

博士論文

論文題目 神経活動依存的な遺伝子発現の可視化を目指した
機能的個体発光観察法の開発

氏名 柳下（姜） 楠

目次

第1章 要旨	3
第2章 序文	4
第3章 材料・方法	20
第4章 結果	39
第5章 考察	56
第6章 参考文献	69
謝辞	82

参考図・図説

第1章 要旨

神経活動依存的な新規遺伝子発現は長期記憶の形成に必須であると考えられているが、その動態を生きた動物で時空間的に観察した例は少ない。そこで、神経活動依存的な遺伝子発現を反映する指標として最初期遺伝子の一つである *Arc* のプロモーター配列に注目し、**Luciferase** をレポーターとした *Arc* プロモータートランスジェニックマウスを作成し、生きた個体における長時間発光観察法を開発した。この個体発光観察法を用いて、感覚刺激によって引き起こされる感覚野での遺伝子発現を経時的に観察することに成功した。また、匂い報酬連合学習課題を用いて連合学習依存的な個体間の遺伝子発現の変動を検出した。

第2章 序文

2.1 神経活動依存的な遺伝子発現の重要性

神経活動を *in vivo* で時空間的に捉える手法としては、近年目覚ましい発展があり、細胞レベルの解像度での Ca^{2+} イメージングから個体レベルでの fMRI まで幅広い方法が開発されている。近年では **Optogenetics** の手法を利用して、光刺激依存的に神経細胞への Ca^{2+} や Na^+ の流入を制御することで神経活動を模倣し、神経活動と回路形成および記憶・学習を始めとした行動との因果関係を探求する試みも進められている (Ramirez et al., 2013)。しかし、これらの研究は全て神経細胞への陽イオン流入によって惹起される神経活動そのものか、または神経活動と関連した血流量の変化などを検出したものである。

神経活動を受けた神経細胞では、シナプスの効率が変化するとともに、NMDA 型グルタミン酸受容体や電位感受性 Ca^{2+} チャンネルの活性化により Ca^{2+} 流入が起こり、下流の PKA や CaM キナーゼの活性化を経て、CREB などの転写調節因子によって新規遺伝子発現が制御されていると考えられている (Bito et al., 1996; Bito and Takemoto 2003; Shaywitz et al., 1999)。ここで誘導された新規遺伝子発現により、シナプス可塑性に関わるタンパク質が翻訳されることが、長期増強(LTP)や長期抑制(LTD)といったシナプスの長期的な変化につながると

考えられている。このシナプスの変化が新たな記憶形成に関わっていることが示唆されている。記憶には、保持できる期間から大別して短期記憶と長期記憶とがあるが、保持期間が長くても数時間単位の短期記憶に対して、数日から数年という期間維持される長期記憶の形成に新規遺伝子発現を伴うシナプスの長期的な変化が必要であることが示されている(図 1)。これは、転写阻害剤やタンパク質合成阻害剤を訓練時および訓練直後に投与した時に、短期記憶の障害は見られなかったのに対して、長期記憶形成が著しく障害されるという一連の報告によるものである(Davis and Squire, 1984; Nader et al., 2000; Kandel, 2001)。また、固定化された長期記憶が想起されると、記憶は不安定化し、再固定化という過程を経て再び安定した状態をとると考えられているが、この再固定化の過程においても神経活動依存的な新規遺伝子発現が必須であることが示されている(Debiec et al., 2002)。また、この再固定化によって、長期記憶がアップデートされると考えられている(Monfils et al., 2009)。

例えば学習課題を行う時のように、記憶形成を導くような刺激を受けた時に、脳の中では多数の細胞で活動電位が引き起こされる。しかし、この神経活動の中には、直接的に記憶の形成に関わらない細胞も多く含まれている。神経活動が起こった細胞の中でも、長期記憶形成に関わっている細胞では新規遺伝子発現につながる一連の反応が起こっていると考えられるため、この新規遺伝子発

