

遺伝子改変マウスの行動解析と小脳における最初期遺伝子  
マッピングによる運動課題遂行に關与する脳機能の解析

中村 徹

目次	
略語 .....	5
要約 .....	6
序論 .....	8
第 1 章 .....	10
nNOS 遺伝子欠損マウスおよび線条体 NOS 阻害剤投与による、NO の運動機能および運動学習への関与の検討	
背景 .....	11
結果 .....	12
1-1 nNOS KO マウスによるステップホイール課題 .....	12
1-1-1 基本的な運動パフォーマンス .....	12
1-1-2 パターン変化後の適応 .....	12
1-1-3 記憶の保持、想起 .....	13
1-2 NOS 阻害剤投与実験 .....	14
1-2-1 手術後のパフォーマンス .....	14
1-2-2 薬物投与時のパフォーマンス .....	14
1-2-3 薬物投与後のパフォーマンス .....	14
1-2-4 NOS 阻害剤投与後のカタレプシーテスト .....	15
第 1 章、結果のまとめ .....	15
考察 .....	16
1-1 パターン変化後の学習、適応 .....	16
1-2 nNOS KO マウスで見られた複雑パターンにおける <i>Water On Time</i> 、 <i>Turn Stop</i> の高成績 .....	16
1-3 記憶の維持、想起 .....	17
1-4 線条体への NOS 阻害剤投与 .....	17
1-5 nNOS KO マウスおよび線条体 NOS 阻害剤投与の結果からの示唆 .....	18
第 2 章 .....	19
ドーパミンが運動に及ぼす影響について、ドーパミン受容体サブタイ プ D1R、D2R 遺伝子欠損マウスを用いた解析	

背景 .....	20
結果 .....	22
2-1 自発活動の特徴.....	22
2-2 摂食量と飲水量.....	23
2-3 ローターロッド課題.....	23
2-4 ステップホイール課題で見られた成績の改善.....	24
2-5 様々な速度設定でのステップホイール課題における運動パフォーマンス.....	25
2-6 静止したステップホイール装置内での飲水行動.....	26
第2章、結果のまとめ.....	26
考察 .....	28
2-1 自発活動.....	28
2-2 ローターロッド課題とステップホイール課題における運動成績.....	29
2-3 ローターロッドとステップホイール課題における行動特性.....	31
2-4 3つの行動課題における D1R KO、D2R KO マウスの表現型の違いとその意味.....	32
第3章 .....	34
小脳における最初期遺伝子(IEG)を用いた神経活動マッピングとIEG遺伝子マッピングの可能性	
背景 .....	35
結果 .....	36
3-1 小脳における IEG 遺伝子の発現.....	36
3-2 ローターロッド課題時の D1R KO、D2R KO マウスにおける小脳 <i>c-fos</i> 、 <i>jun-B</i> 発現.....	37
3-3 静止ロッドから 24 時間後における発現、ハンドリングによる影響.....	37
第3章、結果のまとめ.....	37
考察 .....	39
3-1 小脳における IEG 遺伝子の発現.....	39
3-2 小脳 flocculus の 3 層構造における <i>c-fos</i> 、 <i>jun-B</i> 遺伝子の発現パターン.....	40

3-3 D1R KO、D2R KO マウスの小脳 flocculus における <i>c-fos</i> 、 <i>jun-B</i> 遺伝子発現.....	40
3-4 静止ロッドから 24 時間後における flocculus での神経活性 .....	41
図の説明文 .....	43
図 .....	50
総括 .....	77
実験材料と方法 .....	78
実験動物 .....	78
運動行動課題 .....	78
ステップホイール装置 .....	78
ローターロッド課題 .....	80
自発活動量測定 .....	80
摂食量、飲水量測定 .....	81
線条体薬物投与 .....	81
カタレプシーテスト .....	82
ローターロッド課題後の小脳 IEG 発現 .....	82
ハンドリング処置 .....	83
<i>In situ</i> ハイブリダイゼーション法 .....	83
データ解析と統計処理 .....	84
表 .....	85
謝辞 .....	86
参考文献 .....	87

## 略語

NO: nitric oxide 一酸化窒素

nNOS: neuronal nitric oxide synthase、神経型一酸化窒素合成酵素

D1R: dopamine receptor type1、ドーパミン受容体サブタイプ1型

D2R: dopamine receptor type2、ドーパミン受容体サブタイプ2型

KO mouse: knockout mouse、遺伝子欠損マウス

WT mouse: wild type mouse、野生型マウス

IEG: immediate early gene、最初期遺伝子

ISH: *in situ* hybridization、*in situ* ハイブリダイゼーション

## 解剖用語

### 大脳基底核

SNc: substantia nigra pars compacta、黒質緻密部

SNr: substantia nigra pars reticulata、黒質網様部

VTA: ventral tegmental area、腹側被蓋野

GPe: external segment of the globus pallidus、淡蒼球外節

GPi: internal segment of the globus pallidus、淡蒼球内節

DMS: dorsomedial striatum、背内側線条体

DLS: dorsolateral striatum、背外側線条体

MSNs: medium-sized spiny neuron、中型棘突起ニューロン

### 小脳

hemisphere: hemisphere of cerebellum、小脳半球

vermis: vermis of cerebellum 小脳虫部

Sim: simple lobule、単小葉

Crus 1: crus I of the ansiform lobule、第I脚

Crus 2: crus II of the ansiform lobule、第II脚

Cop: copula of the pyramis、錐体結合節

flocculus、片葉

ML: molecular layer、分子層

GL: granular layer、顆粒細胞層

## 要約

スポーツなどの場面で新しい運動技能を習得する時、初期段階では身体動作一つ一つを意識的に行い、それでも動きは拙く不正確である。同じ動作を繰り返し行う事で、意識せずによりスムーズにより正確に身体が動くようになり、動作が自動化される。これは脳の機能の一種、運動学習（手続き記憶）と呼ばれ、運動を制御する脳領域のニューロンや神経回路などの可塑性によると考えられている。この機能については大脳皮質や基底核、小脳などの関与が報告されているが、詳しい脳内機構については未知の部分も大きい。私の研究室では、哺乳類のモデル生物であるマウスを用いて運動制御や運動学習を研究する行動実験系、ステップホイール装置を開発した。この装置では、マウスは報酬の水を飲むために足場となるペグを掴んで走行する必要がある、ペグの配列は実験者により変更する事が可能である。マウスは報酬を得るためにペグ配列に合わせて空間的、時間的に四肢の動きを制御する必要がある。この装置を用いた先行研究で、ペグ配列変更時の運動学習に、脳内の線条体の神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 陽性介在ニューロンが関与している事を示唆する結果が得られた。そこで本研究第1章では、nNOS 遺伝子欠損マウス (KO マウス) にステップホイール課題を課し、そのパフォーマンスを野生型 (WT) マウスと比較し、運動機能、運動学習への nNOS 遺伝子欠損の影響を調べた。nNOS マウスのパフォーマンスは、*Touch Time* (四肢の踏み外し時間) では差が認められないのに対して、*Water On Time* (飲水時間)、*Turn Stop* (ホイールの回転停止回数) では高成績という結果であった。nNOS KO マウスが見せたこの特徴は、報酬である水に対する意欲、動機付けの違いが起因するものと推測され、nNOS KO マウスにおいて、運動機能や運動学習の障害が起こっている可能性は低いものと考えられる。KO マウスは身体全体の遺伝子が欠損しているため、線条体局所での NOS の作用、機能を調べる為に、線条体へ NOS 阻害剤を投与してステップホイール課題を課した。結果、運動機能、運動学習ともに、阻害剤投与による効果は認められなかった。以上、nNOS KO マウスと NOS 阻害剤投与の実験結果を合わせて考えると、線条体の NOS 作用を遺伝学的、薬理学的方法により阻害しても、運動制御や運動学習の機能にほとんど影響がない事が示唆された。第2章では、線条体の主要な神経投射回路である直接路、間接路にそれぞれ選択的に発現しているドーパミン受容体1型、2型 (D1R、D2R) の KO マウスを用い、線条体における直接路、間接路回路、そしてドーパミンが運動機能に及ぼす影響について調べた。さらにステップホイール装置に加えて、広く一般的に使用されている行動実験装置のローターロッドを用い、異なる遺伝型マウスの、異なる運動系行動課題のパフォーマンスを比較、検討した。両課題のパ

パフォーマンスから、D1R KO、D2R KO マウスとも WT マウスと比較して運動機能は顕著に劣っている事が示唆された。一方、D1R KO、D2R KO マウスとも遅延はあるものの成績向上が認められる事から、運動学習は可能であることが示された。さらに、D1R KO マウスは報酬系課題であるステップホイールに対して、D2R KO マウスは嫌悪回避課題であるローターロッドに対して等の、それぞれの課題特性による運動障害を示唆する結果を得た。第1、2章の結果から、ステップホイール装置は遺伝子改変マウスを用いた運動に関する行動実験系として有用である事が初めて示された。

第3章では、線条体と同じく運動制御、運動学習に関与している小脳について、運動時にどの領域に神経活性が見られるかについて調べた。最初期遺伝子(IEG)は神経活性に伴って直ちに発現が誘導される事が知られており、神経活性の指標として用いられている遺伝子群である。IEG 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって可視化してマッピングする事により、神経活性を細胞レベルの解像度で明らかにする事が可能である。私の研究室の先行研究では、長期抑圧(LTD)の擬似刺激を小脳切片および麻酔下動物に与えた時、小脳プルキンエ細胞の IEG の発現が誘導される事を報告している。LTD は小脳の学習機構の一端と考えられている事から、*in vivo* においても学習時に LTD が引き起こされ、IEG 発現が誘導される事が推測される。本研究では IEG 遺伝子群として *fos* ファミリー (*c-fos*, *fos-B*)、*jun* ファミリー (*jun-B*, *c-jun*, *jun-D*)、その他、*zif-268*, *krox 20*, *arc* の計 8 遺伝子の発現を調べた。何の課題も行っていない Naïve マウスでは、ほぼ全ての IEG の発現が認められないのに対して、ローターロッド課題を行ったマウスでは、特に *c-fos*, *jun-B* が強く発現していた。また、領域によって発現の有無や強弱の違いが認められ、特に flocculus (片葉) において *c-fos*, *jun-B* の強い発現が確認出来た。*c-fos* は小脳皮質の 3 層全てで数多く強い発現が認められたのに対し、*jun-B* は数少ないがプルキンエ細胞に強い発現がみえる傾向があった。以上、自由行動下での *in vivo* 運動課題における IEG 発現の基礎的データを得ることが出来た。また、第2章で異なる表現型を示した D1R KO、D2R KO マウスにおける小脳の IEG 発現を調べたが、顕著な違いは認められなかった。しかし、ハンドリング後、あるいは、静止したロッドに3日載せた後、しかも 24 時間後の時点でも *c-fos*, *jun-B* が発現しているという予期しない結果が得られた。これらの実験から小脳における、*c-fos*, *jun-B* を用いた IEG マッピングの有効性を示すことができた。

## 序論

スポーツや楽器の演奏などの場面で、新しい運動技能を習得しようとする時、初期段階では身体動作一つ一つを意識的に行い、それでも動きは拙く不正確である。同じ動作を繰り返して行うことにより、強く意識せずともよりスムーズにより正確に身体が動くようになり、運動が自動化される。しかも、一度習得した運動技能は長期間失われることはない。この現象は脳の機能である記憶の一種、運動学習（手続き記憶）と呼ばれ、運動を制御している脳領域のニューロン（神経細胞）やそのネットワークが、繰り返し行われた運動の刺激によって不可逆的に変化した結果と考えられている。運動制御や運動学習には運動野、補足運動野、体性感覚野などの大脳皮質に加えて大脳基底核、小脳などの関与が明らかにされているが、その脳内機構については未知の部分が多い。運動学習は日常生活において欠かせない機能であり、その脳内機構を明らかにすることは意義あることと思われる。

哺乳類のモデル生物として広く使われているマウスについて、運動制御や運動学習を調べる行動実験系はいくつかある。一番良く知られているのは、回転する筒状のロッドに乗っている時間を計測するローターロッド (rota-rod) 課題である。しかし、これは歩行 (ロコモーション) 時の身体のバランス機能が主なターゲットであり、成績の指標も保持時間 (retention time) だけで、より精緻な運動制御を調べるには不十分と思われる。私の研究室では、マウスのロコモーション時の運動制御、運動学習を観察できる行動実験系システム、ステップホイール装置 (Step-Wheel system) を開発した (Kitsukawa et al., 2011) (Figure 1)。この装置は、輪回し内を走るマウスの足場となるペグの配置を変えることが可能で、より細かい四肢の運動制御が必要と考えられる。そこで私はこのステップホイール装置と、一般的に広く用いられているローターロッド装置を用いて、マウスの運動時、運動学習時の脳内メカニズムを研究するため、以下の実験を行った。

私の研究室の先行研究で、ステップホイール装置による運動学習時の脳内神経活性を、c-Fos タンパク発現を指標として調べた結果、運動学習に伴い線条体の介在ニューロン的一种である神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 陽性ニューロンにおいて特異的に認められた (木津川ら、未発表データ)。ここから、本研究第 1 章では、nNOS 遺伝子欠損マウス (nNOS KO マウス) にステップホイール課題を課し、そのパフォーマンスを WT マウスのものと比較することで、nNOS 遺伝子の欠損が運動学習にどのような影響を及ぼすかを検討した。更に NOS 阻害の効果在线条体に限定させるため、NOS 阻害剤の線条体局所投与時のステップホイール課題のパフォーマンスを調べた。結果、線条体の NOS を阻害する事

でマウスの運動機能および運動学習に及ぼす効果は、ほとんどない事が明らかになった。

次に第2章では、線条体の神経回路を構成する直接路、間接路のニューロンに選択的に発現しているドーパミン受容体サブタイプ1型、2型(D1R、D2R)の遺伝子欠損マウス(KOマウス)を用いて、ローターロッド課題とステップホイール課題での成績を比較した。D1R KO、D2R KOマウスとも、WTマウスと比較して顕著な運動機能の低下が確認された。また、D1R KOマウスは報酬系課題であるステップホイールに対して、D2R KOマウスは嫌悪回避課題であるローターロッドに対して等の、それぞれ課題選択的な障害が認められた。一方、運動学習についてはD1R KO、D2R KOマウスとも遅延はあるものの、課題の回数を重ねることで成績の向上が認められ、運動学習は可能である事が示唆された。第1章、第2章の結果から、ステップホイール装置が遺伝子改変マウスを用いた行動実験系として有用なことが初めて示された。

第3章では、線条体と同じく運動制御、運動学習に関与している小脳について、運動時にどの領域に神経活性が見られるかについて調べた。最初期遺伝子(IEG)は神経活性に伴って直ちに発現が誘導される事が知られており、神経活性の指標として用いられている遺伝子群である。IEG発現を*in situ*ハイブリダイゼーション法によって可視化してマッピングする事により、神経活性を細胞レベルの解像度で明らかにする事が可能である。*in vivo*の小脳皮質におけるIEG発現についての報告は少なく、IEGの種類も*c-fos*などごく一部であり、詳細な報告は現在までにほとんどない。よって、本研究第3章ではローターロッド課題遂行時の*in vivo*小脳における8種類のIEG遺伝子発現をマッピングすることで、小脳におけるIEG発現パターンの基礎的なデータを得ることができた。さらに、運動課題時の小脳と線条体の相互作用について調べるため、第2章で用いたD1R KO、D2R KOマウスとWTマウスでの小脳flocculusにおける*c-fos*、*jun-B*の発現を比較した。結果、異なる遺伝型マウス間での顕著な差は見られなかった。しかし、ハンドリング後、あるいは、静止したロッドに3日載せただけ、しかも24時間後の時点でも*c-fos*、*jun-B*が発現しているという予期しない結果が得られた。これらの実験から小脳における、*c-fos*、*jun-B*を用いたIEGマッピングの有効性を示すことができた。

## 第1章

nNOS 遺伝子欠損マウスおよび線条体 NOS 阻害剤投与による、  
NO の運動機能および運動学習への関与の検討

## 背景

哺乳類のモデル生物として広く使われているマウスについて、運動制御や運動学習を調べる実験系はいくつかある。一番良く用いられているのは、回転する筒状のロッドに乗っている時間を計測するローターロッド (rota-rod) 課題である。しかし、これは歩行 (ロコモーション) 時の身体のバランス機能が主なターゲットであり、成績の指標も保持時間 (retention time) だけで、より精緻な運動制御を調べるには不十分と思われる。私の研究室では、マウスのロコモーション時の運動制御、運動学習を観察できる行動実験系システム、ステップホイール装置 (Step-Wheel system) を開発した (Kitsukawa et al., 2011) (Figure 1)。この装置は、輪回し内を走るマウスの足場となるペグの配置を変えることが可能で、より細かい四肢の運動制御が必要と考えられる。この装置による運動学習時の脳内神経活性を、c-Fos タンパクの発現を指標として調べた結果、運動学習に伴った c-Fos 陽性ニューロン数の増減は、線条体の介在ニューロン的一种である神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 陽性ニューロンにおいて特異的に認められた (木津川ら、未発表データ)。線条体は約 80~95% の投射ニューロンと残り少数の介在ニューロンで成り立ち、その介在ニューロンの中の一部が nNOS 陽性ニューロンである (Kawaguchi et al., 1995)。NO を合成する NOS は 3 種のアイソフォームが存在し、神経型 (nNOS、NOS1)、誘導型 (iNOS、NOS2)、内皮型 (eNOS、NOS3) に分類される。この内、神経系で多く発現している nNOS とそこから合成される NO が神経系に与える作用については、一酸化窒素 (NO) はガス状の小さな分子で膜透過出来るため、シナプスや受容体に依存せずに拡散して神経伝達物質として作用すると考えられている (Dawson and Snyder, 1994)。NOS 阻害剤や NO 捕捉剤 (スカベンジャー) の投与による薬理実験、KO マウスを用いた遺伝子操作実験から、記憶や神経可塑性のメカニズムの一端と考えられている長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) への NO の関与が報告されており (Lev-Ram et al., 1997; Calabresi et al., 1999)、また、小脳による学習・適応の阻害も報告されている (Yanagihara and Kondo, 1996; Katoh et al., 2000)。しかし、線条体における NO と運動学習に関してはほとんど報告がない。

よって、本研究の第 1 章では、nNOS 遺伝子欠損マウス (nNOS KO マウス) と NOS 阻害剤を線条体に投与したマウスにステップホイール課題を課し、そのパフォーマンスを対照群と比較することで、NOS が運動学習にどのように関与しているのかを検討した。

## 結果

### 1-1 nNOS KO マウスによるステップホイール課題

まず nNOS KO マウスについて、ステップホイール課題を行った。

#### 1-1-1 基本的な運動パフォーマンス

最初に、簡単で基本的な足運びを行う左右交互のペグパターン A で第 1 セッショングループを行った (**Figure 2(1)**)。各遺伝型マウスとも、それぞれの第 1 日目と比較すると、2~3 日目以降で有意に成績が向上していた。一方、3 つの遺伝型マウス間については、局所では有意差がみられた (*Touch Time*、3 日目の WT-KO マウス間、*Water On Time*、7 日目のヘテロ-KO マウス間、*Turn Stop*、5 日目のヘテロ-KO マウス間の 3 点で有意差) もの、全体通して顕著な差は見られなかった。次に、複雑なペグパターン C1 で第 2 セッショングループを行った (**Figure 2 (2)**)。第 1 セッショングループと同様、どの遺伝型マウスも、第 1 日目と比較して 2~4 日目以降で有意差が見られた ( $p < 0.05$ )。遺伝型間での比較では、特に *Water On Time* で顕著に有意差が見られ、ホモ KO マウスは WT、ヘテロ KO マウスに対して 8 日間通じて全ての日で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。 *Touch Time* については第 1 日目の WT-ホモ KO マウス間 ( $p < 0.05$ ) で、 *Turn Stop* については 1~5 日目の WT-ホモマウス間 ( $p < 0.01$ ) と、1~3 日目と 5 日目のヘテロ-ホモ KO マウス間 ( $p < 0.05$ ) で有意差が見られた。第 1、第 2 セッショングループの結果から、3 つの遺伝型マウス全て、単純パターン、複雑パターンどちらにおいても学習能力があることが示唆された。異なる遺伝型マウス間での比較については、単純パターン時には大きな差がないものの、複雑パターン時の *Water On Time* (全日通じて) と *Turn Stop* (初期段階) で有意差が見られた。

#### 1-1-2 パターン変化後の適応

第 1 から第 2 セッショングループへの切り替えでは、単純パターンから複雑パターンへの変化による影響を調べた。次の第 3 セッショングループでは、複雑パターンから異なる複雑パターンへの変化について調べるため、第 2 セッショングループとは異なる複雑パターン、ペグパターン C2 で行った (**Figure 2 (3)**)。それぞれの指標について、前セッショングループ最終日 (8 日目) と次セッショングループ初日 (1 日目) で比較すると、ホモ KO マウス *Turn Stop* についての第 1-2 セッショングループ間 ( $p = 0.09$ ) を除いて、他の全てで有意差が認め

られた ( $p < 0.05$ )。このことから、単純-複雑パターンあるいは複雑-複雑パターンへの変化に関わらず、パターンが変化した直後の日には、いずれの指標も成績が低下することがわかる。

第3セッショングループ内について、第1日目と比較すると、どの遺伝型マウス、いずれの指標に関しても2~4日目以降において有意な差が見られた ( $p < 0.05$ )。遺伝型マウス間の比較では、*Water On Time*で顕著に見られ、1~7日目でWT-ホモ KO マウス間、ヘテロ-ホモ KO マウス間それぞれで有意差が見られた ( $p < 0.05$ 、**Figure 2 (2)**)。また、*Turn Stop*についても1~3日目で差がみられた (WT-ホモ KO マウス間の1、3日目で  $p < 0.05$ 、2日目は  $p = 0.06$ 。ヘテロ-ホモ KO マウス間の2、3日目で  $p < 0.05$ 、**Figure 2 (3)**)。以上のように、ペグパターン C2は、異なるパターンではあるもののペグパターン C1 (第2セッショングループ) と概して類似した結果であった。

### 1-1-3 記憶の保持、想起

一度経験した記憶の保持 (retention) と想起 (recall) について調べるため、次の2種類の組み合わせを行った。まず、第4セッショングループでは、異なる複雑パターン (ペグパターン C2) の後に再び同じパターンを行い (**Figure 2 (4)**)、第5、6セッショングループでは、何も課題を行わない通常飼育期間3週間の後に再び同じペグパターンを行った (**Figure 2 (5)(6)**)。第2セッショングループで見られたのと同様に、第4セッショングループにおいても、*Water On Time*で差が認められた。WT-ホモ KO マウス間で1~5日目で有意差が見られ ( $p < 0.05$ )、またヘテロ-ホモ KO マウス間では第1日目のみで有意差が見られた ( $p < 0.05$ )。同遺伝型マウス内での1日目との比較では、ヘテロ KO マウスのみ3つの指標全てで有意差が見られた (*Touch Time*は2日目以降で  $p < 0.01$ 。*Water On Time*は4日目以降で  $p < 0.05$ 。*Turn Stop*は5日目以降で  $p < 0.01$ ) のに対し、WT マウスはいずれも有意差なし、ホモ KO マウスは *Turn Stop* のみであった (6日目以降で  $p < 0.05$ )。次に、3週間通常飼育した後に第5、6セッショングループを行い、休止期間の後の保持、想起について調べた。通常飼育時に課題含め全く運動していない影響を除くために、第5セッショングループではペグパターン B1 (**Figure 1**、方法の項参照) で3日間だけ行い、その後第6セッショングループとしてペグパターン C1で3回目となるセッショングループを行った。異なる遺伝型マウス間での有意差は、WT-ホモ KO マウス間の *Turn Stop* 5、7日目でのみ認められ ( $p < 0.05$ )、他では全く有意差がなかった。同遺伝型マウス内での1日目との比較では、どのマウスも有意な成績の

向上が見られた (*Touch Time* では全てのマウスとも 2 日目以降で  $p < 0.05$ 。*Water On Time* では WT マウスは 2 日目以降で、ヘテロ、ホモ KO マウスは 4 日目以降で  $p < 0.05$ 。*Turn Stop* では、WT マウスは 2 日目以降、ヘテロ KO マウスは 5 日目以降、ホモ KO マウスは 4 日目以降で  $p < 0.05$ )。

## 1-2 NOS 阻害剤投与実験

nNOS KO マウスは身体全体での nNOS 遺伝子を欠損しているため、その影響は線条体を含めた脳内に限られない。そこで、線条体をターゲットに脳内カテーテル留置術を行い、NOS 阻害剤を線条体局所に投与することで、線条体における NOS 機能を阻害した時のステップホイール課題のパフォーマンスを調べた。

### 1-2-1 手術後のパフォーマンス

第 1 セッショングループでは、カテーテル手術による影響を確認した。手術後 7 ~ 10 日間の回復期の後にペグパターン A で走らせた (**Figure 3 (1)**)。最初、手術の影響か数日間課題を行っていなかった影響か、成績が悪かったが、2、3 日目には頭打ちの状態になった。

### 1-2-2 薬物投与時のパフォーマンス

第 2 セッショングループとして、NOS 阻害剤である SMTC (s-methyl-L-thiocitrulline) を投与し、ペグパターン C1 で課題を行わせた。SMTC は 2 つに濃度を設定し、低濃度 (Low) 群は 10 nmol/0.2 $\mu$ l、高濃度 (High) 群は 100 nmol/0.2 $\mu$ l、対照群は溶媒である生理食塩水 (Saline) 群としたが、いずれの群間にも差は認められなかった (**Figure 3 (2)**)。

### 1-2-3 薬物投与後のパフォーマンス

第 3、4 セッショングループでは、薬物投与後の影響を調べるため、それぞれ薬物投与なしでパフォーマンスを確認した。投与による基本的なロコモーションに影響があるかを確認するために第 3 セッショングループではペグパターン A で (**Figure 3 (3)**)、投与時と同じペグパターンの運動学習効果が残っているか、記憶の記銘に影響があるかを確認するために第 4 セッショングループではペグパターン C1 で (**Figure 3 (4)**) 課題を行ったが、いずれも差は認められなかった。

#### 1-2-4 NOS 阻害剤投与後のカタレプシーテスト

NOS 阻害剤投与によりカタレプシーが引き起こされると報告されている(Del Bel et al., 2002, 2004)ため、カタレプシーが起こるか確認をした。薬物投与から 20、60、120 分後に hanging bar test (方法の項参照)を実施したが、SMTC の 2 つの濃度どちらも、いずれのタイミングでも、カタレプシー症状は認められなかった (データ非掲載)。

#### 第 1 章、結果のまとめ

本研究第 1 章では、線条体における NOS が運動機能および運動学習に関与するかを検討するため、nNOS KO マウスと線条体への NOS 阻害剤投与という 2 つの方法で、ステップホイール課題のパフォーマンスを調べた。nNOS KO マウスでは、ステップホイール課題を評価する指標について、以下のような特徴が現れた。*Touch Time* ではいずれの条件下においても、異なる遺伝型マウス間での大きな差は見られなかった。*Water On Time* では複雑のペグパターンにおいて、ホモ KO マウスが他の 2 種のマウスより成績が高かった。*Turn Stop* では、セッショングループの初期段階で、ホモ KO マウスが他のよりも成績が良かった。ヘテロ KO マウスについては、いずれの指標に関しても、WT とほぼ差がない結果であった。NOS 阻害剤投与による影響は、対照群と比較して差は見られなかった。

## 考察

### 1-1 パターン変化後の学習、適応

私の研究室の先行研究で、パターン変化時に線条体 nNOS 陽性介在ニューロンにおける c-Fos 発現増加が認められた(Kitsukawa et al., 2011)。事から、このニューロンが運動学習に関与する可能性が示唆された。このニューロンは nNOS の他にもソマトスタチン、ニューロペプチド Y を発現している(Kawaguchi et al., 1995)が、NO が LTP、LTD に関与する報告(Lev-Ram et al., 1997; Calabresi et al., 1999)があることから、nNOS KO マウスを用いて nNOS の関与を調べた。結果、nNOS KO マウスにおいても成績向上が認められ、運動学習が阻害される事はなかった。どのセッショングループにおいても見られるように、後期段階になるにつれて成績が改善し、ある一定の所で頭打ちのレベルに達する。そして次のセッショングループに移ってペグパターンが変わると、成績が落ちるがまた日を追うにつれて改善していく。この様子は、単純-複雑パターンへの変更と複雑-複雑パターンへの変更、どちらでも認められた。本研究の結果では単純-複雑パターンの変更の方が、複雑-複雑パターンへの変更よりも、次のセッショングループ初日にみられる成績の低下が大きいのが、これが組み合わせによるものなのか、順番によるものなのかは現時点では不明であり、今後の課題である。

### 1-2 nNOS KO マウスで見られた複雑パターンにおける *Water On Time*、*Turn Stop* の高成績

WT マウスとホモ KO マウスとの比較では、*Touch Time* に関しては大きな差が見られなかった (**Figure 2A**) が、*Water On Time*、*Turn Stop* ではホモ KO マウスの方が良い成績という結果 (**Figure 2B、C**) であった。*Touch Time* で、特に頭打ちになった後期段階で、異なる遺伝型マウス間において差がないという結果は、遺伝子欠損によって運動機能そのものには障害がない事を示唆している。*Touch Time* で差がないにも関わらず、他の2つの指標で差が見られたことから、運動機能や学習能ではなく、他の要因の影響の可能性もある。nNOS KO マウスの表現型として多飲、多尿傾向が報告されており(Tsutsui et al., 2006)、報酬である水に対する意欲、動機付けの違いがこの結果になった可能性がある。実験時の様子を観察しても、特にパターン変化直後の初期段階において、WT マウスは断続的に走り、ペグの上で立ち止まることが多いのに対して、KO マウスはペグを踏み外しながらも四肢を猛烈に動かし、走り続けようとする様子が観察され、これは *Turn Stop* のデータにも現れている (**Figure 2C**)。

nNOS KO マウスの表現型の一つとして、攻撃性の増加が報告されており (Nelson et al., 1995)、それがこの行動に現れているのかも知れない。また、*Water On Time*、*Turn Stop*での差がなぜ第2、3セッショングループの複雑パターンで顕著に見られ、単純パターンでは現れなかったのかについては、単純パターンが最初に行われた (第1セッショングループ) 事により、どの遺伝型マウスも成績向上の過渡期であった点、あるいは単純であるために WT マウスでも十分高いレベルであり、差が出にくかった点が要因として予想されるが、いずれも推測の域を出ない。

