







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 675号	氏名	梅田 涼平
審査委員会委員		主査氏名	小林 隆志 
		副査氏名	井原 健一 
		副査氏名	松尾 哲孝 
<p>論文題目 Vrk2 deficiency elicits aggressive behavior in female zebrafish (Vrk2 の欠損は、メスのゼブラフィッシュにおける攻撃行動を誘発する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Genes to Cells</p> <p>論文要旨</p> <p>Vaccinia-related kinase 2 (VRK2)はセリンスレオニンキナーゼであり、胸腺細胞や胎児肝細胞などの増殖性の高い細胞で最初に同定され、細胞分裂や細胞周期の調節に関連していることが知られている。VRK2は脳においても発現が確認されているが、中枢神経系における機能は明らかになっていない。ヒト genome-wide association studies (GWASs)において、VRK2 は統合失調症を含む精神神経疾患の関連因子として報告されているが、精神神経疾患での VRK2 の病態生理学的意義については未だ不明な点が多い。そこで本研究は、<i>vrk2</i> 遺伝子欠損ゼブラフィッシュ(<i>vrk2^{-/-}</i>)を樹立し解析し、VRK2 の生理機能と精神神経疾患における役割の解明を目指した。</p> <p>CRISPR/Cas9 システムを用いて <i>vrk2^{-/-}</i> を作製し、まず初めに <i>vrk2^{-/-}</i> の体長や体重、脳の大きさなどの形態学的な解析を行ったが有意差は認めなかった。次に、<i>vrk2^{-/-}</i> ならびに野生型ゼブラフィッシュ (<i>vrk2^{+/+}</i>) を用いて①Novel tank diving test, ②Mirror test, ③Social interaction test などの一連の行動解析を実施した。これらの行動解析では、Mirror test においてメス <i>vrk2^{-/-}</i> の攻撃行動の顕著な増加を認め、Social interaction test ではメス <i>vrk2^{-/-}</i> が、既知のゼブラフィッシュに対する社会的行動の異常を示した。さらに、<i>vrk2^{-/-}</i> と <i>vrk2^{+/+}</i> の脳を採取し、LC-MS を用いて代表的な神経伝達物質であるドーパミン、セロトニン、グルタミン酸、gamma-aminobutyric acid (GABA) 含量の測定を行ったところ、メス <i>vrk2^{-/-}</i> では <i>vrk2^{+/+}</i> と比較して、脳内 GABA 含量の著しい低下を認めた。その他の神経伝達物質含量については、オス、メスともに <i>vrk2^{-/-}</i> と <i>vrk2^{+/+}</i> 間に有意差は認めなかった。最後に、メス <i>vrk2^{-/-}</i> で認められた攻撃行動に関連する脳部位である前脳領域における神経樹状突起の形態を解析するために、Golgi-Cox 染色を施行したところ、メス <i>vrk2^{-/-}</i> では <i>vrk2^{+/+}</i> と比較して神経樹状突起数の有意な増加が認められ、神経樹状突起の密度が高くなっていることが判明した。</p> <p>本研究は、<i>vrk2</i> 遺伝子欠損ゼブラフィッシュを用いた解析により、VRK2 が精神神経疾患の病態分子メカニズムに関与する可能性が示された。これは精神神経疾患の治療戦略につながる重要な知見である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第 675 号	氏名	梅田涼平
審査委員会委員	主査氏名	小林隆志 	
	副査氏名	井原健二 	
	副査氏名	松尾哲孝 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. vrk1とvrk2の発現部位、標的分子及び分子機能について説明しなさい。特に発生段階における発現レベルや発現部位、さらに性差との関連について知見はあるのか答えなさい。 2. 統合失調症、鬱や癲癇について性差はあるのか答えなさい。 3. GWASを用いた先行研究でvrk2遺伝子と精神神経疾患との関連が報告されているためvrk2欠損ゼブラフィッシュで疾患病態メカニズムの解明を目指したということだが、機能獲得ではなく機能喪失が疾患と関連すると推定した根拠を説明しなさい。 4. vrk2欠損マウスの表現型はどのようなものか、また、欠損マウスの報告があるのに、今回ゼブラフィッシュを用いることにした理由、特にゼブラフィッシュのモデル動物としての優位性を説明しなさい。 5. データの統計処理はどのように行い、多重比較法の結果はどこに示してあるのか答えなさい。 6. 本研究で樹立し解析したvrk2欠損ゼブラフィッシュは1系統だけか答えなさい。 7. vrk2の欠損はタンパク質レベルでも確認したのか答えなさい。 8. Mirror testで、vrk2欠損メス個体の攻撃行動がオスと同レベルまで高くなっているのは、行動がオス化したと考えられるのか答えなさい。 9. Social interaction testで、vrk2欠損メス個体は既知のゼブラフィッシュに接近する時間的割合が高いが、野生型では高くなくオスとメスは同レベルである。これは、Mirror testの見解と一致すると考えられるのか答えなさい。 10. Social interaction testで、ゼブラフィッシュは既知個体と未知個体をどのように認識し区別しているのか答えなさい。 11. vrk2欠損メス個体がMirror testで鏡に衝突するのは攻撃ではなくSocial interaction testで見られた既知個体への接近と解釈できるのか答えなさい。 12. メス個体においてドーパミンの発現が高いのは一般的であるのか答えなさい。 13. 神経突起の刈り込み現象は、発生のどの段階で行われているのか答えなさい。 14. Vrk2はmicrogliaで発現するとのことだが、vrk2の欠損によりNeuronのシナプス内神経伝達物質の量が増えたのはどのようなメカニズムが考えられるのか説明しなさい。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること

