

審査の結果の要旨

氏名 高月香菜子

瞬目反射条件付けは、条件刺激 (CS) を音、無条件刺激 (US) を瞼への電気刺激として CS と US の組み合わせを繰り返し提示していくと、条件応答 (CR) として、音を聞くだけで瞼を閉じるようになる連合学習である。この学習には小脳皮質の平行線維 - プルキンエ細胞間のシナプスに見られる長期抑圧 (LTD) が重要であり、このシナプス可塑性に障害を持つグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluR $\delta 2$) 欠損マウスは CS と US が時間的に重なる遅延課題の学習が障害される。しかしながら、CS と US が時間的に重ならない短トレース課題 CS と US の間の無刺激時間をトレース間隔 (trace interval; TI) と呼ぶが、これが 0-100 ms 程度の短い課題] は正常に学習することから、瞬目反射条件付けには小脳 LTD を中心としたメカニズムの他に、小脳 LTD を必要としないメカニズムが存在することが明らかになっている。高月香菜子は、GluR $\delta 2$ 欠損マウスの短トレース課題の学習が海馬破壊により障害されることを見出し、小脳 LTD 非依存的メカニズムには海馬が重要な役割を果たすことを示唆した。そこで、高月香菜子は、さらに、この小脳 LTD 非依存的メカニズムにおける海馬の役割を破壊実験、電気生理学の実験により詳細に明らかにしようとした。

1 . GluR $\delta 2$ 欠損マウスの記憶の保持に対する海馬の関与

小脳 LTD 非依存的メカニズムにおける海馬の役割は、学習の獲得に限定されたものなのか、それとも獲得した記憶の保持にも重要であるのかはふめいであった。そこで、GluR $\delta 2$ 欠損マウスに短トレース課題を学習させてから海馬を破壊し、破壊前の記憶の保持を調べた。

(1) 学習直後に海馬を破壊した場合

野生型マウス、GluR $\delta 2$ 欠損マウスの両方において、瞼に筋電位記録用電極と刺激電極を埋め込む手術を行い、回復後短トレース課題を学習させた。学習試行では CS-US の組み合わせを 1 日 100 回提示し、CR が出た割合を学習率 (CR%) と定義するが、本実験では CR% が 70% を超えるまで条件付けを行い、70% を超えた翌日 (すなわち学習直後) に海馬破壊手術を行った。海馬破壊群では背側海馬と海馬を覆っている大脳皮質を、コントロール群では海馬を覆っている大脳皮質のみを吸引除去した。手術後 2 週間の回復期間を置いた後、保持試験として学習試行を 7 日間行った。GluR $\delta 2$ 欠損マウスで学習直後に海馬を破壊すると、その後の記憶保持に有意な障害が見られた。しかしながら記憶保持の程度を示す retention index の値については GluR $\delta 2$ 欠損マウスの海馬破壊群で低い傾向は見られたが、この値に有意差はなかった。野生型マウスでは、学習直後に海馬を破壊してもその後の保持に障害は見られなかった。

(2) 十分に学習させた後海馬を破壊した場合

海馬破壊前の学習試行を 7 日間行って十分学習させ、翌日に海馬破壊手術を行った。その他の手法は(1)と同様とした。GluR $\delta 2$ 欠損マウスで十分に学習させた後海馬を破壊しても、コントロール群と同程度に破壊前の記憶を保持しており、retention index の値にも有意差はなかった。この場合でも野生型マウスでは、障害は見られなかった。

2 . 野生型マウス、GluR $\delta 2$ 欠損マウスにおける短トレース課題学習中の海馬脳波 (electroencephalogram; EEG) の比較

学習中の GluR δ 2 欠損マウスの海馬の脳波(EEG)を記録し、中でも、海馬ニューロンの集団的同期活動であるシータ波 (4-12 Hz)に着目した。海馬シータ波は、atropine 非感受性の type 1 (8-12 Hz)、atropine 感受性の type 2 (4-8 Hz)の 2 種類に分けられている。瞬目反射条件付けにおいては、scopolamine 投与や中隔破壊による学習障害が報告されていることから、特にシータ波 type 2 (以下 type 2) に注目して解析した。

海馬 EEG の取得には、ステンレス線 (直径 100 μ m) を 2 本よりあわせ先端を 500 μ m ずらした電極を用い、電極の長い方の先端が海馬 fissure に入るように電極を挿入して歯科用セメントで固定した。取得した EEG は高速フーリエ変換(FFT)及びゼロ交差法を用いて解析した。

(1)条件付け前の海馬シータ波レベルと学習速度の関連

ウサギにおいて条件付け前からもともと海馬シータ波が良く出ている個体は遅延課題の学習が早いという報告がある。そこで条件付け前に海馬 EEG を 15 分間取得し、その後の学習速度との相関を調べた。CS-US の組み合わせ 10 回を 1 block とし、2 block 続けて CR% が 80% を超えるまでに要した CS-US 提示回数(trials to criterion)とシータ波 type 2 レベルの関連を調べたが、野生型マウス、GluR δ 2 欠損マウスともに相関は見られなかった。

(2)条件付けに伴う海馬シータ波の変化と学習率の関連

学習に伴う海馬シータ波の変化を調べるために、条件付け中の海馬 EEG を 50 分間取得した。野生型マウス、GluR δ 2 欠損マウスともに、毎日の条件付けに伴って type 2 レベルが減少する傾向が見られた。各個体において学習との相関を調べたところ、GluR δ 2 欠損マウスでは 7 日目の学習率(学習達成度)と type 2 の減少率との間に相関が見られた($r = -0.76, P < 0.01$)。これに対し野生型マウスでは学習率との相関は見られなかった($r = -0.33, P > 0.05$)。

以上をまとめると、実験 1 により GluR δ 2 欠損マウスの小脳 LTD 非依存的な学習において、海馬は形成されたばかりの記憶の保持には関与するが、十分に学習した後は海馬を必要としないことが明らかとなった。この結果は、記憶保持に関しての海馬の役割が部分的であるという意味では、野生型マウスの長トレース課題 (TI が 250 ms 以上、500 ms が典型的) についての報告と合致している。しかしながら GluR δ 2 欠損マウスの海馬を学習直後に破壊した場合でもある程度の記憶の保持が見られ、この点では顕著な障害が見られる野生型マウスの長トレース課題の報告と異なる。このことから、GluR δ 2 欠損マウスでの海馬の役割は、野生型マウスの長トレース課題における役割と異なることが示唆された。

実験 2 により、GluR δ 2 欠損マウスではシータ波 type 2 の変化率と学習率の間に相関があるが、野生型マウスでは相関がないことが明らかとなった。野生型の遅延課題では学習時に海馬神経活動が増大するが、海馬を破壊しても学習にあまり影響を受けないことが知られている。今回の結果は、野生型マウスでは短トレース課題においても海馬の活動は変化するが学習率とは対応しないことを示しており、海馬の役割が遅延課題と同様であることを示唆している。一方、GluR δ 2 欠損マウスでは条件付けに伴って type 2 が良く減少する個体ほどよく学習していた。これより、GluR δ 2 欠損マウスの短トレース課題の学習には海馬が深く関与していることが電気生理学的実験からも明らかとなった。

以上、本研究は、東京大学大学院薬学系研究科・神経生物物理学教室において発見された「瞬目反射条件付けにおける小脳 LTD 非依存的メカニズム」において、海馬は学習の初期段階、つまり獲得の過程で重要な役割を果たしていることを破壊実験、電気生理学的実験から明らかにしたものであり、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと判定した。