

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430094

研究課題名(和文)高学習能ラットを規定する分子制御機構の包括的解析

研究課題名(英文)A comprehensive analysis of the molecular mechanism supporting high learning ability rats.

研究代表者

吉井 文均 (YOSHII, Fumihito)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90129726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：学習や記憶機能は、単一遺伝子のみではなく、多くの遺伝子が協調し複雑な伝達ネットワークを形成していくことで成立する。レバー押しによる学習試験において好成績を示すTokai High Avoider (THA)ラットを用いて、学習・記憶に関わる新しい分子機構の解明を目指した。本研究において、THAラットの表現型には、免疫応答や酸化ストレス応答など生体防御機構を担う遺伝子群が関与することが示唆された。代謝産物の主成分分析の結果から、WistarラットとTHAラットは明らかに異なる系統であることが分かった。THAラットは様々なアミノ酸量に変動が認められ、学習や記憶の制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The higher brain function such as learning and memory is established by which many genes are developed the complicated transduction network. We attempted to identify the novel molecular regulation involved in the learning and memory through the use of unique rat strain Tokai High Avoider (THA), a high learning ability phenotype. In the current study, we have suggested that immune system- and antioxidant function-related sets of genes are prominently involved in the phenotype of THA rats. We have demonstrated by principal component analysis of metabolites that Wistar and THA are a completely different strain. In addition, the levels of various amino acids are profoundly different from Wistar rats. These results suggested that the phenotype of THA rats is regulated by an intricate and unique molecular network.

研究分野：脳神経科学

キーワード：高次脳機能 高学習能モデル動物

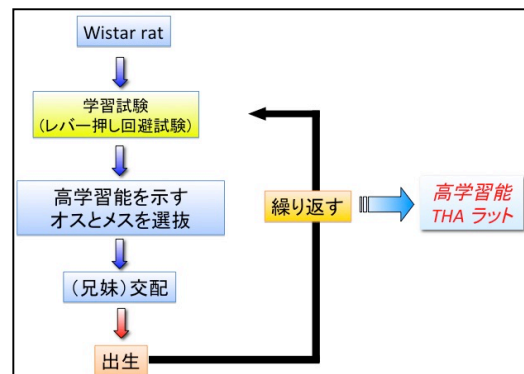
## 1. 研究開始当初の背景

(1) 学習・記憶や情動行動は、人が社会生活を営む上で不可欠な機構であり、そのメカニズムの解明は生命科学の根底を知る手掛かりになる。特に、学習の固定化や記憶の成立に関わる分子生物学的機序の解明は、脳・神経科学のゴールと言っても過言ではない。これまで、遺伝子工学技術をもとに作成されたモデル動物を用いた研究などから、数多くの遺伝子の突然変異やタンパク質の活性化が学習および空間認知能力に影響することが報告され、学習・記憶を制御する分子メカニズムへの理解は飛躍的に広がってきた。また、脳内で記憶の形成に関与する分子機構はヒトと齧歯類で共通点が多いと予想されており、高次脳機能を活性化させたモデル動物は、新たな学習・記憶障害の予防や治療法の開発に対し有用な情報を与えてくれる。一方で、学習を含む高次脳機能は、特定の単一遺伝子だけが機能するのではなく、記憶、認知、情動面において多くの遺伝子が協調し複雑な伝達ネットワークを形成していくことで成立する。また、遺伝子改変動物が高次脳機能の解析において重要なツールとなりえるが、少なからず遺伝子改変による代償作用が出現することや、遺伝子変異による恒常的な活性化または抑制による表現型は自然な状態を表しているとは言えず、高次脳機能本来の姿を捉えることは出来ない。すなわち、定常状態で動物個体が示す高次脳機能研究には、遺伝子改変操作をせずに作成されたモデル動物が必要である。また、安定した学習・記憶能力を備え、かつ個体差がないモデル動物の作成は不可能とされてきた。

(2) これまで、野生型の Wistar 系ラットをもとに、レバー押しによる嫌悪刺激回避試験において好成績を示す表現型を掛け合わせることで、近交系の Tokai High Avoider (THA) ラットを確立・維持してきた(図1)。

従来の実験動物では、出生前の学習レベルは未知であり、かつ出生後の学習能力の個体差が大きいため、次世代の中枢神経系への影響は正確に評価することが不可能であった。THA ラットは、そのような問題点を全て解決する目的で作成が試みられた実験動物である。THA ラットは、生まれながらに高い学習能力が担保されており、安定した情動性を示し、かつ個体差が極めて小さい実験動物であることが既に証明されている。THA ラットと THA ラットの由来の実験動物となっている Wistar ラットを比較することで、学習・記憶に関わる新しい分子機構や加齢と高次脳機能の関係を探索することが出来るため、新たな高次脳機能障害に対する創薬開発に向けた知見を得ることが出来ると考え研究を行った。

