

論文の内容の要旨

論文題目 **Molecular and Behavioral Analyses of Contextual Memory Formation in Mice.**

和訳 マウスの文脈記憶形成に関する
分子・行動学的解析

指導教官 三品昌美 教授
東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 城山優治

我々は、NMDA 受容体 GluRε1 サブユニットのノックアウトマウスにおいて、その電気生理学的・行動学的な解析を行った。

導入：

NMDA 型のグルタミン酸受容体 GluR チャンネルは、GluRεと GluRζの2種類のサブファミリーから構成されており、中枢神経系のシナプス可塑性に関わる分子である。GluRεサブファミリーには、中枢神経で発達段階に応じて異なる発現を示す4種類の分子が存在し、チャンネル特性の機能的多様性を決定している。GluRε1 サブユニットは、生後1週間より前脳において発現開始し、Mg²⁺の感受性が高いチャンネルを構成する。このサブユニットの生理機能を明らかにする為、我々は GluRε1 の欠損マウスを作成し、シナプス可塑性と学習能力を測定した。このマウスでは、海馬CA1野におけるNMDA受容体電流が野生型マウスの約半分に減少し、シナプス長期増強(LTP)の程度が減少しており、更にモリス水迷路学習の能力の低下が見出されている。以上の結果から、GluRε1 サブユニットは、前

脳におけるシナプス可塑性と学習・記憶に関与していると示唆された。

我々は、GluRε1 欠損マウスにおける LTP 減少のメカニズムを明らかにする事、および海馬 NMDA 受容体に依存し、且つ条件刺激を定量的に変化させられるなどの特性を持つ文脈依存性恐怖条件付けを用いて GluRε1 欠損マウスの学習能力を明らかにする事を目的として、以下の実験を行った。

結果：

GluRε1 サブユニット欠損マウスでは通常の高頻度刺激(tetanus)による海馬 CA1 野の LTP のレベルが野生型マウスに比べて減少しているが、より強い tetanus 刺激を加えると LTP のレベルは上昇し、その飽和レベルにおいては野生型マウスと差が無いことが示された。以上の結果から、GluRε1 サブユニット欠損マウスでは、LTP 誘導の閾値が上昇していることが示された。

また、通常の状態による文脈依存性恐怖条件付けを行ったところ、GluRε1 欠損マウスでは大きな学習欠損は見出されなかった。そこで、我々は GluRε1 欠損マウスを C57BL/6 マウスとバッククロスを行い、遺伝子背景の約 99.99%が C57BL/6 由来となる GluRε1 欠損マウスのラインを確立した。このバッククロスにより得られた野生型マウスの学習成績は、C57BL/6 マウスとほぼ同レベルであることが確認された。このバッククロスマウスにおいて、通常の状態条件で音依存性、文脈依存性恐怖条件付けを行ったが、その成績は野生型と同程度であった。また、文脈依存性恐怖条件付けにおいて、非条件刺激として用いている電気ショックの電流を 0.5mA から 0.2mA に弱めたが、学習能力の差は見出されなかった。しかし、条件刺激として用いている電気ショック前の実験箱の探索時間を、従来の 3 分間から 20 秒間に短縮したところ、GluRε1 欠損マウスの学習成績は野生型マウスに比べて明らかに低下していることを見出した。更に探索時間を変えて検討した結果、実験箱の探索時間が 20 秒間～1 分間の時にのみ有意な学習能力の低下が見出された。以上の結果から、GluRε1 サブユニット欠損マウスでは文脈依存性恐

怖条件付けの獲得において十分な実験箱の探索時間が必要なことから、学習の閾値が上昇していることが示された。

更に、GluR ϵ 1 欠損マウスでは条件付けにおける電気ショック直後の実験箱内での少量の Freezing 反応 (Freezing Immediately After Shock, FIAS) においても有意な学習成績の低下が見いだされた。しかし、FIAS は上記の文脈記憶の結果とは異なり、実験箱の探索時間を長くしても野生型と比べて低いままであった。また、Conditioning 終了後にマウスを一旦飼育箱に戻して1分後に実験箱に戻すと、GluR ϵ 1 サブユニット欠損マウスの Freezing 反応は大きく上昇し、野生型マウスとの有意差が消失した。

討論：

GluR ϵ 1 欠損マウスでは、LTP の閾値が上昇し、且つ飽和レベルに差が無かった。このことから、GluR ϵ 1 サブユニット欠損マウスは LTP の誘導の機構に障害があり、それ以降の LTP 発現の機構には影響を受けていないと考えられた。海馬では NMDA 受容体 ϵ サブユニットとして GluR ϵ 1 の他に GluR ϵ 2 サブユニットも発現していることから、今回の解析で LTP が完全に消失しなかった原因は残存する GluR ϵ 2 の機能によるものと考えられる。

本実験の行動解析では、マウスの遺伝子背景を均一化し、また定量的な解析手法を導入した。その結果、GluR ϵ 1 サブユニット欠損マウスでは、文脈依存性恐怖条件付けにおいても学習誘導の閾値が上昇し、且つ飽和レベルに差が無かった。GluR ϵ 1 欠損マウスでは、LTP と文脈依存学習の両方の閾値が上昇し、これらの相関性が高いことが示された。このことから、海馬 CA1 野の LTP が文脈依存学習の生理的メカニズムであるという仮説を強く支持する結果となった。

一方、GluR ϵ 1 欠損マウスは FIAS が顕著に低下しており、それは刺激条件の増加によっても野生型と同じレベルまで回復することはなかった。この結果から、FIAS と翌日の Freezing は、それぞれ異なる分子メカニズムが関与している事が示唆された。また、Conditioning 終了後にマウスを飼育箱に戻して1分後に実験箱に戻

した場合の実験結果から、FIAS と翌日の Freezing とを区分する要素は、時間経過ではなく箱からの出し入れに伴う実験手続きであることが示唆された。