現に着目し、これを直接可視化することが可能になれば、短期記憶から長期記憶へと記憶の相転移が起こる過程を制御する重要な脳部位や部位同士の連関を同定することが可能になるかもしれない(図 2)。また、特定の活動部位が同定されていないような学習課題において、神経活動依存的な新規遺伝子発現をマウスの脳全体を対象とした巨視的な視点で可視化することにより、限定された視点では検出できなかった活動部位を検出できる可能性が高いと考えられる。しかし、生きた動物においてこの神経活動によって引き起こされる新規遺伝子発現およびタンパク質合成を時空間的に捉え、可視化している例は少ない。そこで、本研究の目的を神経活動依存的な遺伝子発現の可視化を目指した個体イメージングの開発とし、その学習課題への応用を目指した。

2.2 IEG の役割

神経活動依存的な遺伝子発現の可視化としては、最初期遺伝子(immediate early gene, IEG)と呼ばれる一群の遺伝子を用いた研究がさかんに行われている。IEG は神経活動によって誘導され、一過的かつ迅速に発現するという特徴を持つ一連の遺伝子群である。IEG の研究はもともと、ウイルス学の研究から見出されたものであり、ウイルスが宿主細胞に感染した際に迅速に転写されるウイルス遺伝子が存在する。この転写には宿主細胞の既存の転写因子のみを用

いており、タンパク質合成阻害剤存在下でも転写が進むことが知られている (Watson and Clements, 1980)。その後、このようなウイルス IEG と酷似した特徴を持つ内在性のタンパク質が見出され、細胞内 IEG および簡潔に IEG と呼ばれるようになった。脳に発現する IEG の構成要素としては、主に転写因子、シナプス関連タンパク質、細胞内シグナル分子、分泌タンパク質などからなり、活動を受けた後の神経細胞の変化を調節する因子を多く含む。これらの IEG はその特徴から、神経活動の指標として注目され、主に脳切片における *in situ* hybridization (ISH) や免疫染色法が広く研究されている。様々な刺激や行動課題と組み合わせた観察が行われているが、生きた動物で経時的に IEG の発現を観察した例は少なく、課題による IEG の誘導の動態についてはわかっていないことも多い。

IEG の中でも特に代表的なものとして、転写因子の一部を構成する *c-fos* や *c-jun*、シナプスタンパクをコードする *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) などが挙げられる。特に *Arc* タンパク質は以下に挙げるように、近年、その性質が徐々に明らかになってきたことでシナプス可塑性や長期記憶の形成などに深く関与していると考えられており、その役割がますます注目されている。私もこの *Arc* 遺伝子に注目し、神経活動による *Arc* 遺伝子の発現を可視化することで、新規遺伝子発現を伴う神経活動を可視化し、

その長期記憶形成機構に及ぼす役割を検証できるのではないかと考え、*Arc* プロモーターを用いた神経活動依存的な新規遺伝子発現の可視化の可能性を探求した。

2.3 *Arc* の働き

Arc は activity-regulated gene3.1(*Arg3.1*)とも呼ばれ、電気痙攣刺激(maximal electro convulsive shocks、MECS)で発現する IEG の一つとして発見された(Lyford et al., 1995; Link et al., 1995)。基底状態では発現レベルは低い、MECS によって、海馬と大脳皮質に著しく mRNA が発現する。また、その転写調節は NMDA 型グルタミン酸受容体を介した興奮性の活動によると考えられている。*Arc* の転写活性化は非常にすばやく、MECS 刺激後 1-2 分で核に mRNA が観察され、15-45 分後では、細胞質や樹状突起で観察されるようになる(Guzowski et al., 1999)。また、*Arc* の発現誘導は長期増強(LTP)を誘導する高頻度刺激や新規環境刺激によっても起こることが確認されている(Guzowski et al., 2006; Waltereit et al., 2001; Rodriguez et al., 2005)。さらに、*Arc* の mRNA は細胞体のみならず、神経活動を受容した樹状突起にも局在すること、また、新規合成された *Arc* タンパク質もシナプス活動の起こった樹状突起領域に蓄積することが報告されている(Steward et al., 1998)。この mRNA

