

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 岸 岡 歩

本研究は、恐怖条件付け学習に線条体が関与するか否かを明らかにすることを目的に、分子遺伝学的手法を用いて線条体特異的かつ誘導的に神経細胞を除去可能なマウスを作製し、恐怖条件付け学習により記憶の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. まず線条体特異的に神経細胞を誘導的に除去可能なマウスを作製した。線条体に選択的に発現する G タンパク質 $\gamma 7$ サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター下に Cre 組換え酵素とプロゲステロン受容体のリガンド結合領域を融合させた CrePR 遺伝子を挿入し、G $\gamma 7$ -mCrePR マウスを作製した。G $\gamma 7$ -mCrePR マウスを Cre 依存的にジフテリア毒素 A サブユニット を発現する Eno2-STOP-DTA マウスに掛け合わせ、6 週齢マウスに抗プロゲステロン製剤 RU-486 を投与することにより CrePR の活性化を誘導した。
2. RU-486 投与後 10 日目に細胞死のマーカーである TUNEL 陽性細胞が線条体特異的に誘導できた。さらに、神経細胞のマーカーである NeuN の免疫染色は、投与後 13 日目には線条体においてほぼ完全に消失し、NeuN 免疫染色シグナルの消失は線条体特異的であった。線条体神経細胞の約 90% を占める中型有棘神経細胞 (medium spiny neuron) には、黒質網様部への直接経路および淡蒼球を解した間接経路が存在する。線条体神経細胞の除去を誘導したマウスにおいて、直接経路で発現する substance P と間接経路で発現する enkephalin は黒質網様部と淡蒼球のそれぞれにおいて消失していたことから、線条体の中型有棘神経細胞はほぼ完全に消失していることが支持された。
3. RU-486 投与後 13 日目以降のマウス (線条体特異的神経細胞除去マウス) は見た目の運動失調やジストニアの症状は示さず、thin rod にもバランス良く乗ることができた。一方で加速式の rotarod ではより厳しい条件になるとパフォーマンスの向上は見られなかった。
4. 線条体特異的神経細胞除去マウスで恐怖条件付けを行った。刺激強度 0.5 mA の電気ショックを音と対提示したところ、線条体神経細胞除去マウスは対照群同様に強いすくみ (freezing) 反応を示した。しかしながら、刺激強度 0.3 mA の条件下では、対照群のマウスは 24 時間後の音提示において強い freezing 反応を示したものの、線条体神経細胞除去マウスでは freezing 反応は著しく低下していた。電気ショックに対する感受性を flinch と jump を示す電流強度の閾値を指標に調べたところ、有意な変化は認められなかった。これらの結果から、線条体は刺激強度が弱い条件下における恐怖条件付け

学習に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

5. 線条体が記憶学習のどのプロセスに関与するかを調べるために、刺激強度 0.3 mA の条件下で短期記憶のテストを行ったところ、対照群と線条体神経細胞除去マウスで有意な差は認められなかった。さらに同じ刺激強度の条件で、学習の 24 時間後に RU-486 を投与し、その 2 週間後にテストを行ったところ、線条体神経細胞除去マウスで **freezing** 反応は有意に低下した。このことから、線条体は刺激強度が弱い条件下における恐怖条件付け学習の長期記憶の保持に関与していることが示唆された。
6. 次に、記憶の固定時に線条体において NMDA 受容体の活動が必要かどうかを調べた。刺激強度 0.3 mA の条件下で、学習直後に線条体に NMDA 受容体の阻害剤である APV を投与した群は人工脳脊髄液(ACSF)投与の対照群に比べ、24 時間後の **freezing** 反応は有意に低下した。
7. 記憶の固定時に線条体において新規タンパク質合成が必要かどうかを調べた。刺激強度 0.3 mA の条件下で、学習直後に線条体にタンパク質合成阻害剤であるアニソマイシン(ANI)を投与した群は ACSF 投与群に比べ、24 時間後の **freezing** 反応は有意に低下した。また学習 1 時間後に ANI を投与した群は翌日の **freezing** 反応は有意に障害されたのに対し、学習 3 時間後に ANI を投与した群は高い **freezing** 反応を示し、ACSF 群と比べ有意差は見られなかった。これらの結果より、記憶固定時に必要とされるタンパク質合成には時間枠があることが示唆された。

以上、本論文は線条体が刺激強度の弱い条件下における恐怖条件付け学習の長期記憶に関与すること、またその記憶の固定時に線条体において NMDA 受容体の活性化及び新規タンパク質合成が必要であることを明らかにした。本研究は刺激強度が弱い条件下における恐怖記憶に関わる新たな神経経路を解明し、恐怖情動記憶のメカニズム解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。