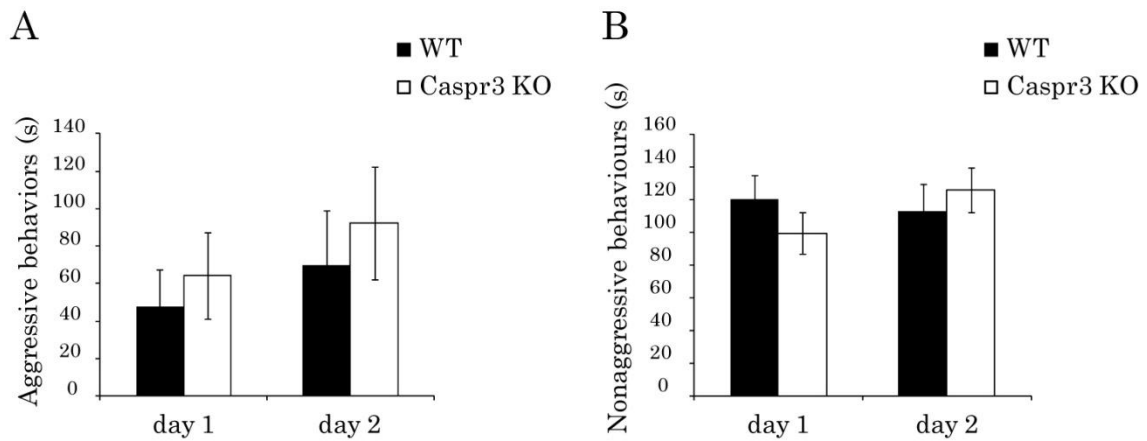


図 31 居住者-侵入者テストによる社会性および攻撃行動の評価

A : 攻撃行動（噛みつきや攻撃的な毛づくろい）をとった時間。B : 社会行動（匂い嗅ぎや追跡）をとった時間。Caspr3 WT マウスと KO マウスの間に有意差はなく、攻撃行動および社会行動には異常がなかった。n = 12 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 6. 恐怖条件付けテストによる恐怖条件付け学習の評価

恐怖条件付け学習の評価として、恐怖条件付けテストを用いた（図 32）。このテストは、専用のチャンバーにマウスを入れて、ブザー（音刺激）の直後に電気ショックを与えることで、音刺激と電気ショックを関連付けて恐怖心を覚えさせる。その後、飼育ケージ内で音刺激のみを与えた際に、学習した記憶から電気ショックに対する恐怖の指標として現れる、freezing（呼吸など生命活動に必要な動き以外を止める行動）の時間を計測し、比較した。しかし、Caspr3 WT マウスと KO マウスのfreezing 時間に有意差は認められなかった（図 32）。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

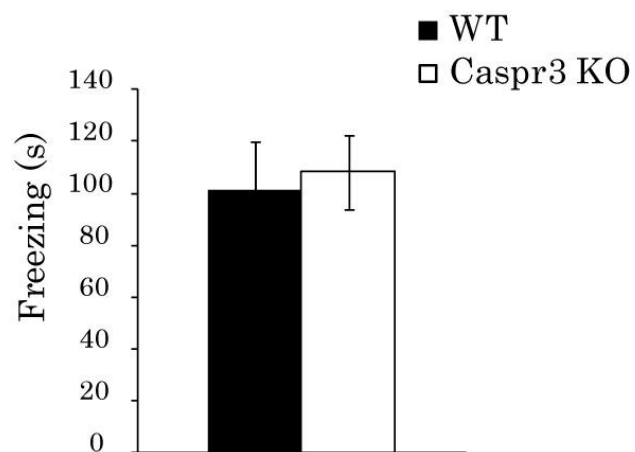


図 32 恐怖条件付けテストによる恐怖学習の評価

Caspr3 WT マウスと KO マウスの、条件付け学習による電気ショックに対する恐怖心の指標 (freezing) を比較した。両者の間に差はなかった。n = 12 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 7. 驚愕反応および PPI テストによる感覚運動ゲート制御の評価

このテストは急激な音刺激に対する無条件反射反応（驚愕反応）と、驚愕反応の音刺激の直前にこれより弱い刺激（プレパルス）を与えることで驚愕反応が抑制される現象（PPI）を調べたものである（図 33）。PPI テストは、ドーパミン作動薬の投与によって PPI の障害が起きることが知られている（Ralph et al., 2002 ; 2003）。また統合失調症の患者では PPI の障害が認められ、障害に遺伝性が認められている（Greenwood et al., 2007 ; Hasenkamp et al., 2010）ことから、抗精神薬の評価や精神疾患モデルの特徴としても用いられる。まず初めにプレパルスがない通常の刺激（120 dB）に対する驚愕反応と反応速度を調べたところ、Caspr3 WT マウスと KO マウスの反応には差がなかった（図 33A, B）次に 70、75、80 dB のプレパルスを用いた場合の驚愕反応から PPI 率を算出したところ、両遺伝子間での PPI 率は徐々に差が広がっていた（図 35C）。Caspr3 KO マウスの 80 dB の時の PPI 率と WT マウスの 80 dB の時の PPI 率の検定結果は、Bonferroni 補正前には有意水準 5%を下回っていた（ $p = 0.0499$ ）が、補正後には有意差がなくなった（ $p = 0.1497$; 図 33C）。一方、これらプレパルスを用いた時の驚愕反応に対する反応速度は、両者の間で差がなかった（図 33D）。70~80 dB のプレパルスを用いた際の PPI 率が、両遺伝子間で徐々に差が広がっていたことから、さらに強めのプレパルスを与えると明確な差が出るのではないかと考え、行動テストバッテリーとは別に追加実験として 80、85、90 dB を用いた場合の PPI 率を調べた（図 33E, F）。しかし、80~90 dB を用いた時の PPI 率および反応速度には、Caspr3 WT マウスと KO マウスの間で差が全くなかった。このことから、Caspr3 KO マウスの 80 dB に対する PPI 率の抑制は再現性が得られず、差がないものと判断をした。

この結果の違いの原因としては、70~80 dB を用いたテストが、その前に行った

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

様々な行動テストの影響を受けていること、あるいは80～90 dB というプレパルス強度が強すぎたことが考えられる。これについては、70～80 dB を用いたテストを行動テストバッテリーに組み込まずに、単独の実験として行い、比較する必要があると考えられる。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

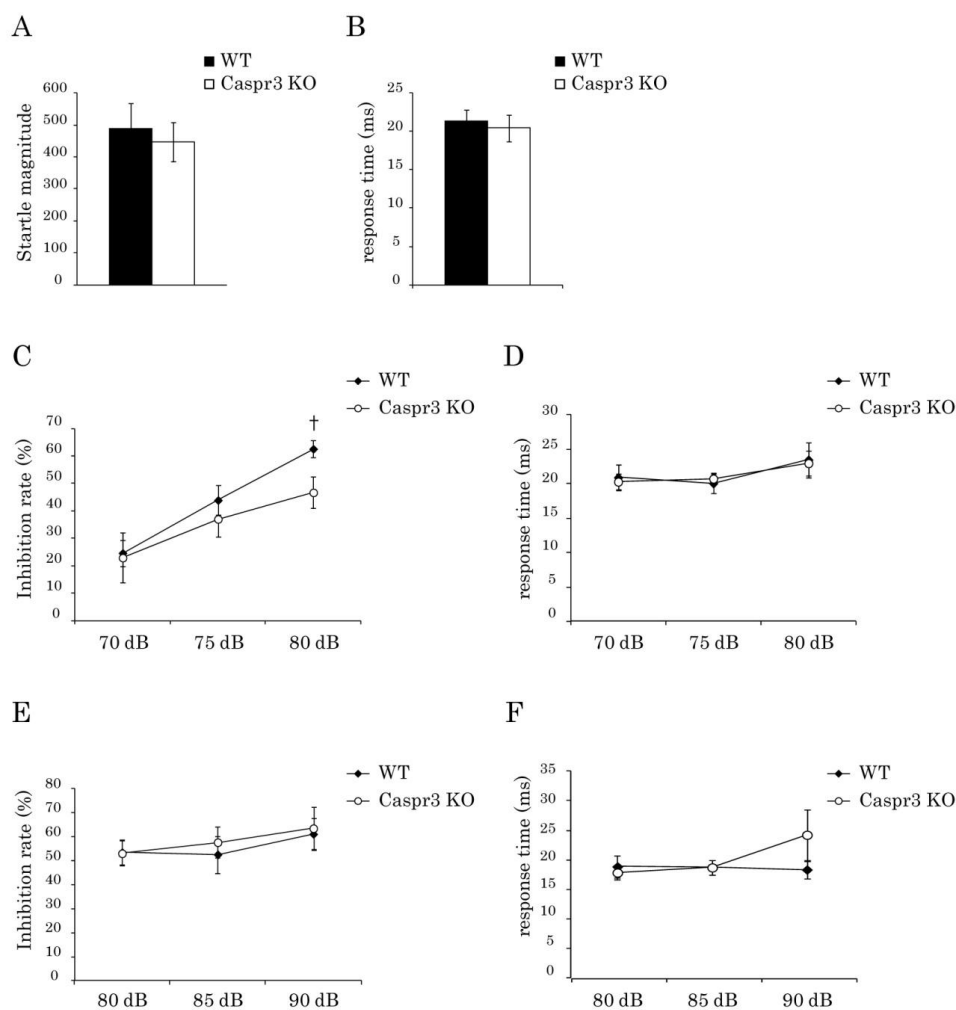


図 33 驚愕反応および PPI テストによる感覚運動ゲート制御の評価

A、B : 120 dB の聴覚刺激に対する驚愕反応 (A) と反応速度 (B) 。Caspr3 WT マウスと KO マウスの間では、有意差が見られなかった。C、D : 70~80 dB のプレパルス刺激を用いた PPI 率 (C) と反応速度 (D) 。80 dB のプレパルスを用いた時の Caspr3 KO マウスの PPI 率は、WT マウスに比べて低い傾向にあった。一方 70、75、80 dB を用いた場合の反応速度には、WT と Caspr3 KO マウスとの間に差はなかった。E、F : 80、85、90 dB を用いた PPI 率を検証したところ、80 dB も含めて全ての PPI 率に有意差がなかった。またこれらに対する反応速度も、両遺伝子間で有意差はなく、Caspr3 KO マウスの驚愕反応および PPI には異常がなかった。[†]p = 0.1497、Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction (比較数は 3) 。A

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

—D : n = 12 ; WT、 n = 12 ; Caspr3 KO。 E、 F : n = 8 ; WT、 n = 6 ; Caspr3 KO。

3. 3. 1. 8. ホットプレートテストおよびテールフリックテストによる痛覚感受性の評価

行動テストバッテリーの最後に、痛覚感受性の評価としてホットプレートテスト（図 34A）とテールフリックテスト（図 34B）を行った。このテストは痛覚感受性を通して脊髄反射の異常を調べる目的があり、行動解析を行う上では必ず確認をしておかなければならない項目である。ホットプレートは 52°C に保温したプレート装置上にマウスを置き、マウスが後肢を振るまでの時間やなめるまでの時間を測定する。それに対しテールフリックテストでは、マウスの尻尾に投射熱を与え振り払うまでの時間を計測する。Caspr3 KO マウスの反応時間は、どちらのテストにおいても WT マウスと変わらなかった（図 34A, B）。