### 1-3 記憶の維持、想起

本研究では、同じペグパターンを、時間をおいて施行した場合のパフォーマンスについて、間に別のペグパターンを挟んだ場合 (第2~4セッショングループ) と、課題を行わない通常飼育をした場合 (第4~6セッショングループ) とを設定して検討した。KO マウスについて、WT マウスと同程度 (*Touch Time* と *Turn Stop*) か、それ以上 (*Water On Time*) の成績を示した事から、遺伝子欠損による記憶の維持、想起の機能に影響はないと考えられる。興味深い事に、第2、4セッショングループでは顕著に見られていた *Water On Time* での有意差が、第6セッショングループにおいては認められなかった (**Figure 2B (6)**)。これが、前のセッションでの運動の有無によるものなのか、同パターンの回数 (経験) によるものなのかは現時点では不明である。

### 1-4 線条体への NOS 阻害剤投与

先に記載したように KO マウスは身体全体の遺伝子を欠損させているため、その影響は脳内に限らない。そこで、脳内、特に線条体での NOS を阻害した時の効果を調べるために、線条体局所へ NOS 阻害剤 (SMTC) の投与実験を行った。結果、いずれの指標に関してもパフォーマンスの成績曲線は対照群と差がなく (**Figure 3**)、運動機能についても運動学習能についても影響が無いことが示された。nNOS KO マウスで見られた *Water On Time* と *TurnStop* の高成績も、阻害剤投与時には認められなかったことから、この表現型は線条体以外での NOS の作用、可能性としては腎臓での影響 (Tsutsui et al., 2006) が考えられる。予備実験レベルではあるが、別の NOS 阻害剤として L-NAME と NO 依存性グアニル酸シクラーゼ阻害剤の ODQ の線条体投与実験も行ったが、SMTC の結果と同様に対照群との差は認められなかった (データ非掲載)。

#### 1-5 nNOS KO マウスおよび線条体 NOS 阻害剤投与の結果からの示唆

nNOS KO マウスにおいて、海馬 LTP(O'Dell et al., 1994)および小脳 LTD(Linden et al., 1995)は阻害されない一方、nNOS と eNOS のダブル KO マウスにおいては LTP が阻害される(Son et al., 1996)ことから、nNOS が無くても eNOS が代償作用を果たしている可能性がある。一方、NOS 阻害剤は NOS の3つのアイソフォームそれぞれに対する選択性の違いはあるものの、全てに効果があるため、nNOS も eNOS も阻害する。よって、今回の結果から、線条体における NOS 機能を阻害しても、ステップホイール課題に及ぼす影響がほとんどない事が示唆された。前述したように、線条体の nNOS 陽性介在ニューロンは NOS の他にもソマトスタチン、ニューロペプチド Y も発現している(Kawaguchi et al., 1995)事から、NO 以外の別の物質が作用しているか、あるいはこれらの物質を介さずに回路としてニューロン自体が機能している事が予想され、今後、更なる検証が必要である。

## 第2章

ドーパミンが運動に及ぼす影響について、ドーパミン受容体サブタイプ D1R、D2R 遺伝子欠損マウスを用いた解析

## 背景

ドーパミンは神経系において多くの脳機能に重要な役割を果たしている。哺乳類の脳において、ドーパミンは運動制御、摂食行動、認知機能、習性に影響を与え、環境に対する生体の反応の仲介に関与している(Moore and Bloom, 1978; Gingrich and Caron, 1993; Schultz, 2007; Graybiel, 2008; Grahn et al., 2008; Kim et al., 2010)。ドーパミンのシグナルはドーパミン受容体を介して作用し、その受容体はドーパミン受容体サブタイプ 1~5 型 (それぞれ D1R~D5R) までの 5 種類のサブタイプが存在する。さらにその 5 種類は大きく 2 種類に分類され、D1 様受容体 (D1-like receptors) と D2 様受容体 (D2-like receptors) と呼ばれる。D1R、D5R を含む D1 様受容体はアデニル酸シクラーゼを活性化させる一方、D2R、D3R、D4R を含む D2 様受容体はこれを抑制し、カリウムチャンネルを活性化させる。D1R は線条体 (尾状核、被核)、側坐核、嗅結節、大脳皮質、扁桃体で多く発現しており、広く分布している。D2R は線条体、嗅結節、側坐核、黒質緻密部 (SNc)、腹側被蓋野 (VTA) で多く発現している。最後の 2 領域、黒質緻密部と腹側被蓋野は主たるドーパミン経路を構成している(Gingrich and Caron, 1993; Vallone et al., 2000)。運動制御に関与するドーパミンの主なターゲットの一つが線条体である。

線条体は大脳基底核の主な入力領域であり、運動制御や運動学習を含めた様々な脳機能に重要な役割を果たしている(Graybiel, 1995; Reynolds and Wickens, 2000)。線条体は大脳皮質の様々な領域や黒質緻密部から入力を受け、他の基底核へ抑制性の出力を送って調整性の回路を形成している。線条体からの投射ニューロンはガンマアミノ酪酸 (GABA) 作動性の中型棘突起ニューロン (MSNs) であり、線条体-黒質ニューロンと線条体-淡蒼球ニューロンの 2 つに分類され (Gerfen et al., 1990; Schiffmann et al., 2007)、これらは基底核の 2 つの経路を構成している。線条体-黒質ニューロンは淡蒼球内節 (GPi) と黒質網様部 (SNr) という基底核の出力領域に直接投射し、直接路と呼ばれる経路を構成している。一方、線条体-淡蒼球ニューロンは淡蒼球外節 (GPe) や視床下核を介して基底核の出力領域には間接的に投射しており、間接路と呼ばれる経路を構成している。運動制御に対して直接路は促進的に、反対に間接路は抑制的に作用しており、古典的モデルにおいて、これら 2 つの経路はお互いに反対方向に作用することで協調して運動のバランスをとっていると考えられている(Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990; Gerfen et al., 1990; Graybiel, 1995; Reynolds and Wickens, 2000; Gerfen, 2000)。さらに、D1R と D2R は前述したように下流のシグナル経路に反対方向に作用している。以上から、D1R 遺伝子欠損マウス (D1R KO マウス) と D2R 遺伝子欠損マウス (D2R KO マウス) を

直接比較することで、ドーパミンがその受容体サブタイプを介して運動行動にどのように影響を与えているのかを解明する事は重要である。

D1R KO マウス(Xu et al., 1994a, 1994b; Drago et al., 1994; Smith et al., 1998; Centonze et al., 2003; Tran et al., 2005, 2008)と D2R KO マウス(Baik et al., 1995; Yamaguchi et al., 1996; Kelly et al., 1997; Jung et al., 1999; Tran et al., 2002)の解析から、D1R および D2R の機能に関して重要な知見が得られてきた。しかし、D1R KO マウスの自発活動量に関しては、一貫した結果が得られていない。これは用いたマウスの遺伝的背景や活動量の測定方法が異なる事によるものと考えられる(Kelly et al., 1998; Fowler et al., 2002; McNamara et al., 2003; Holmes et al., 2004; Waddington et al., 2005)。しかし、遺伝的背景や方法が異なる数々の研究の結果が一貫していない事を考えると、何が結果に影響を与えているのかを正確に特定する事は困難である。実験環境や方法の些細な違いが動物の行動に影響を及ぼすことが報告されており(Crawley, 1999; Wahlsten et al., 2003)、同一の遺伝的背景を持つマウスで、同一の実験環境と測定方法で得られた結果を比較することが重要である。遺伝的背景が均一な(コンジェニックな) D1R KO マウス、D2R KO マウスの運動機能、運動学習についてはそれぞれ報告があり(Kelly et al., 1998; Fowler et al., 2002; Wall et al., 2011)、また、非コンジェニックな D1R KO マウスと D2R KO マウスの直接比較を行った報告もある(Kobayashi et al., 2004)が、より詳細な解析は行われていない。

本研究第 2 章では、10 世代以上の戻し交配を行ったコンジェニックな KO マウスを用い、同一環境下での行動実験を解析、結果の直接比較を行った。外的要因によるマウスの行動への影響を極力減らすため、通常飼育環境下であるホームケージ内でのマウスの活動を 5 日間連続で記録し、通常自発活動として観察した。さらに活動の特徴をより詳細に理解するために、活動の強度と一区切りの活動の時間の長さ、回数を、活動記録から解析して算出した。ドーパミン受容体は体重の増減や摂食量、飲水量にも関与しているため(Kim et al., 2010)、活動量測定中の摂食量と飲水量もともに記録した。線条体と報酬系機能の関わりについて、直接路は報酬系学習(reward learning)に、間接路は嫌悪回避学習(aversive learning)に重要であるというように、反対の作用を持つことが報告されている(Hikida et al., 2010)。よって本研究第 2 章では、D1R KO、D2R KO マウスの運動機能を解析するに辺り、嫌悪回避学習課題であるローターロッド(rota-rod)課題と、報酬系学習課題であるステップホイール(Step-Wheel)課題の 2 種類を用いた。

## 結果

以下、2-1 自発活動量測定、2-2 摂食量飲水量測定の実験は、共同研究者である北里大学、佐藤朝子博士と新潟大学、笹岡俊邦教授が行ったものである。

### 2-1 自発活動の特徴

コンジェニックな D1R KO、D2R KO マウスは WT マウスと比較して、大人に成熟する早期段階まで体重が少なく、成長遅延が見られた。これはコンジェニックな D1R KO マウス(McNamara et al., 2003)と D2R KO マウス(Kelly et al., 1998; Clifford et al., 2001; Kim et al., 2010)を用いた先行研究の報告と一致する。本研究の実験実施の時には十分に成長しており、KO マウスと WT マウスとの体重差は見られなかった (D1R KO マウス,  $27.48 \pm 0.76$  g, n=4; D2R KO マウス,  $31.58 \pm 1.35$ g, n=8; WT マウス,  $30.11 \pm 1.33$  g, n = 8)。

最初に、D1R KO、D2R KO、WT マウスのホームケージ環境下での連続 5 日間の自発活動を、摂食量、飲水量と合わせて記録した。24 時間の累積活動量は、WT マウスと比較して D1R KO マウスは活動量が多く ( $p < 0.01$ )、D2R KO マウスは活動量が少なかった ( $p < 0.01$ ) (**Figure 4A**)。この結果は、コンジェニック KO マウスのオープンフィールド課題での結果と一致している(Kelly et al., 1998; McNamara et al., 2003; Holmes et al., 2004)。グラフの大きなエラーバーが示す通り、個々の D1R KO マウスの活動量は大きくバラついていた。このような個々の活動量の大きなバラつきは Wall らの先行研究 (2011)でも見られている。本研究では、摂食量、飲水量がほんの少ししかなく、実験続行が不可と判断した D1R KO マウス 3 匹のデータは除外している。より詳細な日内活動を調べるため、次の実験を行った。

D1R KO、D2R KO マウスが通常の日周リズム (diurnal rhythm) を持っているか調べるため、明期、暗期毎の活動量を解析した。WT マウスと同様に、D1R KO、D2R KO マウスともに暗期活動量が明期活動量よりも高く (**Figure 4B**)、この結果は両 KO マウスとも日周リズムが正常であることを示している。WT マウスの活動量と比較して、D1R KO マウスの活動量は、暗期でのみ有意に高かった ( $p < 0.01$ ) が、一方 D2R KO マウスの活動量は、明期も暗期も両方とも有意に低かった ( $p < 0.01$ )。これらの結果から、D1R KO マウスの高い活動量は暗期活動量の増加によるものである一方、D2R KO マウスの低い活動量は日内活動量全体の低下によるものと考えられる。

暗期における活動パターンを明らかにするため、10 分間毎の活動量の測定に基づいて、より詳細に解析した (**Figure 4C-F**)。ここでは 10 分間の活動状態を

その間の測定値に基づいて、無、低、中、高活動状態 (inactive、low、medium、high) の 4 段階に分類し、各状態でいた時間の割合を算出した (**Figure 4C**)。興味深いことに、D1R KO、D2R KO マウスとも無活動状態の割合は WT マウスの割合と同程度であった。他の低～高活動状態に関しては WT マウスと比較して、D1R KO マウスは高活動状態の割合が有意に高く ( $p < 0.01$ )、D2R KO マウスは低活動状態の割合が有意に高かった ( $p < 0.01$ )。マウスの活動は断片的であることから、一区切りの活動の長さと同数を算出した (**Figure 4D-F**)。D1R KO マウスにおける活動状態、無活動状態の長さは WT マウスに比べて有意に長く (それぞれ  $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ )、活動状態の回数は少なかった ( $p < 0.01$ )。一方、D2R KO マウスにおける活動状態、無活動状態の長さは WT マウスに比べて有意差はないものの短い傾向があり、活動状態の回数は有意に多かった ( $p < 0.05$ )。

## 2-2 摂食量と飲水量

摂食行動、飲水行動は、マウスの自発活動量を成す行動の一部である。それゆえ、活動量、摂食量、飲水量の各遺伝型マウスの平均値の経時的動態を **Figure 5** に示した。全ての遺伝型マウスについて、摂食量、飲水量の経時的動態は活動量の経時的動態に似たパターンを示した。つまり、大きなピークの山が活動期 (暗期) の真ん中付近に現れ、小さなピークの山が活動期の最後に現れた。これらの結果から、D1R KO、D2R KO マウスとも正常な活動リズム、摂食飲水パターンを示す事を表している。しかし、D1R KO マウスは WT マウスに比べて高い活動量を示す一方、摂食量、飲水量は有意に少ない (24 時間、あるいは 12 時間毎の摂食量、飲水量の解析において、それぞれ  $p < 0.01$ 、**Figure 6**)。D2R KO マウスでは、WT マウスに比べて摂食量は有意差がみられない ( $p > 0.05$ ) が、飲水量については有意に少なかった ( $p < 0.01$ 、**Figure 6**)。

## 2-3 ローターロッド課題

次にマウスの運動機能を調べるためにローターロッド課題を行った。プレセッションにおいて静止したロッドにマウスを載せたが、3 種の遺伝型のマウスのほとんどが設定した最大時間 (120 秒間) 乗っている事が出来た (データ非掲載)。各遺伝型マウスはランダムに 2 つの群、高速-低速群 (fast-slow 群: FS 群) と低速-高速群 (slow-fast 群: SF 群) に分けた。FS 群は第 1 セッショングループにおいて高速回転 (15rpm)、第 2 セッショングループにおいて低速回転 (5rpm) の条件で課題を行った。SF 群はこの条件の順番を入れ替えた。最初に、FS 群

マウスを 15 rpm でテストした (**Figure 7A、8A-C**) が、D1R KO、D2R KO マウスともにほとんどロッドに乗っている事が出来ず、また成績の改善も見られなかった。この第 1 セッショングループを通して、両 KO マウスと WT マウスの成績の間には有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。WT マウスの成績には有意な改善が見られた (1 日目と比較して 2 日目以降で、 $p < 0.05$ )。次の第 2 セッショングループでは、5 rpm でテストした。D1R KO、D2R KO マウスともにロッド上に乗っている事が出来、ロコモーションも出来ていた。第 2 セッショングループの 1 日目では、両 KO マウスの成績は WT マウスと比較して優位に低かった ( $p < 0.05$ )。D1R KO マウスの成績は改善し (1 日目と比較して 2 日目以降で、 $p < 0.05$ )、D1R KO マウスと WT マウスとの間の有意差は 2 日目以降では見られなくなった。一方、D2R KO マウスの成績は第 2 セッショングループを通じて WT マウスの成績より有意に低く ( $p < 0.05$ )、改善も見られなかった。D1R KO マウスと D2R KO マウスとの間では、第 2 セッショングループの 3 日目以降で有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

次に SF 群について、FS 群とは逆の順番、すなわち第 1 セッショングループで低速回転、第 2 セッショングループで高速回転の順番で試行を行った (**Figure 7B、8D-F**)。低速回転では、D1R KO マウスの成績の改善が見られ、1 日目と 6 日目の間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ 、1 日目と 5 日目との間では  $p = 0.053$ 、7 日目との間では  $p = 0.059$ )。一方、D2R KO マウスにおいては成績の改善は見られなかった。WT マウスでは成績の改善が見られた (1 日目と比較して 3 日目以降で  $p < 0.05$ )。低速回転のセッショングループの同一日において、WT、D1R KO、D2R KO マウスの 3 群間ではいずれも有意差は認められなかった。次の高速回転条件下である SF 群の第 2 セッショングループ全体を通じて、両 KO マウスとも WT マウスに比べ有意に成績が低かった。この結果は FS 群の第 1 セッショングループと類似している。WT マウスについて、FS 群の高速回転の条件下で成績の改善が見られたのに対して、SF 群の高速回転下では改善が見られなかった。この違いは、SF 群のマウスは前のセッショングループにおいて既に低速回転のローターロッド課題を経験している事に起因していると推測される。

成績変化の傾向について、D1R KO、WT マウスとも SF 群、FS 群において類似したパターンが見られるのに対して、D2R KO マウスの低速回転下では 2 群に違いが見られる。この事については後ほど詳しく考察する。

#### 2-4 ステップホイール課題で見られた成績の改善

次にステップホイール課題を用いて D1R KO、D2R KO マウスの運動機能や運動学習を調べた。マウスは最初ペグパターン A で 14 日間の試行を行った。この課題の成績を評価するのに、*Touch Time* (接触時間、踏み外し時間、**Figure 9A**)、*Water On Time* (擬似飲水時間、**Figure 9B**)、*Turn Stop* (回転停止回数、**Figure 9C**) の 3 つの指標を用いた (詳細は方法の項に記載)。D1R KO、D2R KO マウスともステップホイール課題で成績の改善は見られたが、成績が上限で頭打ちになるまでに要した日数は WT に比べて遅かった (**Figure 9A, B**)。また、D1R KO マウスでの頭打ちになった最高成績は WT、D2R KO マウスのそれと比べて低かった ( $p < 0.01$ )。D1R KO マウスの 1 日目と比較して、各日にちの *Touch Time*、*Water On Time* における有意差は、それぞれ 11 日目以降、8 日目以降で認められた ( $p < 0.05$ )。また、D1R KO マウスの *Touch Time*、*Water On Time* の成績は、WT マウスと比較して全ての日において有意に低く ( $p < 0.01$ )、D2R KO マウスと比較しても後期段階の 8 日目以降で低かった ( $p < 0.05$ )。対照的に、D2R KO マウスでは有意に成績が向上し、最終的には WT マウスの成績と同程度までになった。D2R KO マウスの *Touch Time*、*Water On Time* の成績は、早期段階では WT マウスに比べて有意に低かった (7 日目以前において  $p < 0.05$ ) が、後期段階では有意差はなくなった。D2R KO マウスの 1 日目の成績と比較して、*Touch Time*、*Water On Time* はそれぞれ 4 日目以降と 2 日目以降で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。WT マウスの *Touch Time*、*Water On Time* について、1 日目と比較して 2 日目以降で有意差がみられる ( $p < 0.05$ ) ことから、WT マウスは 2 日目には既にほぼ頭打ちのレベルに達していたと思われる。

## 2-5 様々な速度設定でのステップホイール課題における運動パフォーマンス

次に、各遺伝型マウスの運動機能をより詳細に明らかにするため、徐々に回転速度を上げる条件 (第 1~第 7 セッショングループ毎で、2、3、4、5、6、7.5、10 回転/分の 7 段階の速度設定) において、どれだけの速さで走ることが出来るかを調べた。このテストでは、ペグ配列はペグパターン B2 とし (**Figure 1C**)、同一速度で 1 日 1 試行を連続 5 日間行い、この 5 日間の平均値で各遺伝型マウス間の成績を比較した (**Figure 10**)。WT マウスと比較して、D1R KO マウスの *Touch Time* と *Water On Time* の成績は、第 1~第 4 セッショングループを通して有意に低かった ( $p < 0.01$ )。第 5 セッショングループ (6 回転/分) において、D1R KO マウスは回転速度についていけず、よって第 4 セッショングループの速度 (5 回転/分) が D1R KO マウスの上限速度と判断した。WT マウス

と比較して、D2R KO マウスの第 1 セッショングループにおける成績は、*Turn Stop* での差は見られず、*Water On Time* では僅かな差が、*Touch Time* では大きな差があった。しかし、これら 3 つの指標とも、第 2~3 セッショングループにおいては有意差はなかった。D2R KO マウスの成績は徐々に低下し、第 1 セッショングループと比較して、*Water On Time* については第 4 セッショングループ以降において ( $p < 0.05$ )、*Turn Stop* については第 5 セッショングループ (6 回転/分) で有意差が認められた。よってこの 6 回転/分という速度が D2R KO マウスの上限と判断した。WT マウスは最初は高成績を示していたが、セッショングループが進むに連れて徐々に低下していった。最終的に、第 7 セッショングループ (10 回転/分) において、*Water On Time* と *Turn Stop* の成績が急に低下し、そのため、ここが WT マウスの上限と判断した。これらの結果から、ステップホイール装置により、WT、D1R KO、D2R KO マウス間の運動成績、運動機能が明確に区分出来る事が示された。

## 2-6 静止したステップホイール装置内での飲水行動

ステップホイール課題時の飲水へのモチベーションに違いがあるかどうかを調べるため、静止したホイール内で自由行動下での飲水量 (**Figure 11A**) と飲水時間 (**Figure 11B**) を 30 秒毎に 5 分間記録した。計測はプレセッションの 3 日間と課題期間の後 3 日間に行い、課題の 1 試行と同じ 3 分と 5 分の 2 つの時点での累積値を、異なる遺伝型マウス間で統計解析した。D1R KO マウスは WT マウスに比べて、飲水量は全ての時点で有意に少なく ( $p < 0.01$ )、飲水時間もプレセッション 3 日目の 3 分の時点を除いた全ての時点で有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。D2R KO マウスは WT マウスに比べて、飲水量についてはプレセッションの 1 日目の 5 分 ( $p < 0.01$ )、課題後の 1 日目の 3 分 ( $p < 0.01$ ) と 5 分 ( $p < 0.05$ ) で有意に多く、飲水時間についてはプレセッションの 1 日目の 3 分と 5 分、課題後の 3 日目の 5 分 ( $p < 0.01$ ) で有意に多かった。

## 第 2 章、結果のまとめ

第 2 章では自発活動量、ローターロッド課題、ステップホイール課題の 3 つのテストにおける D1R KO、D2R KO マウスの表現型を調べ、これらの行動課題に与える D1R、D2R の機能を検討した。自発活動量では WT マウスに比べ D1R KO マウスは高活動、D2R KO マウスは低活動を示した。高速回転の条件下でのローターロッド課題では D1R KO、D2R KO マウスともほとんど走れないのに対して、低速回転条件下での D2R KO マウスは、その順番によって結果に違

いが現れた。ステップホイール課題では異なる遺伝型マウスの成績曲線がきれいに分離され、成績は WT、D2R KO、D1R KO マウスの順に良かった。ステップホイール課題での D1R KO マウスは、後期段階になっても顕著に劣っていた。

## 考察

D1R KO、D2R KO マウスの活動量に関する先行研究はいくつかあるが、D1R KO マウスについては一致した結果が得られていない(Xu et al., 1994a, 1994b; Drago et al., 1994; Smith et al., 1998; Centonze et al., 2003; Tran et al., 2005, 2008)。この原因は KO マウスの遺伝的背景の違い、そして実験方法の違いによる可能性が考えられる(Kelly et al., 1998; Fowler et al., 2002; McNamara et al., 2003; Holmes et al., 2004; Waddington et al., 2005)。よって本研究第 2 章では、遺伝的背景が均一なコンジェニック KO マウス (C57BL/6 で 10 世代以上の戻し交配を行ったマウス) を用い、より通常に近い状態の自発活動を調べるため、連続 5 日間のホームケージ内の活動量を比較した。この方法は外部要因によるマウスへの影響をより少なくするためのものである。さらに、ローターロッドとステップホイールを用いてコンジェニックな D1R KO、D2R KO マウスの運動機能を比較し、WT マウスを含めた 3 種の遺伝型マウスの表現形に明らかな違いがある事を本研究において確定した。

### 2-1 自発活動

本研究では WT、D1R KO、D2R KO マウスの自発活動を 24 時間記録できるシステムで計測した (**Figure 4、5**)。結果から、ホームケージ環境下における 24 時間の自発活動量は、WT マウスと比較して D1R KO マウスでは多く、D2R KO マウスでは少ない事が明らかになった。これらの結果は、実験方法や計測時間の違いがあるものの、コンジェニックマウスを用いた他の先行研究の報告と概ね一致している(Kelly et al., 1998; McNamara et al., 2003; Wall et al., 2011)。さらに詳細を調べるため、活動のパターンを解析した。D1R KO マウスは暗期でのみ高い活動量を示した (**Figure 4B、5**)。詳細な解析により、D1R KO マウスは活発に動き回り、活動状態、無活動状態の一区切りの時間はともに長かったが、無活動状態 (休止状態) の合計時間は WT マウスとほぼ同じであった (**Figure 6**)。録画したビデオ映像を確認すると、D1R KO マウスは活動状態の間、ケージの蓋への昇り降りを繰り返すというような常同行動を見せていた。D1R KO マウスで見られたこの異常な行動と摂食量、飲水量の低下は、これらのマウスが示した活動性の高さは摂食飲水行動の増加によるものではないことを示唆している。先行研究によると、D1R KO マウスは精緻な運動制御に欠損があるために摂食や飲水が効果的に出来ない事が報告されており(Xu et al., 1994a, 1994b; Drago et al., 1994; Holmes et al., 2004)、これは本研究の結果と一致する。他にも、報酬系機能の欠損も D1R KO マウスの活動パターンに

影響を及ぼしていることが考えられる。その一方で、D2R KO マウスは明期暗期ともに活量は低く、経時変化をみても、全体的に活動量が低い事が明らかになった (**Figure 5**)。これらのマウスは WT マウスよりも活動量が低いにも関わらず、摂食量、飲水量に有意な差は認められなかった。D2R KO マウスの活動性の低さは報酬系機能の欠損というよりも、一般的な運動機能の不全による可能性が考えられる。より理解を深めるため、次にローターロード装置とステップホイール装置を用いて D1R KO、D2R KO マウスの運動機能を調べる実験を行った。

## 2-2 ローターロード課題とステップホイール課題における運動成績

D1R KO、D2R KO マウスともに静止したロッド上に乗ることは出来 (データ非掲載)、ゆっくり回転するロッドでもある程度は乗っている事が出来た (**Figure 7、10**)。これらの結果から、D1R KO、D2R KO マウスとも運動失調やカタレプシーといった深刻な運動機能障害はないことが示唆される (Kelly et al., 1998; Clifford et al., 2001; Tran et al., 2005, 2008)。それでも、D1R KO マウス (Xu et al., 1994a, 1994b; Drago et al., 1994; Holmes et al., 2004) および D2R KO マウス (Baik et al., 1995; Kelly et al., 1998; Fowler et al., 2002) の先行研究で、それぞれ WT マウスと比べて運動機能が乏しい事が報告されている。これは、本研究の高速条件下のローターロード課題において、D1R KO、D2R KO マウスともに WT マウスと比べはるかに成績が低いという結果と一致する (**Figure 7**)。低速条件下での D1R KO マウスと D2R KO マウスの成績を比較すると、低速条件下でのセッショングループを行ったのが 1 回目か 2 回目によって結果が異なった。第 1 セッショングループ、SF 群の D2R KO マウスは成績が良い (**Figure 7B**) のに対して、第 2 セッショングループ、FS 群の D2R KO マウスは他の 2 つの遺伝型マウスに比べて成績が幾分悪い (**Figure 7A**)。D2R KO マウスの個体ごとのデータを見ると (**Figure 8C、F**)、セッション全体を通じて個々の成績のバラつきが見られる。つまり、ある個体は長い時間ロッド上に乗っていられるが、他のある個体は不可能であり、そしてほとんどの個体で成績の改善が見られなかった。これらのことから、低速条件下での D2R KO マウスの成績には、運動機能以外の他の要因も関与しているのだろう。この要因として、課題の特性 (後述) や、あるいはこの前に高速条件下で上手く出来なかった経験が、後の低速条件下でも影響を及ぼした事が推測される。もしそうであるならば、D2R KO マウスの運動機能をローターロードで評価する事は困難である。実際、D1R KO マウスと D2R KO マウスのどちらがより運動機

能の成績が良いかは不明確である。また、D1R KO マウスは成績の改善が見られるのに対して、D2R KO マウスは改善する事ができるかどうか、つまり運動学習能があるかどうかについても不明である。先行研究では、D2R KO マウスはローターロード課題において、最初の成績は悪いが、後に向上することが報告されている(Kelly et al., 1998; Fowler et al., 2002)。よって、本研究では次にステップホイール装置を用いて、D1R KO、D2R KO マウスの運動機能、運動学習能を調べた。

