

論文の内容の要旨

論文題目 瞬目反射古典的条件付けに關与する小脳および海馬シナプス機構

氏 名 岸本 泰司

物事が記憶される時、脳内の何処でどのような変化が起こっているのでしょうか？パプロフ型連合学習の一種である瞬目反射条件づけ(eyeblink conditioning)は、音を条件刺激(CS)とし瞼への侵害刺激を無条件刺激(US)とした時、学習成立後は音だけで、刺激間隔に応じた瞬きの条件応答(CR)が表出される古典的条件付けの一手法である。古典的条件付けは生活体が環境内の2つの事象間の関係を学習する連合学習の1例であるとみなすことができる。それらの事象の一方は一般に意味対象(US)であり、もう一方は一般に学習経験前には生体にとって意味の中性なもの(CS)である。これらの諸事象間の関係を脳内で連合させた結果として、生活体は変化させられ、その変化を行動の修正によって表出する。パプロフ型条件付けは様々な事象間の様々な関係が学習されるものであって、連合学習一般のモデルとなりうると考えられている。古典的条件付けの中でも、瞬目反射条件付けは、關与する脳部位がよく同定されていることから連合学習モデルとしてとりわけ有用である。瞬目反射条件づけにおいて動物は2つの異種情報(CS および US)を意味的かつ時間的に脳内で連合させる。この性質は、我々が日常の意味で用いる“いつ何が起こったのか”という記憶の意味により感覺的に近いものである。しかしながら空間学習における遺伝子改変マウスを用いた行動学的・電気生理学的研究に比べ、古典的条件付けの分子レベルの研究は殆ど進んでいない。そこで本研究はこの学習系を遺伝子ノックアウトマウスに適用することにより、小脳および海馬シナプス可塑性が、瞬目反射 delay 課題(CS と US が同時に提示される)および trace 課題(CS と US の間に無刺激の期間が挿入される)双方の記憶形成にどのように關与して

いるかを明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

1. 小脳長期抑圧(LTD)仮説の検証

小脳はその特徴的な層構造から、パーセプトロンであるというモデルが1969年に提出され(Marr, 1969) 平行繊維-プルキンエ細胞間におけるシナプス伝達が固定したものではなく可変的ならば、この可塑性が運動学習の基礎過程でありうると予測された(Albus JS, 1971)。その後 Ito らは小脳において実際にこの部位にシナプス伝達の投機的な抑圧現象(LTD)が起こることを示し、LTD が関与しうる運動学習として前庭動眼反射とともに瞬目反射条件付けが例示された。そこで、瞬目反射条件付けの LTD 仮説を検討する目的で、LTD 生成の必須分子として同定された一連の遺伝子のノックアウトマウスの delay 課題における学習能力を測定した。その結果グルタミン酸

受容体 $\delta 2$ サブユニット(GluR $\delta 2$)をはじめ、I型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)およびリン脂質加水分解酵素ホスホリパーゼ C $\beta 4$ (PLC $\beta 4$) 欠損マウスにおいても delay 課題において顕著な障害が観察された。これら一連の結果は、mGluR1 \rightarrow PLC $\beta 4$ \rightarrow PKC \rightarrow AMPA-R という、プルキンエ細胞内におけるリン酸化カスケードが小脳 LTD および瞬目条件反射の成立に共通して必須であることを明らかにするものであり、delay 課題における瞬目反射条件付けの小脳 LTD 仮説を強く支持するものとなった(図1)。しかしながら CS 終了と US 開始の間に500msの無刺激期間をもつ trace 課題 (standard-trace conditioning) では GluR $\delta 2$ mutant および PLC $\beta 4$ mutant のいずれにおいても wild-type と同様に学習が成立した。

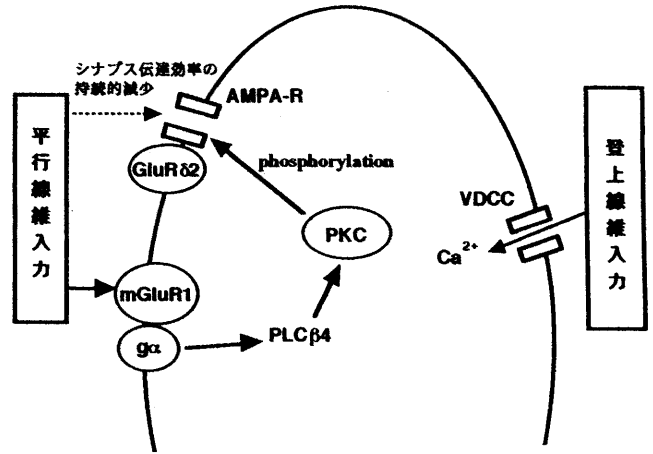


Fig.1. 瞬目反射条件付け delay 課題の基礎過程を担う小脳 LTD の分子機構模式図

2. 海馬機能の関与

小脳 LTD に障害のある mutant でも standard trace 課題で学習が成立する。ではこの場合、その neural substrate は何であろうか？野生型マウスにおいてイボテン酸により両側性に海馬を破壊したり、NMDA 受容体のアンタゴニストを投与すると standard trace 課題が顕著に抑制されたことから、NMDA 受容体依存的な海馬長期増強(LTP)がその候補として考えられた。また、海馬が広い範囲の対象についての空間記憶、陳述記憶またはエピソード記憶に重要なことが、ヒトだけではなく他の動物種でも認識されるようになってきている。そこで瞬目反射条件付けへの海馬 LTP の関与を明らかにする目的で、海馬 CA1 領域の LTP に障害を呈するグルタミン酸受容体サブユニット $\epsilon 1$ (GluR $\epsilon 1$) 欠損マウスで行動解析を行った。

