

氏 名	か 藤 明
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2136 号
学位授与の日付	平成 12 年 1 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	新たな解析システムを用いたマウス反射性眼球運動における一酸化窒素合成酵素の役割に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 伊藤維昭 教授 平野丈夫 教授 三木邦夫

論 文 内 容 の 要 旨

水平性視機性眼球反応 (HOKR) と水平性前庭動眼反射 (HVOR) は共に種を超えてよく保存された反射性眼球運動である。OKR は視覚刺激の大きな動きに応じてその動きを追従するように生じる眼球運動であり、VOR は頭部の動きと反対方向に生じる眼球運動であり、いずれも網膜上の像のブレを緩和する機構である。視覚刺激および頭部の動きによる前庭器官の持続的な刺激は、OKR および VOR の強度を変化させる適応現象を誘導する。この適応変化は学習・記憶のモデルの一つであり、感度および定量性に優れている。マウスは遺伝子操作が容易な唯一の哺乳類であり、脳の高次機能を解析する上で有用な動物種である。本研究では前半でマウスにおける眼球運動の測定解析システムを構築し、OKR の適応の誘導条件および脳の責任領域を明らかにした。後半ではこの実験系をもちいて OKR の適応における一酸化窒素 (NO) の役割について解析した。

まず、ターンテーブル、スクリーンおよび赤外線カメラからなる実験装置のマウスへの至適化を図り、HOKR および HVOR とともに定量的に測定できることを確認した。C57BL/6 系統マウスにおけるそれらの動特性は、質的にこれまで解析されてきた他動物種と変わらないことを確認した。「網膜上の滑り」が十分に生じると考えられる条件で持続した視覚刺激を与えることにより、C57BL/6 マウスで HOKR に適応変化を誘導することに成功した。HOKR の適応に関与する神経回路を検証するために、イボテン酸の投与および電気的手法により小脳片葉を選択的に破壊したマウスおよび 3-アセチルピリジンの腹腔内投与による下オリーブ核を損傷したマウスは、適応反応が消失することを観察し、この適応反応が他動物種と同様に下オリーブ核・小脳片葉回路で制御されていることを明らかにした。さらに、遺伝子ノックアウトマウスの作製に多用される 129 系統マウスは、C57BL/6 系統に比べて低い HOKR の利得と位相の遅れを観察し、129 系統マウスが神経回路に異常を有する可能性を示唆した。

反射性眼球運動の適応は小脳平行線維・プルキンエ細胞間シナプスの伝達効率が長期間にわたって低下する長期抑圧現象を細胞基盤とするとの仮説が提唱されている。長期抑圧には NO を介する経路があることが示唆されているが、実験システムにより結果の一致を見ていない。例えば、小脳における NO 生成の主酵素であると考えられる Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) 欠損変異マウスについて小脳長期抑圧を解析した論文では、nNOS 変異マウスにおいて、小脳スライスでの長期抑圧は不全であるが、プルキンエ細胞の分離培養の実験系での長期抑圧は正常であることが報告されている。生体内での NO および nNOS の役割を検証するために、NO 合成阻害剤 (L 型-NMMA) の小脳片葉への局所投与群および nNOS 欠損変異マウスの反射性眼球運動を解析した。その結果、L 型-NMMA 投与群は HOKR の適応を消失した。一方で、不活性異性体である D 型-NMMA 投与群における HOKR の適応は正常であった。また、nNOS 欠損変異マウスも HOKR の適応の減弱を示した。これらの結果に基づいて、HOKR の適応には小脳片葉における NO を介した神経可塑性が必須であること、またその生成酵素の主体は nNOS であることを示唆した。

グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) の欠損変異マウスは小脳長期抑圧に不全を示し、瞬目条件反射学習に異常を示すこと

が報告されている（参考論文2）。このマウスについて反射性眼球運動を解析したところ、HOKRの動特性および適応ともに異常を認めなかった。これらの結果に基づいて、慢性的な遺伝子欠損のみならず、薬理学的実験手法などを用いた急性阻害の実験や生体からの運動学習中の神経活動記録の必要性を示唆した。

参考論文1ではアストロサイトに特異的な中間径フィラメントの構成蛋白質であるGFAPの欠損変異マウスを作製し、そのマウスの中樞神経系の発達が異常を示さないことを明らかにした。また、GFAPがプリオンの複製に関与するとする仮説を検証し、明快に否定した。参考論文2では同上の変異マウスの小脳スライスで、小脳長期抑圧に不全を示すこと、また瞬目条件反射学習に異常を示すことを観察し、脳の高次機能におけるアストロサイトの関与を示唆した。