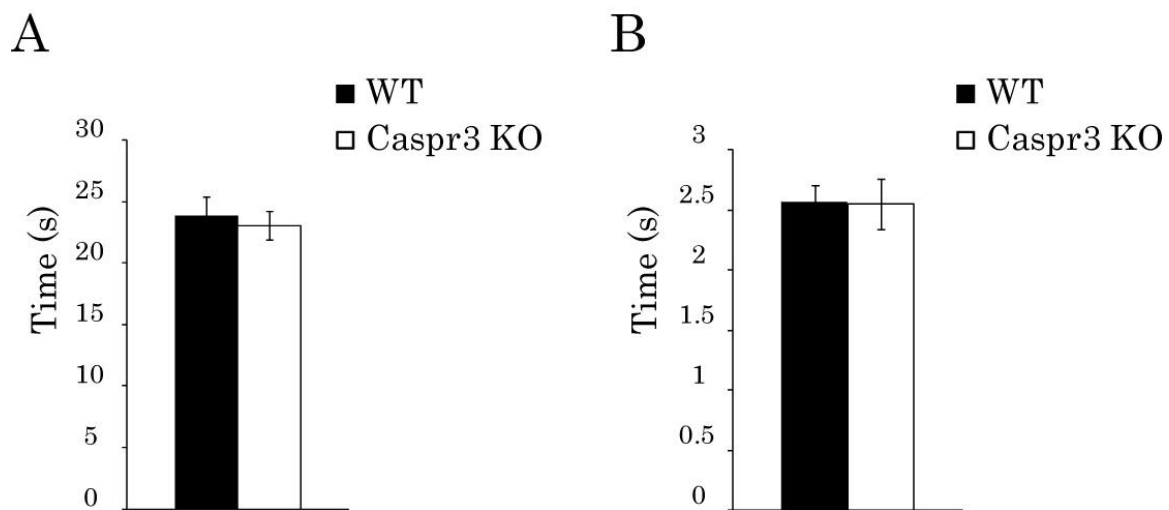


図 34 ホットプレートテストおよびテールフリックテストによる痛覚感受性の評価

A : ホットプレートテストによる熱に対する反応速度。B : テールフリックテストによる熱に対する反応速度。どちらのテストにおいても Caspr3 WT マウスと KO マウスの刺激に対する反応速度は両遺伝子間での差はなく、痛覚感受性に異常はなかった。n = 12 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 3. 2. ホイールランニングテストによる運動学習の評価

加速式ロータロッドテストで Caspr3 が初期の運動学習に影響を及ぼす可能性が示唆されたことから、別の行動テストとしてホイールランニング装置を用いた運動学習の評価を試みた (図 35)。このテストでは、ホイール内にマウス閉じ込め、自発的にホイールを回した回転数をセンサーで自動的に計測する (図 35A)。テストは 1 日 1 時間、6 日間連続で測定を行った。これについては、Caspr3 WT および KO マウス共に 6 日間に渡って回転数が徐々に増加したが、両者の間で差はなかった (図 35A)。またこのテストは、全てビデオ撮影した。動画を用いて、テスト中にホイールを回している際に、マウスがスリップし、ホイール内で振り子のようにスウィングした回数をランニングエラーとして数えた (図 35B, C)。まず 1 時間辺りのスウィング数を比較したところ、6 日間に渡って減少はしているものの、Caspr3 WT および KO マウス間に有意な差はなかった (図 35B)。ただしホイールの回転数は日数を重ねるごとに増加していることから、マウスが経験するホイールの回転速度、回転させるインターバル、ステップのタイミングなどは、各個体によって異なることが予想される。従って、1 時間辺りのスウィング数からは平等に運動学習能力を比較することはできない。そこで 1 時間辺りの回転数とスウィング数から、1,000 回転辺りのスウィング数を算出した (図 35C, D)。その結果、Caspr3 WT および KO マウスの 1,000 回転辺りのスウィング数に有意差はなかった (図 35C)。また、1 日目の 1,000 回転辺りのスウィング数を 100%として 2~6 日目の 1,000 回転辺りのスウィング数の割合を比較したが有意差はなく (図 35D)、ホイールランニングによる運動においては、Caspr3 WT マウスと KO マウスの運動学習能力に差がないという結果となった。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

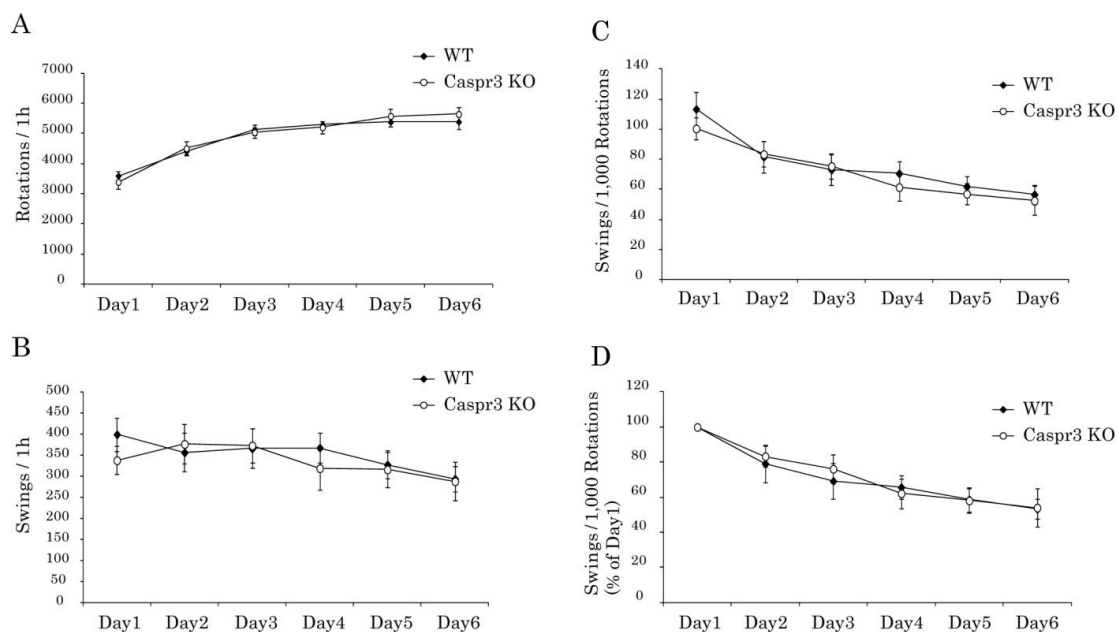


図 35 ホイールランニングテストによる運動学習の評価

A : 1 時間辺りのホイール回転数。B : 1 時間辺りのスウィング数。どちらの項目も、Caspr3 WT マウスと KO マウスの間で有意差がなかった。C、D : 1,000 回転辺りのスウィング数 (C) と Day 1 に対する Day 2~6 のスウィング数の割合。WT および Caspr3 KO マウス共にスウィング数が減少しており、運動学習ができていた。n = 14 ; WT、n = 12 ; Caspr3 KO。

3. 4. 考察

行動解析の結果から、Caspr3 KO マウスでは、加速式ロータロッドテストによる初期の運動学習の低下が見られた (図 30)。最初の 2 日間のみ、Caspr3 KO マウスの落下時間が WT マウスに比べて有意に短く、3 日目以降の Caspr3 KO マウスの落下時間は WT マウスと変わらなかった。これは、Caspr3 KO マウスの最終的な運動能力は、WT マウスと変わらないことを示している。このことから、Caspr3 KO マウスの運動協調性には異常がないと考えられる。またホットプレートテストやテールフリックテストによる痛覚感受性の評価にも異常がないことから、脊髄反射や末梢神経系にも特に異常はないと考えられる (図 34)。一方同じ学習機能でも、Y 字迷路テストによる自発交替行動や作業記憶は、認知機能を主体とする短期記憶である (図 29)。また恐怖条件付けテストによる恐怖条件付け学習は、物事の文脈に基づいた宣言的記憶 (エピソード記憶) に属するものである (図 32)。運動学習は短期記憶や宣言的記憶ではなく、長期記憶の中の手続き記憶に属するものであり、加速式ロータロッドテストはこれに属する。Caspr3 KO マウスでは Y 字迷路テストおよび恐怖条件付けテストに変化が見られなかったことから、Caspr3 は短期記憶や宣言的記憶には関与せず、長期的な手続き記憶である運動学習にのみ関与している可能性が考えられる。

1. 3. 運動学習で述べたように、Costa らの報告では、背側線条体の 57%の神経細胞が、加速式ロータロッドテストでの運動に関与していることが明らかにされている (Costa et al., 2004)。そして 8 日間の加速式ロータロッドテストでは、初期段階 (運動初日) には主に背内側線条体の神経活動が関与し、後期 (8 日目) では主に背外側線条体の神経活動が関与していることが報告されている (Yin et al., 2009)。

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

Caspr3 は線条体に強く発現しており、線条体における Caspr3 の発現は外側よりも内側が強かった (図 7~9)。以上のことから、Caspr3 KO マウスの初期の運動学習の低下は、背側線条体、特に背内側線条体の神経活動が関与している可能性が考えられる。

また 1. 4. 大脳基底核で触れたように、背側線条体の直接路および間接路 MSN をそれぞれ薬理的に破壊した場合でも、加速式ロータロッドテストでの運動パフォーマンスの低下が見られる (Durieux et al., 2012)。特に背内側線条体の間接路 MSN を破壊すると、初日のみ運動パフォーマンスが低く、2 日目以降の運動パフォーマンスはコントロールと変わらない (Durieux et al., 2012)。しかし、直接路または間接路の MSN を破壊すると、日常的に活動量が変化する (Durieux et al., 2012; Nakamura et al., 2014)。今回の Caspr3 KO マウスの加速式ロータロッドテストの結果は、Durieux らの間接路 MSN を破壊した結果と似ている (図 30)。しかし、Caspr3 KO マウスの活動量に変化はなかった (図 26~28)。このことから、Caspr3 KO マウスの運動学習の低下は、間接路 MSN だけの影響ではないと考えられる。図 3 に示した大脳基底核の神経回路によれば、直接路 MSN は黒質緻密部や外節淡蒼球にも投射しており、これらの領域は線条体に投射している (図 3)。従って、直接路 MSN だけでも大脳基底核全体の神経回路をつなぐことは可能である。Caspr3 は直接路と間接路両方の MSN に発現している可能性が示唆されたが、黒質線条体路に発現していることから、少なくとも直接路の MSN に発現していることは確かである (図 7, 図 16)。そして Caspr3 はアセチルコリン作動性インターニューロンにも発現していた (図 14)。アセチルコリン作動性インターニューロンは、黒質緻密部から線条体に投射しているドーパミン作動性ニューロンと拮抗あるいは共同で作用し、学習機能において重要であることが報告されている (Ljungberg

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

et al., 1992; Aosaki et al., 1994; Morris et al., 2004)。Caspr3 KO マウスの運動学習の低下は、大脳基底核全体の神経活動のバランスが、WT マウスと異なるのためではないかと考えられる。

