

審査の結果の要旨

氏名 岸本泰司

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)とし唼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)が表出されるというもので、古典的条件付けの一つであり、生物が環境内の2つの事象間の関係を学習する連合学習の1つである。一般に、USは意味対象であり、CSは意味のない中性なものである。瞬目反射条件づけにおいて動物はCSとUSを意味的かつ時間的に脳内で連合させる。本研究は、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関与しているかを明らかにすることを目的としたものである。

1. 小脳長期抑圧(LTD)仮説の検証とLTDに依存しないメカニズムの発見

小脳はその特徴的な層構造から、平行繊維-プルキンエ細胞間におけるシナプス伝達の長期抑圧(LTD)が運動学習の基礎過程であるとする有力な仮説が提出されており、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ている。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 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。

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。これは、小脳LTDに依存しない神経メカニズムが存在することを初めて示したものである。

2. 瞬目反射学習への海馬の関与

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 $\epsilon 1$)欠損マウスを用いて行動解析を行った。GluR $\epsilon 1$ 欠損マウスは delay 課題では正常な瞬目反射学習を示したが、trace 課題では wild-type に比べ非常に顕著な学習障害を呈した。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。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。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。こうした違いを決定的にする両パラダイムの刺激特性を探究するために、様々な CS-US 間の時間間隔で 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 の間隔によらず、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、CS と US の開始の間隔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 2 刺激間の間隔“長短”を認識している可能性が示唆された。

4. プリオン蛋白質の小脳シナプス機構への関与

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り、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。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。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、小脳 LTD に障害が観察された。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。mutant 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考えられた。

以上の通り、本研究は、種々の遺伝子変異マウスを用いて、瞬目反射学習における小脳皮質及び海馬の関与を解明したものであり、学習の神経科学に寄与するところが大きいので、博士(薬学)の学位に値するものであると認めた。