

審査の結果の要旨

氏名 小島 寛人

【序論】

私達の脳内で主要な情報伝達を行う興奮性神経細胞は、神経細胞のつなぎ目であるシナプスを介して情報伝達を行っている。この情報伝達効率は常に一定ではなく、可逆的に変化する性質を持つ。シナプスにおいて情報伝達効率が変化する性質はシナプス可塑性と呼称される。また、シナプス可塑性は情報の取捨選択を可能にする事から、記憶・学習の細胞レベルのメカニズムであると考えられてきた。近年、シナプスの情報伝達効率を高める高頻度の刺激を神経軸索へ与えると、情報の受け手である樹状突起スパインの頭部体積の拡大が起こり、長期間に渡り形態的变化が持続する事が報告された。スパインの形態とシナプス伝達効率には正の相関があるため、スパインの構造変化は「構造可塑性 (structural plasticity)」とも呼ばれる。小島らのこれまでの研究により、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) を介したスパインへのカルシウムイオンの流入によるカルシウム/カルモデュリン依存性キナーゼ2 (CaMKII) の活性化とそれに伴うグアニンヌクレオチド交換因子 Tiam1 との相互作用がシナプス構造可塑性に必要であることが明らかになった。本研究では、CaMKII-Tiam1 シグナル複合体の記憶・学習への関与を検討するため、Tiam1 ゲノム DNA へ CaMKII と相互作用できない変異 (1552- 1554 AAA) をノックインしたマウス(Tiam1 KI マウス)を作製し、スパイン形態や動物個体における各種行動成績が評価された。

【結果・考察】

1、CRISPR/ Cas9ゲノム編集技術による Tiam1 KI マウスの作製

本研究では CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いてノックインマウスの作製が試みられた。本技術は、化膿レンサ球菌の免疫応答を応用した技術であり、Guide RNA と Cas9 エンドヌクレアーゼからなる。Guide RNA が Cas9 を目的遺伝子へ導き、Cas9 がゲノム DNA を切断することで目的遺伝子をノックアウトさせることができる。また、この際に目的遺伝子に変異を導入したオリゴ DNA が存在すると、確率的に目的配列へノックインされる。本技術を用いて Tiam1 KI マウスの作製が試みられた。まず、CaMKII 結合ドメイン近傍に相同配列を持つ4種類の Guide RNA を設計し、Cas9 と共に mouse Tiam1 遺伝子を HEK293 T細胞へ共発現させ、Tiam1 タンパク質のノックアウト効率の高い Guide RNA が選別された。ノックアウト効率が最も高い Guide RNA を使い、Cas9 mRNA、Tiam1 変異体オリゴ DNA と共に受精卵へ注入され、23 匹の Tiam1 KI マウスを得ることに成功した。

2、Tiam1 KI マウスの脳構造や神経細胞の形態学的所見

Tiam1 KI マウスは各遺伝子型がメンデルの法則に従って生まれ、成体においても際立った身体的所見が見られないことから、Tiam1 変異導入による致死的な影響は無いことがわかった。次に、Tiam1 KI マウスの脳全体の形状や細胞形態への影響が調べられた。脳全体の大きさや細

胞層の染色パターンは同腹の野生型マウスと比べ顕著な差は見られなかった。また Tiam1 KI マウスでの樹状突起スパインの形態が調べられた。小島はゴルジ・コックス染色により細胞を染色し、記憶・学習に重要な脳領域として知られる海馬 CA1 錐体細胞樹状突起スパインの形態を詳細に調べた。その結果、Tiam1 KI マウスのスパイン密度は野生型と比べ有意な違いは見られない一方、スパイン頭部幅や長さの長いスパインの割合が多いことがわかった。この結果から、CaMKII-Tiam1 相互作用はスパインの形成や消失ではなくスパインの体積変化に重要である事が示唆された。

3、Tiam1 KI マウスのシナプスタンパク質発現および情報伝達経路解析

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術のオフターゲットやノックインによる目的以外の遺伝子発現の影響が報告されていることから、小島は Tiam1 KI マウスで神経細胞のシナプスに存在するタンパク質の発現に影響が見られるか調べた。小島は Tiam1 KI マウスと野生型マウスの前脳ライセートを作製し、ウエスタンブロッティング法によりシナプスタンパク質の発現量を比較した。その結果、Tiam1 KI マウスは同腹の野生型マウスと比べ、グルタミン酸受容体や足場タンパク質、アクチン制御に関わるシグナルタンパク質等のシナプスタンパク質の発現量に有意な差はみられなかった。次に、Tiam1 の下流分子 Rac1 の活性が調べられた。小島は前脳ライセートを用い、Rac1 の下流分子 Pak1 の Rac1 結合部を用いたプルダウンアッセイを行い、活性化型 Rac1 の量を比較した。その結果、Tiam1 KI マウスで野生型マウスと比べ有意に Rac1 活性化が低下していた。また、Rac1 とは同じ small GTPase ファミリーである Cdc42 の活性化型の量は両群間で差が見られなかった。小島は Tiam1 KI マウスの脳では CaMKII-Tiam1 相互作用による Tiam1 の RacGEF 活性を維持できない結果、Rac1 活性が特異的に低下した為であると考えた。