線条体における運動学習には、グルタミン酸を介したシナプス可塑性が重要であり、特に N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体が重要であると報告されている (Calabresi et al., 1992; Calabresi et al., 1997; Centonze et al., 1999; Fernagut et al., 2002; Palencia et al., 2004)。NMDA 型グルタミン酸受容体は、NR1 サブユニットが必須であり、NR2A-D サブユニットによって生理活性、Ca²⁺透過性などの性質が決められている (Standaert et al., 1994; Wenthold et al., 2003; Yashiro et al., 2008)。線条体特異的な NMDA 型グルタミン酸受容体欠損マウスは、加速式ロータロッドテストにおける運動パフォーマンスの上昇が一切見られない (Beutler et al., 2011)。また NR1 を線条体特異的に欠損させたマウスでは、背側線条体の長期増強が消失し、加速式ロータロッドテストにおける運動学習の障害がされている (Dang et al., 2006)。線条体には主に NR2A、NR2B が発現していることが知られており、NR2A に対する薬理的な遮断は、加速式ロータロッドテストによる運動パフォーマンスに影響を与えることが報告されている (Kosinski et al., 1998; Clermont et al., 2011)。また NR2B に関して、加速式ロータロッドテストについての報告はない。しかし到達課題を用いた報告で、課題遂行前には線条体では NR2A の発現が多く、課題遂行後には NR2A よりも NR2B の発現が多くなることが報告されている (Kent et al., 2013)。このことから、運動学習前後で NR2A から NR2B へのシフトが起り、NMDA 受容体の構成が変化するのではないかと考えられている (Kent et al., 2013)。

Spiegel らの報告によれば、Caspr3 はアダプタータンパク質の Mint1/X11 と細胞

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

内の PDZ binding モチーフを介して相互作用することが報告されている (Spiegel et al., 2002)。一方 Mint1 は、NMDA 型グルタミン酸受容体の NR2B サブユニットとモータータンパク質の KIF17 それぞれと相互作用しており、Mint1 と KIF17 の相互作用は、NR2B サブユニットを含む小胞の輸送に重要であることが報告されている (Setou et al., 2000)。さらに KIF17 は、シナプスにおける NR2A/NR2B の発現調節に重要な役割を持つことも報告されている (Yin et al., 2011)。これらのことから、Caspr3 が Mint1 を介して NR2B と相互作用することが示唆され、それらの相互作用が運動学習において重要な役割を担っている可能性が考えられる。

以上のことから、Caspr3 が NMDA 型グルタミン酸受容体と機能的関わりを持ち、加速式ロータロッドテストを用いた運動学習に関与している可能性が示唆された。

Caspr3 と NR2B との相互作用を示唆されたが、今回の局在解析では、Caspr3 がシナプスに局在しているという結果は得られなかった (図 18~20)。しかし、2. 4. 考察でも述べたように、今回はポストシナプスマーカーと Caspr3 との共局在は調べていないため、ポストシナプスマーカー、特に NR2B との蛍光二重染色は必要であると考えられる。またその他にも、シナプトソームや免疫電顕を用いた解析などにより Caspr3 のドット状シグナルの局在を明らかにする必要があると考えられる。

今回、加速式ロータロッドテストとは別にホイールランニングテストによる運動学習の評価を行ったところ、Caspr3 KO マウスと WT マウスに差はなかった (図 35)。加速式ロータロッドテストは自動的に回転する棒の上を歩く強制運動だが、ホイールランニングテストは強制運動ではない。マウスはテスト中、ホイール内に閉じ込められてはいるものの、いつ、どのタイミングで、どのくらいの速さでホイールを回すかは各個体に依存する。これらの性質の違いから、今回のホイールラン

第3章 Caspr3 遺伝子欠損型マウスの行動解析

ニングテストでは、平等で正確な運動学習の評価が行えていない可能性がある。

またホイールランニングテストは報酬機能に関連したテストであり、報酬は運動学習の維持や促進に効果をもたらすことが知られている (Lett et al., 2000; Wächter et al., 2009; Abe et al., 2011; Galea et al., 2015)。従って、ホイールランニングテストを用いた運動学習では、報酬の獲得による効果の関与していることが考えられる。このことから、Caspr3 KO マウスの運動学習への影響の妥当性を調べるためには、また別のテストにより運動学習の評価を試みる必要があると考えられる。

運動学習の研究は、主にヒトやサルで行われており、マウスやラットなどで評価する方法はあまり開発されていない。そもそもマウスやラットに自発的に運動をさせることが難しく、何を運動学習の客観的な指標とするかが問題になるからである。加速式ロータロッドテスト以外の運動学習の方法として、到達課題やステップホイールシステムなどがある (Bury and Jones, 2002; Kitsukawa et al., 2011)。しかし、これらはテスト前に摂食や飲み水の制限を設けて、実際のテストで餌を獲得するため、あるいは飲み水を飲むための運動課題を与え、その成功率の増加を運動学習の指標としている。これらのテストは餌や飲み水といった報酬を利用したテストであり、先ほども述べたように報酬は運動学習の維持や促進に影響を与える。Caspr3 KO マウスのためだけでなく、今後の運動学習の研究を行う上での課題として、より簡潔で客観的な、報酬の影響を受けずに運動学習を評価できる行動テストの開発が望まれる。

第 4 章 Caspr3 の運動学習における役割

4. 1. 緒言

第 3 章では、Caspr3 KO マウスの行動学的異常を、運動機能中心の行動テストバッテリーを組んで解析した。その結果、Caspr3 KO マウスは加速式ロータロッドテストにおいて、初期の運動学習が低下しているという結果を得た (図 29)。これまでの研究で、加速式ロータロッドテストを用いた運動学習には、線条体や運動皮質、小脳など様々な領域が関わっていることが報告されている (Buitrago et al., 2004; Costa et al., 2004; Bureau et al., 2010 ; Kakegawa et al., 2011; French et al., 2012; Bergeron et al., 2014)。Bureau らの報告では、加速式ロータロッドテストを 10 trials 行った後に神経細胞活性化マーカーである c-Fos の発現を調べた結果、背側線条体、小脳、運動皮質、帯状皮質で c-Fos 発現の有意な増加が見られた (Bureau et al., 2010)。このことから、Caspr3 KO マウスで見られた加速式ロータロッドテストでの初期の運動パフォーマンスの低下は、これら運動関連領域での神経細胞の活性化が低下しているためではないかと考えた。

本章では、加速式ロータロッドテストにおける、Caspr3 KO マウス脳の運動関連領域の神経細胞活性化について解析した。

4. 2. 材料および方法

4. 2. 1. 実験動物

実験動物については、3. 2. 1. 実験動物を参照。

4. 2. 2. 加速式ロータロッドテスト

装置および手順については、3. 2. 2. 5. 加速式ロータロッドテストを参照。ただし、テストは1日（10 trials）のみ行った。

4. 2. 3. 灌流固定

加速式ロータロッドテストの10 trialめ終了2時間後に灌流固定を行った。解剖の手順については、2. 2. 4. 1. 灌流固定を参照。ただしマウスの麻酔には、生理食塩水（Otsuka, Tokushima, Japan）で10倍に希釈したソムノペンチル（Kyoritsu seiyaku, Tokyo, Japan）を200～300 ml投与した。脱血には生理食塩水、固定液にはザンボニ固定液（4% PFA, 0.2% picric acid / PBS（Nissui, Tokyo, Japan））を使用し、ペリスタポンプで灌流固定を行った。

4. 2. 4. 切片の作製

切片は、凍結マイクロトーム（Zeiss）を用いて60 μmの厚さで作製した。解析には、運動皮質 M1、M2（+1.70 mm to +0.98 mm from the bregma）、帯状皮質 Cg1、Cg2（+0.98 mm to -0.22 mm from the bregma）、線条体（+0.98 mm to -0.22 mm from the bregma）、小脳（-5.68 mm to -6.36 mm from the bregma）を用いた。

4. 2. 5. DABを用いた免疫染色

実験の手順については、2. 2. 4. 3. DABを用いた免疫染色を参照。一次抗体に

は rabbit anti-c-Fos 抗体 (Santacruz, Santa Cruz, CA, Cat. #sc-52; 1: 1,000) 、二次抗体には biotin 標識 goat anti-rabbit 抗体 (Vector Laboratories, Cat. #PK6101; 1: 250) を用いた。血清は NRS ではなく NGS を使用した。ただし BSA については、変更はない。

4. 2. 6. 画像解析およびデータの定量化

c-Fos 陽性細胞数のカウントには、1 個体から各領域 5 枚の切片を用いた。両半球から 1 枚ずつ画像 (440×331 μm) を取得し、カウントした。サンプルは WT マウスと Caspr3 KO マウスで、加速式ロータロッドを経験したマウスと経験していないマウスをそれぞれ 6、7 個体用いた。

4. 2. 7. 統計解析

統計解析については、3. 2. 4. .統計解析を参照。ただし、ANOVA で有意性が認められた場合の多重比較検定には、Tukey-kramer test を用いた。

4. 3. 結果

4. 3. 1. 加速式ロータロッドテストを用いた運動による神経細胞活性化の比較

Caspr3 KO マウスの加速式ロータロッドテストでの運動による神経細胞の活性化を調べるため、運動前後の脳を用いて神経細胞活性化マーカーc-Fos 抗体で免疫染色を行い、発現細胞を比較した（図 36-40）。

まず初めに線条体における c-Fos 陽性細胞数の比較を行った（図 38）。ANOVA の結果、c-Fos 陽性細胞数に対して遺伝子型による主効果（ $F(1, 21) = 5.581$, $p = 0.0279$ ）、運動による主効果（ $F(1, 21) = 66.736$, $p < 0.0001$ ）、さらに遺伝子型×運動の交互作用（ $F(1, 21) = 5.253$, $p = 0.0323$ ）それぞれの有意性が認められた。多重比較検定の結果、Caspr3 WT マウスおよび KO マウス共に、運動後に背側線条体の c-Fos 陽性細胞数が有意に増加していた（WT : $p < 0.0001$; Caspr3 KO : $p = 0.0020$; 図 36A）。さらに Caspr3 KO マウスの背側線条体における運動後の c-Fos 陽性細胞数は、WT マウスに比べて有意に少なかった（ $p = 0.0148$; 図 36A）。一方腹側線条体において、Caspr3 WT および KO マウス共に運動による c-Fos 陽性細胞数の増加は見られなかった（図 36B）。

過去の報告によれば、加速式ロータロッドテストでの運動の初期段階では主に背内側線条体の神経活動が関与しており、後期には主に背外側線条体の神経活動が関与することが明らかにされている（Yin et al., 2009）。そこで今回はさらに、背側線条体を背内側線条体と背外側線条体に分けて c-Fos 陽性細胞の比較を行った（図 37）。まず背内側線条体の c-Fos 陽性細胞数について、運動による主効果（ $F(1, 21) = 63.804$, $p < 0.0001$ ）と遺伝子型×運動の交互作用（ $F(1, 21) = 5.186$, $p = 0.0333$ ）の有意性が認められた。多重比較検定の結果、Caspr3 WT マウスおよび KO マウス共に、運動後に背内側線条体の c-Fos 陽性細胞数が有意に増加していた

(WT : $p < 0.0001$; Caspr3 KO : $p < 0.0026$; 図 37A) 。 図 36 で示した、運動後の背側線条体の c-Fos 陽性細胞数は、WT マウスに比べて Caspr3 KO マウスが有意に少なかったが、背内側線条体における運動後の c-Fos 陽性細胞数は、両遺伝子間で差がなかった (図 37A) 。 一方背外側線条体においては、Caspr3 WT および KO マウス共に運動による c-Fos 陽性細胞数の増加は見られなかった (図 37B) 。

