

氏 名	さっ 佐 々 たか 貴 ゆき 之
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2319 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	瞬目条件反射学習を中心とした脳機能におけるマウス蛋白質リン酸化酵素 KKIAMRE の転写調節および機能に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 維 昭	教 授 丸 岡 啓 二	助教授 秋 山 芳 展
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

脳が担う記憶の様式は、その持続時間により短期記憶と長期記憶に大別される。長期記憶の獲得は、タンパク質および RNA の新たな合成を必要としたシナプス結合の質的および量的変化により為されると考えられている。そのようなシナプス結合の可塑性に関与する分子群の探索と作用機構の研究は、神経科学において最も注目されている課題の一つである。瞬目条件反射学習は、古典的条件付けのパラダイムであり、種を越えて広く保存されている。その主な神経回路は良く解析されており、分子基盤の解析を行うには有利な特徴を持っている。小脳深部核は極めて小さいが、瞬目条件反射学習に必須な役割を果たすとされている神経核であり、組織学的に他の機能単位と明瞭に分離していることも上記課題に取り組む上で適している。

KKIAMRE は、ウサギにおける瞬目条件反射学習の獲得に伴い、小脳深部核において発現が増強する遺伝子として同定された cdc2 類縁ファミリーに属するセリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素である。KKIAMRE の作用機構を個体レベルで解析することを可能とするために、マウス KKIAMRE 遺伝子 (*Kkm*) を単離し、その構造を明らかにした。マウス KKIAMRE の触媒ドメインは、ヒトおよびウサギ KKIAMRE のそれと 92% の相同性を示し、系統発生的に高度に保存されていることを明かした。さらに、スプライシングバリエーションの存在と、多重プロモーターの存在を明かした。

上記の結果は、本酵素の機能調節に RNA レベルでの制御機構が関与する可能性を暗示しており、その転写制御と瞬目条件反射学習の獲得の関連についてマウスの実験系で検証を試みた。瞬目反射の条件付けを施した野生型マウスの小脳深部核局所の *Kkm* 転写産物レベルを定量的 RT-PCR 法で経時的に定量したところ、ウサギの場合と異なり、条件付けに伴った有為な *Kkm* 転写量の変化を認めなかった。さらに、小脳深部核への主な入力であるプルキンエ細胞が欠損する *Lurcher* マウスを利用して、本遺伝子の転写活性の小脳プルキンエ細胞からの投射(入力)の依存性を検証した。本研究で作製したノックアウトマウスでは *LacZ* 遺伝子が *Kkm* 遺伝子のコード領域に置換挿入してあるので、それを利用した。β ガラクトシダーゼ活性 (*Kkm* 遺伝子の転写量を反映)を組織学的に観察することによって、細胞単位での転写状況を高分解能で解析した。また、本遺伝子の転写が確認される大脳皮質および線条体ニューロンの培養細胞に各種刺激を負荷することによる本遺伝子の発現レベルの変化を *c-Fos* のそれと比較検討した。これらの実験から、マウス *Kkm* 遺伝子の転写レベルはニューロンの活動と明白な関連を持たないとの結論に達している。

ノックアウトマウスを組織学的に詳細に解析し、*Kkm* の脳での転写は生後 1 週間程で検出され始め、4 週間程で成体のレベルに達し、小脳深部核のみならず、大脳皮質、海馬、扁桃体を含めた幅広い領域のニューロンで発現することを明らかにした。*Kkm* 変異ホモ接合体 (*Kkm*^{-/-}) において脳の基本的組織構築に異常は認めなかった。*Kkm*^{-/-} マウスは正常な四肢の協調と調節機能を示し、瞬目反射条件付けにおいても野生型マウスと同等の条件反射の頻度曲線を示した。一方、海馬および扁桃体等の領域が関与する受動的回避反応テスト、文脈依存性恐怖条件付けテストにおいて、野生型マウスに比べ、成績の低下を観察した。したがって、マウスにおいて KKIAMRE は瞬目条件反射学習の分子基盤には関与しないが、

その他の学習記憶のパラダイムの分子基盤を担うと結論づけている。これらの結果は、比較神経科学的解析の重要性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