学 位 論 文 要 旨

氏名 梅田 涼平

論 文 題 目

Vrk2 deficiency elicits aggressive behavior in female zebrafish

(Vrk2 の欠損は、メスのゼブラフィッシュにおける攻撃行動を誘発する)

要 旨

< 緒 言 >

Vaccinia-related kinase 2 (VRK2)はセリンスレオニンキナーゼであり、胸腺細胞や胎児肝細胞などの増殖性の高い細胞で最初に同定され、細胞分裂や細胞周期の調節に関連していることが知られている。VRK2 は脳においても発現が確認されているが、中枢神経系における機能は明らかになっていない。ヒト genome-wide association studies (GWASs)において、VRK2 は統合失調症を含む精神神経疾患の関連因子として報告されているが、精神神経疾患での VRK2 の病態生理学的意義については未だ不明な点が多い。本研究では、vrk2 遺伝子欠損ゼブラフィッシュ (*vrk2*^{-/-}) を樹立し解析することで、VRK2 の生理機能の解明を目指すとともに、精神神経疾患における VRK2 の役割について明らかにすることを目的とした。

< 研究対象及び方法 >

CRISPR/Cas9 システムを用いて *vrk2*^{-/-} を作製し、まず初めに *vrk2*^{-/-} の体長や体重、脳の大きさなどの形態学的な解析を行った。次に、*vrk2*^{-/-} ならびに野生型ゼブラフィッシュ (*vrk2*^{+/+}) を用いて①Novel tank diving test、②Mirror test、③Social interaction test などの一連の行動解析を実施した。さらに、*vrk2*^{-/-} と *vrk2*^{+/+}

の脳を採取し、LC-MS を用いて代表的な神経伝達物質であるドーパミン、セロトニン、グルタミン酸、
gamma-aminobutyric acid (GABA) 含量の測定を行った。最後に、メス *vrk2*^{-/-} で認められた攻撃行動に関
連する脳部位である前脳領域における神経樹状突起の形態を解析するために、Golgi-Cox 染色を施行し
た。

< 結果 >

vrk2^{-/-} は *vrk2*^{+/+} と比較して、体長、体重、脳の大きさに有意差は認めなかった。一連の行動解析で
は、Mirror test においてメス *vrk2*^{-/-} の攻撃行動の顕著な増加を認め、Social interaction test ではメス *vrk2*^{-/-}
において、既知のゼブラフィッシュに対する社会的行動の異常を認めた。上記のような行動異常が認め
られたことから、脳内神経伝達物質含量を測定したところ、メス *vrk2*^{-/-} では *vrk2*^{+/+} と比較して、脳内
GABA 含量の著しい低下を認めた。その他の神経伝達物質含量については、オス、メスともに *vrk2*^{-/-} と
vrk2^{+/+} 間に有意差は認めなかった。近年、精神神経疾患など行動の異常を示す患者や動物モデルにおい
て、神経樹状突起の異常が報告されている。そこで前脳領域における Golgi-Cox 染色を施行したところ、
メス *vrk2*^{-/-} では *vrk2*^{+/+} と比較して神経樹状突起数の有意な増加が認められ、神経樹状突起の密度が高く
なっていることが判明した。

< 考察 >

本研究においてメス *vrk2*^{-/-} は行動異常の表現型を示し、脳内 GABA 含量の低下ならびに前脳領域で
の神経樹状突起数の増加を認めた。ゼブラフィッシュの前脳領域は大脳や海馬、扁桃体を含んでおり、
行動制御に関する重要な領域である。また、精神神経疾患では行動の異常に加え、神経樹状突起の形態
異常も報告されている。よってメス *vrk2*^{-/-} での行動の変化は、前脳領域における神経樹状突起密度の変
化によるものと考えられた。さらに神経樹状突起の密度に関しては、GABA により神経樹状突起の刈り
込みが行われていることが報告されている。以上より、メス *vrk2*^{-/-} では脳内 GABA 含量の低下により、
神経樹状突起の密度が増加し、行動の異常を示したと考えられた。

< 結語 (まとめ) >

本研究では、*vrk2* 遺伝子欠損ゼブラフィッシュを用いた解析により、VRK2 が精神神経疾患の病態
分子メカニズムに関与する可能性が示された。