次に、運動学習には小脳や運動皮質の重要な役割を担っていると報告されている (Costa et al., 2004 ; Kakegawa et al., 2011) ことから、運動によって Caspr3 KO マウスのこれらの領域に影響が出ているかを調べた (図 38-40) 。 小脳における c-Fos 陽性細胞数を比較したところ、Caspr3 WT および KO マウス共に、運動による小脳での c-Fos 陽性細胞数の増加が見られた (WT : $p = 0.0156$; Caspr3 KO : $p = 0.0108$; 図 38) 。 しかし、両遺伝子間での有意差はなかった。

続いて、運動皮質における c-Fos 陽性細胞数を比較した (図 39) 。 まず運動皮質 M1 において、Caspr3 WT および KO マウス共に、運動後に c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が見られた (WT : $p = 0.0156$; Caspr3 KO : $p = 0.0264$; 図 39A) が、両遺伝子間での有意差はなかった。また運動皮質 M2 では、ANOVA の結果、運動による主効果のみ有意性が認められた ($F(1, 21) = 24.463$, $p < 0.0001$) 。 そして運動後の c-Fos 陽性細胞は、Caspr3 WT マウス ($p = 0.0208$) と KO マウス ($p = 0.0053$) それぞれで有意に増加していた (図 39B) 。

最後に Bureau らの報告では、帯状皮質においても加速式ロータロッドテストによる運動後に c-Fos 細胞の増加が見られた (Bureau et al., 2010) ことから、帯状皮質における c-Fos 陽性細胞数についても比較した (図 40) 。 しかし今回の結果では、Caspr3 WT および KO マウス共に、運動による帯状皮質での c-Fos 陽性細胞数の増加が見られなかった (図 40)

これらの結果をまとめると、Caspr3 KO マウスの背側線条体において、加速式ロータロッドテストでの運動後による神経活性化が低下していることが明らかになった。特に Caspr3 は、運動による背内側線条体の c-Fos 発現に影響を与えていることが示された。

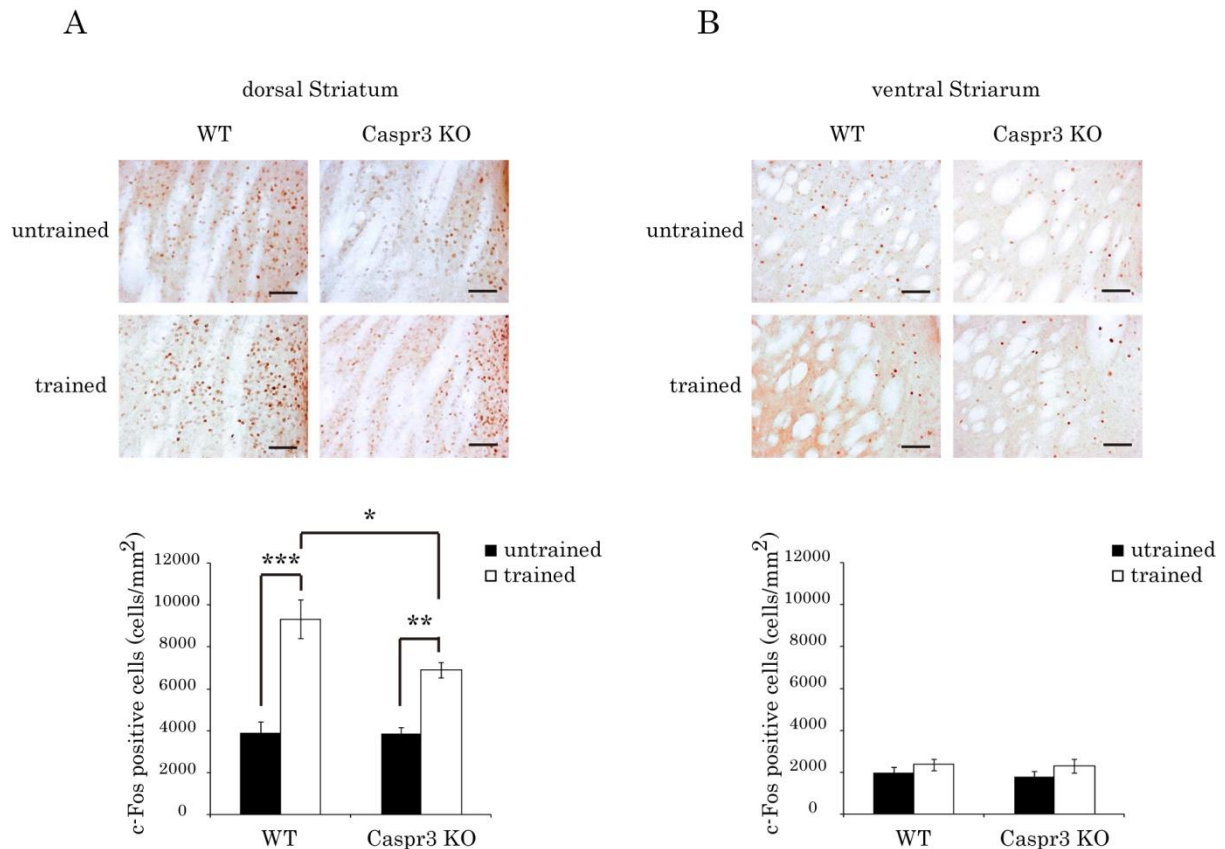


図 36 線条体における運動前後での c-Fos 発現の比較

A : Caspr3 WT マウスと KO マウスの、背側線条体における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。ANOVA を行った結果、遺伝子型による主効果 ($F(1, 21) = 5.581, p = 0.0279$)、運動による主効果 ($F(1, 21) = 66.736, p < 0.0001$)、さらに遺伝子型×運動の交互作用 ($F(1, 21) = 5.253, p = 0.0323$) それぞれの有意性が認められた。WT および Caspr3 KO マウス共に、運動後に c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が見られた。特に運動後の Caspr3 KO マウスの背側線条体における c-Fos 陽性細胞数は、WT マウスに比べて少ない傾向にあった。B : 腹側線条体における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。両遺伝子型とも、運動後に c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が見られなかった。scale bars : 100 μm 。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、Tukey-kramer test。n = 6 ; untrained WT、n = 6 ; untrained Caspr3 KO、n = 6 ; trained WT、n = 7 ; trained KO。

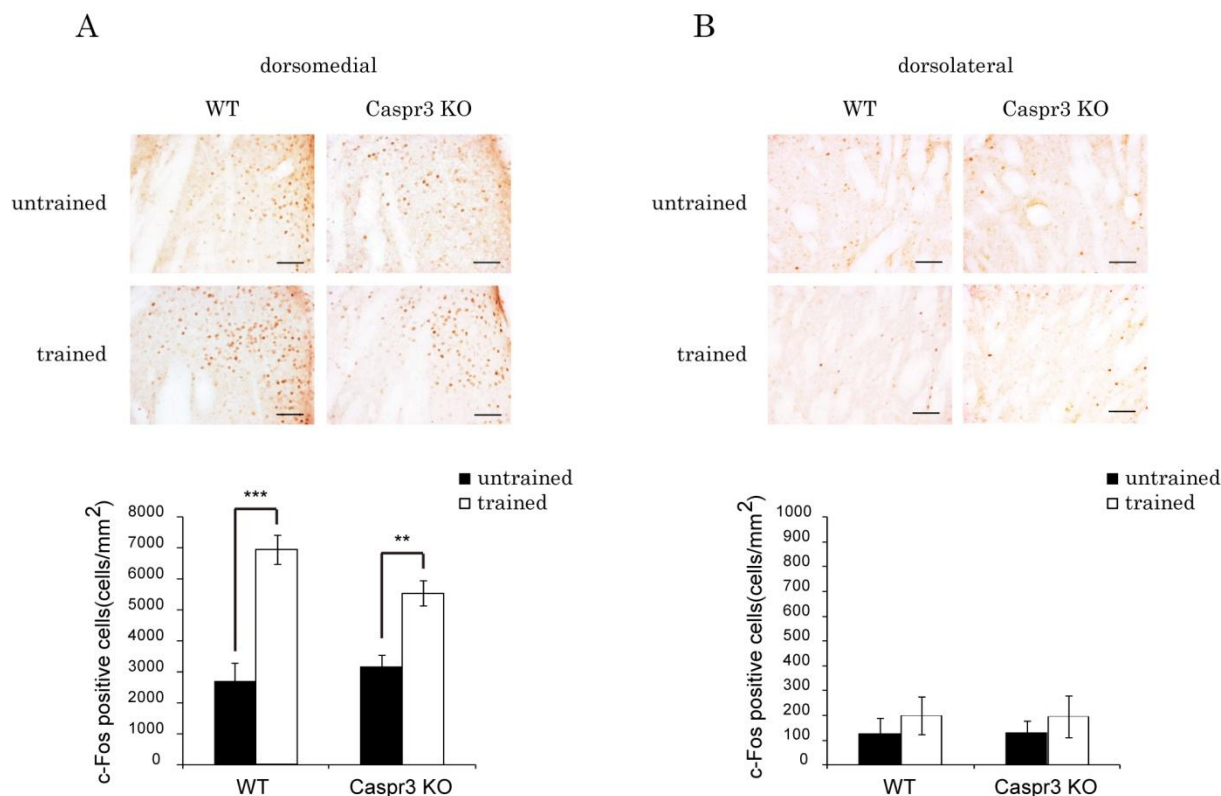


図 37 背側線条体における運動前後での c-Fos 発現の比較

A : Caspr3 WT マウスと KO マウスの、背内側線条体における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。ANOVA を行った結果、運動による主効果 ($F(1, 21) = 63.804$, $p < 0.0001$) と遺伝子型×運動の交互作用 ($F(1, 21) = 5.186$, $p = 0.0333$) の有意性が認められた。WT および Caspr3 KO マウス共に、運動後に c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が見られた。B : 背外側線条体における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。WT、Caspr3 KO マウス共に、運動後の c-Fos 陽性細胞数の有意な増加は見られなかった。scale bars : 100 μm 。 ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、Tukey-kramer test。 n = 6 ; untrained WT、 n = 6 ; untrained Caspr3 KO、 n = 6 ; trained WT、 n = 7 ; trained KO。

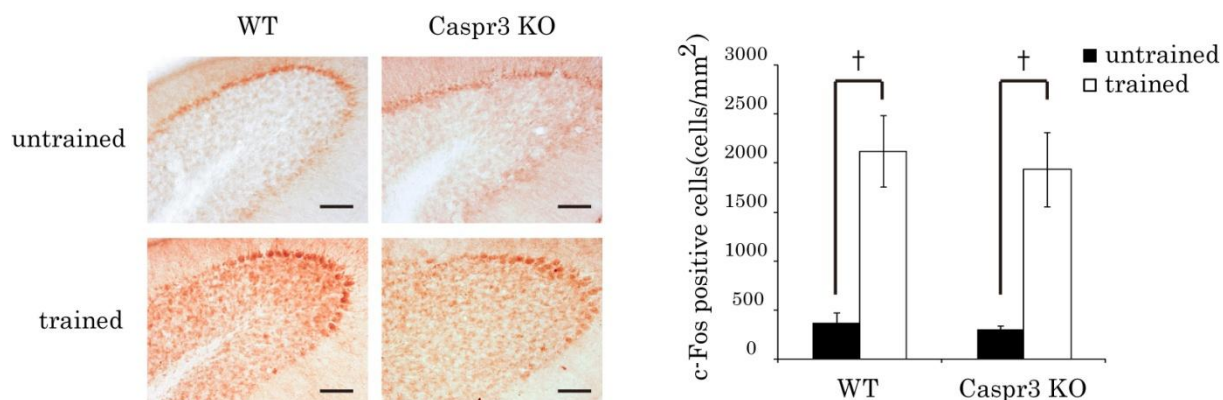


図 38 小脳における運動前後での c-Fos 発現の比較

Caspr3 WT マウスと KO マウスの、小脳における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。WT、Caspr3 KO マウス共に、運動前後に c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が見られたが、両遺伝子間には有意差は認められなかった。scale bars : 100 μ m。†p < 0.05、Mann-Whitney test with Bonferroni correction (比較数は 4)。n = 6 ; untrained WT、 n = 6 ; untrained Caspr3 KO、 n = 6 ; trained WT、 n = 7 ; trained KO。

