

審査の結果の要旨

氏名 喜名 振一郎

本研究は、未だのその機能がほとんど解明されていないチロシンフォスファターゼ PTPMEG の個体レベルでの機能解析を試みており、PTPMEG ノックアウトマウスを作製し、神経系における解析を行った結果、下記の結果を得ている。

1. PTPMEG の locus に Tau-LacZ をノックインしたコンストラクトでターゲティングベクターを設計し、ノックアウトマウスを作製している。ヘテロマウス同士のかけあわせではメンデルの法則にしたがって子供は出生しており、ノックアウトマウスはオス、メスともに交配可能であった。さらにノックアウトマウスは最高齢 16 ヶ月に達しており、その時期までに野生型と比較して著しい発達の異常というのは観察されていない。
2. PTPMEG の小脳における発現をヘテロマウスに対する LacZ 染色により観察したところ、小脳プルキンエ細胞において成長するにつれ発現が高まることが示された。さらに PTPMEG に対する抗体を作製して小脳における PTPMEG の時期依存的発現をタンパクレベルで観察したところ、PTPMEG はタンパクレベルでも成長していくにつれ発現が高まっていくことが分かった。またさらに、PTPMEG に対する抗体を用いて野生型とノックアウトマウスの小脳の lysate に対してウェスタンブロットを行ったところ、ノックアウトマウスにおいては PTPMEG の全長よりも低分子量側においても複数のバンドが消失することが確認でき、PTPMEG は小脳において部分断片の形でも存在していることが示された。
3. PTPMEG ノックアウトマウスの小脳プルキンエ細胞への興奮性入力の基本的性質を調べている。登上線維からプルキンエ細胞への多重支配はおきていなかった。またプルキンエ細胞に発現している AMPA レセプターの kinetics やコンダクタンスも正常であり、プレシナプスからの伝達物質の放出を反映する PPF や PPD も正常であった。さらにキャパシタンスやレジスタンスの値も正常であった。抗カルバインジン抗体を用いた免疫染色の結果、小脳プルキンエ細胞の形態も異常はなかった。これらの結果は PTPMEG ノックアウトマウスにおいて発達段階は正常に進行したことが示された。
4. PTPMEG ノックアウトマウスに対して小脳依存性の行動実験をほどこし、rotarod および、eyeblink conditioning 実験の両方においてノックアウトマウスでは野生型と

比較して成績が低下していることが示された。これにより PTPMEG が小脳依存性の運動学習に関わる分子であることが示された。

5. 小脳におけるチロシンリン酸化の割合を抗リン酸化チロシン抗体である 4G10 を用いて野生型とノックアウトマウスで比較したところ、ノックアウトマウスにおいて 73 kDa 付近のタンパクのチロシンリン酸化の割合が著しく増大していることが示された。ノックアウトマウスにおいてチロシンリン酸化の割合が上昇していることから PTPMEG の小脳においてはこの 73 kDa のタンパクが基質の一つである可能性が示された。
6. ノックアウトマウスにおいて海馬や扁桃体依存性の行動実験である **fear conditioning** 実験を行ったところ、海馬依存性の行動実験において成績が上昇していた。扁桃体依存性の行動実験は正常であった。
7. PTPMEG ノックアウトマウスでは、**Tau-LacZ** をノックインしたコンストラクトでターゲティングベクターを作製していることを利用して、**LacZ** 染色を行い、視床から大脳皮質への投射の様子を観察している。その結果、ノックアウトマウスでは視床から大脳皮質への投射に異常が出ている可能性が示された。

以上、本論文はノックアウトマウスを使った解析からチロシンフォスファターゼ PTPMEG が小脳において運動学習に関わっていることを示した。本研究はこれまでその機能がほとんど分かっていなかった PTPMEG の機能を明らかにしたものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。