の選択的な局在はタンパク合成阻害剤によって阻害されず、mRNA 自身に限局シグナルが備わっていることが示唆されている(Kobayashi et al., 2005)。Arc はまた、dynamin 2 と endophilin 3 と結合し、AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスに関わることが示されており、AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプスにおける恒常的なスケールリングに働いていると考えられる(Chowdhury et al., 2006; Shepherd et al., 2006; Rial Verde et al., 2006)。所属研究室では、この、神経活動を受けた樹状突起への mRNA の蓄積という特徴と、AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスによってシナプス強度を弱めるという一見逆の方向に働く特徴とをつなげる仮説として ”inverse synaptic tagging”を提唱し、その実証を行った(Okuno et al., 2012)。所属研究室の詳細な検証により、Arc は Calmodulin と結合していない不活性型の CaMKII β と結合し、神経活動を受けた樹状突起の中でも、非活性のスパインに蓄積し、そのスパイン膜上の AMPA 型グルタミン酸受容体を内在化させることを示した。この働きによって、活性化したスパインと非活性型のスパインのシナプス強度の比をより大きくしていると考えられる(図 3)。

2.4 Arc と長期増強および長期抑制、長期記憶形成

以上のような特徴から、Arc のシナプス可塑性や長期記憶形成との関連が注目

されている。実際に、海馬における *Arc* の発現を antisense oligodeoxynucleotides(AS ODNs)によって阻害した実験においては、早期相 LTP(early-LTP)には変化がなかったが、後期相 LTP(late-LTP)において LTP が速く減衰することが示された(Guzowski et al., 2000)。また、モリスの水迷路課題においても、トレーニング前および直後での AS ODNs の海馬への注射によって、長期記憶の形成に障害が見られた。更に、*Arc* タンパク質は代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の活性化によって誘導される長期抑制(LTD)に必須であると考えられており、mGluR の活性化をきっかけに *Arc* の翻訳が誘導され、AMPA型グルタミン酸受容体の内在化を促すことでLTDが引き起こされることが示されている(Park et al., 2008; Waung et al., 2008)。*Arc* ノックアウトマウスについてはいくつかの見解が存在するが、Kuhlら(Plath et al., 2006)の作製した *Arc* ORF が完全に欠損したマウスでは、early-LTP の増強と late-LTP の消失が見られた。また、この KO マウスでは水迷路課題や恐怖条件付け課題等の記憶課題において、長期記憶形成に影響がみられているが、記憶の獲得や短期記憶形成には影響がないことが示されている。更に、GFP をノックインすることにより *Arc* 遺伝子を完全に欠損させたマウスでは、視覚野における眼優位性や方位選択性に対する可塑性に障害が見られた(Wang et al., 2006; McCurry et al., 2010)。

また、近年では、記憶・学習障害を呈するアルツハイマー病に *Arc* が関係している可能性が示唆されている。アルツハイマー病の患者死後脳の研究から、*Arc* タンパク質の発現が前頭前野において上昇していることが見いだされた。また、*Arc* がアルツハイマー病の発症に関与していると考えられている *Presenilin1* と結合し、アルツハイマー病で脳内に蓄積する $A\beta$ の産生に関わっていると報告されている(Wu et al., 2011)。

2.5 *Arc* の発現制御

神経活動依存的な *Arc* の発現制御機構に関して、近年、様々な報告が行われており、その詳細が明らかになりつつある。Waltereit らは *Arc* 転写開始点の上流 2kb の配列からいくつかの serum response site(SRE)と Fos/Jun 複合体と結合する部位である AP-1 配列を同定したが、この 2kb の配列のみでは内在性の *Arc* と同レベルの刺激依存的な発現上昇が見られないことを 2001 年に報告した。所属研究室ではさらに、10kb 上流までのプロモーター領域の探索を行い、転写開始点から 7kb の配列が *Arc* のダイナミックな転写調節を担っていることを明らかにした。更に、この 7kb 上流にある約 100bp の配列の中に、転写因子である CREB や serum response factor(SRF)、myocyte enhancer factor-2(MEF2) と結合するサイトが含まれており、転写調節において特に重要であることを見