図1 THA ラットの系統確立略図



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子改変操作を行わずに確立された高学習能モデル動物(THA ラット)と野生型の Wistar ラットを比較し、新たな学習と記憶に関わる分子を統合的に捉え、その制御機構について解明することである。

## 3. 研究の方法

THA と Wistar ラットは6週齢時にレバー押しによる嫌悪刺激回避学習試験(シドマン型の負の強化スケジュール)を行い、学習試験開始前、学習試験5日目および試験終了時に両群から尾静脈より採血した。学

習試験のスケジュールは5秒に1回0.5秒間の嫌悪刺激を発生させ、レバー押しにより30秒間の刺激回避が出来るようにプログラムした。この学習試験は1日1回1時間、計10日間行った。THAラットは、105～113世代の個体を用いた。Wistarラットは学習試験の結果において低回避（低学習）成績を示した個体を選抜し、THAラットとの比較を行った。

WistarラットとTHAラットの血清および脳から目的部位に分画したサンプルを用いて、THAラットに発現している特異的な因子とその分子ネットワークを解析し比較検討を行った。特に、遺伝子発現、タンパク発現、代謝産物の産生に焦点を当て、THAラットの高学習能を規定する分子機構を包括的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子発現解析

4匹ずつのTHA rat と Wistar rat の海馬からRNAを抽出し、Agilent社製マイクロアレイ(Rat Whole Genome Ver. 3.0)と解析ソフトウェア(Genespring GX ver11.0.2)を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した(図2)。遺伝子発現量の差が2倍以上の増減を認めた遺伝子について統計解析を行い、有意水準が0.05未満を統計的有意と判断した。その結果、Wistar rat と比較しTHA rat で遺伝子発現量に増減の差が認められたものは、合計263個であった。そのうち、発現量の上昇は61個、減少が202個の遺伝子であった。さらに、有意差を認めた変動を示した遺伝子群について Gene Ontology 解析を行い、発現変動遺伝子群を対象として統計的な評価に基づき、特徴的なGO Term(遺伝子機能が類似した集団)を抽出した。免疫応答や主要組織適合遺伝子複合体、さらには酸化ストレス応答といった生体防御機構において重要な役割を

担う遺伝子群に発現差があることが明らかとなった。このことから、THAラットの高学習能は、既存の報告で知られているような遺伝子ではなく、免疫系を中心とした生体防御機構に関与する遺伝子によって制御されていることが示唆された。これまでの先行研究では、学習・記憶といった高次脳機能が免疫応答遺伝子群によって調節されるといった報告は少ない。一方で、海馬の内因性MHCIが、哺乳類の中樞神経系におけるNMDA型グルタミン酸受容体を介するシナプス応答を調節することが報告された(Fourgeaud et al. PNAS, 2010)。MHCIはNMDA受容体を阻害し、シナプス可塑性時に下流にあるNMDA受容体依存性に機能するAMPA受容体の輸送を抑制する。THAラットにおけるMHCI関連遺伝子の発現はWistarラットと比較し有意に減少しており、海馬におけるMHC遺伝子群の発現調節がTHAラットの高学習能を表現していることが考えられた。

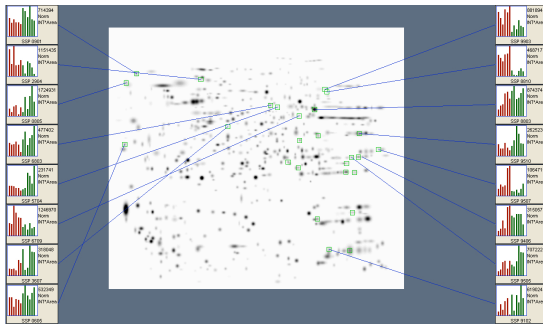
図2 変動を示した遺伝子群

|                    | GO Term                             | p-value  |
|--------------------|-------------------------------------|----------|
| cellular_component | MHC protein complex                 | 2.18E-09 |
|                    | MHC class I protein complex         | 3.25E-08 |
| biological_process | antigen processing and presentation | 6.30E-08 |

##### (2) タンパク質発現解析

海馬からタンパクを抽出し、二次元電気泳動及びMALDI型質量分析計によりTHAラットで有意な発現変化が認められる特徴的なタンパク質の同定を試みた。約20種類のタンパク発現に焦点を当て、質量分析計で得られた結果をデータベース検索([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF))した(図3)。これらの解析結果から、THAラットの海馬で特徴的な発現変動が認められたタンパク質のほとんどは、抗酸化反応を担う分子であることが予想された。