GluRε1 欠損マウスは delay 課題では学習が阻害されなかったのに対し、trace 課題では wild-type に比べ非常に顕著な学習障害を呈した(Figs.2A, B)。この結果は同じく海馬 CA1 野での LTP に障害がある mGluR1 mutant および小脳プルキンエ細胞特異的に mGluR1 を rescue させた mGluR1-rescue mice でも観察された。即ち delay 課題と小脳 LTD との対応の場合と同様に、trace 課題と海馬 LTP の障害の有無に対応関係が見られた (Table 1)。また GluRε1 欠損マウスは CR の獲得率の障害のみならず CR 獲得のタイミングも障害されていた (Fig.2C)。この CR の潜時の攪乱は、mGluR1 mutant および海馬損傷マウスにおいても観察され、海馬がエピソード記憶の一因子である”temporal memory”に関与するとの考えに合致するものであった。

3. CS-US の時間的特性に依存したシナプス可塑性の変化

上記の実験により standard な delay 課題および trace 課題において GluRδ2 および GluRε1 mutant はそれぞれに対し相補的な学習障害を呈することが明らかとなった (Table 1) が、こうした違いを決定的にする両パラダイムの刺激特性は何であろうか？この疑問に答えるために、さらに様々な刺激間隔をもつ条件で delay および trace 課題を 2 種類の mutant mice に行わせた。その結果 GluRδ2 mutant は、CS と US の刺激間隔(interstimulus interval; ISI)によらず、2 刺激の“重なり合い”があれば障害を呈し、ない場合には wild-type と同じように学習が成立することがわかった。すなわち GluRδ2 mutant は 2 事象が同時性をもつときにおいてのみ学習障害を呈した。一方、GluRε1 mutant は 2 刺激の“重なり合い”の有無には依存せず ISI が長くなればなるほどその学習障害の程度は大きくなった。これらの結果より、瞬目反射条件付けにおいて小脳 LTD は 2 刺激の“同時性”を検出しており、海馬は ISI の“長短”を認識している可能性が示唆された。

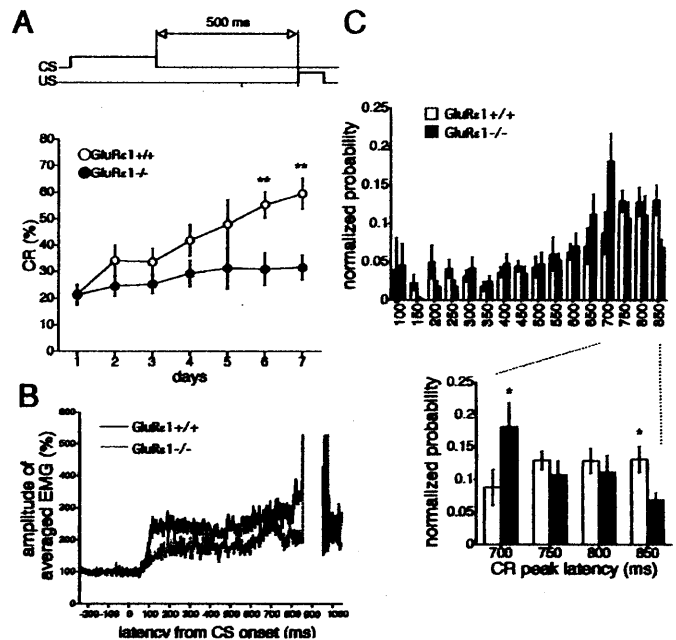


Fig.2. GluRε1 mutant mice における standard trace conditioning. (A) 7日間の acquisition session における CR% の変遷。mutant では顕著な障害が観察される ($P < 0.001$; by two-way ANOVA)。 (B) 7日目の筋電位の加算平均トレース (C) ピーク CR の潜時を表したヒストグラム。 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Table 1. Correlation between eyeblink conditioning and cerebellar/ hippocampal plasticity

KO	Delay EBCC	Trace EBCC	Cerebellar LTD	Hippocampal LTP
GluRδ2	impaired	normal	impaired	not tested ¹
GluRε1	slow	impaired	not tested ²	impaired
PLCβ4	impaired	normal	impaired	not tested ³
mGluR1	impaired	impaired	impaired	impaired

^{1,3} GluRδ2 and PLCβ4 are little expressed in hippocampus.

² GluRε1 is not expressed in cerebellar PCs of adult mice.