出し、この配列を synaptic activity-responsive element(SARE)と名付けた (Kawashima et al., 2009)。私は神経活動依存性の高さと *in vivo* の観察においても十分な発現量を見込めるという点から、遺伝子発現の指標として、この SARE を含む 7kb のプロモーター配列を利用することとした(図 4)。

2.6 神経活動の指標としての *Arc*

上記のような *Arc* の神経活動依存的に迅速かつ一過的に発現するという特徴から、これを神経活動依存的な遺伝子発現の指標として活用した研究がさかんに進められている。これらの手法としては主に、脳切片における *in situ* hybridization(ISH)や免疫染色法が広く利用されている(Guzowski et al., 1999, 2000)。

しかし、ISH や免疫染色法を用いるためには、サンプルを固定しなければならず、生きた細胞や脳で観察することはできなかった。そこで、生きた状態での神経細胞や脳での神経活動依存的な遺伝子発現を見るために、この数年では *Arc* プロモーター下流にレポーター遺伝子を付加したトランスジェニックマウスを用いるアプローチが行われるようになってきている。大腸菌人工染色体(BAC)を用いて *Arc* の翻訳領域より下流を緑色蛍光タンパク(d4EGFP)に置き換えたトランスジェニックマウスでは、電気刺激やより生理的な刺激であるヒゲに対

する刺激に応答して、レポーターの誘導が観察されている(Grinevich et al., 2009)。また、*Arc* プロモーターの上流 7000 塩基に黄色蛍光タンパク (dVenus) を付加したトランスジェニックマウスにおいても光刺激による視覚野での dVenus の誘導が観察されている(Eguchi et al., 2009)。

しかし、蛍光を利用するレポーターを導入したマウスでは、その観察において励起光の照射を必要とするため、長時間の観察ではマウスへのダメージやレポーターの退色が起こる可能性が出てくる。これらの問題は、長期記憶形成やシナプス可塑性を視野に入れた長時間の観察では、特に大きな影響を及ぼす可能性があり、このことから、私は *Arc* プロモーターのレポーターとして、蛍光ではなく発光を用いる系を検討した。所属研究室では、SARE 配列を含む *Arc* の 7kb のプロモーター配列に *Luciferase* をレポーターとしたトランスジェニックマウスを作成した(図 4、A)。*Luciferase* レポーターは、励起光を必要とせず、基質である D-Luciferin との反応により ATP 依存的に発光を呈し、長時間の観察においても退色や個体へのダメージ等の影響を最小限にとどめることが期待できる。一細胞レベルの空間解像度を得ることは困難であるが、体性感覚野や一次視覚野といった脳機能部位ごとの識別は可能である。また、海馬特異的に発現するラインの選定や D-Luciferin の局所投与といった更なる工夫によって、たとえば海馬といった励起光が届かないような深部を低侵襲で可視化できるこ

とも期待できる。*c-fos* や *Arc* のプロモーター下流に *Luciferase* を付加したトランスジェニックマウスによる感覚刺激に対する刺激依存的な発光観察も少数報告されているが(Wada et al., 2010; Izumi et al., 2011)、長時間持続して経時的に発光の変化を観察している報告はない。

私は、このような発光レポーターを用いた神経活動依存的な遺伝子発現を可視化する個体イメージング系を確立することで、今まで検出することが困難であった、神経活動依存的な遺伝子発現が起こっている座を経時的に観察することが可能になると考えた。また、イメージング技術と行動試験を組み合わせることで、短期記憶の獲得と長期記憶の形成、更には長期記憶の保持期間が異なる段階での想起と再固定化といった異なる記憶形成・保持過程における神経活動依存的な新規遺伝子発現の起こる部位やタイムコースの違いなどを実際に可視化できる可能性が開け、長期記憶の形成機構解明に大きく貢献する強力なツールとなる。

