

## 審査の結果の要旨

氏名 坪田 匡史

本博士論文は、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、ラット大脳皮質・小脳皮質の局所機能解明を試みたものである。大脳皮質機能解析では、ウイスキーからの入力を表象する領域であるバレル皮質に着目をし、大部分のウイスキー入力に遮断された環境下で誘導される神経細胞応答の可塑的変化時のコフィリンの役割を、単一機能カラムの皮質 2/3 層において調べた。その結果、以下のことを示した。

1. コフィリンに対する microRNA を発現するレンチウイルスベクターを、内因性信号の機能的イメージングによって同定した機能カラム (D2 カラム) の皮質 2/3 層へと少量投与 (200 nl) した結果、同カラムの 2/3 層の神経細胞限定的にコフィリンタンパク質がノックダウンされることを示した。
2. 感覚遮断 (D1 ウイスキーのみを残してその他のウイスキーを全て抜く) を行った野生型ラットの D2 カラム 2/3 層神経細胞で観察される、D1 ウイスキーに対する反応の可塑的上昇が、コフィリンをノックダウンした神経細胞では観察されないことを示した。一方で、野生型ラットで観察される D2 ウイスキーに対する反応の可塑的減少は、コフィリンをノックダウンした神経細胞でも保存されることを示した。このことは、感覚遮断に伴うバレル皮質 2/3 層の可塑的変化のうち、神経細胞活動の上昇においてのみ、コフィリンの作用が必要であることを示唆する。

また、小脳皮質機能解析では、虫部第 9 小葉に存在する循環制御部位に着目をし、光遺伝学的手法を用いて、この部位に存在するプルキンエ細胞のみを特異的に活性化・不活性化することで、循環制御におけるその機能の解析を行った。その結果、以下のことを示した。

3. 短縮型 (~1 kb) の L7 プロモーターの制御下で channelrhodopsin-2 (ChR2) あるいは halorhodopsin (NpHR) を発現するデザインのレンチウイルスベクターを設計・作成し、これをラットの小脳皮質虫部第 9 小葉へ局所投与 (6  $\mu$ l) することで、ChR2 あるいは NpHR の発現を第 9 小葉のプルキンエ細胞に局限させることに成功した。
4. 安静下のラットにおいて、ChR2 刺激により第 9 小葉プルキンエ細胞活動を活性化させると動脈圧が下降する一方で、NpHR 刺激により同プルキンエ細胞活動を抑制すると動脈圧が上昇することを示した。姿勢変化時のラットにおいて、NpHR 刺激

により第9小葉プルキンエ細胞活動を抑制すると、姿勢変化によって生じる変動からの動脈圧の回復が阻害されることを示した。以上の結果は、第9小葉循環制御部位が姿勢変化時の血圧維持に寄与していることを示唆する。

以上のように、本博士論文は、投与部位の周辺に限局した感染をするレンチウイルスベクターの性質を利用することで、大脳および小脳の両皮質における局所的な機能解析という新たなアプローチの開拓を行った。これらの皮質の局所において遺伝子操作(外来遺伝子導入や遺伝子ノックダウンなど)を行うことは、局在した機能を解明する上で重要な方法論であると考えられる一方、従来の細胞種特異的プロモーターを利用する方法などでは、皮質局所に遺伝子操作を限定することは難しい。そのため、本博士論文が確立した手法はその応用範囲が広く、今後の大脳・小脳機能のさらなる理解に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。