

氏 名	わ だ のり お 和 田 教 男
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 137 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	可逆的の神経情報伝達制御による小脳運動学習機構の解明

論文調査委員	(主 査) 教 授 渡 邊 大 教 授 松 田 道 行 教 授 上 村 匡
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

瞬目条件反射は、音を条件刺激 (CS)、瞼への侵害刺激を無条件刺激 (US) とする条件学習の一種であり、小脳に依存した運動学習である。小脳皮質の出力細胞であるプルキンエ細胞には、CSの情報は苔状線維から小脳顆粒細胞を介して、USの情報は登上線維を介して、伝達される。一方、プルキンエ細胞が投射する小脳深部核の一つである中位核へは、苔状線維、登上線維が直接入力し、CS・USの情報を、それぞれ伝達している。瞬目条件反射における小脳皮質と中位核の重要性とメカニズムを明らかにするため、可逆的の神経伝達阻止法 (Reversible neurotransmission-blocking, RNB) を導入したトランスジェニックマウスにより解析を行った。これは、テトラサイクリン発現調節システムを生体内で利用して、顆粒細胞特異的に破傷風菌毒素タンパクを発現させ、可逆的に神経伝達を阻害する、という方法である。つまり、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン (DOX) を投与すれば、毒素タンパクは発現するため、顆粒細胞からプルキンエ細胞への神経伝達は阻害され、DOXを除去すれば、毒素タンパクは消失するため、神経伝達は回復する。

まず、顆粒細胞からの神経伝達がどの程度阻害されているか確かめるため、覚醒状態のRNBマウスのプルキンエ細胞から細胞外電気活動記録を行った。DOX投与状態では顆粒細胞からの伝達によって引き起こされる単純発火のみが消滅していた。登上線維からの伝達によって引き起こされる複雑発火は変化していなかった。DOXを除去すると、RNBマウスの単純発火は野生型マウスと同程度に回復した。この結果により、顆粒細胞とプルキンエ細胞間のみの神経伝達を可逆的に阻害・回復できることが明らかとなった。

次に、瞬目条件反射学習への影響を検討した。DOX投与によって顆粒細胞からプルキンエ細胞へのCS情報の伝達を遮断すると、RNBマウスの瞬目条件反射の学習反応は消滅した。DOX除去によって顆粒細胞からのCS情報の伝達を回復させると、DOX投与時には学習反応が見られなかったRNBマウスにおいて、正常な学習反応が再学習実験初回から現れた。瞬目条件付けに先立って両側の中位核を電氣的に破壊すると、このRNBマウスの再学習実験における学習反応の出現は、失われた。これらの結果により、中位核が瞬目条件反射における学習反応の獲得および維持に必要であり、表出には小脳皮質におけるプルキンエ細胞との連携が必要であることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

瞬目条件反射は、音を条件刺激 (CS)、瞼への侵害刺激を無条件刺激 (US) とする条件学習の一種であり、小脳に依存した運動学習である。CS、USの情報は、それぞれ苔状線維、登上線維により小脳へ入力する。小脳皮質では、CS情報は苔状線維から顆粒細胞を介して、US情報は登上線維から直接、皮質出力であるプルキンエ細胞へ伝達され統合される。一方、小脳深部核を構成する中位核は、小脳皮質で処理された情報をプルキンエ細胞から受けるとともに、苔状線維、登上線維から直接入力を受けることでCS、USの情報を統合し出力する。小脳皮質、中位核におけるCS、USの情報処理が、瞬目条件反射の学習プロセスにどのような役割を果たしているか明らかにするため、申請者は、分子遺伝学的な手法で成体マウスの

小脳顆粒細胞の神経伝達を可逆的にブロックし、解析を行った。

小脳顆粒細胞特異的に発現するGABA_A受容体 $\alpha 6$ サブユニット遺伝子プロモーター下にtetracycline-controlled reverse activator (rtTA)を発現するトランスジェニックマウスと、tetracycline responsibleプロモーター下にtetanus neurotoxin light chain (TeNT)を発現するトランスジェニックマウスを交配し確立したreversible neurotransmission-blockingマウス(RNBマウス)に、tetracycline系薬剤であるdoxycycline (DOX)を投与し、DOX依存的に顆粒細胞に対してTeNTの発現誘導を行った。プルキンエ細胞は、顆粒細胞、登上線維の入力に対して、それぞれ単純スパイク、複雑スパイクとよばれる活動電位を生じる。RNBマウスのプルキンエ細胞から単一細胞レベルで神経活動を計測したところ、DOX投与状態では単純スパイクのみが消滅し、複雑スパイクには変化が生じなかった。さらにDOX除去後14日目のRNBマウスでは、単純スパイク、複雑スパイクともにコントロール群と有意差を認めなかった。すなわちRNBマウスでは、DOX依存的に顆粒細胞—プルキンエ細胞間の神経伝達をブロックすることで、プルキンエ細胞へのCS情報の伝達を可逆的に制御できることを示した。次にDOX投与によりプルキンエ細胞へのCS情報の伝達を遮断し、瞬目条件反射への影響を調べた。DOX投与によりプルキンエ細胞へのCS情報の伝達を遮断すると、RNBマウスではCSによる瞬目応答は出現しなかった。DOX除去後14日目から再び条件学習を行うと、DOX存在下ではCSによる瞬目応答が見られないRNBマウスで、再学習初日からコントロール群と同等のCSによる瞬目応答が出現した。さらに両側の中位核を破壊したRNBマウスでは、DOX除去後に再学習を行ってもCSによる瞬目応答は認められなかった。これらの実験より、苔状線維、登上線維からCS、US情報が中位核へ伝達され統合されることが瞬目応答における条件学習の獲得と維持に必要であり、さらにその表出には、小脳皮質で処理された情報がプルキンエ細胞を介して中位核へ伝達され、これらの情報が統合されることが必要であることが明らかとなった。

以上のように、本論文で述べられた成果は重要であり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成20年1月24日に論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。