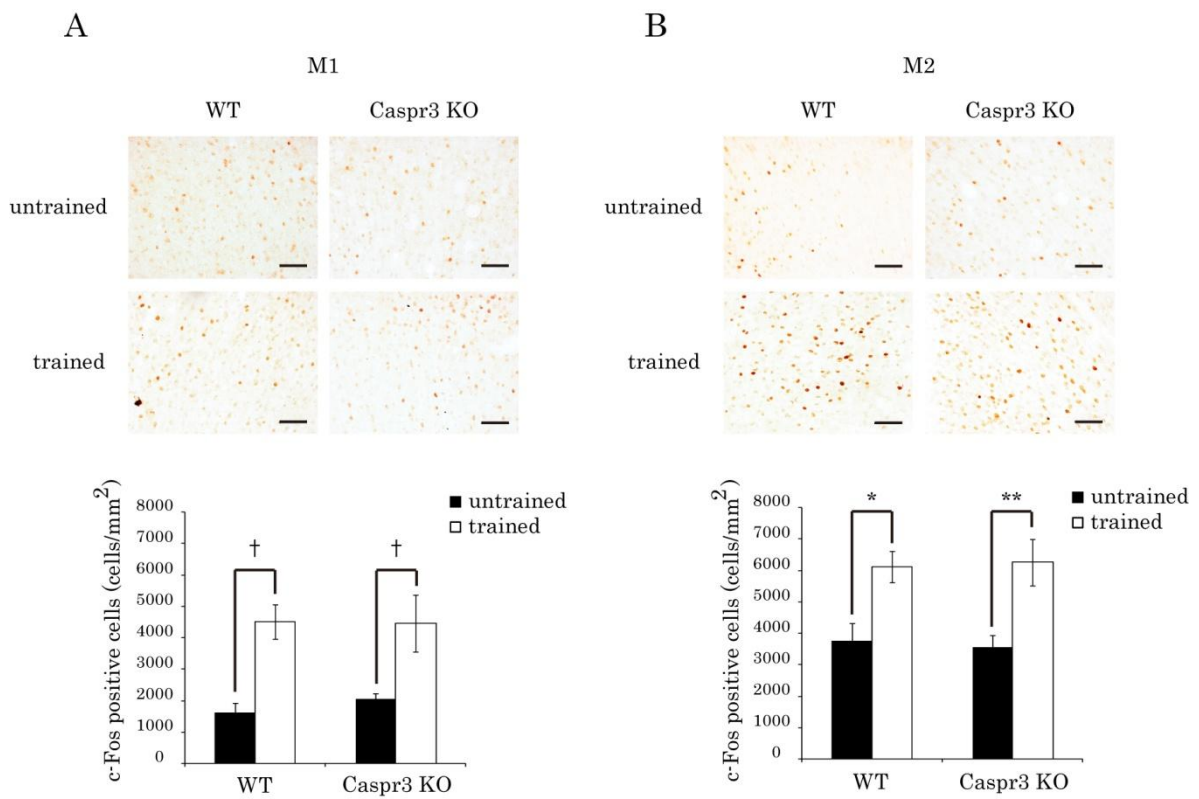


図 39 運動皮質における運動前後での c-Fos 発現の比較

A : Caspr3 WT マウスと KO マウスの、運動皮質 M1 における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。 B : 運動皮質 M2 における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。

WT、Caspr3 KO マウス共に、M1 と M2 それぞれで運動後の c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が見られたが、両遺伝子間に有意な差はなかった。 scale bars : 100 μ m。

* $p < 0.05$ 、Mann-Whitney test with Bonferroni correction。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、Tukey-kramer test。 n = 6 ; untrained WT、 n = 6 ; untrained Caspr3 KO、 n = 6 ; trained WT、 n = 7 ; trained KO。

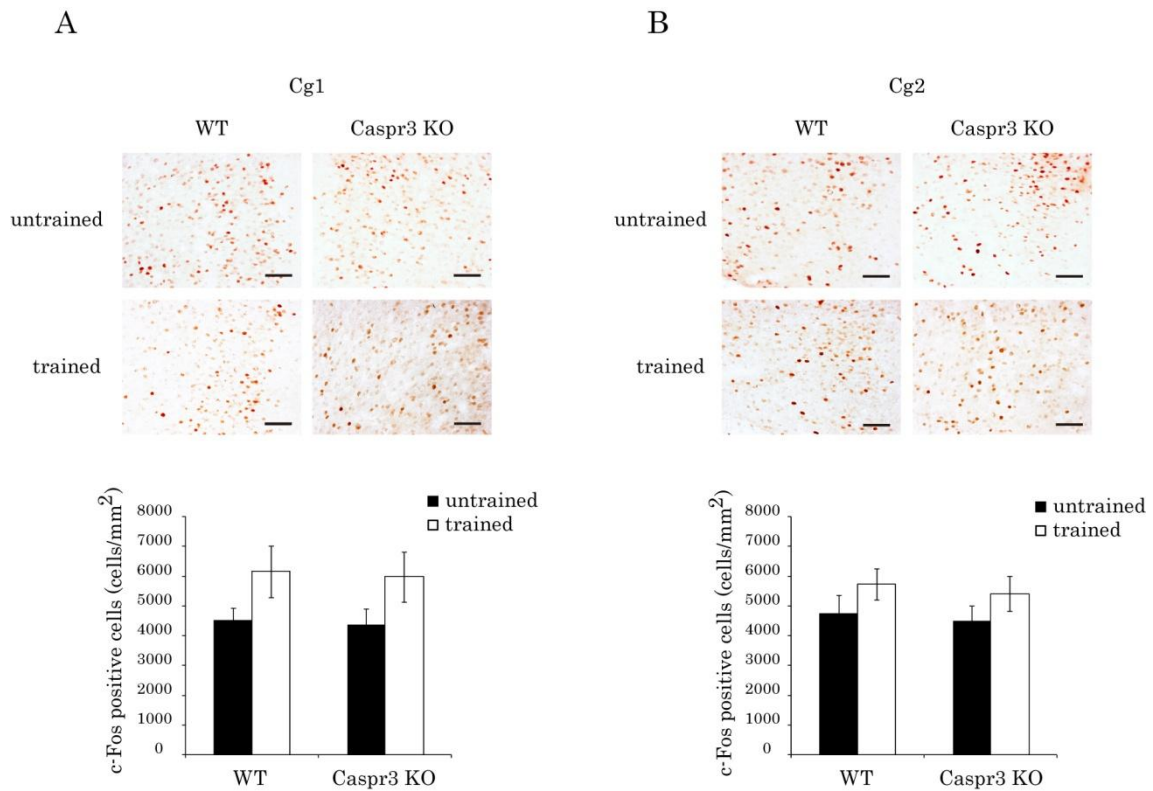


図 40 帯状皮質における運動前後での c-Fos 発現の比較

A : Caspr3 WT マウスと KO マウスの、帯状皮質 Cg1 における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。 B : 帯状皮質 Cg2 における運動前後の c-Fos 陽性細胞数の比較。

WT と Caspr3 KO マウスどちらも、Cg1、Cg2 それぞれにおいて運動後の c-Fos 陽性細胞数の有意な増加は見られなかった。 scale bars : 100 μ m。 n = 6 ; untrained WT、 n = 6 ; untrained Caspr3 KO、 n = 6 ; trained WT、 n = 7 ; trained KO。

4. 4. 考察

加速式ロータロッドテスト後の神経細胞活性化マーカーc-Fosの発現を調べたところ、Caspr3 KO マウスでは背側線条体において運動後の神経細胞の活性化が低下していることが明らかになった(図36A)。さらにCaspr3 KO マウスは、背内側線条体の運動によるc-Fos発現が変化していることが示唆された(図37A)。この結果は、運動の初期段階では背内側線条体の神経活動が重要であるというYinらの報告とも一致している(Yin et al., 2009)。一方、小脳および運動皮質も重要な役割を持つことが知られている(Costa et al., 2004 ; Kakegawa et al., 2011)が、これらの領域では、運動前後にc-Fos陽性細胞の有意な増加が見られたものの、Caspr3 WT マウスとKO マウス間で有意な差は見られなかった(図38、図39)。これは、Caspr3が小脳と運動皮質にはほとんど発現していない(図9)ため、c-Fosの発現に影響が出なかったことが考えられる。またBureauらの報告では、帯状皮質でも運動後にc-Fos陽性細胞数の増加が見られていたが(Bureau et al., 2010)、今回の結果では運動前後でのc-Fos陽性細胞数の増加が見られなかった(図40)。帯状皮質が運動学習に関与するかどうかについての報告は非常に数が少なく(Procyk et al., 2000)、他の研究グループの間でもあまり注目されておらず、議論が進んでいない。しかしどちらにしても、Caspr3の発現は小脳と運動皮質同様、帯状皮質においてもほとんど発現していない(図9)。従って、Caspr3 KO マウスの帯状皮質では、運動によるc-Fos発現の変化はWT マウスと変わらず、影響がなかったものと考えられる。以上のことからCaspr3 KO マウスでは、Caspr3が強く発現している線条体でのみ、運動後の神経細胞の活性化が低下していることが示された。特にCaspr3は、背側線条体の運動後の神経細胞活性化に必要であり、この神経活性化が運動学習に関与している可能性が示唆された。

NR2B の下流には Ras/ extracellular signal-regulated kinaseE (ERK) シグナルがあり、活性化した ERK が核内に移行し、cAMP response element binding protein (CREB) を活性化することで c-Fos 発現を誘発することが知られている (Girault et al., 2007; Pascoli et al., 2011)。Bureau らの報告では、加速式ロータロッドテストを 8 日間行った中で、3 日目のテスト終了後に線条体での ERK のリン酸化が有意に上昇していることが報告されている (Bureau et al., 2010)。またマウス背側線条体に、ERK 阻害剤を投与して加速式ロータロッドテストを行うと、2 日目以降の運動パフォーマンスがコントロールマウスに比べて低くなることも報告している (Bureau et al., 2010)。Caspr3 KO マウスでは、1 日目と 2 日目の運動パフォーマンスが低く、ERK を阻害した場合とは異なる。しかし、彼らの報告で使用したマウスの個体数はわずか 3, 4 個体であり、行動解析としては非常に少ない。Caspr3 KO マウスの行動解析では、12 個体用いていることから、個体数の違いによる可能性も考えられる。3. 4. 考察で述べたように、Caspr3 が Mint1 と介して NR2B を相互作用しているとすれば、Caspr3 KO マウスで見られた運動後の c-Fos 発現の減少は、NR2B 下流の Ras/ERK シグナルに影響が出た結果である可能性が考えられる。