ステップホイール課題の結果から、3つの遺伝型マウスの運動機能はWT、D2R KO、D1R KO マウスの順に高いことが明らかになり (Figure 9、10)、これはこの装置の有用性を示している。ステップホイール課題の結果 (Figure 9) から、3つの遺伝型マウス全てで運動成績の改善が認められたが、その経時的変化の様子が異なることが示された。D1R KO マウスは成績の改善は見られたが、頭打ちになる上限成績のレベルが他のマウスに比べて低かった。実験中の様子を観察すると D1R KO マウスは後期段階においてもペグの掴み損ねや多くの踏み外しが見られ、脚を直接床板に接地しており、回転速度についていつて給水口近くの位置に留まる事が出来ていなかった。この事から、D1R KO マウスはこのステップホイール課題を上手に行うために要求される精緻な運動機能が乏しいと推測される。さらに、D1R KO マウスは以下の事から、飲水に対する意欲、動機付けが低い様である。ホイールが停止している時 (試行の開始前や試行中に回転停止した時)、WT、D2R KO マウスはすぐに給水口に近づくのに対して D1R KO マウスはなかなか近づこうとしなかった。さらに、D1R KO マウスは静止したホイール内での飲水した量、時間とも他に2つの遺伝型マウスに比べ少なかった (Figure 11)。Tran ら(2005)によると、D1R KO マウスは報酬系機能に欠損があることが報告されている。しかし、ステップホイールテストが進行するにつれて、D1R KO マウスの *Touch Time*、*Water On Time* の成績において僅かな向上が見られることから、D1R KO マウスは他の遺伝型マウスと比較して、飲水に対する意欲、動機付けが弱いのと同時に運動機能も乏しい事を示唆していると解釈出来る。

WT マウスはほぼ2日目には成績が頭打ちのレベルに達した事から、この条件 (ペグ配列や回転速度)はWTマウスにとって非常に簡単であることがわかる。実際、予備実験では WT マウスを最初のセッションからより早い条件下 (3-4回転/分) で課題を行っても走行可能であった (Figure 12) が、D1R KO、D2R KO マウスには不可能であった。これらの結果からも、D1R KO、D2R KO マウスは WT マウスと比較して運動機能が乏しい事が示されている。

### 2-3 ローターロッドとステップホイール課題における行動特性

ローターロッド装置は、げっ歯類の運動機能や運動技能学習を評価するのに広く一般的に使用され、被験動物にロコモーション時の平衡機能を必要とする。ステップホイール装置は、マウスの四肢の運動協調、異なる走行速度やステップパターンへのロコモーション適応を評価するように設計されている(Kitsukawa et al., 2011)。これら2つの行動課題は以下の点でその性質が異なっている。(1)必要とされる運動機能の違い。ローターロッド課題では円筒形のロッドの平らな表面上でバランスをとる必要があるのに対して、ステップホイール課題では四肢の動きを、時間的空間的にタイミングを合わせてペグを掴む必要がある。このことから、ステップホイール課題はローターロッド課題に比べ、より精緻な運動制御が必要と考えられる。(2)課題に対する意欲、動機づけの違い。ローターロッド課題では自然と落下を回避するためにバランスをとり、それゆえ、嫌悪回避課題である。一方、ステップホイール課題では報酬の水を飲むために回転速度に合わせて走行する報酬系課題である。Hikida ら(2010)は、D1R が発現している線条体直接路は報酬系学習に重要であり、D2R が発現している線条体間接路は嫌悪回避学習に重要である事を報告している。この事は、本研究で得られた結果、つまり D1R KO マウスとステップホイール（報酬系）課題、および D2R KO マウスとローターロッド（嫌悪回避）課題それぞれの組み合わせで見られた不適合性と関係していると思われる。

ホームケージ内での 24 時間の飲水量について、D2R KO マウスは WT マウスよりも少なかった (Figure 6C)。Elmer ら(2002)によると、WT マウスに比べ D2R KO マウスはレバー押し反応において飲水量が少ないと報告しているが、Risinger ら(2000)によると有意差はないとしている。このことから、D2R KO マウスの飲水量は実験条件によって変わると考えられる。実際、ステップホイール課題のプレセッションにおいて、WT マウスと D2R KO マウスには有意差は見られず、1 日目の 5 分後の時点では D2R KO マウスの方が多いくらいであった (Figure 11)。それゆえ、D2R KO マウスはステップホイール課題の低速条件下では、少なくとも飲水に対する意欲、動機付けは十分あったと思われる。Soto ら(2011)によると、レバー押し課題や鼻突付き課題 (nose poke task) において、WT マウスに比べて D2R KO マウスでは強化作用 (reinforcing effectiveness) が低下している事が報告されている。Risinger ら(2000)や Elmer ら(2002)も、WT マウスに比べて D2R KO マウスでは、モルヒネやエタノールの投与量を増加しても、レバー押し反応が少ないと報告している。以上のことから、D2R KO マウスは低速回転時のステップホイール課題では、課題遂行に

十分な意欲、動機付けを持ち、WT マウスと比較して中程度の成績であったと解釈される (**Figure 9**)。一方、高速回転の条件下 (**Figure 10**、7.5 回転/分以上) では、D2R KO マウスはステップホイール課題を走ることが全く出来なかった。このことは、D2R 受容体の欠損による強化作用の減少に起因すると推測される(Soto et al., 2011)。

本実験の結果では、ローターロード課題における D1R KO マウスと D2R KO マウスの間の最終的な運動機能の違いは不明確である。本実験では加速式のローターロード装置は使用していないが、いくつか先行研究がある(Wall et al., 2011; Durieux et al., 2012)。Wall ら(2011)によると、D1R KO マウスはほとんど成績の向上は見られないが、その速度の上限値は約 12-15rpm であり、これは本研究の高速回転の条件下に近い (**Figure 7**)。以上の Wall らの報告と本実験の結果から、D1R KO マウスのローターロードにおける成績向上は、低速条件下では見られるが、高速条件下あるいは加速式の条件下では見られない事を示している。

#### 2-4 3つの行動課題における D1R KO、D2R KO マウスの表現型の違いとその意味

本実験では、遺伝的背景が均一な (コンジュニクな) D1R KO、D2R KO マウスについて、24 時間の自発活動量計測、ローターロード装置、ステップホイール装置を用いて、それぞれの行動課題の様子を調べた。これら 3つの行動実験によってこれら 3つの遺伝型マウスの表現型の違いが明らかになった。

Durieux ら(2012)は、背内側線条体 (DMS) あるいは背外側線条体 (DLS) の領域別に、D1R を発現している線条体-黒質ニューロン (D1R MSNs) と D2R を発現している線条体-淡蒼球ニューロン (D2R MSNs) をそれぞれ選択的に破壊し、直接路、間接路の機能を調べた。結果、背内側部と線条体全体の D1R MSNs を除去すると、オープンフィールド課題における活動量が減少した。この発見は D1R KO マウスで見られる結果と反対である。D1R KO マウスでみられた活動亢進は、発達期における D1R の欠損、あるいは成熟段階での線条体以外の領域における D1R の欠損によるものかも知れない。Xu ら(1994b)は、他の辺縁系や皮質領域によって抑制性効果が軽減されることから、D1R KO マウスにみられる活動亢進は D1R が介するドーパミンシグナル伝達の減少によるものと示唆している。本研究では D1R KO マウスにおいて、常同行動の繰り返しが観察された。D1R KO マウスにおける神経経路がどのように変化したことでこの行動が引き起こされたのかは今後の課題である。対照的に、背内側部や線条体全体の D2R MSNs の除去によりロコモーションが増加した(Durieux et al., 2012)。

Sano ら(2003)の報告によると、線条体 D2R MSNs の条件的除去 (conditional ablation) を行うと、オープンフィールド課題における活動亢進につながった。本実験では D2R KO マウスで活動低下がみられた。これら全ての結果は、想定されている D2R MSNs や直接路、間接路の機能とよく一致している。Murer ら(2000)は、視床下核における神経活動の亢進によって D2R KO マウスの活動量低下が引き起こされている事を示唆している。

Durieux ら(2012)は、加速式ローターロッド課題において、局所的神経除去が運動制御や運動学習に及ぼす効果についても報告している。線条体全体あるいは背外側部の D1R MSNs を除去する事によって、後期局面においても運動成績が低いままという結果が出ている。一方、線条体全体あるいは背内側部の D2R MSNs の除去は、早期局面での成績だけを阻害する。これらの発見は本研究の結果とよく適合し、次のように解釈、推察できる。D1R KO マウスでみられる運動機能の障害は、主に線条体背外側部における D1R MSNs の機能不全によるものであり、一方、D2R KO マウスでみられたステップホイール課題の成績向上の遅延は、線条体背内側部における D2R MSNs の機能不全によるものと考えられる。しかしながら、以下のような違いも認められる。先行研究では、線条体全体あるいは背内側部の D2R MSNs を除去しても、後期局面における運動成績には影響がない(Durieux et al., 2012)のに対して、ステップホイール課題での D2R KO マウスでは成績が低いままであった (**Figure 9**)。他の先行研究では、精密な前肢の伸展課題 (precision forelimb reaching task) における運動学習について、運動野のドーパミンが機能の一部を担っている事が示唆されている (Molina-Luna et al., 2008; Hosp et al., 2011)。運動学習の後期局面における D2R KO マウスと D2R MSNs の除去による表現形の違いは、今後詳細を明らかにすべき興味深い点の一つである。

## 第3章

小脳における最初期遺伝子（IEG）を用いた神経活動マッピングと IEG 遺伝子マッピングの可能性

## 背景

小脳は運動制御、運動学習に関与している事が報告されており(Yanagihara and Kondo, 1996; Katoh et al., 2000)、小脳の領域毎の機能については古典的な解剖学的、生理学的手法により調べられてきた。しかし、最初期遺伝子 (IEG) の発現パターンおよび活性領域の特定に関しては、詳細な報告はほとんどない。神経活性によって発現が惹起される IEG(Hoffman et al., 1993; Curran and Morgan, 1995; Herrera and Robertson, 1996)の発現を指標とした遺伝子マッピングは、脳内の神経活性を細胞レベルの解像度で明らかにする事が可能である。私の研究室の先行研究では、小脳切片における IEG 遺伝子群の発現について、AMPA、8-Br-cGMP の添加処置の有無による効果を報告している(Nakazawa et al., 1993)。この薬理処置は小脳プルキンエ細胞における LTD 誘導を擬似する刺激として用いられた。結果、無処置切片では IEG はほとんど発現しなかったのに対して、AMPA と 8-Br-cGMP を添加した切片では *c-fos*、*jun-B*、*zif-268 (NGFI-A)* が高い発現を示した。さらに麻酔下ラットにおいて、下オリーブ核-登上線維への電気刺激と AMPA 投与による擬似 LTD 誘導刺激を与えると、プルキンエ細胞に *jun-B* が発現する事を報告している(Yamamori et al., 1995)。LTD は学習のメカニズムの一端と考えられている事から、学習時に LTD が起こり、また、LTD が起こる事で IEG が発現する事が予想される。しかし、*in vivo* における小脳皮質の IEG 発現についての報告は少なく、また IEG の種類も *c-fos* などごく一部であり、詳細な報告は現在までにほとんどない。本研究第 3 章では *in vivo* の小脳における IEG 遺伝子発現マッピングにより、行動課題遂行時の小脳のどの領域が活性化しているかを調べた。さらにこの手法を用いて運動課題時の D1R KO、D2R KO マウスの小脳の神経活性を調べることで、本研究第 2 章で明らかにしたドーパミン受容体 KO マウスの運動課題に対する表現型と小脳における神経活性領域の関係を調べるとともに、線条体ドーパミン系と小脳の相互作用について知見を得る事を試みた。

## 結果

### 3-1 小脳における IEG 遺伝子の発現

最初に自由行動下のマウスにおける小脳 IEG 発現の基礎的知見を得るため、Naïve マウスとローターロッド課題を遂行した WT マウスについて、小脳における IEG 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH 法) により調べた。IEG 遺伝子群は、*fos* ファミリー (*c-fos*, *fos-B*)、*jun* ファミリー (*jun-B*, *c-jun*, *jun-D*)、その他に *zif-268* (*NGFI-A*)、*krox 20* (*egr 2*, *NGFI-B*)、*arc* の計 8 遺伝子を調べた。小脳全体での発現パターンを調べるため、矢状断切片を内側から外側にかけて一定間隔で作成し、染色を行った。以降、構造的に大きな違いが見られる小脳虫部 (vermis) と小脳半球 (hemisphere) の典型的な染色切片画像を示す。課題を全く課していない naïve マウスの小脳では、全ての IEG 遺伝子の発現はほとんどみられなかった (**Figure 13、14**) のに対して、ローターロッド課題を課したマウスの小脳では、*c-fos*、*jun-B*、*fos-B*、*zif-268*、*krox 20* について発現が確認できた (**Figure 15、16**)。ローターロッド課題を 1、2、7 日間行ったマウスで比較したが、日数の違いによる差は認められなかった (データ非掲載)。発現が認められた遺伝子の内、後者 3 つに関しては、3 層ある小脳皮質内の一部で弱く発現しており、*fos-B* はプルキンエ細胞において、*zif-268*、*krox 20* は分子細胞層 (ML) においてシグナルが確認出来た。これに対して前者 2 つの遺伝子発現は比較的強く、プルキンエ細胞、ML、顆粒細胞層 (GL) の 3 層全てでシグナルが確認出来た (**Figure 15、17、18**)。この 2 遺伝子について、小脳領域ごとに発現パターンをみると、*c-fos* は vermis における第 7 葉を除くほぼ全ての葉、hemisphere における第 I 脚 (Crus1)、錐体結合節 (Cop)、そして片葉 (flocculus) で強い発現が認められた (**Figure 17**)。 *jun-B* もほぼ同じ領域で比較的強く発現していた (**Figure 18**) が、*c-fos* に比べ陽性細胞数は圧倒的に少なく、また切片によるバラつきも大きかった。*c-fos*、*jun-B* とも、特に flocculus における発現が他の領域に比べて顕著に強かった。よってこれ以降では flocculus における *c-fos*、*jun-B* の発現に着目した。小脳皮質の 3 層構造における発現パターンについて、flocculus における *c-fos*、*jun-B* の発現を比べると、*c-fos* は 3 層全てにおいて多くの細胞で強いシグナルが確認出来たのに対して、*jun-B* はプルキンエ細胞では数は少ないが強いシグナルが、次いで ML も数少ないがやや強いシグナルが、GL では少なく弱いシグナルが観察された (**Figure 15**)。

### 3-2 ローターロッド課題時の D1R KO、D2R KO マウスにおける小脳 *c-fos*、*jun-B* 発現

D1R KO、D2R KO マウスの小脳における *c-fos*、*jun-B* の発現は、前述した WT マウスの発現パターンと同様に領域ごとの違いが見られたが、異なる遺伝型マウス間での顕著な違いは認められなかった (**Figure 19-24**)。本章の実験で用いた D1R KO、D2R KO マウスおよび WT マウスは、第 2 章の実験のマウスと同一個体であり、数週間に及ぶ運動課題 (ローターロッドおよびステップホイール課題) を経験したマウスである (**Figure 25 A**)。そのため、対照群として pre 群を設定し (方法の項参照)、1 日あるいは 5 日という短期的なローターロッド課題の有無による影響を調べようと試みた。想定では、pre 群はサンプリング当日には課題を行わないので、Naïve マウスと類似してほぼ発現は認められないと予想していたが、それに反して直前 (30 分前) にローターロッド課題を行った day1、day5 群と同程度の発現を示した (**Figure 19-24**)。一方、day1 と day5 との比較については、どの遺伝型マウスにおいても顕著な差は認められなかった。いずれの群も WT の Naïve マウスに比べれば *c-fos*、*jun-B* とも発現量は高かった。

### 3-3 静止ロッドから 24 時間後における発現、ハンドリングによる影響

pre 群の flocculus において *c-fos*、*jun-B* の発現が認められたことから、静止ロッドに乗せて 24 時間後における発現の再現性を確認した。トレーニングを行っていないマウスを用いて、静止ロッドに乗せてから 24 時間後、そしてそれと同様に静止ロッドに乗せてから 30 分後と、課題を行っていない Naïve マウスとを比較した。結果、flocculus の *c-fos*、*jun-B* の発現がほとんど認められない Naïve に対して、24 時間後では発現していることが確認出来たが、30 分後と比べると弱かった (**Figure 26**)。ここまでの、Naïve 以外のマウスは全てサンプリングの直前 (30 分前) に体重測定を行っていたことから、この処置が IEG 発現に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、ローターロッド課題を行わないハンドリング処置のみのマウス群を設定し (方法の項参照)、その影響を調べた。結果、ハンドリングのみでも flocculus における *c-fos*、*jun-B* の発現が確認された (**Figure 27**)。

## 第 3 章、結果のまとめ

本章では、小脳における IEG 遺伝子の発現パターンを明らかにするとともに、

第2章で見られた、ローターロッド課題において異なる表現型を示した D1R KO、D2R KO マウスについて、小脳での神経活性領域にも違いがあるかを IEG 遺伝子マッピングにより調べた。8つの IEG 遺伝子の発現を ISH 法により染色した結果、Naïve マウスでは全ての遺伝子についてほとんど発現していない一方、ローターロッド課題を遂行したマウスでは *c-fos*、*jun-B*、*fos-B*、*zif-268*、*krox 20* の発現が観察された。その内、*c-fos*、*jun-B* については比較的強い発現が確認でき、領域によるシグナルの有無、強弱の違いがあることが明らかになった。特に発現が強く確認された flocculus において、小脳皮質3層構造における発現パターンを比べると、3層全てで数多く強い発現がみられた *c-fos* に対し、*jun-B* はプルキンエ細胞に比較的強い発現がみられた。さらに D1R KO、D2R KO マウスを用いて flocculus での *c-fos*、*jun-B* の発現を比較したが、これら異なる遺伝型マウス間では顕著な違いは認められなかった。その過程で、サンプリング当日は課題を行っていない pre 群で、静止したロッドに載せてから24時間後での flocculus における *c-fos*、*jun-B* の発現が観察された。この結果は予想外であり、再現性を確認するためにトレーニングなしのマウスで追試を行ったが、静止ロッドに乗せてから24時間後では、30分後と比較して弱いが確かに発現していることが確認できた。また、ハンドリングのみの処置によっても発現が認められた。

## 考察

### 3-1 小脳における IEG 遺伝子の発現

Naïve マウスの小脳においては 8 つの IEG 遺伝子いずれもほとんど発現していなかった (**Figure 13、14**)。小脳切片のプルキンエ細胞での各種 IEG 遺伝子発現を調べた先行研究(Nakazawa et al., 1993)では、無処置時には *zif-268* を除いて発現していないと報告しており、概ね一致する。一方、ローターロッド課題を遂行したマウスでは、*c-fos*、*jun-B*、*fos-B*、*zif-268*、*krox 20* について発現が確認できた (**Figure 15、16**)。先の先行研究では、薬物刺激を与えると *c-fos*、*jun-B*、*zif-268*、*krox 20* に加えて *c-jun* の発現が認められる一方、*fos-B* は発現しないと報告している。この結果の違いは、切片での無処置時には刺激が全くないのに対して、*in vivo* では常に何らかの入力があることが要因と推測される。また、薬物投与と電気刺激によって小脳 c-Fos タンパクの発現が異なる事が報告されている(Tian and Bishop, 2002)ことから、ローターロッド課題遂行と薬物添加という刺激の違いによる可能性も考えられる。*arc* は視覚刺激を含めた様々な神経活性により誘導され(Zangenehpour and Chaudhuri, 2002; Nakagami et al., 2013)、*zif-268* もまた様々な神経活性で誘導されるが、どちらも小脳ではほとんど発現しなかった (**Figure 16**)。この理由として、小脳プルキンエ細胞では機能的 NMDA 受容体が発現していない(Perkel et al., 1990; Llano et al., 1991)ことが考えられ、*arc* の転写調節は NMDA 依存型あるいは電位依存型カルシウムチャネルが介する膜の脱分極、cAMP 依存型経路や BDNF を介した経路によってされている(Zheng et al., 2009)。しかし、なぜ小脳で *arc* が発現しないのかは今後の課題である。*c-fos*、*jun-B* の発現に関しては、先行研究の薬物添加による擬似 LTD 刺激で強い発現が惹起されたように、本実験でのローターロッド課題でも強い発現が確認出来た (**Figure 15、17、18**)。 *c-fos* は vermis における第 7 葉を除く全ての葉、hemisphere における Crus1、Cop、flocculus で発現が認められた。*jun-B* もほぼ同じ領域での発現が認められたが、*c-fos* に比べ陽性細胞数は圧倒的に少なかった。小脳皮質の領域別の特徴として、以下の事が報告されている。小脳 vermis は視覚依存行動(visually guided movements)の中心的役割を果たしていると考えられており、四肢や視覚からの入力を受けている(Edge et al., 2003)。Crus1 もまた視覚運動入力を受ける(Edge et al., 2003; Cerminara et al., 2005)。後肢への刺激は Cop の内側部 (medial aspect of copula pyramis) を活性化させる(Santori et al., 1986)。本研究第 3 章の *c-fos* マッピングの結果は、視覚運動系入力によって活性化する領域を報告したこれらの先行研究と一致する。新たな発見の一つは小脳 flocculus における顕著な神経活性であ

る。flocculus は前庭神経からの投射を受け、眼球運動やバランス調節に関与している事が知られている。ローターロッド課題時には身体のバランスを取る必要があり、それにより眼球運動や前庭系を活性化させることが、今回認められた flocculus の活性の要因と考えられる(Ito, 1982)。小脳 *c-Fos* タンパク発現が領域毎に違うとともに 15~180 分の時間経過によっても異なる事が報告されており(Tian and Bishop, 2002)、本研究では日数単位の経時的変化では調べたものの、分・時間単位では調べていないので、より短い時間軸での発現変化については今後の課題である。本結果から、小脳における神経活性を調べるために、*c-fos*、*jun-B* による遺伝子マッピングの有効性が示唆された。

### 3-2 小脳 flocculus の 3 層構造における *c-fos*、*jun-B* 遺伝子の発現パターン

小脳の領域毎に発現を見た時、*c-fos*、*jun-B* とも顕著に強いシグナルが確認出来たのが flocculus であった。そこで小脳皮質の 3 層構造での発現パターンについて、flocculus における *c-fos*、*jun-B* を比べると、*c-fos* は 3 層全てにおいて多くの細胞で強い発現が確認出来たのに対して、*jun-B* はプルキンエ細胞では数は少ないが強い発現が、次いで ML も数は少ないがやや強い発現がみられ、GL では少なく弱い発現であった。3 層構造でこのように発現パターンが異なるのは、*c-fos*、*jun-B* の発現が単に神経活性を反映しているだけではないのかも知れない。*jun-B* がプルキンエ細胞に比較的選択的に発現しているのは、LTD の発現を反映しているのかも知れない(Nakazawa et al., 1993; Yamamori et al., 1995)。

### 3-3 D1R KO、D2R KO マウスの小脳 flocculus における *c-fos*、*jun-B* 遺伝子発現

第 2 章の実験結果から、D1R KO、D2R KO マウスは運動課題の特性に対して異なる表現型が認められた。ローターロッド課題での D1R KO、D2R KO マウスの結果は、それぞれ先行研究で報告された背外側線条体の D1R MSNs、背内側線条体の D2R MSNs の局所破壊と類似した結果である(Durieux et al., 2012) ことから、D1R KO、D2R KO マウスの表現型は、線条体に起因するものと推測される。その一方で、結果が異なる部分もあり、別の可能性も考えられる(第 2 章の考察参照)。そこで、線条体と同様に運動制御や運動学習に関与している小脳における神経活性について調べるため、ローターロッド課題時の D1R KO、D2R KO マウスの小脳における IEG 遺伝子マッピング (*c-fos* と *jun-B*) を行った。結果、異なる遺伝型マウス間での違いは認められなかった。方法上の都合で比較対照群として、サンプリング当日は課題を行わない pre 群を設定した(詳細は方法の項参照)が、想定外に pre 群でもローターロッド走行群(day1、day5

群)と同程度の発現が確認出来た (**Figure 19-24**)。視覚野における光刺激への *c-fos* mRNA の発現応答は、刺激から 30 分後にピークに達し、その後 90~120 分後には元のレベルに戻ることが報告されている (Zangenehpour and Chaudhuri, 2002)。このように IEG は刺激によって即座に発現が誘導され、その後速やかに元のレベルに戻ることから、今回 24 時間後において発現が認められた事は予想外であった。

### 3-4 静止ロッドから 24 時間後における flocculus での神経活性

静止ロッドに乗せてから 24 時間後の flocculus において *c-fos*、*jun-B* の発現していることの再現性を確認するとともに、ローターロッド課題実施群と同じタイミングの 30 分での発現を比較した。結果、30 分後と比べて 24 時間後では発現は弱いですが、Naïve マウスと比べれば、確かに発現していることが確認出来た (**Figure 26**)。この静止ロッド 24 時間後のマウスと、前述の pre 群のマウス (**Figure 19-20**) を比較すると、後者の方が強く発現している。このことから、運動課題の経験の有無が、発現の強さに影響を与えた可能性が考えられるが、同条件下とはいえ同時に ISH 法での染色をおこなっていない点、そのため染色ムラや発色の程度の違いがでてしまう点は考慮すべきである。

Naïve マウス以外ではサンプリング前 (30 分前) に体重測定を行っていたことから、この処置によって IEG の発現が誘導された可能性が考えられた。そこで、ハンドリングの影響を調べた結果、ハンドリング処置を受けただけでも発現することが確認された (**Figure 27**)。この結果は予想外で、当初はハンドリングだけでは影響はないだろうと考えており、ハンドリング処置群は約 3 分間もの時間、実験者の手のひらに載せる、と設定した。一方、マウスの体重測定は、ケージから取り出して計量計に乗せ、再びケージに戻すという、せいぜい 1 分程度に過ぎない処置のため、これによって発現が誘導されるとは考えにくい。しかし、もしそうであるならば、それほど flocculus の神経活性、あるいは flocculus の *c-fos*、*jun-B* 発現は刺激に対する反応性が高い事が考えられる。さらに検証するためには、同程度の処置を naïve マウスに施し、直前の体重測定によって *c-fos*、*jun-B* が発現するのかを確かめる必要があると考えられる。このように、刺激から 24 時間後に flocculus で神経活性が起こっているかは更なる検証が必要と考えられるが、可能性として以下のことが要因として考えられる。小脳、基底核、大脳皮質の間の相互作用が想定されている (Doya, 2000; Hikosaka et al., 2002; Doyon et al., 2009; Bostan et al., 2013) ことから、基底核のような他の領域が小脳を活性化させた可能性がある。Doyon ら(2009)は、

運動順番学習 (motor sequence learning) と運動適応は内側頭頂葉 (海馬)、線条体、そして小脳皮質を通して情報処理され、そして小脳と線条体で強化 (consolidation) され、大脳皮質領域の相互作用により自動化 (automatization) 段階を経過すると提唱している。また、小脳の神経活性は、既に習得された内部モデルを反映するとも言われている (Imamizu et al., 2000)。本研究で認められた、静止ロッドに乗って 24 時間後の flocculus における *c-fos*、*jun-B* の発現は、この様な過程を反映している可能性が考えられる。本研究は個体数が十分でなく、この現象の再現性の確認が必要であるとともに、より正確な意義を解明するには、更なる研究が必要である。

## 図の説明文

### Figure 1 | ステップホイール装置とペグパターン

(A) ステップホイール装置を側面から見た模式図。ホイールはモーターによって時計回りに一定速度で回転する。マウスの行動を検出するために、2つの赤外線センサー(photobeam、緑色の破線)と電気的接触センサー(touch sensor)を用いた。フォトビーム a (PBa) はマウスの給水口 (water spout) への接近を検出し、フォトビーム b (PBb) はマウスがホイール後方に行った場合を検出するのに使用した。接触センサーはマウスが足場となるペグ (peg) を踏み外してその下の床板 (floorboard) に接触した場合を検出した。(B) ホイール内部、マウス上方部から見た図。給水口と2つの赤外線センサーは左右のペグの間を通している。(C) 本研究で用いた各ペグパターンの図。ペグパターン A (peg-pattern A) は脚運びが左右交互の歩行パターンになるように配置し、ペグパターン B2 (peg-pattern B2) はより簡単となるようにペグパターン A より2倍の数のペグを設置した(図内では水色のペグがペグパターン A より増加した分を示す)。ペグパターン B1 ではペグパターン B2 より倍の数のペグを設置した。(図内では赤のペグがペグパターン B1 より増加した分を示す)。前後のペグ間隔はそれぞれ 56、28、14 mm である。ペグパターン C1、C2 (Peg-pattern C1、C2) は前後のペグ間隔を 15~56 mm の間で不均等にし、左右の順番もバラバラになるような複雑なパターンとした。赤色のペグは左右1番目のペグを示している。

### Figure 2 | nNOS KO マウスによるステップホイール課題の結果

(A) *Touch Time* (接触時間、踏み外し時間。1試行に対する割合を%で表記)  
(B) *Water On Time* (疑似飲水時間。1試行に対する割合を%で表記)  
(C) *Turn Stop* (回転停止回数) を、それぞれ群の平均値±標準誤差で示した。WT (黒色バツ印、n=6) nNOS ヘテロ KO (青色四角印、n=9)、nNOS ホモ KO (赤色丸印、n=7)。異なる遺伝型マウス間での有為差を、それぞれ\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (WT・ホモ KO マウス間)、†  $p < 0.05$ 、††  $p < 0.01$  (WT・ヘテロ KO マウス間)、#  $p < 0.05$ 、##  $p < 0.01$  (ヘテロ・ホモ KO マウス間) で示した(クラスカル・ウォリスの検定)。同遺伝型マウス群内で1日目と比較して有為差が認められた日をグラフ下の水平線で示した ( $p < 0.05$ 、ダネットの検定。WTは黒色、ヘテロ KO は青色、ホモ KO マウスは赤色)。セッショングループ間は2日間、第4、5セッショングループの間には約3週間空いている。