4、Tiam1 KI による構造可塑性及び記憶・学習への影響

続いて CaMKII-Tiam1 相互作用の記憶・学習への関与を Tiam1 KI マウスを用いて調べられた。小島はまず Tiam1 KI マウスと野生型マウスから培養海馬スライスを作製し、海馬 CA1 錐体細胞ヘジーンガンにより GFP を発現させ、構造可塑性について検討した。小島は二光子顕微鏡下でケージドグルタミン酸のケージ解除による高頻度刺激を行い、樹状突起スパインの構造変化を GFP の輝度を指標に定量した。野生型マウスでは高頻度刺激によりスパイン体積の拡大と維持が観察されたが、Tiam1 KI マウスでは刺激に伴う体積変化が見られなかった。小島はノックインマウスの神経細胞において CaMKII-Tiam1 の相互作用が阻害されると、Rac1 の活性化が起きないためアクチン細胞骨格系の再構築が起らず構造可塑性が障害されたと考えた。次に、動物個体における記憶学習試験として新規物体認識試験を行った。本試験はマウスが新規物体に嗜好性を示す事を利用し、二つの同一の物体を予めマウスに提示しておき、記憶成績試験時に片方の物体を異なる物体へ取り換えた際の既知物体の記憶、すなわち新規と既知を区別できるかを調べる試験である。本試験を行った結果、Tiam1 KI では学習 1 日後から記憶成績に低下傾向が見られ、学習 7 日後では野生型マウスと比べ有意に低い値を示した。つまり、Tiam1 KI マウスでは物体認識記憶、特にその保持過程が障害されていた。以上の結果を踏まえ、小島は学習時のシナプス刺激によって形成された CaMKII-Tiam1 複合体が維持する分子活性は、記憶保持過程に必須であると考えた。

5、Tiam1 KI マウスの記憶・学習以外の行動表現型

樹状突起スパインの形態は記憶・学習以外にも、鬱様行動や自閉症様行動、統合失調様行動など様々な行動表現型と関連している事が報告されていることから、小島は Tiam1 KI マウスを用いて行動バッテリー試験を行い、記憶学習以外の Tiam1 KI マウス行動表現型を調べた。まず、マウスの直腸温や体重、筋力、温度感受性は野生型マウスと有意な差は見られなかった。次に、オープンフィールド試験並びにローターロッド試験を行い Tiam1 KI マウスの自発行動量や運動学習を調べたが、野生型との有意な差は見られなかった。以上の結果から、中枢神経系以外でのノックインによる影響は少ない事が考えられた。次に、小島は Tiam1 KI マウスに精神疾患様行動が見られるか調べた。まず、不安様行動を調べるため、高架式十字迷路試験、明暗選択箱試験が行われた。高架式十字迷路においては高所に設置された受持迷路で壁のないアームと比べ壁のあるアームへの侵入回数や滞在時間の減少、明暗選択箱試験においては明暗の部屋の移動回数や明室への滞在時間の減少が見られるが、両群においてそれらの値に有意な差は認められなかった。次に、小島は鬱様行動を調べるためにポーソルト強制水泳試験、尾懸垂試験を行い無働時間を測定した。どちらの試験も鬱様行動として無働時間の増加が見られるが Tiam1 KI と野生型マウスの両群に有意な差は認められなかった。また、小島は統合失調様行動を調べるため、プレパルス抑制試験を行った。プレパルス抑制試験では大きな音(110-120 dB)の提示前に小さな音(70-80 dB)を提示する事で大きな音に対する驚愕反応が抑制されるプレパルス抑制という現象を調べる試験であり、統合失調症様モデルマウスや統合失調症患者においてはプレパルス抑制が低下することが知られている。本試験を用いて Tiam1 KI マウスのプレパルス抑制を調べた結果、野生型マウスと比べ有意にプレパルス抑制が低下していた。小島は Tiam1 KI マウスで生じた樹状突起スパイン構造の変化により、統合失調症様行動を呈したと考えた。

【総括】

本研究は、これまで中間表現型として扱われてきた構造可塑性と記憶・学習の関連性に分子メカニズムの観点から迫ったものである。インビトロで発見された CaMKII- Tiam1 相互作用は、個体レベルでの検証でも Small GTPase Rac1 の活性化およびシナプス構造可塑性に必要である事が確認された。さらにこの相互作用が動物個体における記憶の保持過程に必要である事を明らかにした。本研究の結果は CaMKII- Tiam1- Rad 経路が樹状突起スパインの構造の制御のみならず記憶・学習にも重要な役割を持つ事を示している。さらに、この発見は正常時での記憶の分子メカニズムの理解を深めるばかりでなく、アルツハイマー型認知症に代表される記憶障害の治療薬開発に貢献できる。また、CaMKII- Tiam1- Rad 経路の破綻による樹状突起スパイン形態の変化は統合失調症にも関連する事が示唆されたため、記憶障害だけではなく統合失調症など樹状突起スパイン形態に異常が見られる疾患の治療薬開発への貢献が期待できる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。