脳が担う記憶の様式は、その持続時間により短期記憶と長期記憶に大別される。長期記憶の獲得は、タンパク質およびRNAの新たな合成を必要としたシナプス結合の質的および量的変化を必要とすると考えられている。この過程に関わる分子群の探索と作用機構の研究は、神経科学において最も注目されている課題の一つである。動物の学習・記憶の分子基盤の解析は、動物個体を利用して初めてなし得るが、そのような研究は端緒についたに過ぎない。瞬目条件反射学習は、古典的条件付けのパラダイムであり、種を越えて広く保存されている。その主な神経回路は良く解析されており、分子基盤の解析を行うには有利な特徴を持っている。小脳深部核は極めて小さいが、瞬目条件反射学習に必須な役割を果たすとされている神経核である。組織学的に他の機能単位と明瞭に分離していることも上記課題に取り組む上で適している。本研究は、これら瞬目条件反射学習が有する特性を活用して、長期記憶の分子機構の解析を目指して研究をすすめたものである。

KKIAMREは、ウサギにおける瞬目条件反射学習の獲得に伴い、小脳深部核において発現が増強する遺伝子として同定されたcdc2類縁ファミリーに属するセリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素である。その機能は不明であるが、KKIAMREを遺伝子発現の変化を伴う学習・記憶に関与する候補分子としてとらえ、その分子機構を詳細が個体レベルで解析することを可能とするために、マウスKKIAMRE遺伝子(*Kkm*)を単離し、その構造を明らかにした。マウスKKIAMREの触媒ドメインは、ヒトおよびウサギKKIAMREのそれと92%の相同性を示し、系統発生的に高度に保存されていることを明かした。さらに、スプライシングバリエーションの存在と、多重プロモーターの存在を明かした。

その転写制御と瞬目条件反射学習の獲得の関連についてマウスの系で検証を試みた。瞬目反射の条件付けを施した野生型マウスの小脳深部核局所の*Kkm*転写産物レベルを定量的RT-PCR法で経時的に定量したところ、ウサギの場合と異なり、条件付けに伴った有意な*Kkm*転写量の変化を認めなかった。さらに、小脳深部核への主な入力であるプルキンエ細胞が欠損する*Lurcher*マウスを利用して、本遺伝子の転写活性の小脳プルキンエ細胞からの投射(入力)の依存性を検証した。本研究で作製したノックアウトマウスで*LacZ*遺伝子が*Kkm*遺伝子のコード領域に置換挿入してあるので、 β ガラクトシダーゼ活性にもとづいて*Kkm*遺伝子の細胞単位での転写状況を高分解能で解析した。また、本遺伝子の転写が確認される大脳皮質および線条体ニューロンの培養細胞に各種刺激を負荷することによる本遺伝子の発現レベルの変化を*c-Fos*のそれと比較検討した。これら多様な実験により、マウス*Kkm*遺伝子の転写レベルはニューロンの活動と明白な関連を持たないことを示唆した。

ノックアウトマウスを組織学的に詳細に解析し、*Kkm*の脳での転写は生後1週間程で検出され始め、4週間程で成体のレベルに達し、小脳深部核のみならず、大脳皮質、海馬、扁桃体を含めた幅広い領域のニューロンで発現することを明らかにした。*Kkm*変異ホモ接合体(*Kkm*^{-/-})において脳の基本的組織構築に異常は認めなかった。*Kkm*^{-/-}マウスは正常な四肢の協調と調節機能を示し、瞬目反射条件付けにおいても野生型マウスと同等の条件反射の頻度曲線を示したことから、小脳回路機能および深部核を中心とした記憶形成機構に明らかな異常の無いことが明らかになった。一方、海馬および扁桃体等の領域が関与する受動的回避反応テスト、文脈依存性恐怖条件付けテストにおいて、野生型マウスに比べ、成績の低下を観察した。したがって、マウスにおいてKKIAMREは瞬目条件反射学習の分子基盤には関与しないが、その他の学習記憶のパラダイムの分子基盤を担うと結論づけた。

本研究は、特定の動物行動のパラダイムとその責任脳局所における特定遺伝子の発現制御の関連を個体レベルで解析した先駆的研究のひとつであり、その成果は高く評価できる。多面的に解析した結果、動物種を超えて高度に保存されている学習および記憶のパラダイムにおいてさえ、その分子機構の全てが必ずしも保存されている訳ではないことを示唆した。今後の脳科学研究における研究の方向性を示すのもであり、同分野に多大な貢献を与えたと言える。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。