### Figure 3 | 線条体への NOS 阻害剤投与時のステップホイール課題の結果

(A) *Touch Time* (接触時間、踏み外し時間。1 試行に対する割合を%で表記)  
(B) *Water On Time* (疑似飲水時間。1 試行に対する割合を%で表記) (C) *Turn Stop* (回転停止回数) を、それぞれ群の平均値±標準誤差で示した。Saline 群 (生食投与群、黒色バツ印、n = 10) Low 群 (低濃度 SMTC 投与群、橙色丸印、n = 13)、High 群 (高濃度 SMTC 投与群、緑色四角印、n = 13)。薬物投与は第 2 セッショングループの 6 日間のみで、他のセッショングループは投与なしである。同日の異なる遺伝型マウス間での有意差はいずれの日においても認められなかった。同遺伝型マウス群内で 1 日目と比較して有為差が認められた日をグラフ下の水平線で示した ( $p < 0.05$ 、ダネットの検定。Saline 群は黒色、Low 群は橙色、High 群は緑色)。

### Figure 4 | ホームケージ内におけるマウスの自発活動

WT (n = 8)、D1R KO (n = 4)、D2R KO (n = 8) マウスについて、12 時間の明暗周期下で連続 5 日間のホームケージ内の活動量を記録した。(A) 24 時間毎の活動量 (B) 明期・暗期 12 時間毎の活動量 (C) 暗期における活動状態を、動きの回数によって、無活動 (inactive、0-9 回/10 分間)、低活動 (low、10-199)、中活動 (medium、200-499)、高活動 (high、500 以上) 状態の 4 段階に分け、各状態の時間的割合 (%) を示した。(D-F) 暗期での活動状態を、活動状態 (10 回/10 分間以上) と無活動状態 (9 以下) に分類した。(D) 一区切りの活動の時間 (E) 無活動状態での時間 (F) 5 日間での活動状態の回数をそれぞれ算出した。値は平均値±標準誤差で示し、WT に対する有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で示した (一元配置分散分析、チューキーの検定)。

### Figure 5 | 活動量、摂食量、飲水量の経時的変化

(A) WT、(B) D1R KO、(C) D2R KO マウスそれぞれの活動量 (activity)、摂食量 (food intake)、飲水量 (water intake) の計測値を、時間軸に沿って 1 時間毎にプロットした。図下部の白黒の帯は 12 時間の明暗周期を示している。値は平均値±標準誤差で示した。

### Figure 6 | ホームケージにおける摂食量と飲水量

(A) 24 時間毎あるいは (B) 明期・暗期別の 12 時間毎の摂食量と、(C) 24 時間毎あるいは (D) 明期・暗期別の 12 時間毎の飲水量を示した。値は群の平均値±標準誤差で表し、WT に対する有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で示した

(一元配置分散分析、チューキーの検定)。

### Figure 7 | ローターロッド課題の結果

各遺伝型マウスは (A) 高速-低速 (F-S) 群 (高速は 15 rpm、低速は 5 rpm に設定) と (B) 低速-高速 (S-F) 群の 2 群に分けた。全てのマウスは 1 日 3 試行を行い、ローターロッドの成績となる保持時間 (retention time、秒) は 3 回の試行の平均値±標準誤差で示した。WT (黒色バツ印、F-S 群 n = 8、SF 群 n = 5) D1R KO (赤色菱形印、各群 n = 9)、D2R KO (緑色丸印、各群 n = 10)。1 試行の時間は 120 秒を上限とした。異なる遺伝型マウス間での有意差を、それぞれ\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (WT-D1R KO マウス間)、#  $p < 0.05$ 、##  $p < 0.01$  (WT-D2R KO マウス間)、††  $p < 0.01$  (D1R KO-D2R KO マウス間) で示した (クラスカル・ウォリスの検定)。同一遺伝型マウス群内で 1 日目と比較して有為差が認められた日をグラフ下の水平線で示した ( $p < 0.05$ 、ダネットの検定。WT は黒色、D1R KO は赤色、D2R KO は緑色)。

### Figure 8 | 個々のマウスのローターロッド課題の結果

(A、B、C) 高速-低速 (F-S) 群 (高速は 15 rpm、低速は 5 rpm に設定) と (D、E、F) 低速-高速 (S-F) 群の 2 群に分け、全てのマウスは 1 日 3 試行を行った。保持時間 (retention time、秒) は 3 回の試行の平均値で示した。(A、D) WT (黒色、F-S 群は n = 8、S-F 群は n = 5)、(B、E) D1R KO (赤色、各群 n = 9) (C、F) D2R KO マウス (緑色、各群 n = 10)。

### Figure 9 | ステップホイール課題の結果

(A) *Touch Time* (接触時間、踏み外し時間、1 試行に対する割合を%で表記) (B) *Water On Time* (疑似飲水時間、1 試行に対する割合を%で表記) (C) *Turn Stop* (回転停止回数) を、それぞれ群の平均値±標準誤差で示した。異なる遺伝型マウス間での有為差を、それぞれ\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (WT-D1R KO マウス間)、#  $p < 0.05$ 、##  $p < 0.01$  (WT-D2R KO マウス間)、†  $p < 0.05$ 、††  $p < 0.01$  (D1R KO-D2R KO マウス間) で示した (クラスカル・ウォリスの検定)。同一遺伝型マウス群内で 1 日目と比較して有為差が認められた日をグラフ下の水平線で示した ( $p < 0.05$ 、ダネットの検定。WT は黒色、D1R KO は赤色、D2R KO は緑色)。

### Figure 10 | 様々な速度でのステップホイール課題の結果

セッショングループ毎に回転速度を上げた時の (A) *Touch Time* (接触時間、

1 試行に対する割合を%で表記) (B) *Water On Time* (疑似飲水時間、1 試行に対する割合を%で表記) (C) *Turn Stop* (回転停止回数) を、1 セッショングループにつき 5 日間 5 試行の群の平均値±標準誤差で示した。回転速度は第 1～第 7 セッショングループにおいて、それぞれ 2、3、4、5、6、7.5、10 回転/分 (turn/min) に設定した。WT (黒色バツ印、n = 13) D1R KO (赤色菱形印、n = 10)、D2R KO (緑色丸印、n = 10)。異なる遺伝型マウス間の有為差を、それぞれ\*\*  $p < 0.01$  (WT-D1R KO マウス間)、#  $p < 0.05$ 、##  $p < 0.01$  (WT-D2R KO マウス間)、†  $p < 0.05$ 、††  $p < 0.01$  (D1R KO-D2R KO マウス間) で示した (クラスカル・ウォリスの検定)。第 1 セッショングループと比較して有為が認められたセッショングループを、グラフ下の水平線で示した ( $p < 0.05$ 、ダネットの検定。WT は黒色、D1R KO は赤色、D2R KO は緑色)。

#### Figure 11 | 静止ホイール内における飲水行動

(A) 累積飲水量 (mL) と (B) 累積飲水時間 (秒) を 30 秒毎に 5 分間記録し、データは平均値±標準誤差で示した。WT (黒色、n = 10)、D1R KO (赤色、n = 10) D2R KO マウス (緑色、群 n = 10)。最初の 3 日間はプレセッション時に、後ろの 3 日間はステップホイール課題の期間の後に測定した。各日 3 分 (ステップホイール課題の一試行と同じ時間) と 5 分の時点での値を、異なる遺伝型マウス間で統計解析し、有意差をそれぞれ以下の記号で示した。\*\*  $p < 0.01$  (WT-D1R KO マウス間)、#  $p < 0.05$ 、##  $p < 0.01$  (WT-D2R KO マウス間)、†  $p < 0.05$ 、††  $p < 0.01$  (D1R KO-D2R KO マウス間) (クラスカル・ウォリスの検定)。

#### Figure 12 | 異なる速度でのステップホイール課題における WT マウスの結果

2 つの異なる速度、3 回転/分 (黒色丸印、n = 3) と 4 回転/分 (水色菱形印、n = 5) で、WT マウスがペグパターン A のステップホイール課題を連続 10 日間実施した結果。(A) *Touch Time* (接触時間、1 試行に対する割合を%で表記) (B) *Water On Time* (疑似飲水時間、1 試行に対する割合を%で表記) (C) *Turn Stop* (回転停止回数) を平均値±標準誤差で示した。同群内で 1 日目と比較して有為差が認められた日をグラフ下の水平線で示した ( $p < 0.05$ 、ダネットの検定。3 回転/分は黒色、4 回転/分は水色)。

#### Figure 13、14 | Naïve マウスの小脳における IEG 遺伝子の発現

小脳矢状断切片の ISH 法による染色写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は

hemisphere (小脳半球) における切片、右列は中央の写真内の flocculos (片葉) の部分の拡大図を示す。

**Figure 15、16 | ローターロッド課題を行った WT マウスの小脳における IEG 遺伝子の発現**

小脳矢状断切片の ISH 法による染色写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は hemisphere (小脳半球) における染色切片の画像を示し、右列は中央の写真内の flocculos (片葉) の部分の拡大図を示す。マウスはローターロッド課題を 1 日 (一試行最大 60 秒を 5 回) 実施し、その 30 分後に脳を摘出した。

**Figure 17 | ローターロッド課題後の WT マウス小脳における *c-fos* 遺伝子の発現、拡大図**

小脳矢状断切片の ISH 法による *c-fos* 遺伝子の染色写真の拡大図。矢印は陽性のプルキンエ細胞の一部を示す。

**Figure 18 | ローターロッド課題後の WT マウス小脳における *jun-B* 遺伝子の発現、拡大図**

小脳矢状断切片の ISH 法による *jun-B* 遺伝子の染色写真の拡大図。矢印は陽性のプルキンエ細胞の一部を示す。

**Figure 19 | ローターロッド課題後の WT マウスの小脳における *c-fos* 遺伝子発現**

WT マウスの *c-fos* 遺伝子発現を ISH 法により染色した小脳矢状断切片の写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は hemisphere (小脳半球) における切片の画像を示し、右列は中央の写真内の flocculos (片葉) の部分の拡大図を示す。pre 群はプレセッション (3 日間) において静止ロッドに載せ、サンプリング当日は課題を行っていない。Day1、Day5 群はプレセッション後それぞれの日数ローターロッド課題を行い、1 日目、5 日目の課題 30 分後に脳を摘出した。Naïve 群は自由行動下での飼育を行い、プレセッションも含めて、何の課題も行っていない。

**Figure 20 | ローターロッド課題後の D1R KO マウスの小脳における *c-fos* 遺伝子発現**

D1R KO マウスの *c-fos* 遺伝子発現を ISH 法により染色した小脳矢状断切片の写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は hemisphere (小脳半球) における切

片の画像を示し、右列は中央の写真、flocculos（片葉）の部分の拡大図を示す。pre 群はプレセッション（3日間）において静止ロッドに載せ、サンプリング当日は課題を行っていない。Day1、Day5 群はプレセッション後それぞれの日数ローターロッド課題を行い、1日目、5日目の課題30分後に脳を摘出した。

**Figure 21 | ローターロッド課題後の D2R KO マウスの小脳における *c-fos* 遺伝子発現**

D2R KO マウスの *c-fos* 遺伝子発現を ISH 法により染色した小脳矢状断切片の写真。左列は vermis（小脳虫部）、中央は hemisphere（小脳半球）における切片の画像を示し、右列は中央の写真、flocculos（片葉）の部分の拡大図を示す。pre 群はプレセッション（3日間）において静止ロッドに載せ、サンプリング当日は課題を行っていない。Day1、Day5 群はプレセッション後それぞれの日数ローターロッド課題を行い、1日目、5日目の課題30分後に脳を摘出した。

**Figure 22 | ローターロッド課題後の WT マウスの小脳における *jun-B* 遺伝子発現**

WT マウスの *c-fos* 遺伝子発現を ISH 法により染色した小脳矢状断切片の写真。左列は vermis（小脳虫部）、中央は hemisphere（小脳半球）における切片の画像を示し、右列は中央の写真、flocculos（片葉）の部分の拡大図を示す。pre 群はプレセッション（3日間）において静止ロッドに載せ、サンプリング当日は課題を行っていない。Day1、Day5 群はプレセッション後それぞれの日数ローターロッド課題を行い、1日目、5日目の課題30分後に脳を摘出した。Naïve 群は自由行動下での飼育を行い、プレセッションも含めて、何の課題も行っていない。

**Figure 23 | ローターロッド課題後の D1R KO マウスの小脳における *jun-B* 遺伝子発現**

D1R KO マウスの *c-fos* 遺伝子発現を ISH 法により染色した小脳矢状断切片の写真。左列は vermis（小脳虫部）、中央は hemisphere（小脳半球）における切片の画像を示し、右列は中央の写真、flocculos（片葉）の部分の拡大図を示す。pre 群はプレセッション（3日間）において静止ロッドに載せ、サンプリング当日は課題を行っていない。Day1、Day5 群はプレセッション後それぞれの日数ローターロッド課題を行い、1日目、5日目の課題30分後に脳を摘出した。

**Figure 24 | ローターロッド課題後の D2R KO マウスの小脳における**

### ***jun-B* 遺伝子発現**

D2R KO マウスの *c-fos* 遺伝子発現を ISH 法により染色した小脳矢状断切片の写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は hemisphere (小脳半球) における切片の画像を示し、右列は中央の写真、flocculos (片葉) の部分の拡大図を示す。pre 群はプレセッション (3日間) において静止ロッドに載せ、サンプリング当日は課題を行っていない。Day1、Day5 群はプレセッション後それぞれの日数ローターロッド課題を行い、1日目、5日目の課題 30分後に脳を摘出した。

### **Figure 25 | 小脳 IEG 発現に用いたマウスが経験した運動課題の履歴およびローターロッド課題、サンプリングのプロトコール**

第3章の D1R KO、D2R KO マウス (A 図上段)、および WT マウス (A 図中段) が行ってきた運動課題の履歴とサンプリング時のプロトコール (A 図下段)。8つの IEG 遺伝子発現を調べた際のローターロッド課題のプロトコール (B 図)。静止ローターロッド課題時のプロトコール (C 図)。図中の略語は以下の通り。nor Br: normal breeding、通常飼育。Se.: session group、セッショングループ。RR: rota-rod、ローターロッド。SW: Step-Wheel、ステップホイール。w: week、週。d: day、日。h: hour、時間。m: minute、分。s: second、秒。

### **Figure 26 | 静止ロッドに乗せた後のマウスの小脳における *c-fos* と *jun-B* の遺伝子発現**

小脳矢状断切片の ISH 法による染色写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は hemisphere (小脳半球) における染色切片の画像を示し、右列は中央の写真内の flocculos (片葉) の部分の拡大図を示す。静止したローターロッドに 120 秒乗るという試行を 1日3試行、3日間 WT マウスに課し、最後の試行から 30分後 (上段) あるいは 24 時間後 (下段) に脳を摘出した。

### **Figure 27 | ハンドリングを施したマウスの小脳における *c-fos* と *jun-B* の遺伝子発現**

小脳矢状断切片の ISH 法による染色写真。左列は vermis (小脳虫部)、中央は hemisphere (小脳半球) における染色切片の画像を示し、右列は中央の写真内の flocculos (片葉) の部分の拡大図を示す。1週間の間、1日約3分間のハンドリングをマウスに施し、最後の処置から 30分後 (上段) に脳を摘出した。Naïve マウス (下段) は同じ期間、何の処置もせずに飼育し、脳を摘出した。

# Figure 1

## Step-Wheel System and Peg-patterns

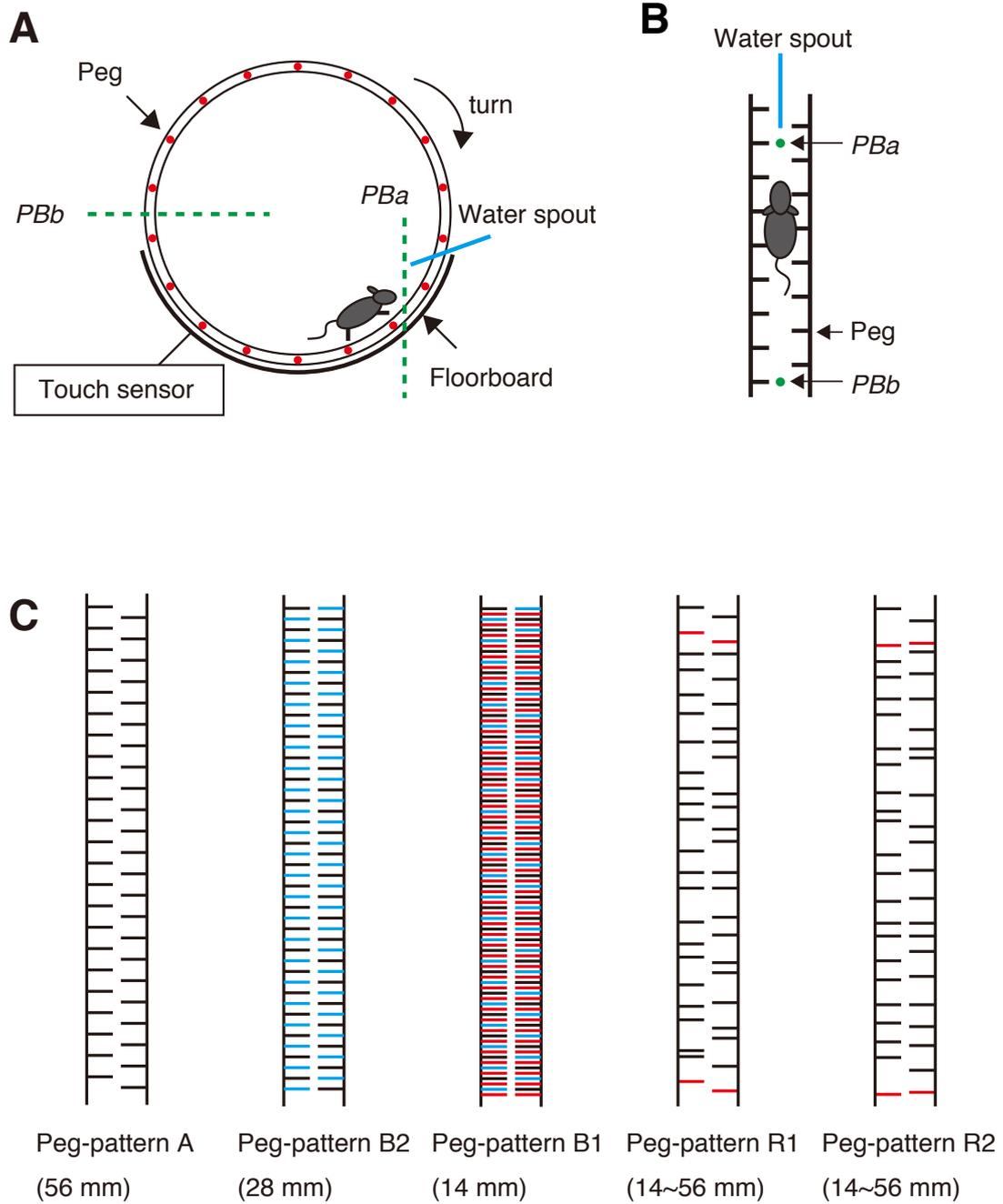


Figure 2

Performance in Step-Wheel System by nNOS KO mice

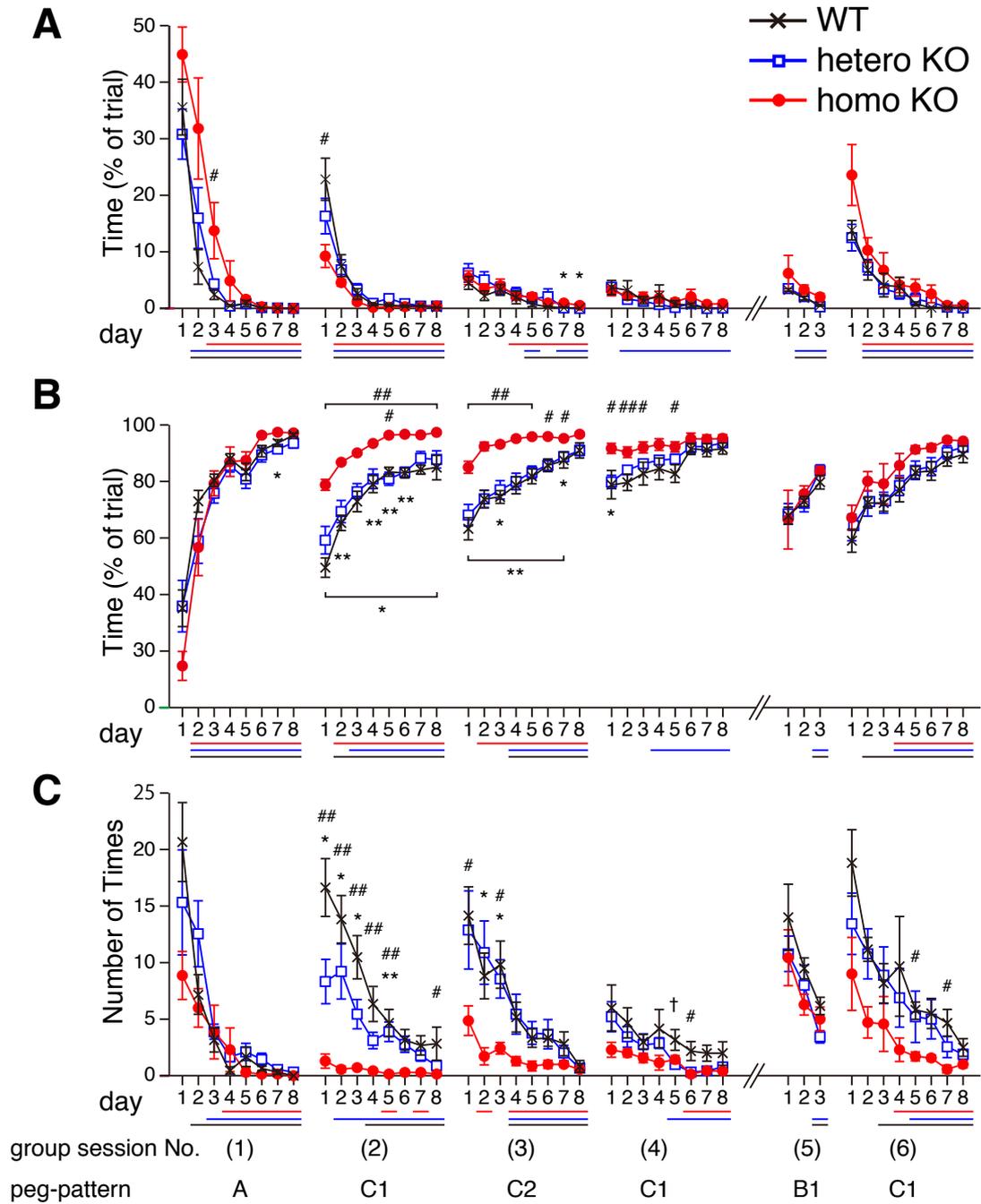
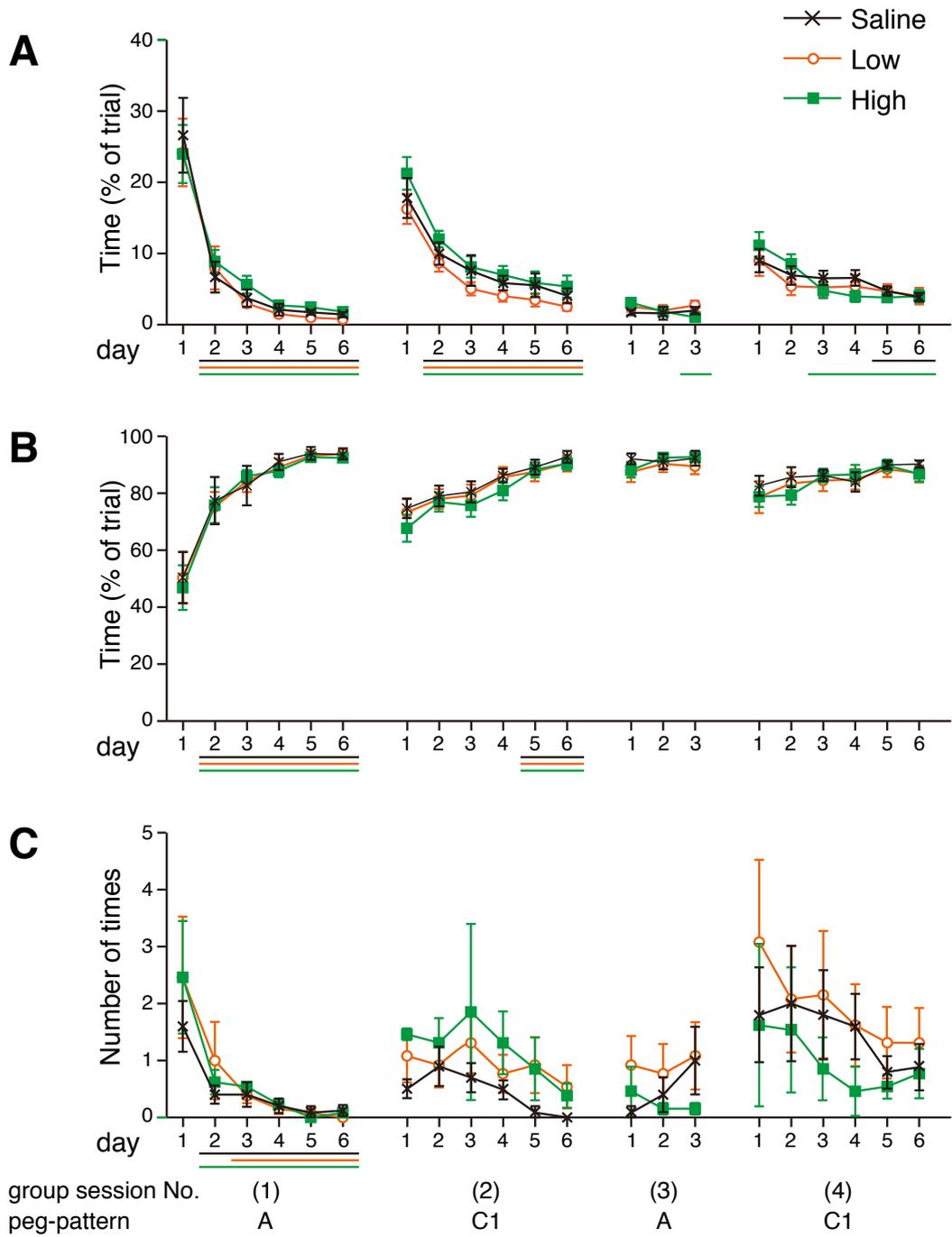