図 3 海馬における二次元電気泳動後のタンパク質のスポット

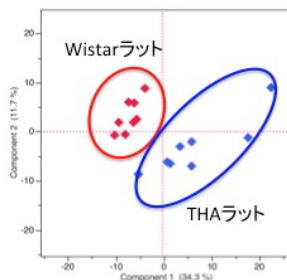


### (3)代謝産物の解析

Wistar ラットと THA ラットの脳組織から分画した海馬、大脳皮質および血清試料を用いてキャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-TOFMS) を用いた分析システムにより、代謝産物の一斉解析を行った。

全代謝産物について主成分分析を行ったところ、Wistar ラットと THA ラットは全く異なった成分グループに分けられ、両者は明らかに異なる系統であることが分かった (図 4)。

図 4 Wistar ラットと THA ラットの代謝産物における主成分分析



血清中の代謝産物を比較したところ、THA ラットにおいてタンパク質合成や筋肉の維持、さらにはエネルギー代謝やインスリンシグナルの制御に重要な役割を担うアミノ酸群が著明に高いことが分かった。さらに、学習試験の経験に伴い血中におけるアミノ酸群の存在量が亢進していくことを見出した。学習した内容を固定化する際、このアミノ酸群を全身循環させることが重要であることが示唆された。しかしな

がら、このアミノ酸群は THA ラットの血液のみならず、海馬や大脳皮質といった脳組織中においても Wistar ラットと比較し有意に多く存在することが明らかとなった。これまでの先行研究において、このアミノ酸群が学習や記憶などの高次脳機能に関与するという報告はない。一方で、THA ラットの血清並びに脳組織において、グルタチオン代謝経路の活性化に伴い産生される代謝産物や、酸化ストレス適応に関わる代謝産物などの亢進が見出され、二次元電気泳動により得られたタンパク質発現の結果を補強するものとなった。次に、学習試験前後で変動する血清中の代謝産物を探索したところ、Wistar ラットおよび THA ラット共に解糖系代謝産物の一つである 3PG (3-phosphoglycerate ; 3-ホスホグリセリン酸) 量が顕著に減少することが分かった。嫌悪刺激である学習試験前後で減少することから、3PG はストレス曝露における新たなバイオマーカーとなりうるものが考えられ、今後は多様なストレス環境下において 3PG がどのような挙動を示すのかなどを詳細に検討する必要がある。

上述したように、高学習能を示す THA ラットは免疫系の遺伝子群の発現、酸化ストレス適応に関わる生体防御タンパクの発現を基本となっていることが明らかとなり、個体の表現型に最も近い位置づけである代謝産物は Wistar ラットと全く異なることが明らかとなった。今後は、THA ラットのゲノム配列に焦点をあて、遺伝子多型や変異などが本研究で明らかとなった分子とどのような関係性にあるのかなどを詳細に検討することや、他の動物系統における高学習能を示す個体をどの程度説明出来るかなど検討する必要がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

富田 勝 (TOMITA, Masaru)  
慶應義塾大学・環境情報学部・教授  
研究者番号：60227626

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Kawaguchi AT, Endo H, Aikawa H, Yamano M, Kawaguchi Y, Haida M, Watanabe T. Effects of Liposome-encapsulated hemoglobin on learning ability in Tokai High Avoider rat after total brain ischemia and reperfusion. Artificial Organs. 38 : 667-674, 2014. (査読有り)

〔学会発表〕 (計 12 件)

1. 角田正史、杉浦由美子、宮島江里子、木戸尊將、細川まゆ子、堀口兵剛、遠藤整、渡辺哲：トリブチルスズに経胎盤・経母乳及び離乳後経口曝露されたメスの Tokai High Avoider ラットのオープンフィールド試験. 第 88 回日本産業衛生学会 5 月 13-16 日 グランフロント大阪 (大阪府大阪市), 2015.
2. 角田正史、長谷川卓弥、菅谷ちえ美、杉浦由美子、堀口兵剛、木戸尊將、柳澤裕之、遠藤整、渡辺哲：塩化トリブチルスズに胎児期～発達期に曝露されたメスの Tokai High Avoider ラットにおける記憶学習能力の抑制 シドマン電撃回避試験による検討. 第 26 回日本微量元素学会学術集会 7 月 4-5 日 北海道大学大学院地球環境科学研究院大講堂 (北海道札幌市), 2015.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://health.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉井 文均 (YOSHII, Fumihito)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90129726

(2) 研究分担者

渡辺 哲 (WATANABE, Tetsu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10129744

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10550551

(3) 連携研究者