3. 4. 考察で述べた、線条体特異的な NMDA 型グルタミン酸受容体 KO マウスおよび線条体特異的な NR1 サブユニットの KO マウスでは、運動学習の障害だけでなく、MSN の形態にも影響を及ぼすことが報告されている (Beutler et al., 2011; Dang et al., 2006)。MSN は、Caspr3 の発現が強い生後 14 日間の中に形態学および生理学的な特性が変化し、成熟することが知られている (Chronister et al., 1976; Misgeld et al., 1986; Tepper et al., 1998; Belleau et al., 2000)。第 2 章の

Nissl 染色では、Caspr3 KO マウスの線条体の形態には異常は見られなかったが、Nissl 染色では神経細胞の突起は染色できないため、細かい形態は計測できない (図 23)。このことから、Caspr3 欠損により線条体神経細胞が未熟で、神経活性化に影響が出ている可能性も考えられる。今後は、Caspr3 KO マウスの線条体神経細胞の神経突起の長さやシナプスの数など、詳細な形態について検討していく必要がある。ただしこの点については、Caspr3 欠損による形態の変化がごく微小なものである可能性も考えられる。従って、今後形態解析を行う際には、Caspr3 発現細胞を正確に選んで計測する必要がある。Caspr3 の発現細胞は線条体の 30%程度である (図 11) ことから、Cre-loxP システムを用いて、Caspr3 遺伝子を欠損させたくうえで EGFP を発現するなどのトランスジェニックマウスを作製して、解析を行う必要であると考えられる。

第5章. 最終討論

本研究では、Caspr3 のマウス脳内における発現時期、領域、細胞を同定し、それに基づいた Caspr3 KO マウスの行動解析を行ってきた。

まず Caspr3 の発現時期、発現領域および発現細胞について、Caspr3 は発達期の線条体をはじめとする大脳基底核に特に強く発現していることが明らかになった。また大脳基底核での発現は、発達期だけでなく胎生期から成体期まで一貫していたことから、Caspr3 が大脳基底核の発達、あるいは大脳基底核に関係した機能において重要な役割を持つことが示唆される。また線条体において、Caspr3 の発現には発達期から成体期にかけて一貫して濃度勾配があり、外側より内側が強いという結果が得られた。大脳皮質から線条体への投射は、由来する大脳皮質領域によって入力様式が異なることから、Caspr3 の線条体での発現分布の結果は、Caspr3 が担う機能を明らかにするための重要な手がかりになる。

さらに Caspr3 は線条体において、投射神経細胞 MSN の一部とアセチルコリン作動性インターニューロンに局在していることが明らかになった。MSN における Caspr3 の発現は、直接路（線条体—内節淡蒼球/黒質網様部）と間接路（線条体—外節淡蒼球）、matrix と striosome それぞれの MSN のマーカートンパク質と共局在していたことから、経路あるいはコンパートメント特異的な発現ではないことが示唆された。直接路および間接路における発現については、Caspr3 が黒質線条体路の軸索の束に発現しているという結果と合わせても、直接路の MSN に Caspr3 が発現していることは明らかだと考えられる。一方、Caspr3 が外節淡蒼球の細胞体に発現していることから、Caspr3 が間接路に発現していることも明らかである。しかし、Caspr3 が間接路の MSN に発現しているかどうかについては、MSN の細胞体でのマーカートンパク質との蛍光二重染色の結果のみである。直接路および間接路の

MSN のマーカータンパク質が 1 つの MSN に発現しているという報告もあることから、慎重に議論しなくてはならない。この点については今後、Caspr3 発現細胞のトレーシング解析を行い、線条体からの実際の投射経路を調べてみる必要がある。またトレーシング解析は、先ほど述べた線条体における Caspr3 発現の濃度勾配と、大脳皮質からの投射様式の間を明らかにするためにも有用であると考えられる。

次に、Caspr3 KO マウスの行動解析により、加速式ロータロッドテストにおいて初期の運動学習の低下が見られ、Caspr3 と脳機能との関係が明らかになった。加速式ロータロッドテストを用いた運動学習の研究は盛んに行われているが、Caspr3 KO マウスのように他の行動テストで影響がなく、かつ初期の運動学習にのみ影響があるマウスはまだ報告がない。4. 4. 考察でも述べたように、線条体の ERK を阻害した場合に影響が出るのは、2 日目以降である (Bureau et al., 2010)。この場合は学習機能だけでなく、記憶機能にも影響が出ている可能性が考えられる。ドーパミン受容体 D1R および D2R の KO マウスでも、加速式ロータロッドテストで障害は見られるが、これらのマウスは日常的な活動量に影響が出ている (Xu et al., 1994 ; Jung et al., 1999 ; Nakamura et al., 2014)。これらのことから、Caspr3 KO マウスは純粋な運動学習障害モデルの有用なツールとして、今後運動学習研究に役立つことが期待できる。

さらに、c-Fos 抗体を用いた免疫染色の結果から、Caspr3 KO マウスの運動学習の低下は、運動による背側線条体の神経活性化の低下が原因であり、特に背内側線条体の神経活性化が関与している可能性を示唆した。この点については、すでに考察で述べているように、Caspr3 が NR2B と相互作用の有無が重要な手がかりになると考えられる。Caspr ファミリーに属する Caspr は、 α -Amino-3-hydroxy-5-

methy-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体と相互作用することが報告されている (Santos et al., 2012)。さらに Santos らは、海馬の初代培養神経細胞を用いた実験で、shRNA を使って Caspr を抑制したところ、ポストシナプスの表面に現れる AMPA 型グルタミン酸受容体の GluA1 サブユニットが少なくなることが明らかにした (Santos et al., 2012)。このことから Caspr が GluA1 のシナプス膜表面への輸送に重要であることが示された。また Caspr と GluA1 の相互作用は、Caspr の細胞内ドメインを介して行われている (Santos et al., 2012)。Caspr3 の細胞内ドメインは、Caspr の細胞内ドメインとは構造が多少異なる (図 1)。しかし、Caspr3 は Mint1 と相互作用しており (Spiegel et al., 2002)、Mint1 は NR2B を含む小胞の輸送に重要である (Setou et al., 2000) ことから、Caspr3 が Mint1 を介して NR2B の輸送に関わっている可能性が考えられる。そして Caspr3 と NR2B の相互作用に関する仮説が正しいとすれば、Caspr3 KO マウスで見られた背側線条体での運動後の c-Fos 発現低下は、NR2B の下流にある Ras/ERK シグナルへの影響を受けた可能性が考えられる、従って、今後は Caspr3 と NR2B との相互作用を調べることで、線条体における運動学習の分子メカニズムの解明に関する、大きな手がかりを得られることが期待できる。

2012 年に Anderson らが、マウス大脳皮質の初代培養神経細胞を用いた Ca^{2+} イメージングによる神経活動の記録に関する報告がある (Anderson et al., 2012)。彼らは、shRNA により Caspr2 の発現を抑制すると、初代培養神経細胞の神経活動が減少することを報告した (Anderson et al., 2012)。そして Caspr2 の抑制は、AMPA 型および NMDA 型グルタミン酸受容体由来の興奮性シナプス後電流が減少しており、さらに抑制性シナプス後電流の減少も引き起こすことを明らかにしている (Anderson et al., 2012)。また Caspr2 の発現を抑制した際、神経細胞の形態を

観察したところ、樹状突起の長さ、分岐数、そしてスパインの幅が減少していた (Anderson et al., 2012)。従って、Caspr2 の発現抑制による神経活動の減少は、神経細胞の形態学的な変化により、シナプスにおける機能が低下したことに起因するものと考えられる。Anderson らはこの報告の中で、Caspr3 の shRNA も実験に使用していた。その結果、Caspr3 の発現抑制は Caspr2 と同様に、大脳皮質の初代培養神経細胞の神経活動を減少させることが明らかになった (Anderson et al., 2012)。このことから、Caspr3 が樹状突起の形態あるいはシナプスでの電気的な性質に影響を与えている可能性が示唆され、大脳皮質だけでなく線条体の神経細胞の形態または活動にも関与していることが考えられる。

最後に、本研究の研究成果は、Caspr3 の脳内における機能的意義の解明だけでなく、線条体が担う運動学習の分子メカニズムの解明に役立つことが期待される。また運動学習は、正しい技術の獲得に必要である。運動学習の分子メカニズムの解明することは、効率的な技術の獲得方法の開発、または間違っただけの姿勢や技術による怪我の防止に役立てることが期待できる。

また理学療法においても、運動学習は重要である。大脳基底核の代表的な疾患であるパーキンソン病の主な治療法は、L-DOPA による薬物治療である。しかし、薬物治療は静止時の振戦のような不随意運動に対して有効だが、バランスの不安定性や歩行障害に対しての効果は期待できないため、代わりに運動療法が必要である

(Schapira et al., 2005)。そしてその運動療法には、運動学習をベースとした目標指向型訓練が用いられている (Petzinger et al., 2013)。例えば、重心移動による姿勢のコントロールとバランス能力が求められる太極拳、トレッドミル、エアロビック訓練などがある。これらを長期に渡って行うことで、パーキンソン病患者の歩行能力およびバランス能力が向上し、この結果は、運動学習および神経可塑性の向

上によるものだと考えられている (Fisher et al., 2008; Schenkman et al., 2012; Li et al., 2012)。

以上のことから、Caspr3 の機能解明は、運動学習メカニズムの基礎研究として貢献できるものであり、運動学習研究の発展は難病疾患のリハビリテーションに役立つことが期待できると考えられる。

略称

ANOVA : analysis of variance, 分散分析

ASD : autistic spectrum disorder, 自閉スペクトラム症

B6 : C57BL/6JJmsSlc

BSA : bovine serum albumin

Caspr : contactin associated protein

ChAT : choline acetyltransferase

CNS : central nervous system, 中枢神経系

Cx : cerebral cortex, 大脳皮質

D1R、D2R : Dopamine receptor1, 2

DAB : *p*-dimethylaminoazobenzene

DARPP-32 : dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of Mr. 32,000

ERK : extracellular signal-regulated kinaseE

FBS : fetal bovine serum

GAD : glutamic acid decarboxylase

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GPe : external segment of the globus pallidus, 外節淡蒼球

HBSS : Hank's balanced salt solution

HRP : horseradish peroxidase

KO:knock-out, 遺伝子欠損型

MAG : myelin-associated glycoprotein

MSN : medium spiny neuron, 中型有棘神経細胞

MOR : μ -opioid receptor

NAcc : nucleus accumbens, 側座核

NGS : normal goat serum

NMDA : N-methyl-D-aspartic acid

NRS : normal rabbit serum

nsp : nigrostriatal pathway, 黒質線条体路

Ob : olfactory bulb

PB : phosphate buffer

PBS : phosphate buffered saline

PFA : paraformaldehyde

PNS : peripheral nervous system, 末梢神経系

PPI : prepulse inhibition, プレパルスインヒビション

SNe : substantia nigra pars compacta, 黒質緻密部

SNr : substantia nigra pars reticulata, 黒質網様部

STN : subthalamic nucleus, 視床下核

Str : striatum, 線条体

SVZ : subventricular zone, 脳室下帯

TBS : Tris-buffered saline

Th : thalamus, 視床

TH : tyrosine hydroxylase

VGAT : vesicular GABA transporter

VGluT 1 : vesicular glutamate transporter 1

WT : wild-type, 野生型

参考文献

- Abe M, Schambra H, Wassermann EM, Luckenbaugh D, Schweighofer N, Cohen LG. Reward improves long-term retention of a motor memory through induction of offline memory gains. *Curr Biol*. 2011; 21: 557–562.
- Aizman O, Brismar H, Uhlén P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A. Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci*. 2000; 3: 226–230.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989; 12: 366–375.
- Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 1990; 13: 266–271.
- Anderson GR, Galfin T, Xu W, Aoto J, Malenka RC, Südhof TC. Candidate autism gene screen identifies critical role for cell-adhesion molecule CASPR2 in dendritic arborization and spine development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 18120–18125.
- Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, Watanabe K, Graybiel AM, Kimura M. Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci*. 1994; 14: 3969–3984.
- Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH, Chakravarti A. A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet*. 2008; 82: 160–164.
- Ashrafi S, Betley JN, Comer JD, Brenner-Morton S, Bar V, Shimoda Y, Watanabe K, Peles E, Jessell TM, Kaltschmidt JA. Neuronal Ig/Caspr recognition promotes the formation of axoaxonic synapses in mouse spinal cord. *Neuron*. 2014; 81: 120–129.
- Belleau ML, Warren RA. Postnatal development of electrophysiological properties of nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol*. 2000; 84: 2204–2216.
- Bellen HJ, Lu Y, Beckstead R, Bhat MA. Neurexin IV, caspr and paranodin--novel

members of the neurexin family: encounters of axons and glia. *Trends Neurosci.* 1998; 21: 444–449.