Figure 3

Performance in Step-Wheel System after drug injection



# Figure 4

Spontaneous motor activity of mice in home cage

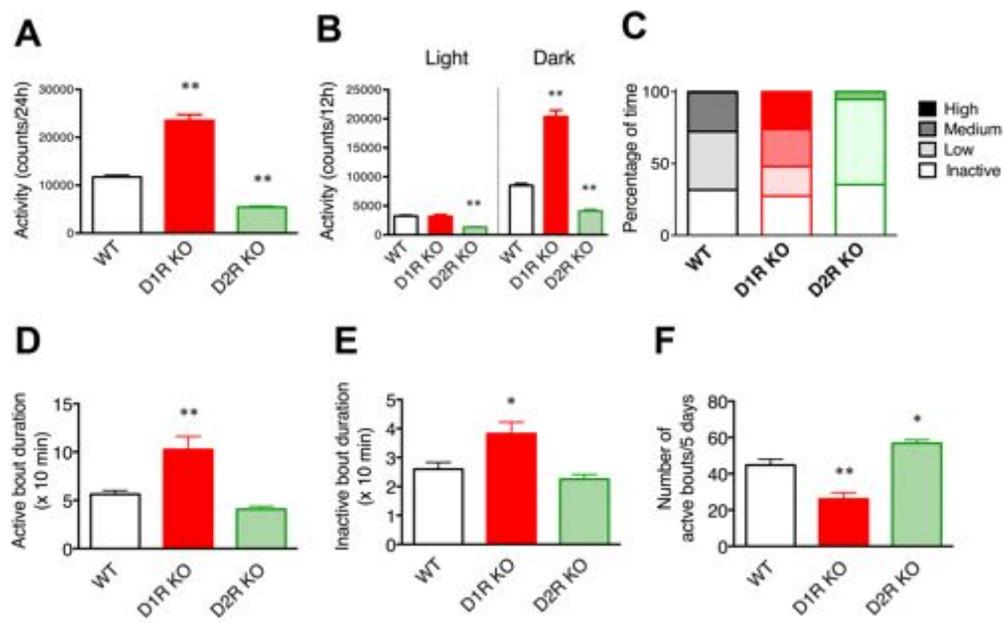


Figure 5

Time courses of motor activity, food intake, and water intake

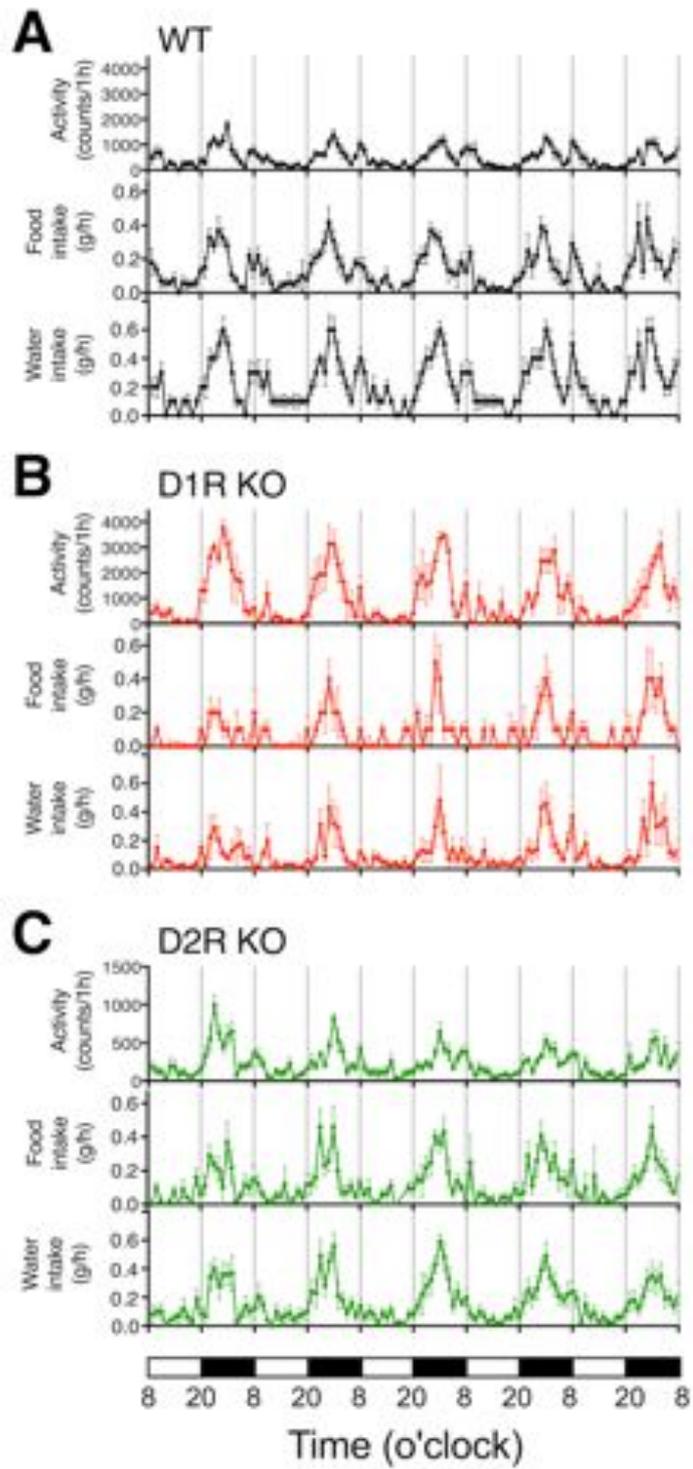


Figure 6

Food and water intakes in home cages

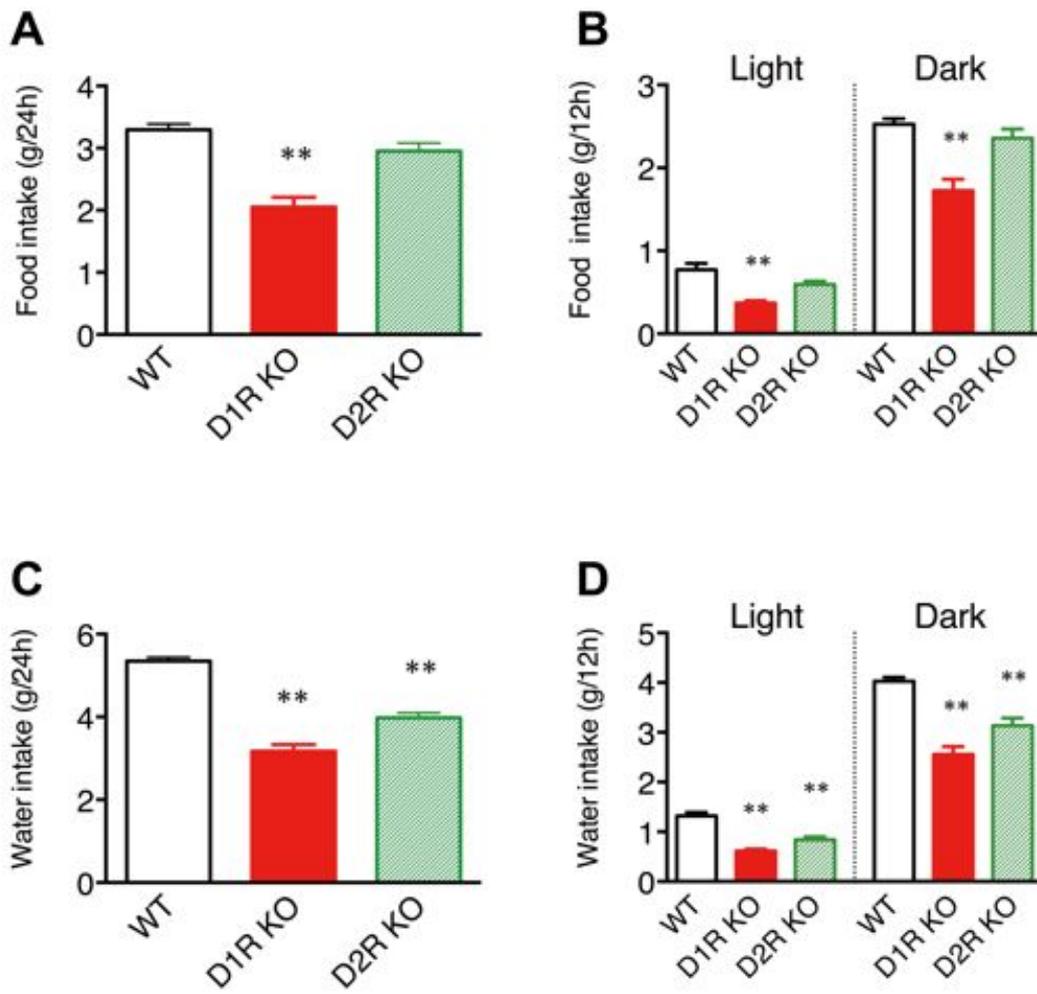
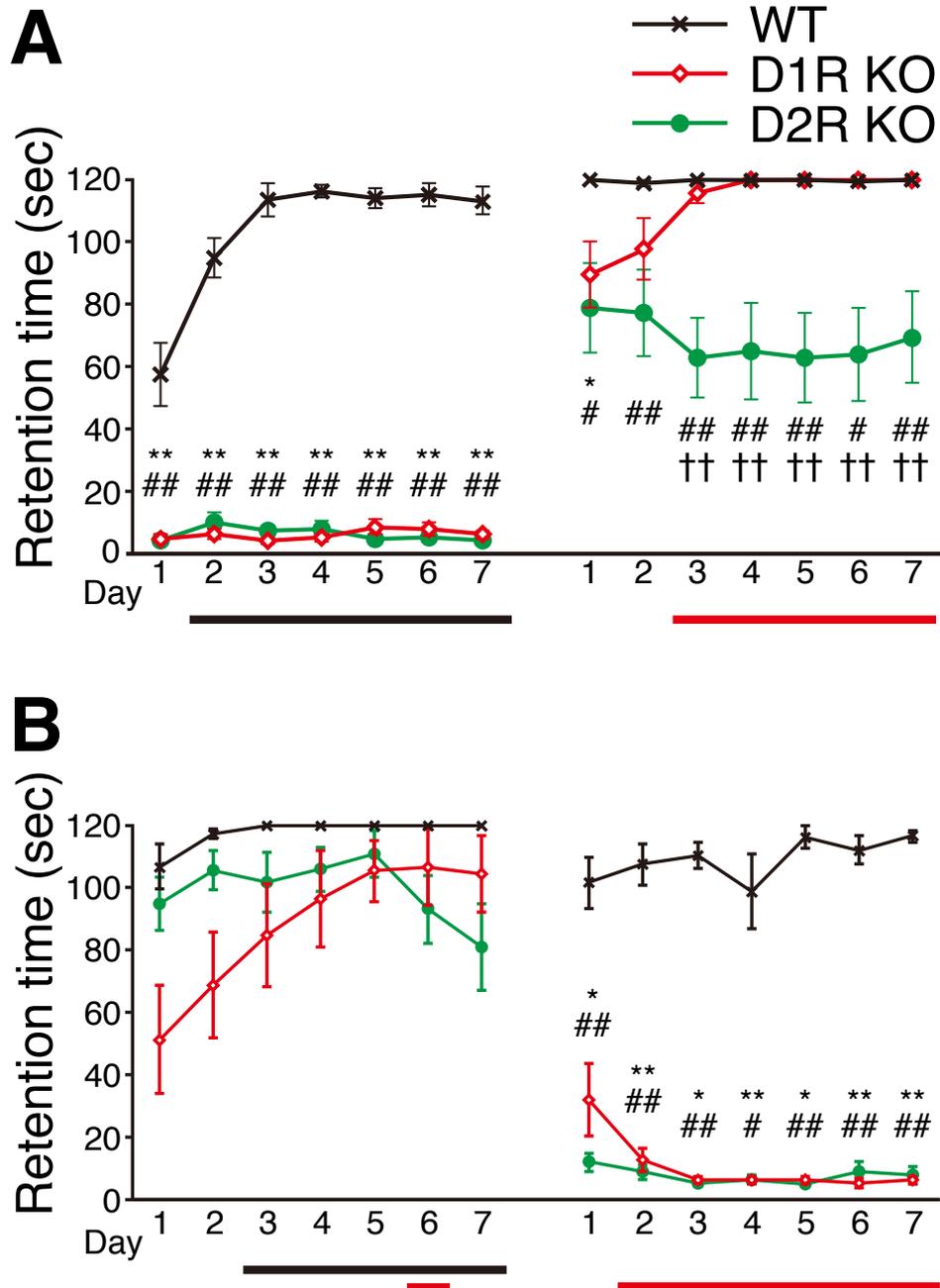


Figure 7

Performance in rota-rod task



# Figure 8

Performance of individual mice in rota-rod task

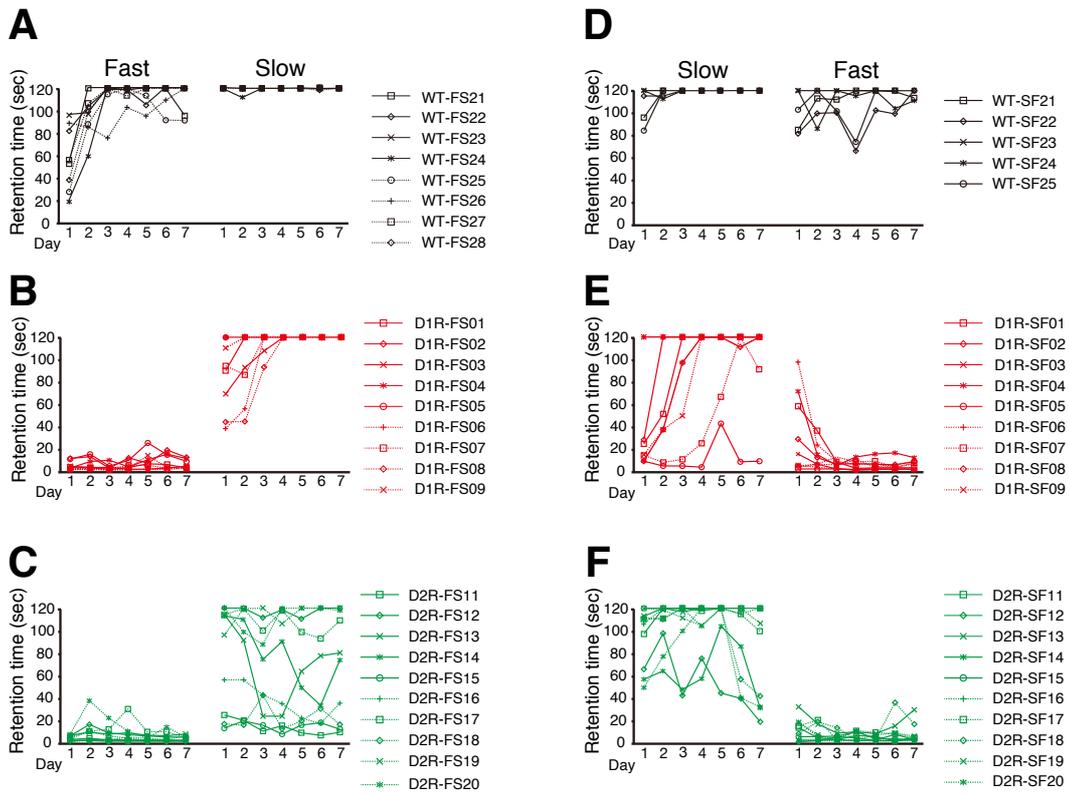


Figure 9

Performance in Step-Wheel task

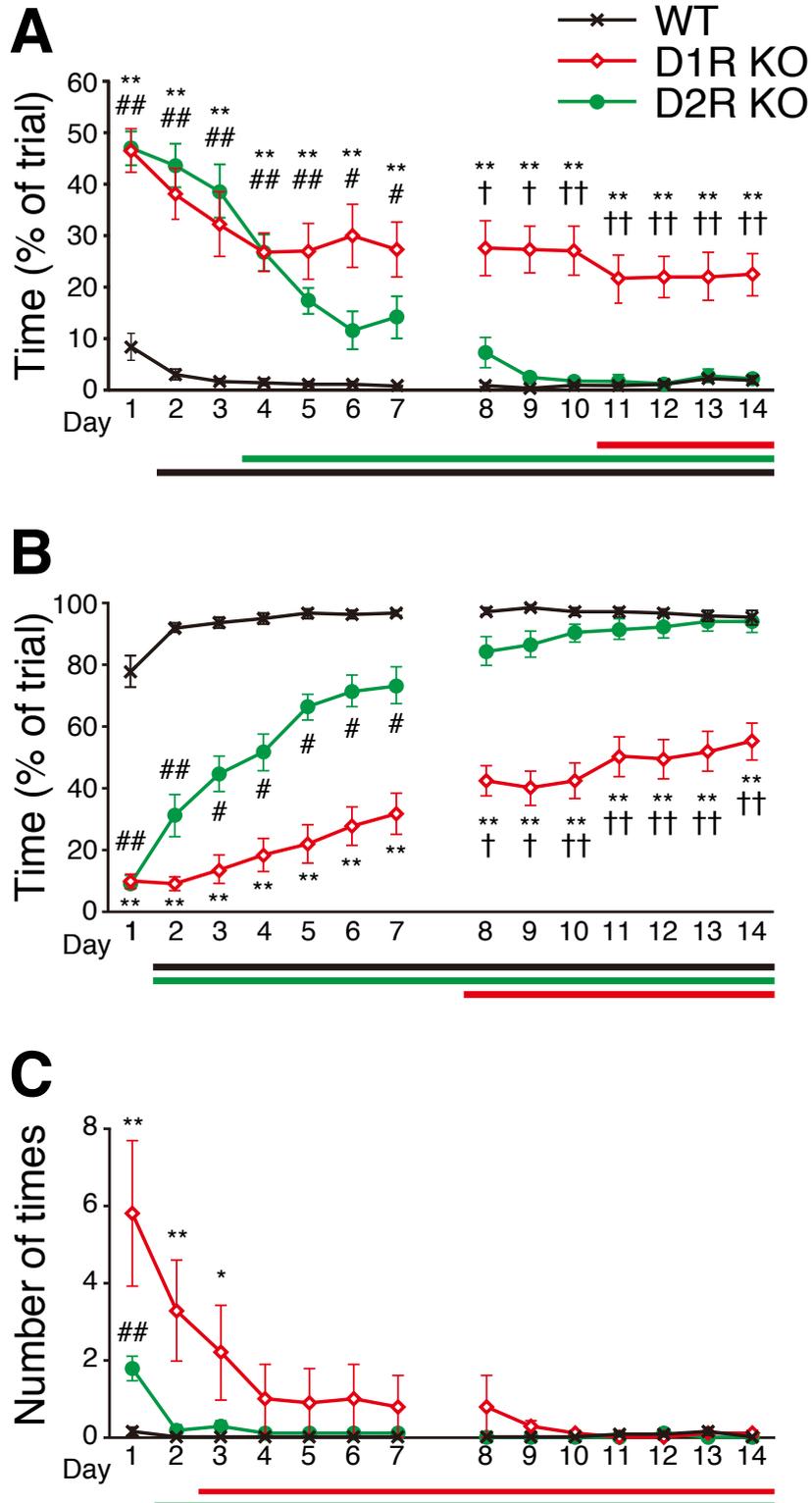


Figure 10

Performance at various speeds in Step-Wheel task

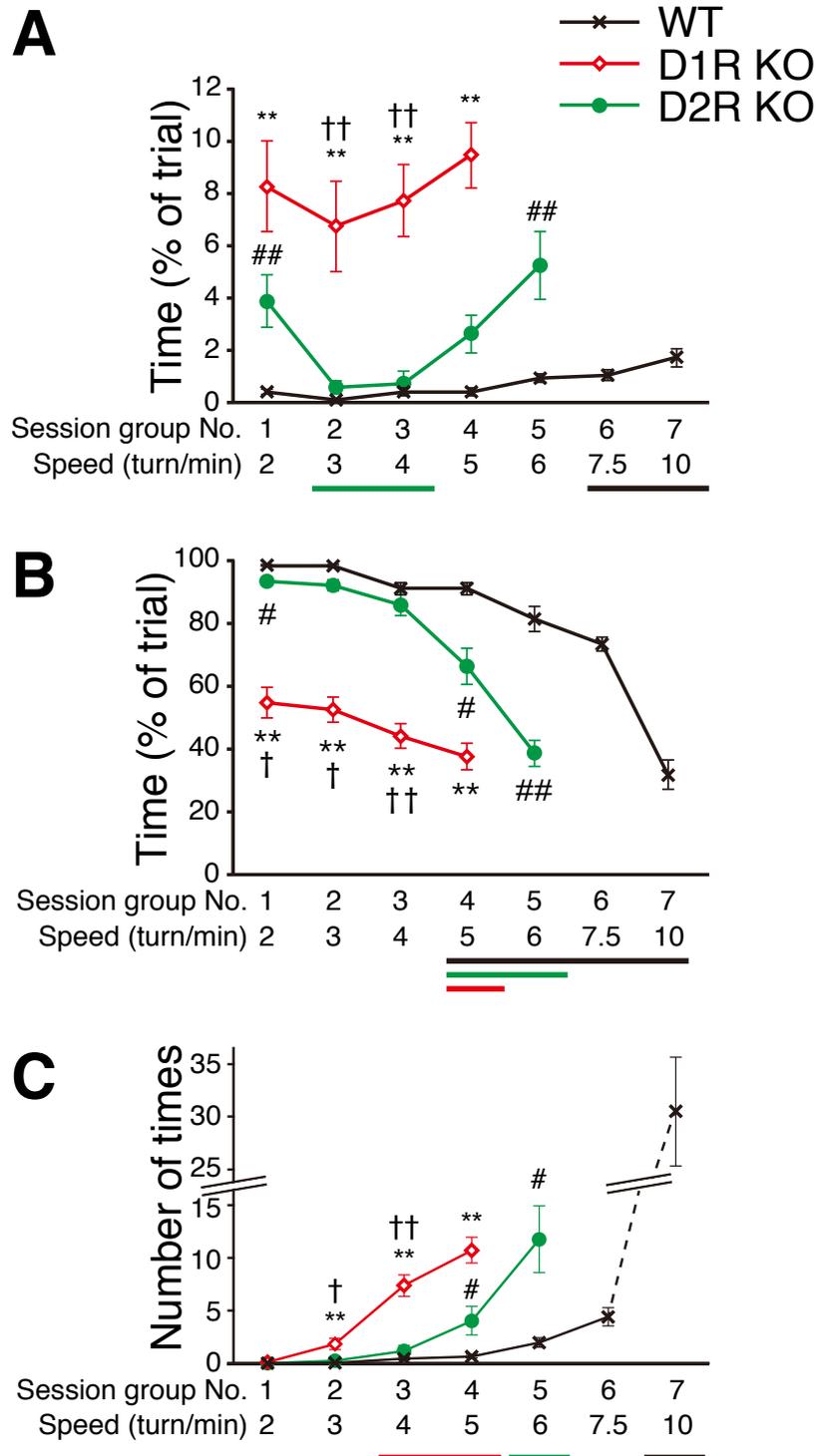


Figure 11

Water drinking behavior in stationary Step-Wheel system

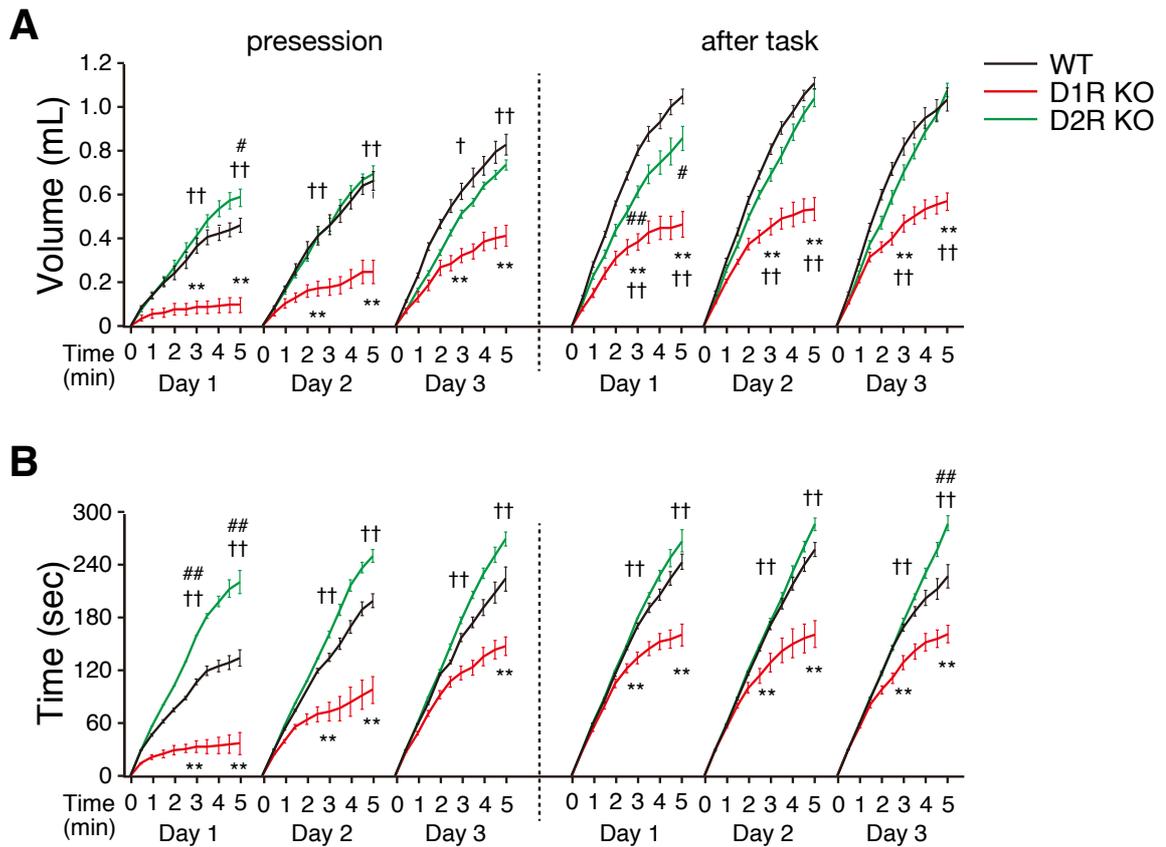


Figure 12

Performance of WT mice in Step-Wheel task at different speeds

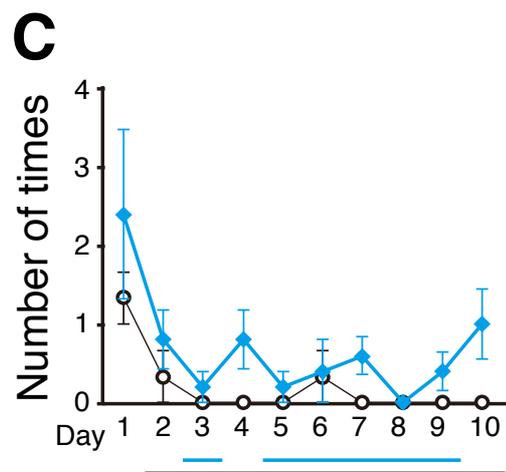
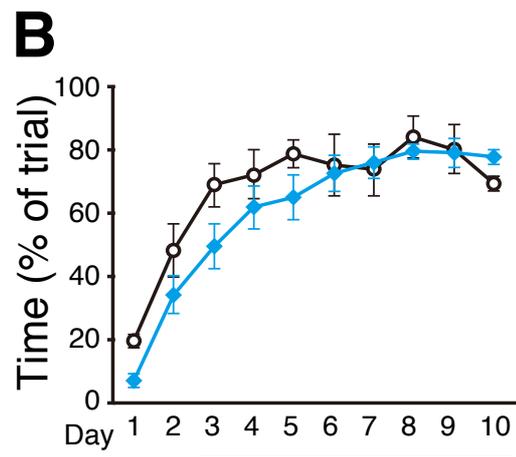
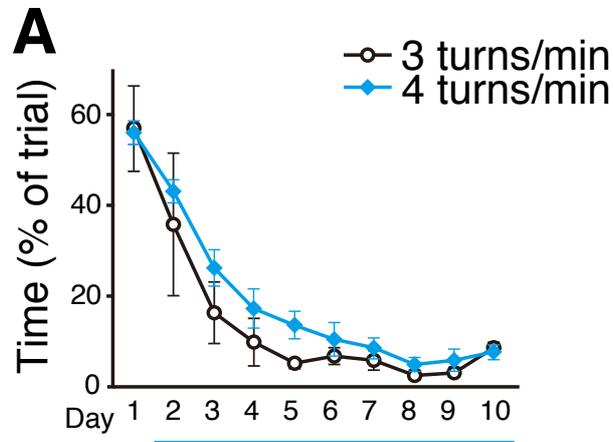