4. プリオン蛋白質の小脳シナプス機構における関与

ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病をはじめとするプリオン病は、主に小脳失調および進行性の痴呆を症状とする遺伝性かつ感染性の疾患である。これら病変は正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})に変換されることにより引き起こされるが、 PrP^C 自体の生理機能は未だ明らかではない。しかしプリオン遺伝子の翻訳領域を内在する exon 3 を完全に除去した、ある系統のプリオン蛋白質ノックアウトマウス (*NgskPrnp^{0/0}* mice)は、約 60 週齢を過ぎる頃より小脳プルキンエ細胞の脱落および運動失調を呈することから、小脳機能に重要な役割を果たしている可能性がある。そこで PrP^C の小脳シナプス機能への関与を調べる目的で、whole cell patch clamp 法により *NgskPrnp^{0/0}* mice の小脳スライスにおいてプルキンエ細胞の電気生理学的特性について調べた。paired pulse facilitation 等、基本的な性質に異常は見られなかったが(Fig. 3D)、小脳 LTD に障害が観察された(Fig. 3A-C)。また mutant ではプルキンエ細胞における抑制性シナプス後電流が有意に減少しており神経細胞死との因果関係が示唆された。さらに 16, 40, 60 週齢における *NgskPrnp^{0/0}* mice の瞬目反射 delay 課題を調べたところ、CR 獲得および潜時について加齢依存的な障害が観察された(Fig.4A&B)。ミュータントの行動変化はプルキンエ細胞の脱落の度合いによく対応しており、この学習における小脳皮質の重要性を示していると思われる。

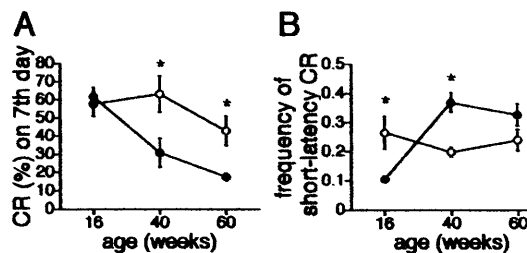
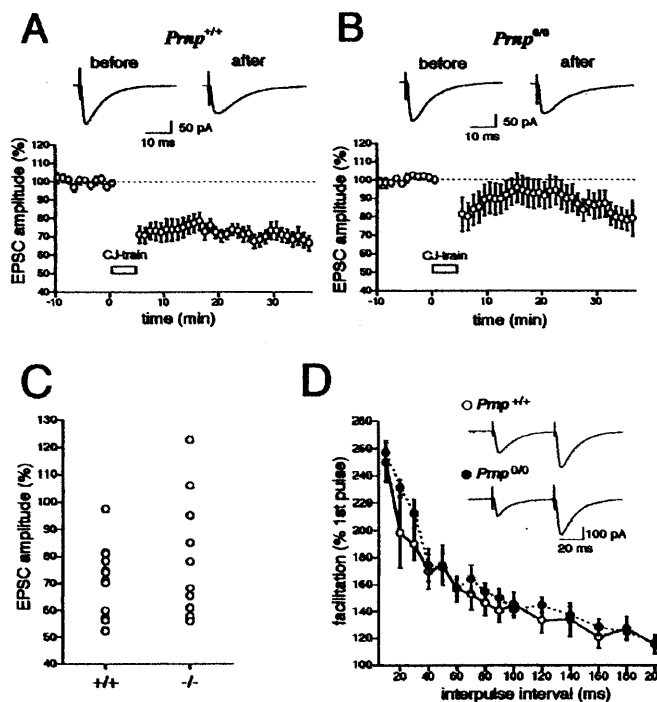


Fig. 3 (left) (A & B) “conjunction protocol”により誘発される小脳 LTD。 *Prnp^{+/+}* mice (○, n = 13 from 8 mice)では wild-type mice (●, n = 12 from 7 mice)に比べ抑圧の程度が小さくなっている (C) 刺激終了 30 分後における EPSC amplitude の分布図 (D) Paired pulse facilitation (PPF) には wild-type (○, n = 20)と *Ngsk Prnp^{0/0}* mice (●, n = 25) 間に差はない。

Fig. 4 (right) *Ngsk Prnp^{0/0}* mice における瞬目反射 delay 課題の加齢依存的障害。(A) 7 日目における学習率および(B)短時間の潜時の CR が出現した頻度。(* $P < 0.05$)

【まとめ】本研究において私はマウス瞬目反射条件付け系を時間的多様性を持つ系に拡張することにより、一般に運動学習として知られるこの連合学習が CS と US の時間的特性の変化によって小脳 LTD 依存적であったり海馬依存的になることを明らかにした。これは脳が外界の状況に応じてその機構を極めて動的に変化させ対応していることを示す良い例と考えられる。また PrP^C

欠損マウスの解析からは加齢に伴う学習障害と小脳 LTD の障害が示された。この結果は PrP^C の生理機能を明らかにする端緒となりうるだけでなく、神経細胞死と学習障害に共通の神経機構が働いている可能性を示唆するものとしても興味深い。瞬目反射条件付けはヒトの臨床研究でも発展してきた経緯があるので、本実験系はヒト中枢疾患モデルを指向した mutant mice の学習機能評価系としても今後期待できるであろう。