Bergeron Y, Chagniel L, Bureau G, Massicotte G, Cyr M. mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice. *Front Mol Neurosci.* 2014; 7: 26.

Beutler LR, Eldred KC, Quintana A, Keene CD, Rose SE, Postupna N, Montine TJ, Palmiter RD. Severely impaired learning and altered neuronal morphology in mice lacking NM DA receptors in medium spinyneurons. *PLoS One.* 2011; 6: e28168.

Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ. Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 525–531.

Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, St Martin M, Li J, Einheber S, Chesler M, Rosenbluth J, Salzer JL, Bellen HJ. Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron.* 2001; 30: 369–383.

Bolam JP, Wainer BH, Smith AD. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation, and electron microscopy. *Neuroscience.* 1984; 12: 711–718.

Buitrago MM, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 81: 211–216.

Bureau G, Carrier M, Lebel M, Cyr M. Intrastratial inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 94: 107–115.

Bury SD, Jones TA. Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimband training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex. *J Neurosci.* 2002; 22: 8597–8606.

- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. *Eur J Neurosci.* 1992; 4: 929–935.
- Calabresi P, Saiardi A, Pisani A, Baik JH, Centonze D, Mercuri NB, et al. Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci.* 1997; 17: 4536–4544.
- Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P. Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 31: 1–5.
- Chronister RB, Farnell KE, Marco LA, White LE. The rodent neostriatum: a Golgi analysis. *Brain Res.* 1976; 108: 37–46.
- Costa RM, Cohen D, Nicolelis MA. Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol.* 2004; 14: 1124–1134.
- Craig AM, Kang Y. Neurexin-neuroigin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol.* 2007; 17: 43–52.
- Dang MT, Yokoi F, Yin HH, Lovinger DM, Wang Y, Li Y. Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 15254–15259.
- DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 1990; 13: 281–285.
- Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, Levitt P, Wilson CJ, Hamm HE, Surmeier DJ. RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci.* 2006; 9: 832–842.
- Etherton M, Földy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Südhof TC. Autism-linked neuroigin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 13764–13769.
- Faivre-Sarrailh C, Devaux JJ. Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 196.

- Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH Jr, Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS. High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett*. 2006; 409: 10–13.
- Fernagut PO, Diguët E, Stefanova N, Biran M, Wenning GK, Canioni P, et al. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience*. 2002; 114: 1005–1017.
- Fisher BE, Wu AD, Salem GJ, Song J, Lin CH, Yip J, Cen S, Gordon J, Jakowec M, Petzinger G. The effect of exercise training in improving motor performance and corticomotor excitability in people with early Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008; 89: 1221–1229.
- French CA, Jin X, Campbell TG, Gerfen E, Groszer M, Fisher SE, Costa RM. An aetiological *Foxp2* mutation causes aberrant striatal activity and alters plasticity during skill learning. *Mol Psychiatry*. 2012; 17: 1077–1085.
- Fujiyama F, Unzai T, Nakamura K, Nomura S, Kaneko T. Difference in organization of corticostriatal and thalamostriatal synapses between patch and matrix compartments of rat neostriatum. *Eur J Neurosci*. 2006; 24: 2813–2824.
- Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura KC, Matsuda W, Kaneko T. Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci*. 2011; 33: 668–677.
- Fukabori R, Okada K, Nishizawa K, Kai N, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Tsutsui Y, Kobayashi K. Striatal direct pathway modulates response time in execution of visual discrimination. *Eur J Neurosci*. 2012; 35: 784–797.
- Galea JM, Mallia E, Rothwell J, Diedrichsen J. The dissociable effects of punishment and reward on motor learning. *Nat Neurosci*. 2015; 18: 597–602.
- Gauthier J, Siddiqui TJ, Huashan P, Yokomaku D, Hamdan FF, Champagne N, Lapointe M, Spiegelman D, Noreau A, Lafrenière RG, Fathalli F, Joobar R, Krebs MO, DeLisi LE, Mottron L, Fombonne E, Michaud JL, Drapeau P, Carbonetto S, Craig AM, Rouleau GA. Truncating mutations in *NRXN2* and

NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Hum Genet.* 2011; 130: 563–573.

Gernert M, Hamann M, Bennay M, Löscher W, Richter A. Deficit of striatal parvalbumin-reactive GABAergic interneurons and decreased basal ganglia output in a genetic rodent model of idiopathic paroxysmal dystonia. *J Neurosci.* 2000; 20: 7052–7058.

Girault JA, Valjent E, Caboche J, Hervé D. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7: 77–85.

Graf ER, Kang Y, Hauner AM, Craig AM. Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 beta LNS domain. *J Neurosci.* 2006; 26: 4256–4265.

Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64: 1242–1250.

Hasenkamp W, Epstein MP, Green A, Wilcox L, Boshoven W, Lewison B, Duncan E. Heritability of acoustic startle magnitude, prepulse inhibition, and startle latency in schizophrenia and control families. *Psychiatry Res.* 2010; 178: 236–243.

Hemmings HC Jr, Girault JA, Nairn AC, Bertuzzi G, Greengard P. 1992. Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *J Neurochem.* 59:1053–1061.

Ikeda M, Aleksic B, Kirov G, Kinoshita Y, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kawashima K, Okochi T, Kishi T, Zaharieva I, Owen MJ, O'Donovan MC, Ozaki N, Iwata N. Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population. *Biol Psychiatry.* 2010; 67: 283–286.

Jackman C, Horn ND, Molleston JP, Sokol DK. Gene associated with seizures, autism, and hepatomegaly in an Amish girl. *Pediatr Neurol.* 2009; 40: 310–313.

Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg

IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* 2003; 34: 27–29.

Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretius S, Varoqueaux F, Ramanantsoa N, Gallego J, Ronnenberg A, Winter D, Frahm J, Fischer J, Bourgeron T, Ehrenreich H, Brose N. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 1710–1715.

Jenkins IH, Brooks DJ, Nixon PD, Frackowiak RS, Passingham RE. Motor sequence learning: a study with positron emission tomography. *J Neurosci.* 1994; 14: 3775–3790.

Johnston JG, Gerfen CR, Haber SN, van der Kooy D. Mechanisms of striatal pattern formation: conservation of mammalian compartmentalization. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990; 57: 93–102.

Jones BJ, Roberts DJ. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 1968; 20: 302–304.

Jung MY, Skryabin BV, Arai M, Abbondanzo S, Fu D, Brosius J, Robakis NK, Polites HG, Pintar JE, Schmauss C. Potentiation of the D2 mutant motor phenotype in mice lacking dopamine D2 and D3 receptors. *Neuroscience.* 1999; 91: 911–924.

Takegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitzu K, Yuzaki M. D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\delta 2$ glutamate receptor. *Nature Neurosci.* 2011; 14: 603–611.

Takegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M. Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron.* 2015; 85: 316–329.

Kanno K., Kokubo H., Takahashi A., Koide T., Ishiura S. Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in *Hesr1*-knockout mice. *J Neurosci Res.* 2014; 92: 287–297.

- Kato S, Ishii A, Nishi A, Kuriki S, Koide T. Segregation of a QTL cluster for home-cage activity using a new mapping method based on regression analysis of congenic mouse strains. *Heredity*. 2014; 113: 416–423.
- Kanda Y. Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR” (Easy R) for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013; 48: 452–458.
- Kang Y, Zhang X, Dobie F, Wu H, Craig AM. Induction of GABAergic postsynaptic differentiation by alpha-neurexins. *J Biol Chem*. 2008; 283: 2323–2334.
- Karayannis T, Au E, Patel JC, Kruglikov I, Markx S, Delorme R, Héron D, Salomon D, Glessner J, Restituto S, Gordon A, Rodriguez-Murillo L, Roy NC, Gogos JA, Rudy B, Rice ME, Karayiorgou M, Hakonarson H, Keren B, Huguet G, Bourgeron T, Hoeffler C, Tsien RW, Peles E, Fishell G. et al. Cntnap4 differentially contributes to GABAergic and dopaminergic synaptic transmission. *Nature*. 2014; 511: 236–240.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 1995; 18: 527–535.
- Karni A, Meyer G, Jezard P, Adams MM, Turner R, Ungerleider LG. Functional MRI evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. *Nature*. 1995; 377: 155–158.
- Keefe KA, Gerfen CR. D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience*. 1995; 66: 903–913.
- Kent K, Deng Q, McNeill TH. Unilateral skill acquisition induces bilateral NMDA receptor subunit composition shifts in the rat sensorimotor striatum. *Brain Res*. 2013; 1517: 77–86.
- Kincaid AE, Wilson CJ. Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *J Comp Neurol*. 1996; 374: 578–592.
- Kitsukawa T, Nagata M, Yanagihara D, Tomioka R, Utsumi H, Kubota Y, Yagi

- T, Graybiel AM, Yamamori T. A novel instrumented multipeg running wheel system, Step-Wheel, for monitoring and controlling complex sequential stepping in mice. *J Neurophysiol.* 2011; 106: 479–487.
- Koide T, Moriwaki K, Ikeda K, Niki H, Shiroishi T. Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*. *Mamm Genome.* 2000; 11: 664–670.
- Kosinski CM, Standaert DG, Counihan TJ, Scherzer CR, Kerner JA, Daggett LP, Daggett LP, Veliçelebi G, Penney JB, Young AB, Landwehrmeyer GB. Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: striatum and globus pallidus. *J Comp Neurol.* 1998; 390: 63–74.
- Lemay-Clermont J, Robitaille C, Auberson YP, Bureau G, Cyr M. Blockade of NMDA receptors 2A subunit in the dorsal striatum impairs the learning of a complex motor skill. *Behav Neurosci.* 2011; 125: 714–723.
- Lett BT, Grant VL, Byrne MJ, Koh MT. Pairings of a distinctive chamber with the aftereffect of wheel running produce conditioned place preference. *Appetite.* 2000; 34: 87–94.
- Li F, Harmer P, Fitzgerald K, Eckstrom E, Stock R, Galver J, Maddalozzo G, Batya SS. Tai chi and postural stability in patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2012; 366: 511–519.
- Liu Y, Hu Z, Xun G, Peng Y, Lu L, Xu X, Xiong Z, Xia L, Liu D, Li W, Zhao J, Xia K. Mutation analysis of the NRXN1 gene in a Chinese autism cohort. *J Psychiatr Res.* 2012; 46: 630–634.
- Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol.* 1992; 67: 145–163.
- Markowitsch, H.J.: Neuroanatomy of memory; In Tulving, E. & Craik, F.I.M (Eds.), *The Oxford Handbook of Memory*, New York: Oxford University Press. 2000; 465–484.
- Masuda M, Miura M, Inoue R, Imanishi M, Saino-Saito S, Takada M, Kobayashi