Figure 13 IEGs expressions in naive mice

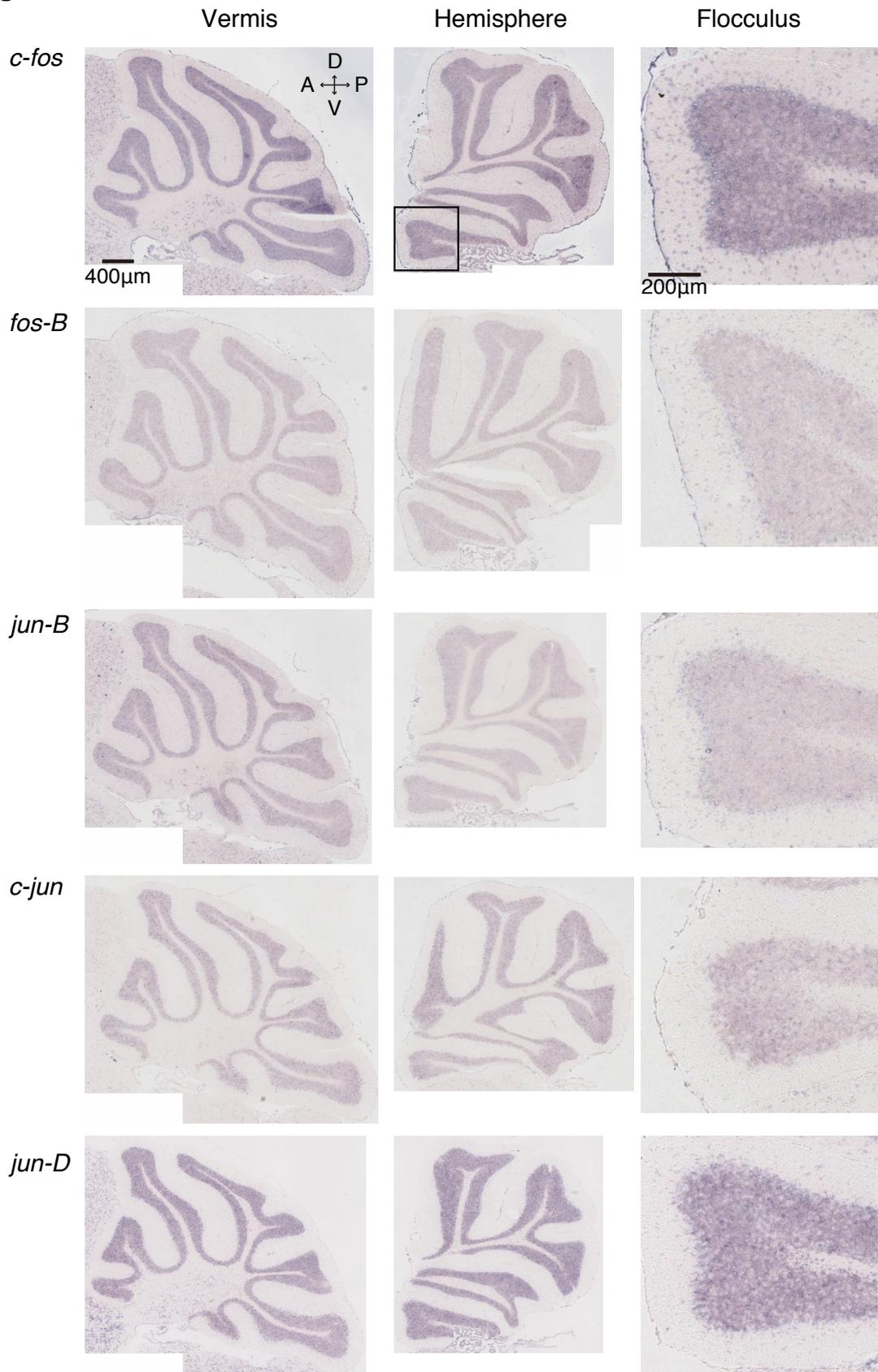


Figure 14 IEGs expressions in naive mice

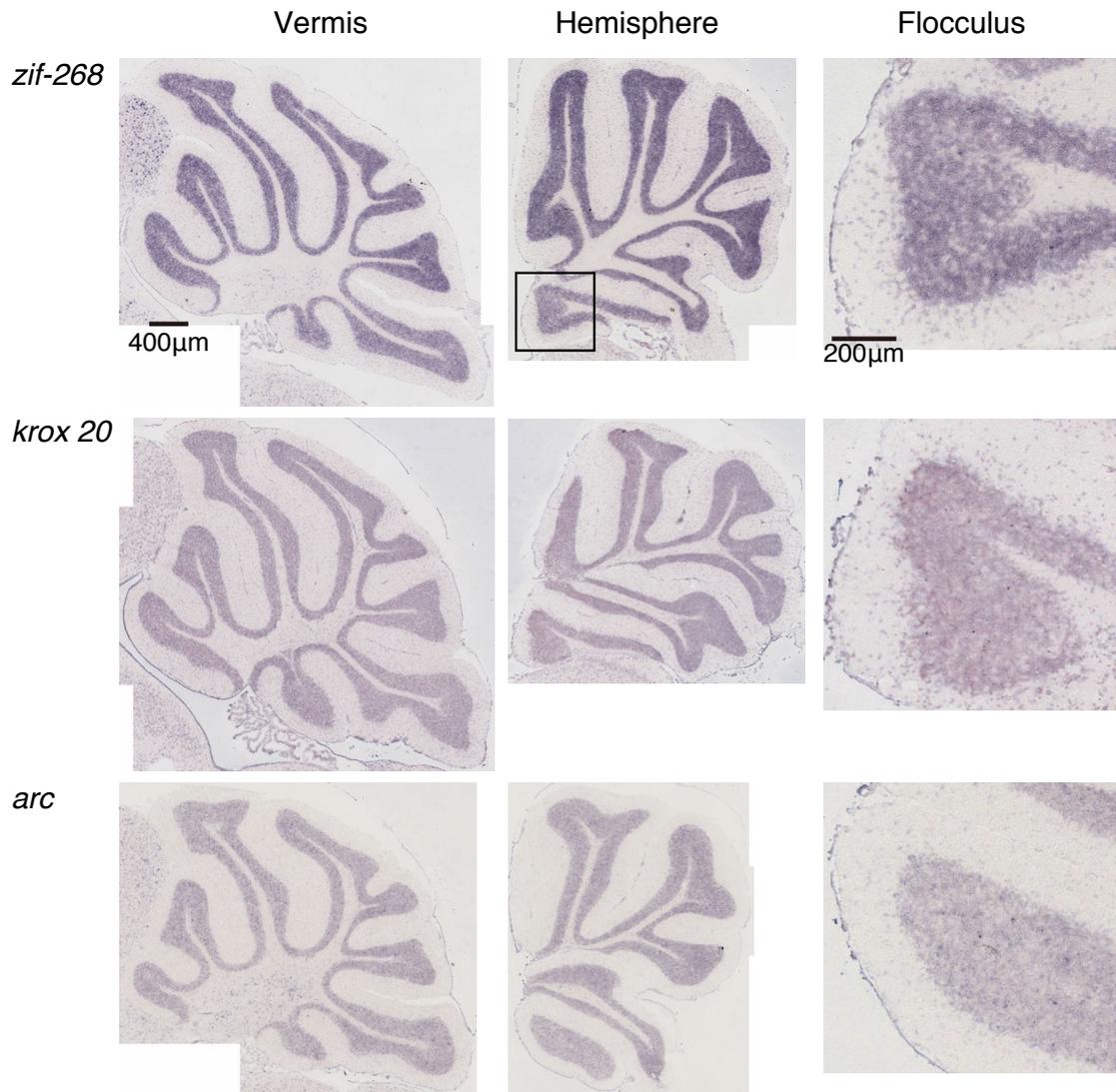


Figure 15 IEGs expressions after rota-rod task

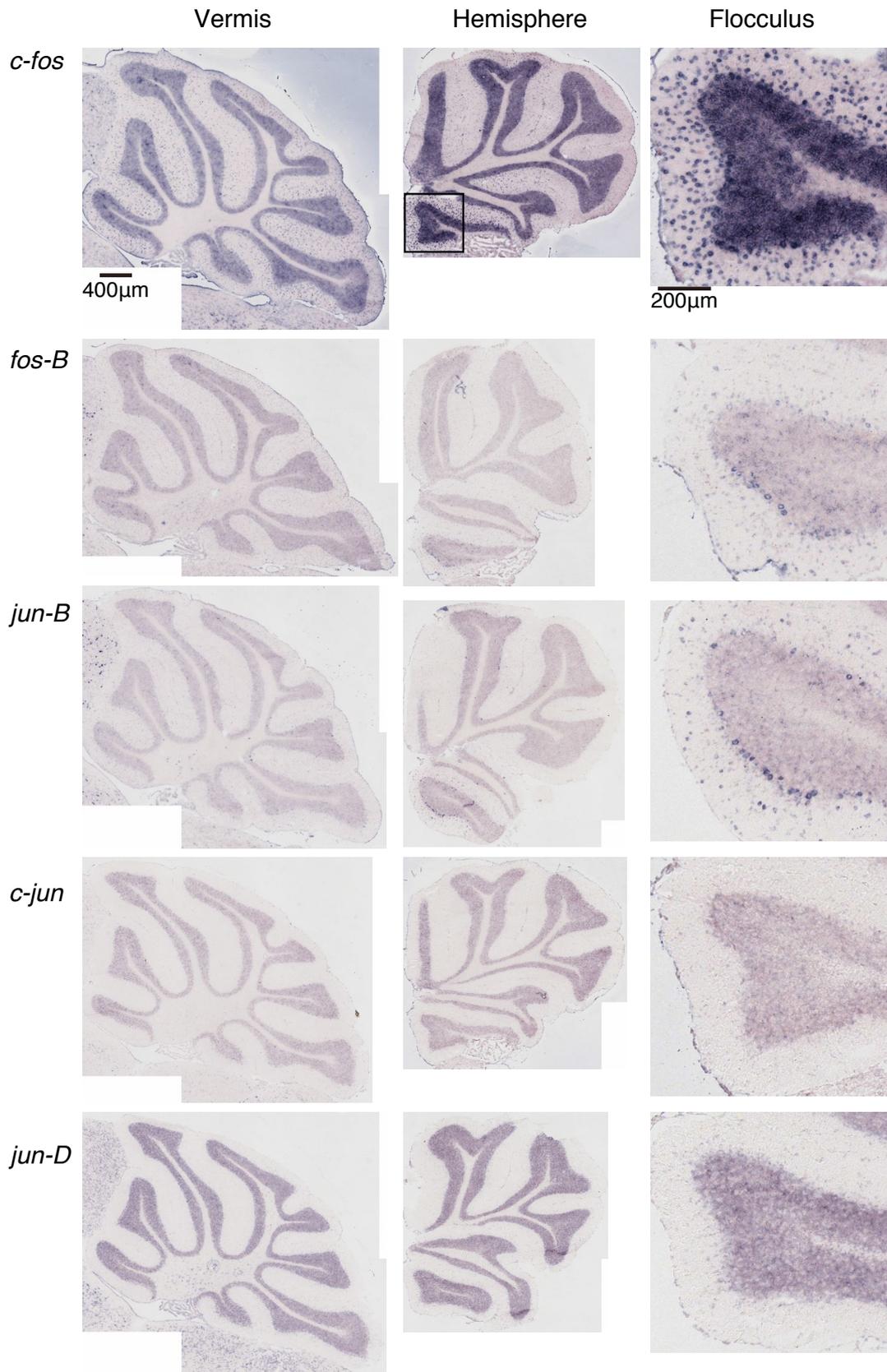


Figure 16 IEGs expressions after rota-rod task

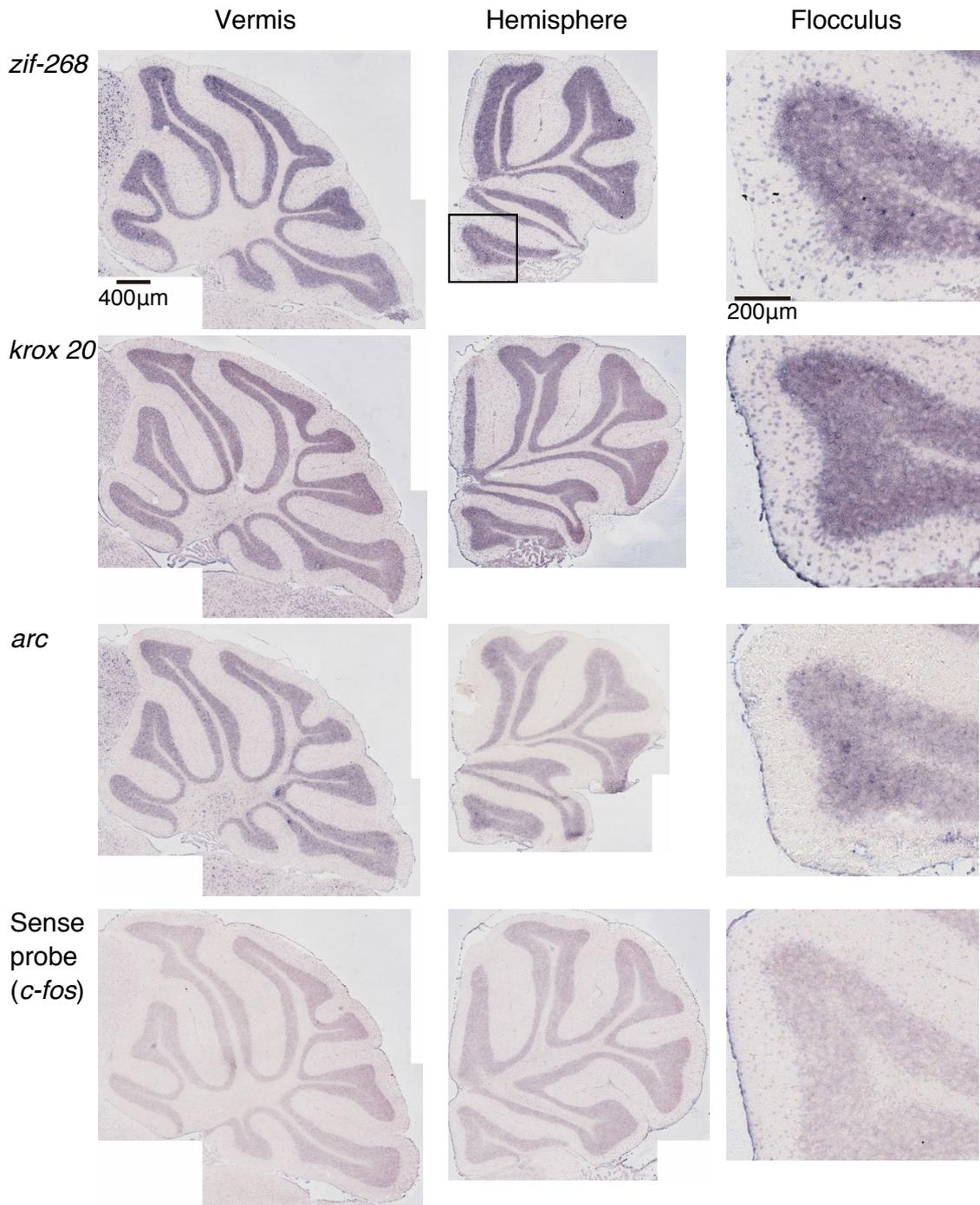


Figure 17 *c-fos* mRNA expression in WT mice

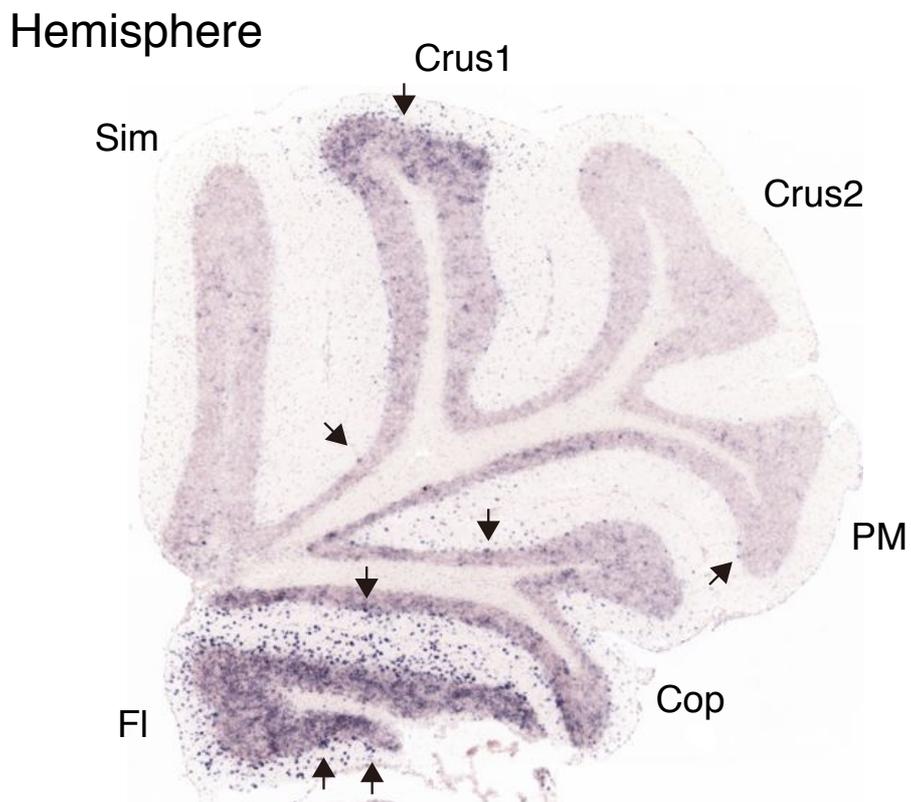
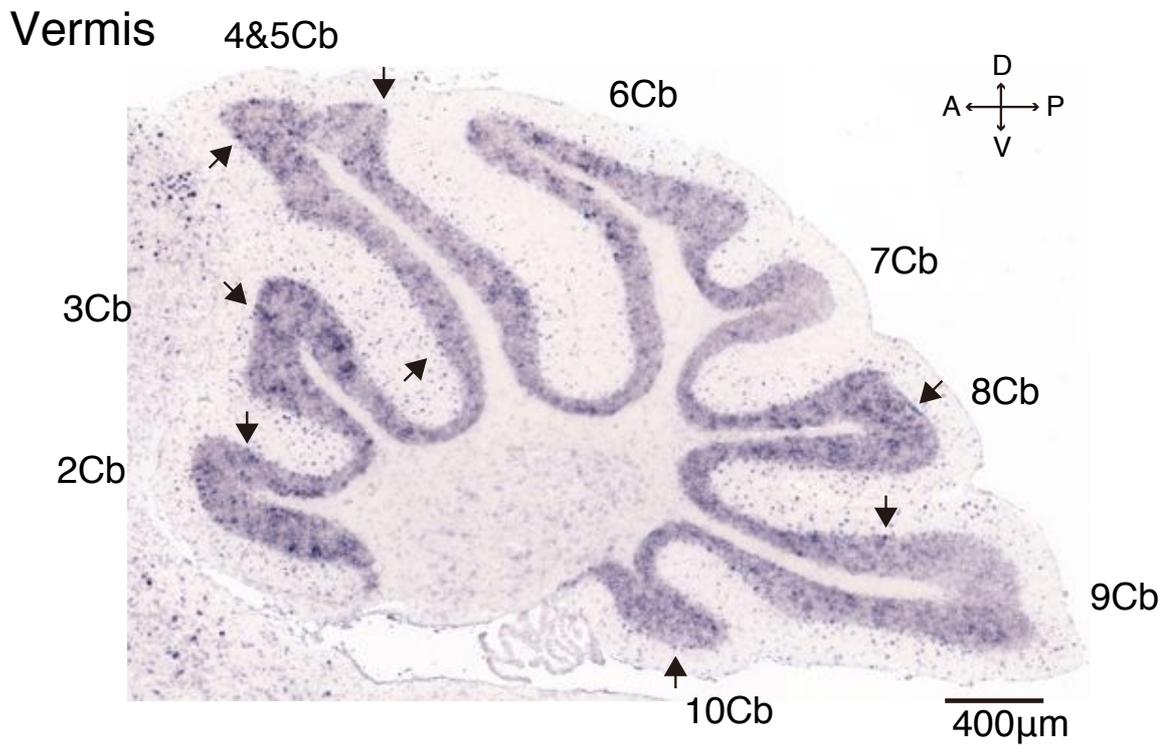
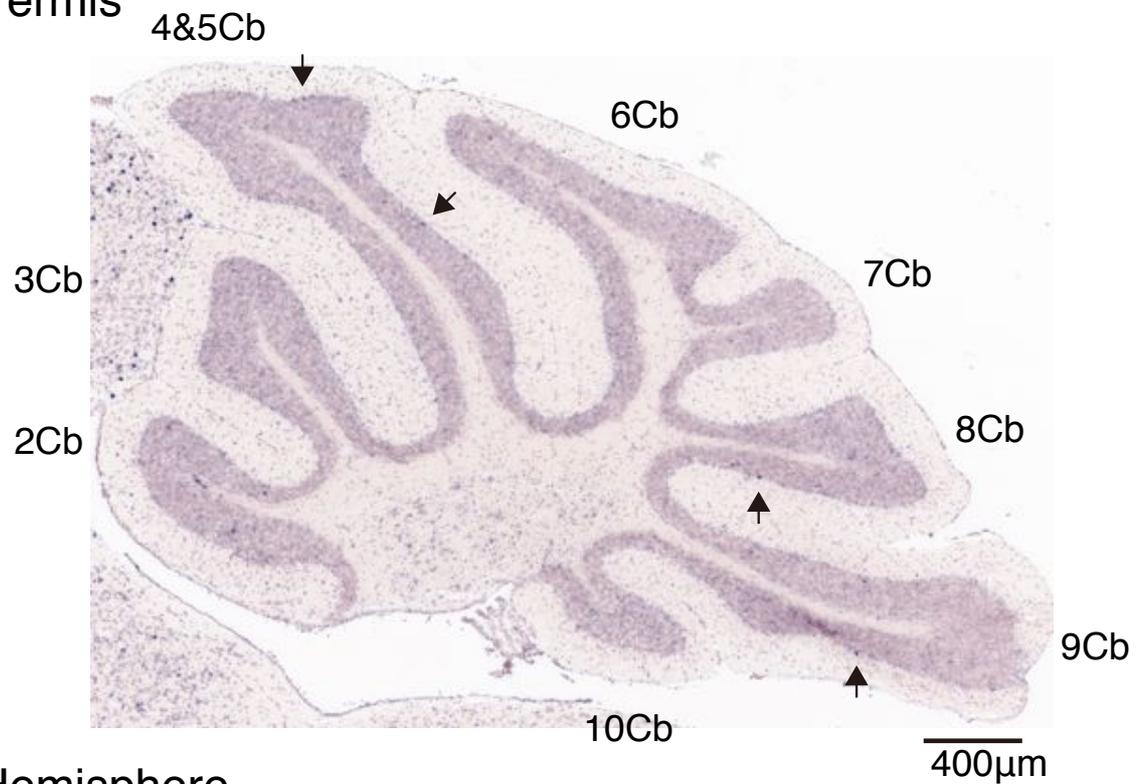