論文審査の結果の要旨

水平性視機械性眼球反応（HOKR）と水平性前庭動眼反射（HVOR）は共に種を超えてよく保存された反射性眼球運動である。OKRは視覚刺激の大きな動きに応じてその動きを追従するように生じる眼球運動であり、VORは頭部の動きと反対方向に生じる眼球運動である。いずれも網膜上の像のブレを低減する機構として位置付けられる。視覚刺激および頭部の動きによる前庭器官の持続的な刺激は、OKRおよびVORの強度を変化させる適応現象を誘導する。この適応変化は学習・記憶のモデルの一つであり、感度および定量性に優れた特徴を持つ。マウスは遺伝子操作が容易な唯一の哺乳類であり、脳の高次機能を解析する上で有用な動物種であり、近年その利用は著しく増加している。申請者は、マウスを利用した学習・記憶機構の解析を目指して、前半でマウスにおける眼球運動の測定解析システムを構築し、HOKRの適応の誘導条件および脳の責任領域について検討し、後半ではこの実験系をもちいてHOKRの適応における一酸化窒素（NO）を介した神経可塑性の意義を解析した。

申請者は、まずターンテーブル、スクリーンおよび赤外線カメラからなる実験装置のマウスへの至適化を図り、HOKRおよびHVORともに定量的に測定できることを確認した。C57BL/6系統マウスにおけるそれらの動特性は、質的にこれまで解析されてきた他動物種と変わらないことを確認した。さらに、「網膜上の滑り」が十分に生じると想定される条件で持続した視覚刺激を与えることにより、C57BL/6マウスでHOKRに適応変化を誘導することに成功した。HOKRの適応に関与する神経回路を検証するために、イボテン酸の投与および電気的手法により小脳片葉を選択的に破壊したマウスおよび3-アセチルピリジンの腹腔内投与による下オリブ核を損傷したマウスを作製した。これらのマウスでは、適応が消失することを観察した。これらの結果はこの適応の制御の責任領域が種を超えて保存されていることを明らかにしたもので、マウスを利用して眼球運動の学習・記憶機構の解析をする上で必須な基礎的知見をもたらした。さらに、申請者は遺伝子ノックアウトマウスの作製に多用される129系統マウスを解析し、それらがC57BL/6系統に比べて低いHOKRの利得と位相の遅れを示すことを明らかにした。この結果は129系統マウスが神経回路に異常を有することを示唆している。したがって、申請者は遺伝子変異マウスを利用して眼球反射運動の解析をする場合に、十分な戻し交配による遺伝的背景の均一化に配慮する必要があることを指摘した。

反射性眼球運動の適応は小脳平行線維・プルキンエ細胞間シナプスの伝達効率が長期間にわたって低下する長期抑圧現象を細胞基盤とするとの仮説が提唱されている。長期抑圧にはNOを介する経路があることが示唆されているが、実験システムにより結果の一致を見ていない。例えば、小脳顆粒細胞に豊富に存在するNeuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) 欠損変異マウスについて小脳長期抑圧を解析した論文では、nNOS変異マウスにおいて、小脳スライスでの長期抑圧は不全であるが、プルキンエ細胞の分離培養の実験系での長期抑圧は正常であることが報告されている。同様の不一致はNO合成阻害剤の投与およびCaged NOの投与実験によっても観察されている。申請者は眼球運動の適応にNOを介した制御機構が必須であるか否かについて、この研究で確立した実験システムを用いて解析した。用いた手法は小脳片葉の局所へのNO合成阻害剤（L型-NMMA）の投与実験とnNOS欠損変異マウスの利用である。その結果、L型-NMMA投与群はHOKRの適応を消失した。一方で、不活性異性体であるD型-NMMA投与群におけるHOKRの適応は正常であった。これらの結果はHOKRの適応が、その責任領域である小脳片葉の場でNO産生を必要とすることを強く示唆した。また、nNOS欠損変異マウスもHOKRの適応の減弱を示した。これらの結果に基づいて、HOKRの適応には小脳片葉におけるNOを介した神経可塑性が必須であると結論した。またこの研究は、小脳片葉で反射性眼球運動の適応反応に利用されるNO生成酵素の主体が3種類のNOS（nNOS, eNOS, およびiNOS）の内、nNOSであることを示唆した点で新規性が高い。

一方、小脳長期抑圧に不全を示し、瞬目条件反射学習に異常を示すことが報告されているグリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) の欠損変異マウスについて解析したところ、HOKR の動特性および適応ともに異常を認めなかった。瞬目条件反射学習および反射性眼球運動の適応反応ともに小脳長期抑圧に依存するとする仮説とは一致しない結果であった。現在のところ、この矛盾が生じる機序は不明である。申請者は、*in vitro* と *in vivo* の実験システム間の差異と慢性的な遺伝子欠損を導入した場合の問題点を指摘した。今後の課題である。

本研究で確立された新たな実験システムは感度、定量性および再現性に優れたものであり、マウスの遺伝学的解析手法の発展とあいまって今後の運動学習の分子機構の研究を加速するものとして評価できる。今後の多角的な解析が期待される。

以上、申請論文はマウスにおける反射性眼球運動の測定システムを確立し、それを用いて水平性視機性反応の適応現象に NO を介した神経可塑性が必須であること、また、中心的役割を果たす酵素が nNOS であることを明らかにした。本研究で得られた知見は小脳に依存した運動学習の分子機構の理解に大きく貢献したと考えられる。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。