- K, Aosaki T. Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum. *Eur J Neurosci*. 2011; 34: 1355–1367.
- Misgeld U, Dodt HU, Frotscher M. Late development of intrinsic excitation in the rat neostriatum: an in vitro study. *Brain Res*. 1986; 392: 59–67.
- Morris G, Arkadir D, Nevet A, Vaadia E, Bergman H. Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron*. 2004; 43: 133–143.
- Nakamura T, Sato A, Kitsukawa T, Momiyama T, Yamamori T, Sasaoka T. Distinct motor impairments of dopamine D1 and D2 receptor knockout mice revealed by three types of motorbehavior. *Front Integr Neurosci*. 2014; 8: 56.
- Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, Ikeuchi Y, Hasegawa N. Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurophysiol*. 2000; 84: 289–300.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res*. 2002; 43: 111–117.
- Nishi A, Ishii A, Takahashi A, Shiroishi T, Koide T. QTL analysis of measures of mouse home-cage activity using B6/MSM consomic strains. *Mamm Genome*. 2010; 21:477–485.
- Nishizawa K, Fukabori R, Okada K, Kai N, Uchigashima M, Watanabe M, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Kobayashi K. Striatal indirect pathway contributes to selection accuracy of learned motor actions. *J Neurosci*. 2012; 32: 13421–13432.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2000; 23: S8–19.
- O’Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, Karakoc E, Mackenzie AP, Ng SB, Baker C, Rieder MJ, Nickerson DA, Bernier R, Fisher SE, Shendure J, Eichler EE. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet*. 2011; 43: 585–589.

Palencia CA, Ragozzino ME. The influence of NMDA receptors in the dorsomedial striatum on response reversal learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 82: 81–89.

Pascoli V, Besnard A, Hervé D, Pagès C, Heck N, Girault JA, Caboche J, Vanhoutte P. Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry.* 2011; 69: 218–227.

Peles E, Nativ M, Lustig M, Grumet M, Schilling J, Martinez R, Plowman GD, Schlessinger J. Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.* 1997; 16: 978–988.

Peles E, Salzer JL. Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10: 558–565.

Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E, Geschwind DH.. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell.* 2011; 147: 235–246.

Perreault ML, Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. The dopamine d1-d2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. *Front Neuroanat.* 2011; 5: 31.

Petzinger GM, Fisher BE, McEwen S, Beeler JA, Walsh JP, Jakowec MW. Exercise-enhanced neuroplasticity targeting motor and cognitive circuitry in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 716–726.

Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol.* 1985; 238: 286–307.

Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E. Caspr2, a new member of the Journal of Neuroscience Research neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K1 channels. *Neuron.* 1999; 24: 1037–1047.

- Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJ, Peles E. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol.* 2003; 162: 1149–1160.
- Poot M, Beyer V, Schwaab I, Damatova N, Van't Slot R, Prothero J, Holder SE, Haaf T. Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. *Neurogenetics.* 2010; 11: 81–89.
- Procyk, E., Tanaka, Y. L., & Joseph, J. P. Anterior cingulate activity during routine and non-routine sequential behaviors in macaques. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 502–508.
- Qiao YQ, Huang ML, Zheng Q, Wang TR, Xu AT, Cao Y, Zhao D, Ran ZH, Shen J. CNTNAP3 associated ATG16L1 expression and Crohn's disease. *Mediators Inflamm.* 2015; 404185.
- Ralph-Williams RJ, Lehmann-Masten V, Otero-Corchon V, Low MJ, Geyer MA. Differential effects of direct and indirect dopamine agonists on prepulse inhibition: a study in D1 and D2 receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002; 22: 9604–9611.
- Radyushkin K, Hammerschmidt K, Boretius S, Varoqueaux F, El-Kordi A, Ronnenberg A, Winter D, Frahm J, Fischer J, Brose N, Ehrenreich H. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav.* 2009; 8: 416–425.
- Ralph-Williams RJ, Lehmann-Masten V, Geyer MA. Dopamine D1 rather than D2 receptor agonists disrupt prepulse inhibition of startle in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28: 108–118.
- Rios JC, Melendez-Vasquez CV, Einheber S, Lustig M, Grumet M, Hemperly J, Peles E, Salzer JL. Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci.* 2000; 20: 8354–8364.
- Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in

central nervous system. *EMBO J.* 1993; 12: 2249–2256.

Santos SD, Iuliano O, Ribeiro L, Veran J, Ferreira JS, Rio P, Mülle C, Duarte CB, Carvalho AL. Contactin-associated protein 1 (Caspr1) regulates the traffic and synaptic content of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors. *J Biol Chem.* 2012; 287: 6868–6877.

Sarnyai Z, Sibille EL, Pavlides C, Fenster RJ, McEwen BS, Toth M. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 14731–14736.

Schapira AHV, Olanow CW. The medical management of Parkinson's disease. In: Schapira AHV, Olanow CW, eds. *Principles of treatment in Parkinson's disease.* Philadelphia: Butterworth–Heinemann Elsevier, 2005; 119–143.

Schenkman M, Hall DA, Barón AE, Schwartz RS, Mettler P, Kohrt WM. Exercise for people in early- or mid-stage Parkinson disease: a 16-month randomized controlled trial. *Phys Ther.* 2012; 92: 1395–1410.

Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science.* 2000; 288: 1796–1802.

Shacter, D.L., Wagner, A.D. & Buckner, R. Memory systems of 1999; In Tulving, E. and Craik, F.I.M (Eds.), *The Oxford Handbook of Memory*, New York: Oxford University Press, 2000; 627–643.

Sieradzan KA, Mann DM. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001; 27: 1–21.

Sharon Pellow, Philippe Chopin, Sandra E. File, Mike Briley, Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci. Meth.* 1985; 14: 149–167.

Spiegel I, Salomon D, Erne B, Schaeren-Wiemers N, Peles E. Caspr3 and caspr4, two novel members of the caspr family are expressed in the nervous system and interact with PDZ domains. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 20: 283–297.

Standaert DG, Testa CM, Young AB, Penney JB Jr. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J Comp Neurol*. 1994; 343: 1–16.

Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*. 2008; 455: 903–911.

Sun C, Cheng MC, Qin R, Liao DL, Chen TT, Koong FJ, Chen G, Chen CH. Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 3042–3051.

Takada M, Tokuno H, Nambu A, Inase M. 1998. Corticostriatal projections from the somatic motor areas of the frontal cortex in the macaque monkey: segregation versus overlap of input zones from the primary motor cortex, the supplementary motor area, and the premotor cortex. *Exp Brain Res* 120:114–128.

Takahashi, A., Kato, K., Makino, J., Shiroishi, T., Koide, T. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild derived mouse strains. *Behav Genet*. 2006; 36: 763–774.

Takahashi, A., Nishi, A., Ishii, A., Shiroishi, T., Koide, T. Systematic analysis of emotionality in consomic mouse strains established from C57BL/6J and wild-derived MSM/Ms. *Genes Brain Behav*. 2008; 7: 849–858.

Tepper JM, Sharpe NA, Koós TZ, Trent F. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electronmicroscopic studies. *Dev Neurosci*. 1998; 20: 125–145.

Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol*. 2003; 162: 1161–1172.

Traut W, Weichenhan D, Himmelbauer H, Winking H. New members of the neurexin superfamily: multiple rodent homologues of the human CASPR5 gene. *Mamm Genome*. 2006; 17: 723–731.

Tulving, E. and Craik, F.I.M: *The Oxford Handbook of Memory* ; New York:

Oxford University Press, 2000.

Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Südhof TC. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science*. 1992; 257: 50–56.

Wächter T, Lungu OV, Liu T, Willingham DT, Ashe J. Differential effect of reward and punishment on procedural learning. *J Neurosci*. 2009; 29: 436–443.

Wächter T, Röhrich S, Frank A, Molina-Luna K, Pekanovic A, Hertler B, Schubring-Giese M, Luft AR. Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training. *Exp Brain Res*. 2010; 200: 319–323.

Wenthold RJ, Prybylowski K, Standley S, Sans N, Petralia RS. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43: 335–358.

Sucher NJ, Awobuluyi M, Choi YB, Lipton SA. NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol Sci*. 1996; 17: 348–355.

Willuhn and Steiner. Motor-skill learning-associated gene regulation in the striatum: effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 2669–2682.

Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci*. 1990; 10: 508–519.

Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell*. 1994; 79: 729–742.

Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*. 2008; 55: 1081–1094.

Yin HH, Mulcare SP, Hilário MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci*. 2009; 12: 333–341.

Yin X, Takei Y, Kido MA, Hirokawa N. Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels. *Neuron*. 2011; 70: 310–325.

Yoshihara Y, Oka S, Ikeda J, Mori K. Immunoglobulin superfamily molecules in the nervous system. *Neurosci Res*. 1991; 10: 83–105.

Yue W, Yang Y, Zhang Y, Lu T, Hu X, Wang L, Ruan Y, Lv L, Zhang D. A case-control association study of NRXN1 polymorphisms with schizophrenia in Chinese Han population. *Behav Brain Funct*. 2011; 7: 7.

小林律子 神経認識分子TAG-1とCaspr2の小脳内局在の解析 2003年度修士論文
長岡技術科学大学

酒井優 神経認識分子Caspr4に対するモノクローナル抗体の作成とその局在解析
2008年度修士論文 長岡技術科学大学

為房大輔 特異性の高い抗Caspr3モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学への適用
2009年度修士論文 長岡技術科学大学

橋本圭子 運動スキル学習に関する考察—脳内経路の変化と記憶の固定をめぐって—
一, 新潟工科大学研究紀要, 2007; 12.

BRAIN and NERVE 神経研究の進歩 大脳基底核—分子基盤から臨床まで— 医学書
院, 2009; 61, 341-372.

線条体ニューロンの局在回路とその働き 東京都老人総合研究所・神経回路動態研究グループ 青崎敏彦

URL : <http://www.jnns.org/niss/2003/text/textAosaki.pdf#search='線条体'>

謝辞

はじめに、本研究を進めるにあたり、親切ご丁寧なご指導を賜りました長岡技術科学大学神経機能工学研究室、霜田 靖准教授、国立遺伝学研究所マウス開発研究室、小出 剛准教授、筑波大学行動神経内分泌学研究室、高橋 阿貴助教に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

次に、多岐に渡って適切なお指導と温かい激励を賜りました長岡技術科学大学分子生物物理学研究室、城所 俊一教授、同大学名誉教授、渡邊 和忠先生及び古川 清先生にも心から感謝申し上げます。

また、共同研究を行うにあたり、実験動物の飼育・管理、その他実験や滞在等に関して、多大なご協力を賜りました国立遺伝学研究所マウス開発研究室及び動物飼育実験施設のスタッフの皆様にも感謝の意を表します。

最後に、7年間日々互いに切磋琢磨し合った神経機能工学研究室の在学学生及び卒業生の皆様にも深く感謝致します。本当にありがとうございました。