Figure 18 *jun-B* mRNA expression in WT mice

Vermis



Hemisphere

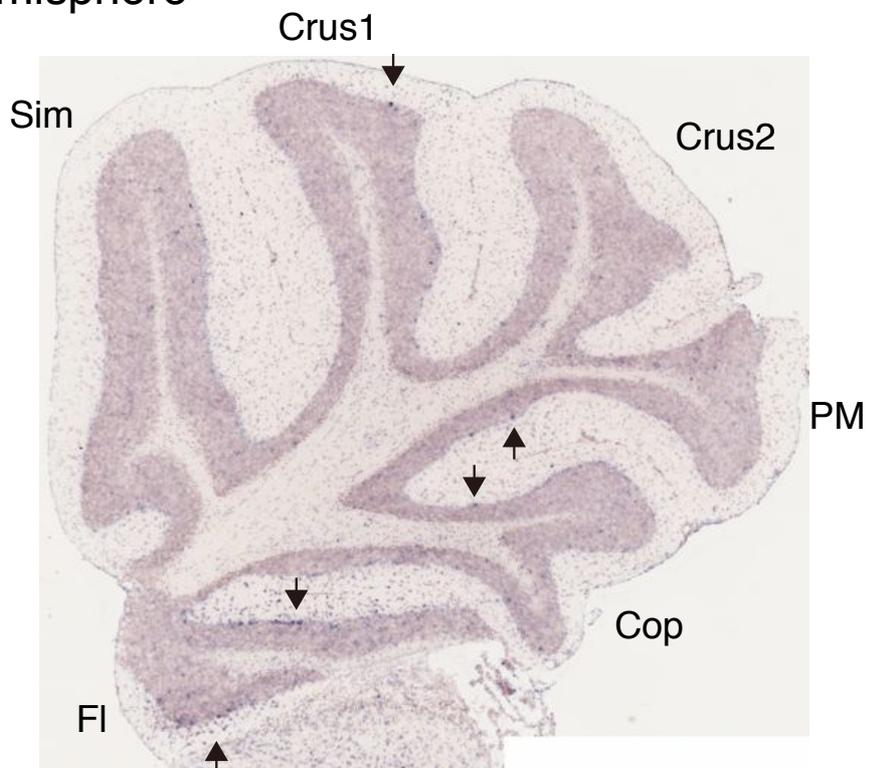


Figure 19 *c-fos* expression in WT mice

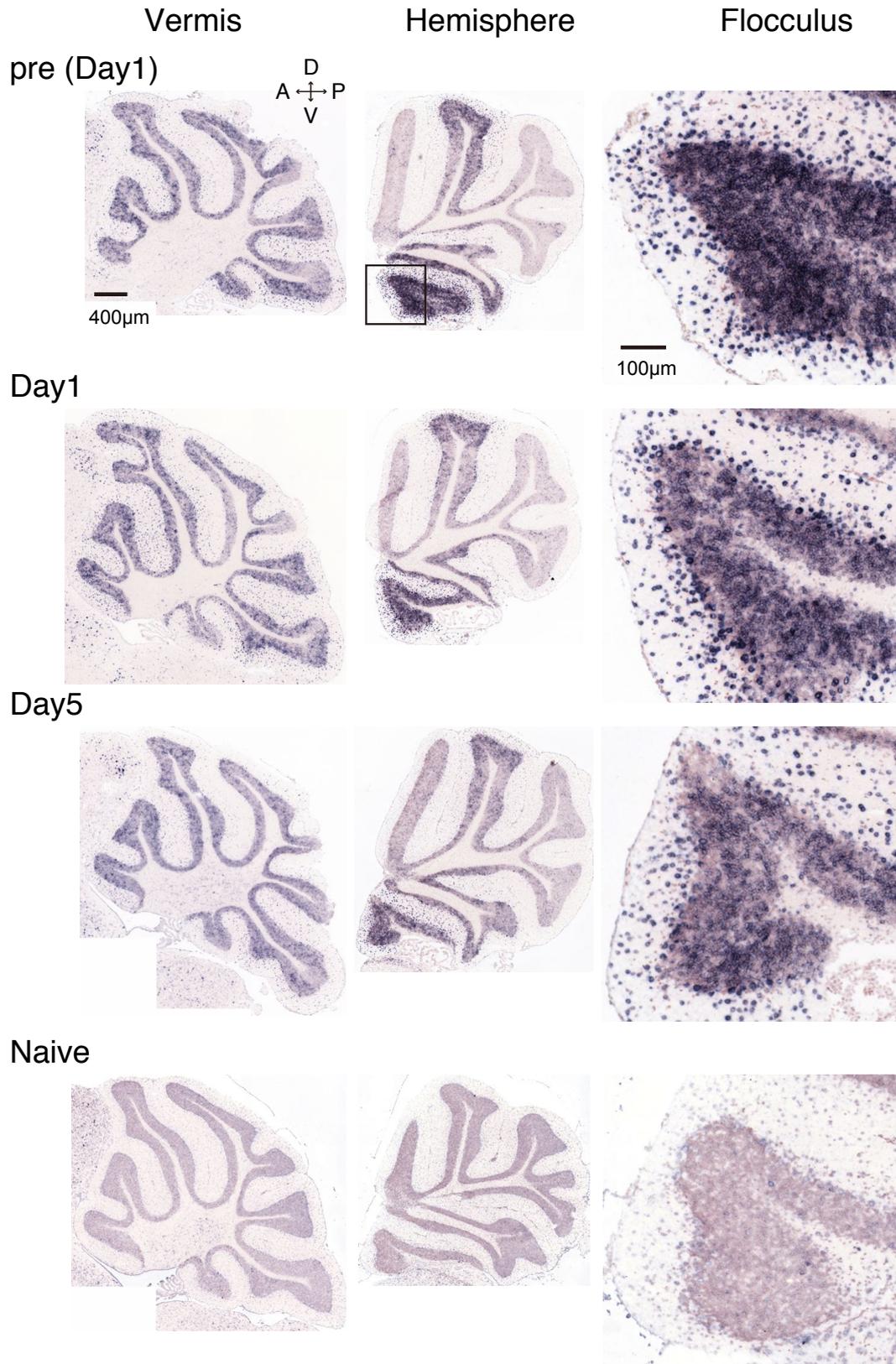


Figure 20 *c-fos* expression in D1R KO mice

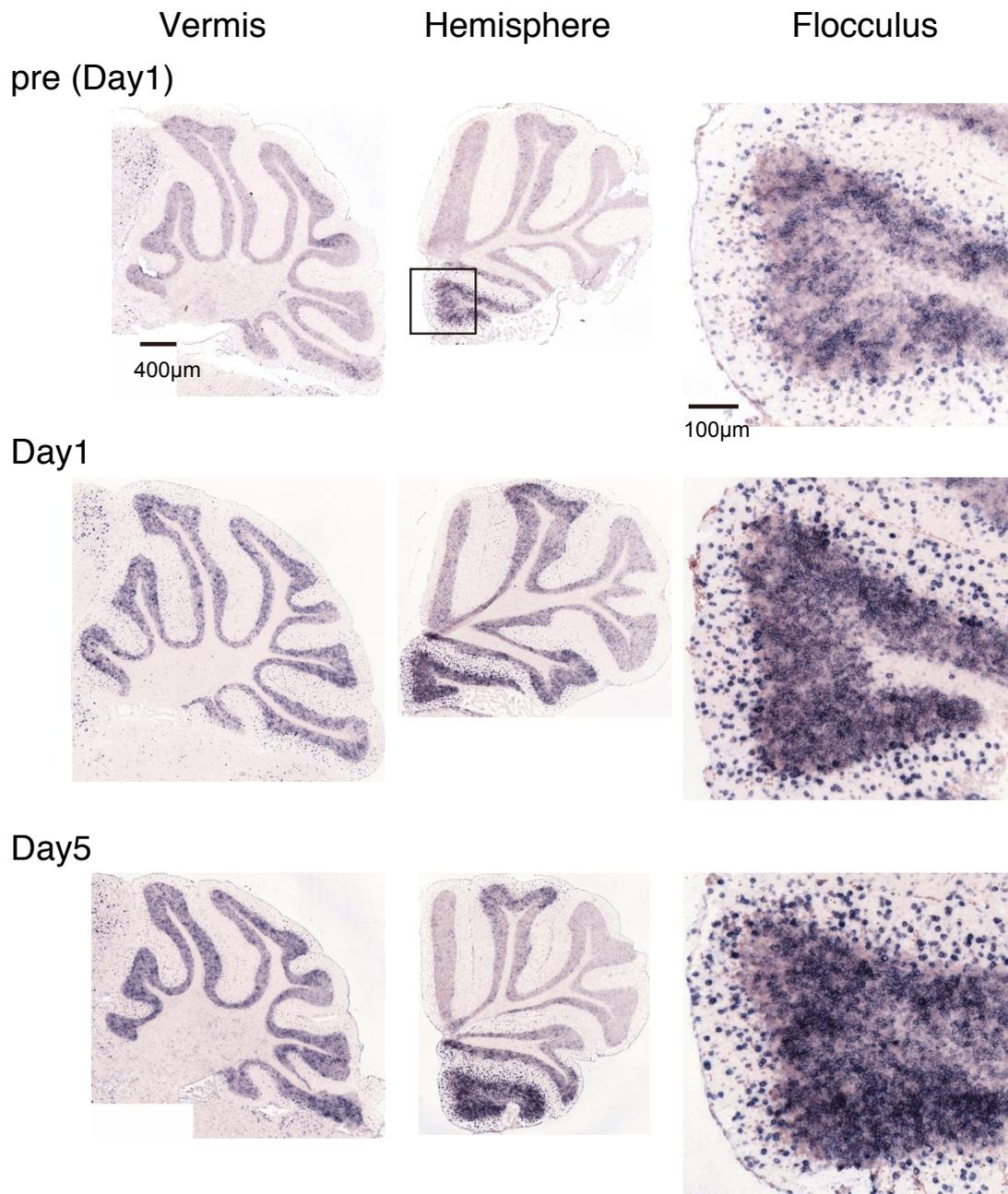


Figure 21 *c-fos* expression in D2R KO mice

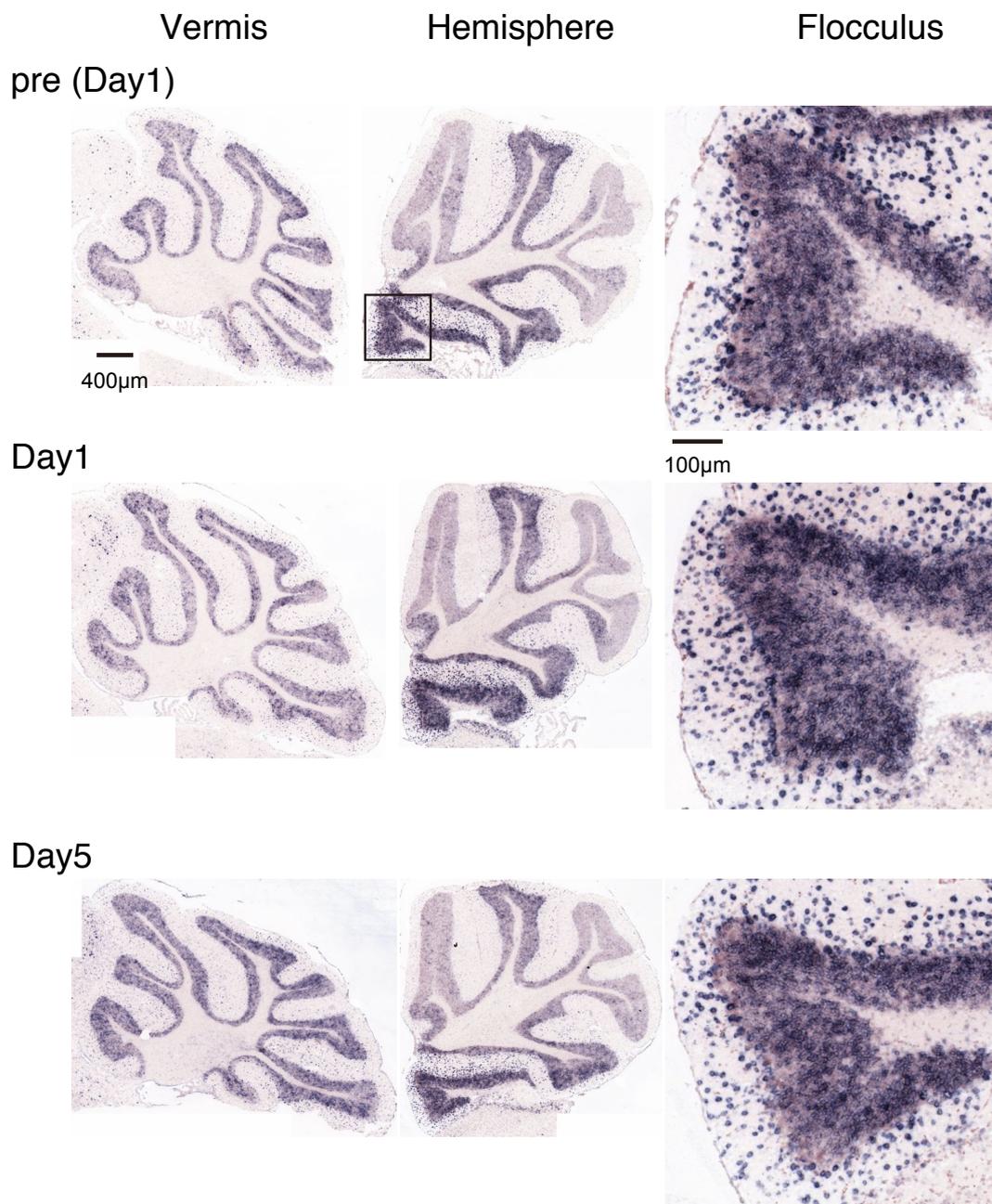


Figure 22 *jun-B* expression in WT mice

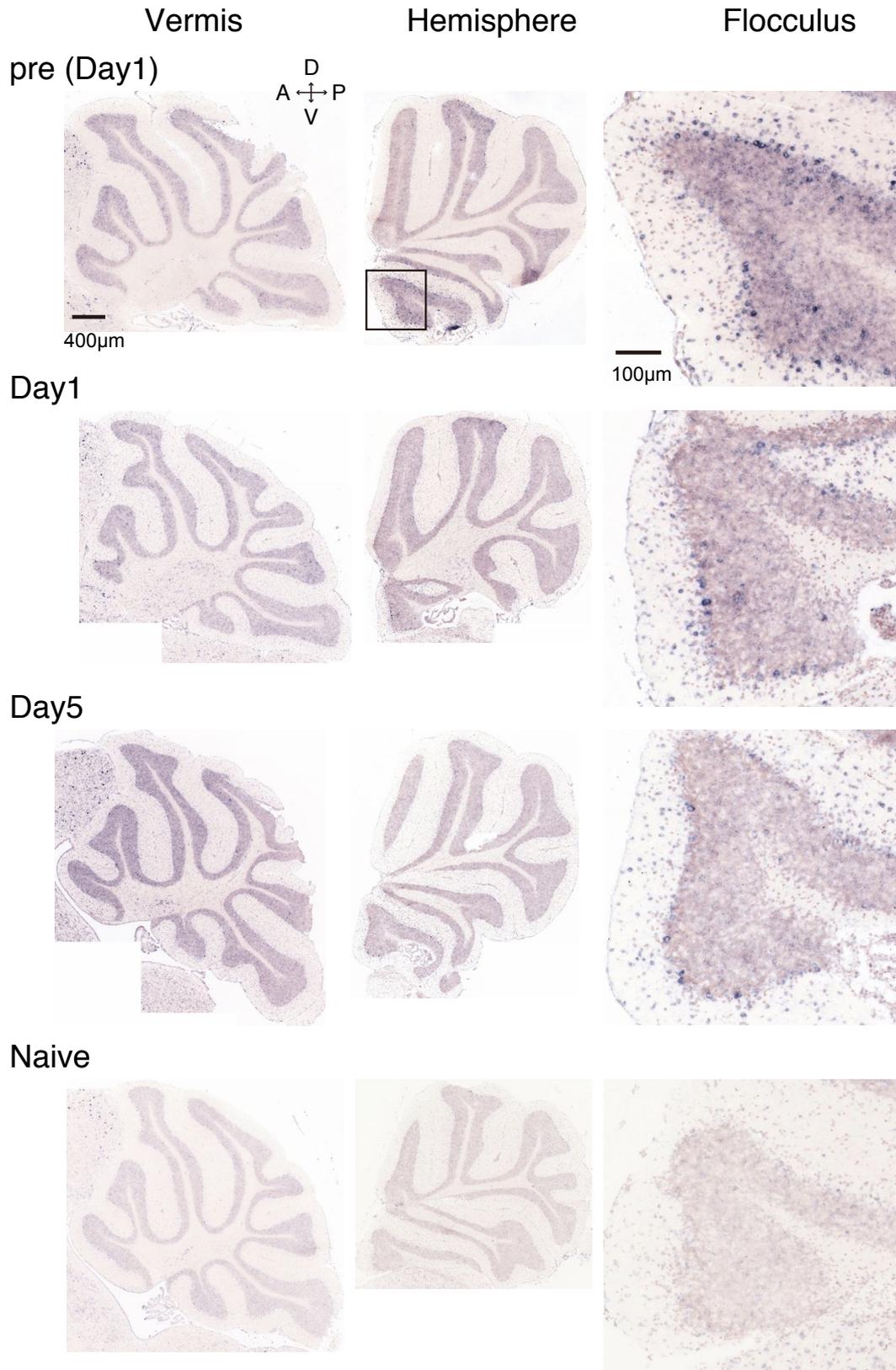


Figure 23 *jun-B* expression in D1R KO mice

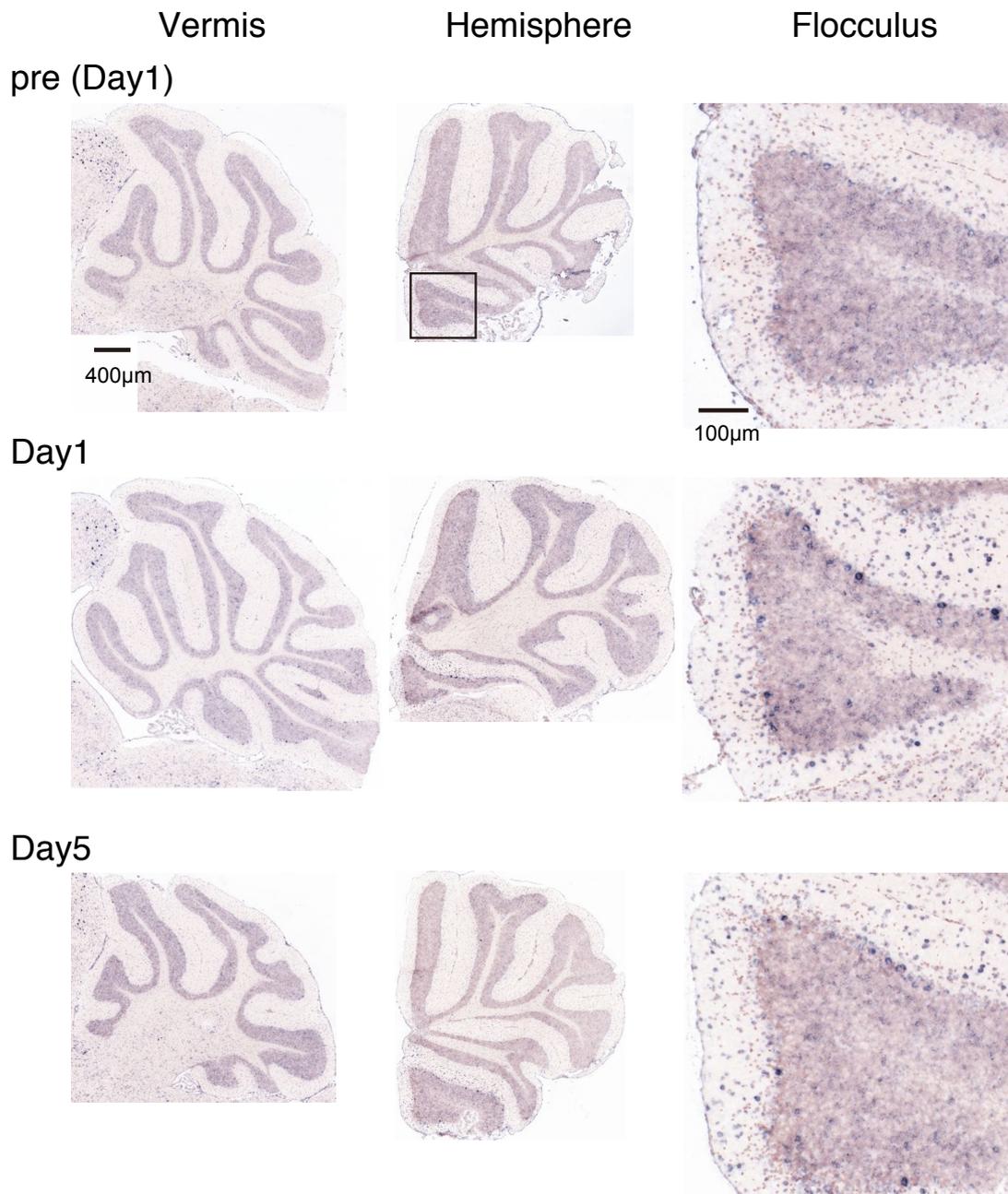


Figure 24 *jun-B* expression in D2R KO mice

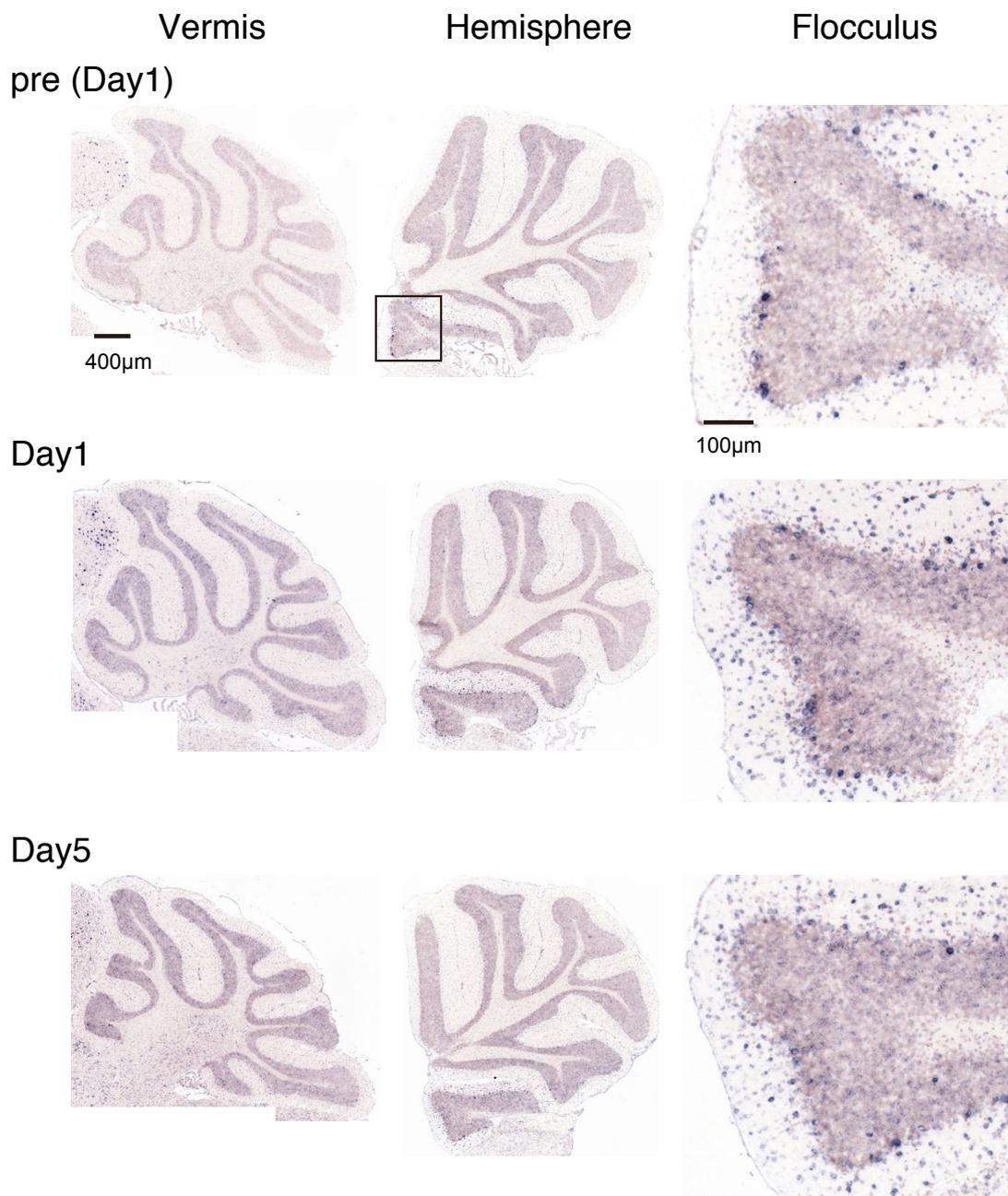
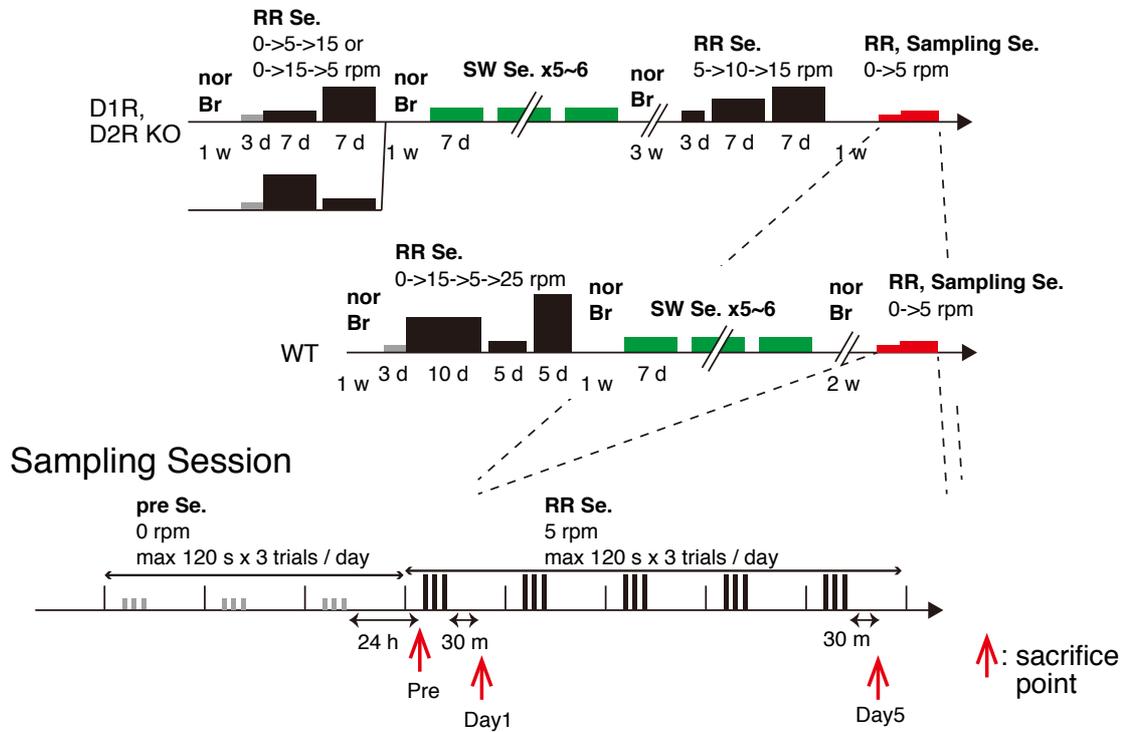
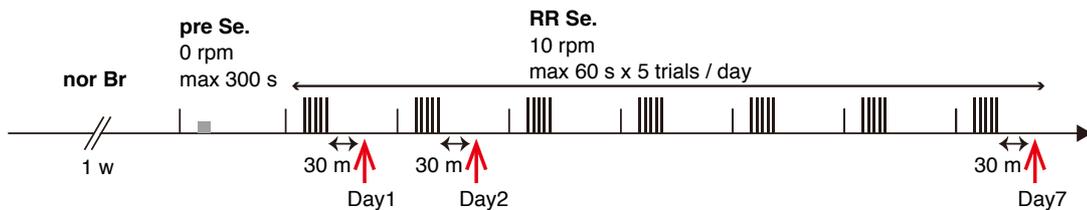


Figure 25 History of motor task and Experimental protocol

A D1R KO, D2R KO, and WT mice that experimeced motor tasks (training)



B Rota-rod task, for 8 IEGs



C Stationary rota-rod, 30 min or 24 h (No training)

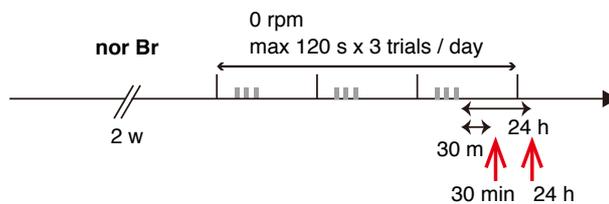


Figure 26 *c-fos* and *jun-B* expression after stationary rota-rod

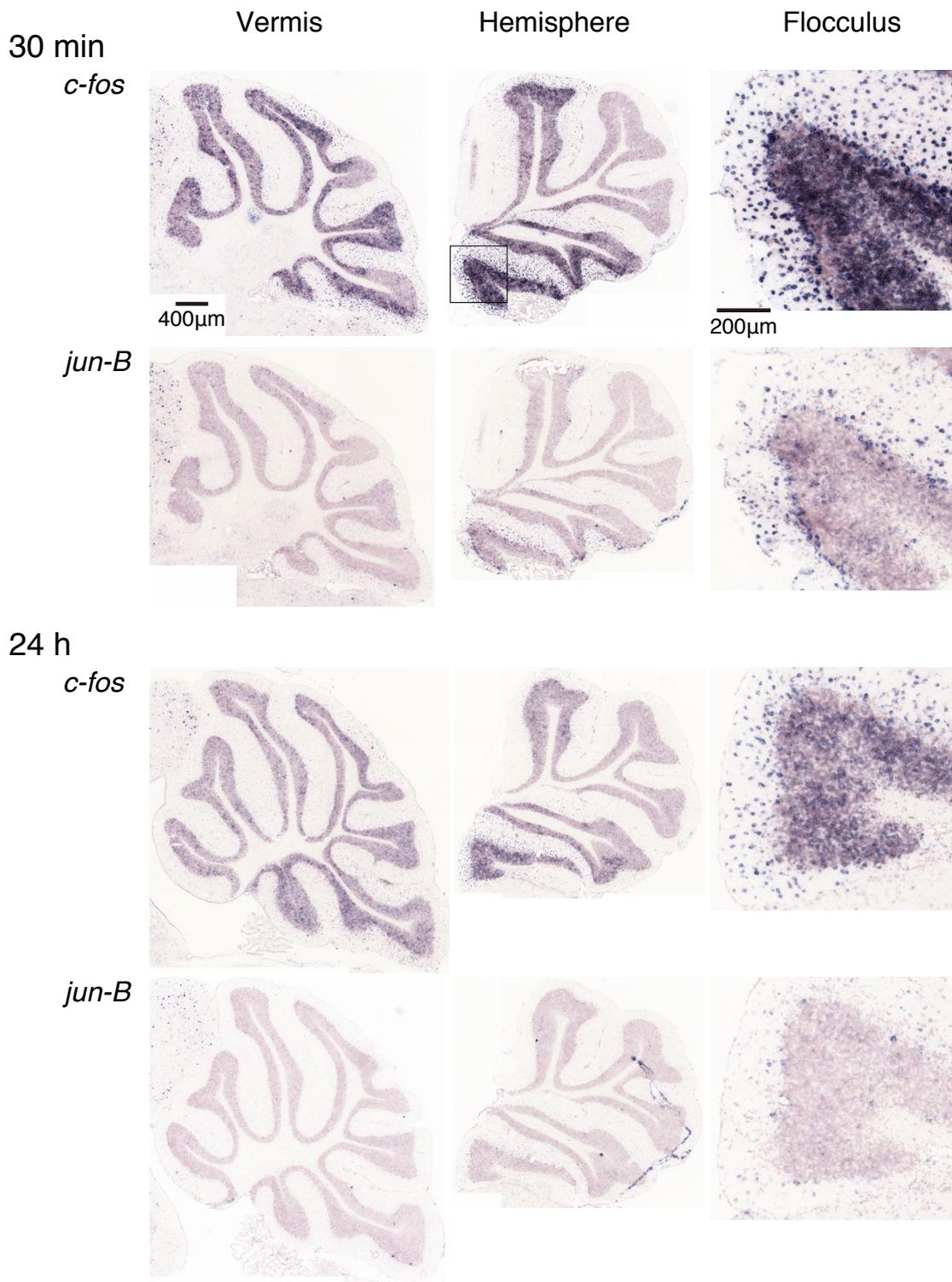
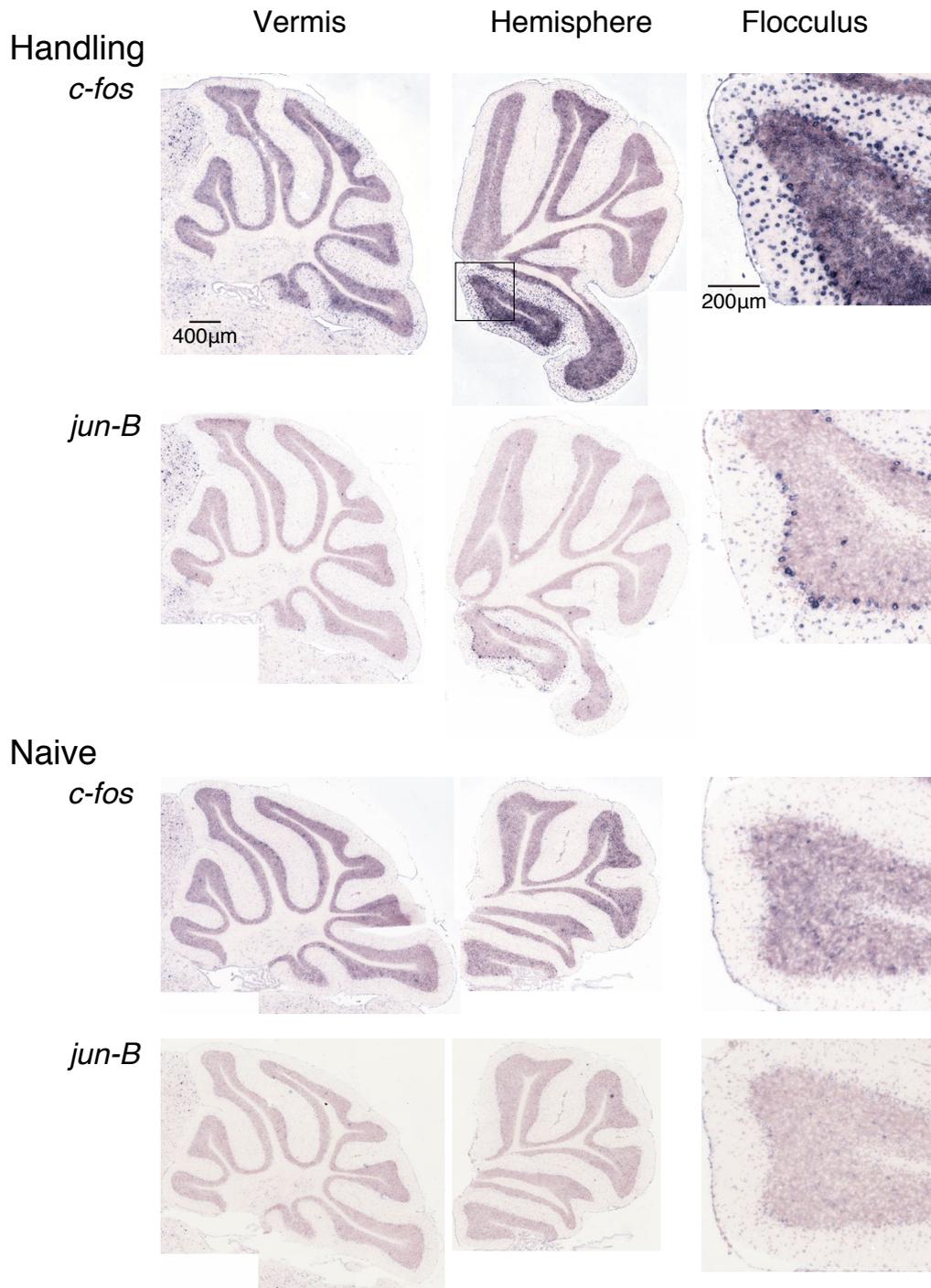


Figure 27 *c-fos* and *jun-B* expression in handling or naive mice



## 総括

本研究ではマウスの運動機能、運動学習に関与する脳機能について調べるため、私の研究室で開発したステップホイール装置と一般的に使われているローターロッド装置を用いて、遺伝子欠損マウスや薬物投与による各運動課題のパフォーマンスへの影響を比較、検討した。私の研究室の先行研究から、ステップホイール装置におけるペグパターン学習時に、線条体 nNOS 陽性介在ニューロンの関与を示唆する結果が得られていた。ここから第 1 章では nNOS KO マウスおよび NOS 阻害剤を用いて、様々な条件下でのステップホイール課題のパフォーマンスを調べた。結果、線条体の NOS を阻害しても、ステップホイール課題の運動機能、学習機能に顕著な影響は認められない事を示唆する結果が得られた。第 2 章では線条体の主な投射経路（直接路、間接路）に関わる 2 種類のドーパミン受容体 D1R、D2R の KO マウスを用いた。加えて自発活動量とローターロッド課題も合わせて検討した。自発運動量は WT マウスに比べて、D1R KO マウスは増加、D2R KO マウスは減少している事が確認出来た。2 種類の運動課題によって、D1R KO、D2R KO マウスとも運動機能は低下しているが、運動学習は可能である事が明らかになった。そして運動課題の性質特異的な障害（D1R KO は報酬系課題、D2R KO マウスは嫌悪回避課題に対して）という表現型が明らかになった。第 3 章では IEG 遺伝子マッピングによって、運動機能、運動学習に関与している小脳について、ローターロッド課題遂行時の活性領域の特定を試みた。結果、IEG の中でも *c-fos*、*jun-B* 遺伝子の発現が強く、領域ごとの発現パターンが明らかになり、特に flocculus で強い発現が確認された。ローターロッド課題で異なる表現型を示した D1R KO、D2R KO マウスについて、小脳における神経活性領域の違いは認められなかったが、興味深い事に、静止したロッドに載せただけの 24 時間後においても小脳 flocculus で *c-fos*、*jun-B* の遺伝子発現が認められた。この現象とその意義については今後更なる研究が必要と考えられる。

ステップホイール装置の主な利点として(1)モデル生物であるマウスを用いる事が出来る (2)ペグパターンを変更する事が出来る、の 2 点が挙げられる。本研究は、本装置を遺伝子欠損マウスに適応した初めての研究であり、その有用性を示すとともに、従来から使用されてきたローターロッド装置との比較から、その性質の違いを示す事が出来た。今後、更に運動機能、運動学習を研究する上で、この装置の有効性が発揮される事が望まれる。

## 実験材料と方法

### 実験動物

nNOS KO マウス(Huang et al., 1993)は業者（日本チャールズリバー）より購入し、C57BL/6J マウス（日本チャールズリバー）と交配、繁殖させた。各マウスの耳の組織から抽出したゲノム DNA による PCR 法で遺伝型を確認した。

D1R KO マウスおよび D2R KO マウスは先行研究(Yamaguchi et al., 1996; Tran et al., 2002, 2005, 2008)と同様の方法により作成し、C57BL/6J マウス（日本クレア）と 10 世代以上に渡る戻し交配を行った。各マウスの尾の組織から抽出したゲノム DNA による PCR 法で遺伝型を確認した。対照群として C57BL/6J マウスを業者より購入し、実験に使用した。D1R KO、D2R KO マウス作成は共同研究者である佐藤朝子博士と笹岡俊邦教授が行ったものである。

室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  に調整された室内で、12 時間の明暗周期下で飼育した。実験に使用する動物の頭数は必要最小限とし、動物が受ける苦痛、ストレスは最小限となるように努力した。全ての実験は日本文部科学省の指針に則り、自然科学研究機構、北里大学の実験動物委員会の承認を得て行った。

### 運動行動課題

実験には成熟オスマウスを用いた。実験開始時のマウスの月齢は、第 1 章の実験は 3 ヶ月齢、第 2 章の実験は 6 ヶ月齢、第 3 章の実験は WT マウス 3 ヶ月齢（結果 3-1 の実験）と 10 ヶ月齢、D1R KO、D2R KO マウス 11 ヶ月齢（結果 3-2 の実験）であった。各マウスは 1 匹ずつプラスチックケージに個別飼育した。12 時間の明暗周期（明期 9～21 時）を設定し、餌（Rodent Diet CE-2、日本クレア）と水は自由摂取とした。D1R KO マウスは食べやすいように小型の餌（Rodent Diet B-F、日本クレア）をケージ内に撒き餌することで、摂食量を確保して健康状態を維持させた(Drago et al., 1994; McNamara et al., 2003)。行動課題前には約 1 週間の予備飼育を行い、その間は体重測定とハンドリングを行った。ステップホイール課題、ローターロッド課題は明期の間（13～19 時）に実施した。ステップホイール課題の期間内は、マウスの飲水量を制限した。

### ステップホイール装置

ステップホイール装置（小原医科産業）は私の研究室で開発した装置である(Kitsukawa et al., 2011) (**Figure 1**)。この装置のホイールはモーターによって一定速度で回転する。トレーニングすることで、マウスは報酬として飲水を

るために足場となるペグ上を走るようになる。ペグの配列は実験者により変更、調整する事が可能である。先行研究(Kitsukawa et al., 2011)の方法から、以下の点を変更した。

第1章の実験では、トレーニング期間としてペグパターン B1 (前後のペグ間隔 14mm) で約 2 週間計 13 回の試行を行い、回転速度は 1 日目の 30 回転/分から徐々に速め、最終日には 7.5 回転/分とした。この期間中、健康状態や動きから衰弱していると判断したホモ KO マウス 2 匹はリタイアさせた。トレーニング後の第 1 セッショングループからは回転速度は 7.5 回転/分、一試行は 40 回転(約 5 分間) とし、一日 1 回の試行を行った。ペグパターンはセッショングループ毎にペグパターン A、C1、C2、C1、B1、C1 と設定した (Figure 1C)。ペグパターン A は左右交互にペグを配置し、マウスの典型的な走行パターンの足運びに合うように調整した。ペグパターン B1 はペグの配置を気にしなくても走行出来るよう、多くのペグを左右並列に配置して、簡単な課題となるように調整した。ペグパターン C1、C2 はペグの前後の間隔、左右の順番をバラバラに配置し、規則的なペグパターン A、B とは異なる複雑なパターンとなるように調整した。連続 8 日間を一つのセッショングループ (ただし第 5 セッショングループのみ 3 日間) とし、セッショングループ間は 2 日間の休日を設け、この間はケージ内にて給水を行った。第 4、5 セッショングループの間には約 3 週間の通常飼育期間を設けた。

第 2 章の実験では 2 つの単純なペグ配列、ペグパターン A とペグパターン B2 を用いた (Figure 1C)。ペグパターン B はペグパターン A に更に 2 倍の数のペグを追加配置し、より簡単な配列となるように調整した。予備実験の結果から、ドーパミン受容体 KO マウスは複雑なペグ配列では走行が困難であったため、単純なパターンのみ使用した。第 2 章のステップホイール課題は、ローターロード課題の後、1~4 週間の通常飼育期間を設け、その後実施した。2 日間の飲水制限の後、連続 3 日間のプレセッションを設け、この間マウスは静止したホイール内で自由に行動させ、給水口から飲水出来るようにした。これによってマウスが装置に慣れ、また給水口の位置を覚えるようにした。この時のペグ配列はペグパターン B2 とした。セッショングループ間には 1 日間の休日を設け、この間マウスにはホームケージ内で 4 分間の自由飲水時間を与えた。次のステップホイール課題の最初のテストにおいて、速度は 2 回転/分、ペグ配列はペグパターン A に設定した。同一のセッショングループの間は実験条件 (ペグ配列、回転速度、1 試行当たりの回転数) は一定とした。1 試行は約 3 分間とした。マウスの健康状態を維持するために、試行終了から 30 分後に 2 分間の給水時間を設け、マウスはホームケージ内で自由に飲水出来るようにした。第 1 の

テストは14日間（うち7日目と8日目の間に1日の休日）行った。この後、2～4週間の通常飼育期間（自由飲水）を設け、続いて、第2のテストを行った。第2のテストではペグパターンB2で回転速度を徐々に速める条件下で運動機能を調べた。このテストは連続5日間を1セッショングループとし、セッショングループが進むにつれて回転速度を上げ、第1～第7セッショングループで、それぞれの速度は2、3、4、5、6、7.5、10回転/分とした。

ステップホイール課題でのマウスの成績を評価するため、*Touch Time*（接触時間、踏み外し時間）、*Water On Time*（擬似飲水時間）、*Turn Stop*（回転停止回数）の3つの指標を用いた。*Touch Time*とは、ホイールの下方に設置した床板にマウスが接触した時間であり、これは接触センサーにより検出した（**Figure 1A**）。*Touch Time*は、マウスが適切にペグをつかめずにその下の床板に接触した時間を示す。*Water On Time*とは、給水口の直前に設置した赤外線センサー（フォトビーム a : PBa）を遮っている時間であり、マウスが飲水できるまでに十分給水口に近付いている時間を表す（**Figure 1A、B**）。*Touch Time*と*Water On Time*のデータは1試行における割合（%）で示した。*Turn Stop*とは、ホイールの最後方に設置した赤外線センサー（フォトビーム b : PBb）を遮った回数であり、マウスがホイールの回転を止めた回数を示す（**Figure 1A、B**）。この装置はマウスの安全を守るため、マウスがホイールの回転速度について行けずに最後方に流された場合に自動的に停まるように設計されている。

### ローターロッド課題

ローターロッド装置（室町機械、MK-660A）は、ロッドの直径3 cm、回転速度一定の仕様の物を用いた。本研究では、高速回転条件として15 rpm、低速回転条件として5 rpmの2つを設定した。1試行は次の3つの事象が起きた場合に終了とした。マウスが(1)ロッドから落下した時、(2)ロッド上に乗ったまま120秒経過した時、(3)ロッドにしがみついて2回転した時（落下と同等とみなした）。このいずれかが起きるまでの時間を、保持時間（retention time、秒）として記録した。一日3試行行い、試行と試行の間は30～60秒間ホームケージで待機させた。プレセッションとして、連続3日間静止したロッド（0 rpm）に載せてマウスを装置に慣れさせた。プレセッションの後、連続7日間のランニングセッションを開始した。第1と第2のセッショングループの間には1日間の課題を行わない休日を設け、マウスはホームケージ内で過ごした。

### 自発活動量測定

成熟オスマウス（2～8ヶ月齢）をプラスチックケージに1匹ずつ個別飼育した。12時間の明暗周期（明期8～20時）を設定し、餌（Rodent Diet CA-1、日本クレア）と水は自由摂取とした。活動量の測定開始前、翌8時までを馴化期間として設けた。ホームケージ内の自発活動は、ケージ上に設置した焦電赤外線センサー（小原医科産業）を用いて測定した(Paemka et al., 2013)。このセンサーはマウスからの放射熱を検出し、水平方向の移動、立ち上がり、蓋に登る動きを含めた全ての動きを検出、計測することが出来る。センサーに接続したコンピューターにより10分毎の活動を記録した。活動量の解析として、動きの回数によって、無活動状態（10分間に0～9回）、低活動状態（10～199回）、中活動状態（200～499回）、高活動状態（500回以上）の4段階に活動状態を分類し、各状態でいた時間的割合を算出した。また、無活動状態を10分間に9回以下、活動状態を10分間に10回以上として2つに分類し、一区切りの活動に関する解析として、それぞれの状態の時間と回数を算出した。自発活動量測定の実験は、共同研究者である佐藤朝子博士と笹岡俊邦教授が行ったものである。

### 摂食量、飲水量測定

摂食量、飲水量の測定は自発活動量の測定と同時に行った。餌の容器と飲水瓶の重量をデジタル計量器（小原医科産業）により測定し、接続したコンピューターにより10分毎の重量変化を自動的に記録した(Paemka et al., 2013)。ケージ内のマウスの全ての行動は赤外線照明とCCDカメラにより撮影し、記録したデータが適切に行動を反映しているか確認した。摂食量飲水量測定の実験は、共同研究者である佐藤朝子博士と笹岡俊邦教授が行ったものである。

### 線条体薬物投与

約2週間のステップホイール課題のトレーニングの後、カテーテル留置手術を行った。マウスに全身麻酔（キシラジン 10mg/kg + ペントバルビタール 25mg/kg の腹腔内投与）を施した後、マウス脳地図(Paxinos G., 1997)を参考に、Bregma より AP 0.74 mm, ML 2.1 mm, DV 2.8 mm をターゲットに、両側の線条体にガイドカテーテル（外形 0.45 mm）を挿入し、歯科用セメントにて固定した。手術後、約1週間の回復期において第1セッショングループのステップホイール課題を開始した。薬物投与はステップホイール課題の試行開始30分前に行った。マイクロシリリング（ハミルトン）を接続したインターナルカテーテル（外形 0.2 mm）をガイドカテーテルに挿入し、1分間かけて薬物を投与し

た。NOS 阻害剤として、SMTC (s-methyl-L-thiocitrulline、シグマ M5171、低濃度 10  $\mu\text{mol}$  / 0.2  $\mu\text{l}$ 、高濃度 100  $\mu\text{mol}$  / 0.2  $\mu\text{l}$ ) と L-NAME (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine、シグマ N5751、低濃度 10  $\mu\text{mol}$  / 0.3  $\mu\text{l}$ 、高濃度 100  $\mu\text{mol}$  / 0.3  $\mu\text{l}$ )、NO 依存性グアニル酸シクラーゼ阻害剤として ODQ (1H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one、シグマ 03636、低濃度 0.01nmol / 0.2  $\mu\text{l}$ 、高濃度 1nmol / 0.2  $\mu\text{l}$ ) を投与した。薬物の選定、濃度決定には先行研究を参考にした(Salter et al., 1995; Southan and Szabó, 1996; Del Bel et al., 2004; Echeverry et al., 2007)。全ての実験終了後、マウスの脳を摘出し、カテーテルの位置を確認した。

### カタレプシーテスト

薬物投与から 20、60、120 分後に、カタレプシーテストとして hanging bar test を実施した(Sanberg et al., 1988; Del Bel et al., 2002, 2004)。床と水平に設置した高さ 4.5 cm、直径 5 mm のプラスチック製の棒にマウスの前肢を掛け、後肢での二足立ちの状態にし、その 30 秒後から時間計測を開始した。記録は次のいずれかが起こるまで測定し、最大 120 秒までとした。(1)前肢の片方または両方が完全に棒から離れる、(2)後肢の片方または両方が完全に床から離れる(棒に登ってしまう)。

### ローターロッド課題後の小脳 IEG 発現

第 3 章、結果 3-1 の実験では、WT マウスをランダムに Naïve 群 (n = 2)、Day1 群 (n = 3)、Day2 群 (n = 3)、Day1 群 (n = 5) の 4 群に分けた。Day1、2、5 群は 1 週間の予備飼育の後、プレセッションとして 1 日だけ、静止したロッド (0 rpm) に乗せた。乗せた時間は最大 5 分間で、途中で落下した場合は再び乗せて累積で 5 分になるようにした。その翌日から、10 rpm にて最大 60 秒まで、一日 5 試行の走行課題をそれぞれの群の日数 (1、2、7 日間) 課した。走行開始から 30 分後に断頭して脳を摘出した。

第 3 章、結果 3-2 の実験で用いた D1R KO、D2R KO および対照群の WT マウスは第 2 章の実験で使用したマウスの一部である。第 2 章にあるようにローターロッドとステップホイール課題を一定期間行った後、1~2 週間の通常飼育期間の後にローターロッド課題を課した (**Figure 25**)。プレセッションとして 3 日間、静止したロッド (0 rpm) に乗せる期間を設けた翌日、5 rpm にて最大 120 秒まで、一日 3 試行の走行課題を行った。Pre 群 (WT、n = 2 ; D1R KO、n = 2 ; D2R KO、n = 2) はサンプリング当日には走行させず、Day1 群 (WT、n =

3 ; D1R KO、n = 3 ; D2R KO、n = 3)、Day 5 群 (WT、n = 3 ; D1R KO、n = 2 ; D2R KO、n = 3) は走行開始から 30 分後に断頭して脳を摘出した。

第 3 章、結果 3-3 の実験では、WT マウスをランダムに 30 分群 (n = 3) と 24 時間群 (n = 3) の 2 群に分けた。約 2 週間の予備飼育の後、静止したロッド (0 rpm) に 120 秒間乗せ、これを一日 3 試行行った。(これは前述「結果 3-2」の実験におけるプレセッションと同じ内容である。) 30 分群は 3 日目の最後の試行から 30 分後に、24 時間群は 24 時間後 (翌日) に断頭して脳を摘出した。

### ハンドリング処置

小脳における IEG 発現を調べたマウスは、Naïve マウスを除いて全て体重測定 (ハンドリング) を行っていた。そのため、実験者の手で扱われる事による刺激を受けた可能性が考えられ、その影響を調べるために、他の行動課題を行わず、ハンドリング処置のみを施した群を作成した。このハンドリングマウスは一日約 3 分間、実験者の手のひらに載せる (合わせて体重測定も行った) という処置を約 1 週間行い、最終日のハンドリングから 30 分後に断頭して脳を摘出した。比較として Naïve マウスは、何の処置も与えずに同じ期間飼育し、脳を摘出した。

### *In situ* ハイブリダイゼーション法

ISH 法は先行研究(Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser, 1993; Liang et al., 2000; Komatsu et al., 2005; Hirano et al., 2012)を参考に、以下のように若干の調整をした。用いたプローブの情報は **Table 1** に示す。摘出した脳はすぐに OCT コンパウンド (サクラファインテック) に包埋して凍結保存した。クライオスタット (ライカ CM3050) を用いて 10 $\mu$ m の小脳矢状断切片を作成し、スライドガラス (マツナミ MAS コート) に貼り付けて風乾した後に凍結保存した。4%パラホルムアルデヒド (4% PFA in 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.3)) で 15 分間固定し、PBS (pH 7.3) で 3 回洗浄した。アセチル化溶液 (0.25% 無水酢酸、0.1 M トリエタノールアミン、0.1 $\times$  塩酸, pH 8.0) に 10 分間浸透させ、PBS で 3 回洗浄した。プレハイブリダイゼーションとして、ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、5 $\times$  SSC (20 $\times$  SSC、3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0)、5 $\times$  デンハルト溶液、250  $\mu$ g/ml yeast tRNA、500  $\mu$ g/ml サケ精子 DNA) に 30 分間浸潤させた。ジゴキシゲニン標識した cRNA プローブを 2 分間 82 $^{\circ}$ C で加熱した後に氷冷し、ハイブリダイゼーション溶液に加えて 1  $\mu$ g/ml に濃度調整した後、サンプル切片のスライドに載

せ、カバーガラスで覆った。乾燥しないよう湿箱 (50%ホルムアミド、5×SSC) に入れて 72°Cで一晩 (14~18 時間) 保温し、ハイブリダイゼーションさせた。0.2×SSC で3回、72°Cに保温して洗浄し、TBS pH 7.5 (100 mM 塩酸トリス pH 7.5、150mM 塩化ナトリウム) で平衡化させた。プローブを検出する為に1×ブロッキング、TBS 溶液 (ロシユ) に 30 分浸潤させた後、ブロッキング溶液で 1000 倍希釈したアルカリホスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体 (ロシユ) をサンプルに載せ、4°Cで一晩保温し、反応させた。TBS pH 7.5 で3回洗浄し、TBS pH 9.5 (100 mM 塩酸トリス pH 9.5、100 mM 塩化ナトリウム、50 mM 塩化マグネシウム) に 10 分間平衡化させた。酵素活性を可視化させるために、0.2 mM NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 0.2 mM nitro blue tetrazolium) TBS pH9.5 溶液をスライドに載せて暗所にて反応させた。切片が十分に染色したら、PBS と蒸留水で洗浄後、エタノール溶液で脱水した。キシレンに浸潤後、エンテランニュー (メルク) でスライドを封入した。

#### データ解析と統計処理

ステップホイール課題、ローターロッド課題のデータについて、3 群間での比較はノンパラメトリック検定であるクラスカル・ウォリス検定 (Kruskal-Wallis test) の後、マン・ホイットニーの U 検定 (Mann-Whitney U-test) により統計解析し、同じ群内の 1 日目とその他それぞれの日の比較はダネット検定 (Dunnett test) の後に多重比較を用いた。自発活動量と摂食量、飲水量の測定データは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、テューキーの検定 (Tukey's test) により統計解析した。自発活動量と摂食量、飲水量の測定データ解析は共同研究者である佐藤朝子博士と笹岡俊邦教授が行ったものである。

Tabel 1. ISH probes

<b>Probe name</b>	<b>Position</b>	<b>Reference</b>
<i>arc</i>	1238 - 1928	NM_001276684.1
<i>c-fos</i>	1-1291	NM_010234.2
<i>c-jun</i>	899 - 1922	NM_010591.1
<i>fos-B</i>	317 - 1149	XM_006539544.1
<i>jun-B</i>	319 - 1359	NM_008416.1
<i>jun-D</i>	1317 - 2291	NM_001286944.1
<i>krox 20 (Egr2)</i>	287 - 1338	XM_006513213.1
<i>zif-268 (Egr1)</i>	284 - 1866	NM_007913.5

## 謝辞

本研究に際しまして、多くの方々のご支援ご協力を頂きました。

本研究に取り組む機会と環境、そして懇切なご指導ご鞭撻を賜りました、自然科学研究機構 基礎生物学研究所 脳生物学研究部門 山森哲雄 教授に、謹んで感謝の意を表します。技術的なご指導、研究の方針やデータ解釈のご助言を頂きました、大阪大学大学院 生命機能研究科 時空生物学講座 心生物学研究室 木津川尚史 准教授に心から感謝の意を表します。D1R KO、D2R KO マウスを用いた共同研究にて、ご協力とご助言を賜りました、新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター 笹岡俊邦 教授、北里大学 医学部 実験動物学 佐藤朝子 博士に心から感謝の意を表します。自然科学研究機構 基礎生物学研究所 脳生物学研究部門の多くの先輩方、同輩、スタッフの方々のご協力とご助言のおかげで本研究を行うことが出来ました。ここに感謝の意を表します。また、多くの実験動物の犠牲なしに本研究は成し得ませんでした。科学研究に貢献する全ての実験動物に対して、ここに深い感謝と哀悼の意を表します。最後に、長年にわたる支援を惜しまず与えてくれた両親家族に心から感謝いたします。

## 参考文献

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12:366–75
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13:266–71
- Baik J-H, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Meur M Le, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377:424–8
- Bel E a Del, Souza a S, Guimarães FS, da-Silva C a, Nucci-da-Silva LP (2002) Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 161:32–7
- Bel E a. Del, Silva C a. da, Guimarães FS, Bermúdez-Echeverry M (2004) Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 485:175–181
- Bostan AC, Dum RP, Strick PL (2013) Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends Cogn. Sci.* 17:241–54
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, Pisani a, Bernardi G (1999) A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J. Neurosci.* 19:2489–99
- Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavón N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R, Calabresi P (2003) Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 23:8506–12
- Cerminara NL, Edge AL, Marple-Horvat DE, Apps R (2005) The lateral cerebellum and visuomotor control. *Prog. Brain Res.* 148:213–26
- Clifford JJ, Kinsella A, Tighe O, Rubinstein M, Grandy DK, Low MJ, Croke DT, Waddington JL (2001) Comparative, Topographically-Based Evaluation of Behavioural Phenotype and Specification of D1-Like: D2 Interactions in a Line of Incipient Congenic Mice with D2 Dopamine Receptor “Knockout.” *Neuropharmacology* 25:527–36

Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 835:18–26

Curran T, Morgan JI (1995) Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J. Neurobiol.* 26:403–12

Dawson TM, Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14:5147–59

Doya K (2000) Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:732–9

Doyon J, Bellec P, Amsel R, Penhune V, Monchi O, Carrier J, Lehéricy S, Benali H (2009) Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. *Behav. Brain Res.* 199:61–75

Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP (1994) Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:12564–8

Durieux PF, Schiffmann SN, Kerchoue d'Exaerde A de (2012) Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J.* 31:640–53

Echeverry MB, Salgado ML, Ferreira FR, da-Silva C a, Bel E a Del (2007) Intracerebroventricular administration of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibitors induces catalepsy in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 194:271–8

Edge AL, Marple-Horvat DE, Apps R (2003) Lateral cerebellum: functional localization within crus I and correspondence to cortical zones. *Eur. J. Neurosci.* 18:1468–1485

Elmer, G. I., Pieper, J. O., Rubinstein, M., Low, M. J., Grandy, D. K., and Wise, R. A. (2002). Failure of intravenous morphine to serve as an effective instrumental reinforcer in dopamine D2 receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* 22.

- Fowler SC, Zarccone TJ, Vorontsova E, Chen R (2002) Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20:309–21
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23:S64–70
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–32
- Gingrich JA, Caron MG (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:299–321
- Grahn J a, Parkinson J a, Owen AM (2008) The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog. Neurobiol.* 86:141–55
- Graybiel a M (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:733–41
- Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 31:359–87
- Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50:83–107
- Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S (2010) Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896–907
- Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H (2002) Central mechanisms of motor skill learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12:217–22
- Hirano K, Kaneko R, Izawa T, Kawaguchi M, Kitsukawa T, Yagi T (2012) Single-neuron diversity generated by Protocadherin- $\beta$  cluster in mouse central and peripheral nervous systems. *Front. Mol. Neurosci.* 5:90
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 14:173–213

Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR (2004) Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology* 47:1117–34

Hosp J a, Pekanovic A, Rioult-Pedotti MS, Luft AR (2011) Dopaminergic projections from midbrain to primary motor cortex mediate motor skill learning. *J. Neurosci.* 31:2481–7

Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75:1273–86

Imamizu H, Miyauchi S, Tamada T, Sasaki Y, Takino R, Pütz B, Yoshioka T, Kawato M (2000) Human cerebellar activity reflecting an acquired internal model of a new tool. *Nature* 403:192–5

Ito M (1982) Cerebellar control of the vestibulo-ocular reflex--around the flocculus hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 5:275–96

Jung MY, Skryabin B V, Arai M, Abbondanzo S, Fu D, Brosius J, Robakis NK, Polites HG, Pintar JE, Schmauss C (1999) Potentiation of the D2 mutant motor phenotype in mice lacking dopamine D2 and D3 receptors. *Neuroscience* 91:911–24

Katoh a, Kitazawa H, Itohara S, Nagao S (2000) Inhibition of nitric oxide synthesis and gene knockout of neuronal nitric oxide synthase impaired adaptation of mouse optokinetic response eye movements. *Learn. Mem.* 7:220–6

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18:527–35

Kelly M a, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt G a, Grandy DK, Low MJ (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J. Neurosci.* 18:3470–9

Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ (1997) Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19:103–13

Kim KS, Yoon YR, Lee HJ, Yoon S, Kim S-Y, Shin SW, An JJ, Kim M-S, Choi S-Y, Sun W, Baik J-H (2010) Enhanced hypothalamic leptin signaling in mice lacking dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 285:8905–17

Kitsukawa T, Nagata M, Yanagihara D, Tomioka R, Utsumi H, Kubota Y, Yagi T, Graybiel AM, Yamamori T (2011) A novel instrumented multipeg running wheel system, Step-Wheel, for monitoring and controlling complex sequential stepping in mice. *J. Neurophysiol.* 106:479–487

Kobayashi M, Iaccarino C, Saiardi A, Heidt V, Bozzi Y, Picetti R, Vitale C, Westphal H, Drago J, Borrelli E (2004) Simultaneous absence of dopamine D1 and D2 receptor-mediated signaling is lethal in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:11465–70

Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T (2005) Retinol-binding protein gene is highly expressed in higher-order association areas of the primate neocortex. *Cereb. Cortex* 15:96–108

Lev-Ram V, Nebyelul Z, Ellisman MH, Huang PL, Tsien RY (1997) Absence of cerebellar long-term depression in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Learn. Mem.* 4:169–77

Liang F, Hatanaka Y, Saito H, Yamamori T, Hashikawa T (2000) Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 416:475–95

Linden DJ, Dawson TM, Dawson VL (1995) An evaluation of the nitric oxide/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in the induction of cerebellar long-term depression in culture. *J. Neurosci.* 15:5098–105

Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth A (1991) Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J. Physiol.* 434:183–213

McNamara FN, Clifford JJ, Tighe O, Kinsella A, Drago J, Croke DT, Waddington JL (2003) Congenic D1A dopamine receptor mutants: ethologically based resolution of behavioural topography indicates genetic background as a determinant of knockout phenotype. *Neuropsychopharmacology* 28:86–99

Molina-Luna K, Hertler B, Buitrago MM, Luft AR (2008) Motor learning transiently changes cortical somatotopy. *Neuroimage* 40:1748–54

- Moore RY, Bloom FE (1978) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu. Rev. Neurosci.* 1:129–69
- Murer, M. G., Dziewczapolski, G., Salin, P., Vila, M., Tseng, K. Y., Ruberg, M., Rubinstein, M., Kelly, M. a, Grandy, D. K., Low, M. J., et al. (2000). The indirect basal ganglia pathway in dopamine D(2) receptor-deficient mice. *Neuroscience* 99, 643–50
- Nakagami Y, Watakabe A, Yamamori T (2013) Monocular inhibition reveals temporal and spatial changes in gene expression in the primary visual cortex of marmoset. *Front. Neural Circuits* 7:43
- Nakazawa K, Karachot L, Nakabeppu Y, Yamamori T (1993) The conjunctive stimuli that cause long-term desensitization also predominantly induce c-Fos and Jun-B in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* 4:1275–8
- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1995) Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378:383–6
- O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265:542–6
- Paemka L et al. (2013) PRICKLE1 Interaction with SYNAPSIN I Reveals a Role in Autism Spectrum Disorders. *PLoS One* 8:e80737
- Paxinos G, Franklin K. B. J. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego (CA): Academic Press.
- Perkel DJ, Hestrin S, Sah P, Nicoll RA (1990) Excitatory synaptic currents in Purkinje cells. *Proc. Biol. Sci.* 241:116–21
- Reynolds J, Wickens J (2000) Substantia nigra dopamine regulates synaptic plasticity and membrane potential fluctuations in the rat neostriatum, in vivo. *Neuroscience* 99:199–203
- Risinger, F. O., Freeman, P. a., Rubinstein, M., Low, M. J., and Grandy, D. K. (2000). Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 152, 343–350

- Salter M, Duffy C, Garthwaite J, Strijbos PJ (1995) Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N omega-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME). *Neuropharmacology* 34:639–49
- Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB (1988) The catalepsy test: its ups and downs. *Behav. Neurosci.* 102:748–59
- Santori EM, Der T, Collins RC (1986) Functional Metabolic Mapping During Forelimb II . Stimulation of Forelimb Muscles Movement in Rat . 6:463–474
- Sano, H., Yasoshima, Y., Matsushita, N., Kaneko, T., Kohno, K., Pastan, I., and Kobayashi, K. (2003). Conditional ablation of striatal neuronal types containing dopamine D2 receptor disturbs coordination of basal ganglia function. *J. Neurosci.* 23, 9078–88.
- Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A (1993) A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100:431–40
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha R a, Ferré S (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* 83:277–92
- Schultz W (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30:259–88
- Smith DR, Striplin CD, Geller a M, Mailman RB, Drago J, Lawler CP, Gallagher M (1998) Behavioural assessment of mice lacking D1A dopamine receptors. *Neuroscience* 86:135–46
- Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87:1015–23
- Soto PL, Grandy DK, Hursh SR, Katz JL (2011) Behavioral economics of food reinforcement and the effects of prefeeding , extinction , and eticlopride in dopamine D 2 receptor mutant mice. :775–784
- Southan GJ, Szabó C (1996) Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 51:383–94

- Tian J Bin, Bishop GA (2002) Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum. *J. Chem. Neuroanat.* 23:157–70
- Tran AH, Tamura R, Uwano T, Kobayashi T, Katsuki M, Ono T (2002) Altered accumbens neural response to prediction of reward associated with place in dopamine D2 receptor knockout mice. *Proc. ...* 99:8986–91
- Tran AH, Tamura R, Uwano T, Kobayashi T, Katsuki M, Ono T (2005) Dopamine D1 receptors involved in locomotor activity and accumbens neural responses to prediction of reward associated with place. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:2117–22
- Tran AH, Uwano T, Kimura T, Hori E, Katsuki M, Nishijo H, Ono T (2008) Dopamine D1 receptor modulates hippocampal representation plasticity to spatial novelty. *J. Neurosci.* 28:13390–400
- Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N (2006) Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J. Pharmacol. Sci.* 102:147–54
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24:125–132
- Waddington JL, O’Tuathaigh C, O’Sullivan G, Tomiyama K, Koshikawa N, Croke DT (2005) Phenotypic studies on dopamine receptor subtype and associated signal transduction mutants: insights and challenges from 10 years at the psychopharmacology-molecular biology interface. *Psychopharmacology (Berl).* 181:611–38
- Wahlsten D et al. (2003) Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J. Neurobiol.* 54:283–311
- Wall VZ, Parker JG, Fadok JP, Darvas M, Zweifel L, Palmiter RD (2011) A behavioral genetics approach to understanding D1 receptor involvement in phasic dopamine signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 46:21–31
- Xu M, Cooper DC, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1994)(a) Elimination of Cocaine-Induced Hyperactivity and Dopamine-Mediated Neurophysiological Effects amine D1 Receptor Mutant Mice. *Cell* 79:945–955

Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel a M, Tonegawa S (1994)(b) Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 79:729–42

Yamaguchi H, Aiba A, Nakamura K (1996) Dopamine D2 receptor plays a critical role in cell proliferation and proopiomelanocortin expression in the pituitary. *Genes Cells* 1:253–68

Yamamori T, Mikawa S, Kado R (1995) Jun-B expression in Purkinje cells by conjunctive stimulation of climbing fibre and AMPA. *Neuroreport* 6:793–6

Yanagihara D, Kondo I (1996) Nitric oxide plays a key role in adaptive control of locomotion in cat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:13292–7

Zangenehpour S, Chaudhuri A (2002) Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 109:221–5

Zheng F, Luo Y, Wang H (2009) Regulation of brain-derived neurotrophic factor-mediated transcription of the immediate early gene *Arc* by intracellular calcium and calmodulin. *J. Neurosci. Res.* 87:380–92