そこで私は修士課程での研究で、この *Arc* プロモーター*Luciferase* トランスジェニックマウスの特性を解析し、長時間個体発光観察の立ち上げ準備を行った。本研究では、その解析をさらに進め、刺激依存的な発光シグナルを数時間のオーダーで持続的に観察できるイメージング系の立ち上げを行った。低侵襲で生理的な状態に近い発光シグナルを観察するため、頭蓋骨越しに脳全体を上

から観察する系を作成した。特に前頭前野を中心とした大脳皮質でのシグナルに注目した行動課題を設定し、学習成立からの時間経過によるシグナルの変化などを検証した。

2.7 長期記憶と短期記憶、遠隔記憶

前頭前野はヒトにおいて、人格の発現や適切な社会行動の調節等にかかわっていると考えられ、特に柔軟な切り替えや逆転学習にかかわる実行機能を担う部位として考えられている。この実行機能に関する前頭前野の働きは遺伝学的解析および破壊実験などの動物実験からも研究されている。また、前頭前野は「遠隔記憶」と呼ばれる記憶の貯蔵に関与していると考えられている。

記憶は上述のように、持続時間という観点から大きく分けて短期記憶と長期記憶の 2 つに分けられる。短期記憶とは、想起による記憶の定着を伴わない短時間の情報保持であり、長期記憶は記憶の定着を伴うことで、数週間や数ヶ月、更には数年に及ぶ長期間に渡って情報を保持する機構である。この 2 種類の記憶を区別する重要な特徴として、先述の通り、長期記憶形成のみが新規タンパク質合成を必要とするということが挙げられる。

この長期記憶は保持している期間によって更に大きく近時記憶と遠隔記憶に分けることができる。近時記憶から遠隔記憶に移行する期間は種や学習の内容

等により異なるが、一定期間保持した記憶はより持続的な遠隔記憶となると考えられている。この研究は、海馬を含む内側側頭葉の損傷を受けた患者での健忘症の研究から見いだされた (Scoville and Milner, 1957; Nadel and Moscovitch, 1997; Bayley et al., 2003)。これらの患者ではしばしば、言葉で表現できる記憶である、陳述記憶の前向性健忘および一部の逆行性健忘を呈する。しかし、この逆行性健忘は完全ではなく、ある期間以前の記憶は保持していることが多く、その期間は損傷の程度と相関している。このことより、海馬を含む内側側頭葉は新しい記憶の形成および近時記憶の保持に関係しており、それ以上の期間を持って保持している遠隔記憶については他の部位が主に担っているのではないかという仮説が提唱された (Squire and Alvarez, 1995; McClelland et al., 1995)。動物モデルを用いた破壊実験および遺伝的なアプローチからこの仮説は支持され、文脈依存的な恐怖関連づけ学習や報酬を伴う学習において近時記憶の形成には海馬が必要であり、遠隔記憶は海馬非依存的であることが示されている (Kim and Fanselow, 1992; Clark et al., 2002)。マウスやラットといったモデル動物においては、遠隔記憶は脳皮質の中でも、主に前帯状皮質 (anterior cingulate cortex, ACC) や前辺縁皮質 (prelimbic cortex) 及び下辺縁皮質 (infralimbic cortex) を含む前頭前野皮質が担っていると考えられている。しかし、長期記憶の保持期間が短い時点 (近時記憶の段階と考えられる)

と保持期間が長くなった時点(遠隔記憶の段階と考えられる)における新規遺伝子発現について、生きた動物で想起させてからのタイムコースを観察した例は無く、固定化された記憶が時間経過に伴ってどのように大脳皮質に移行し、そこで遺伝子発現が誘導され情報が伝えられているかは未解明な部分が多い。

そこで私は、課題として良く確立されている匂い - 報酬連合学習課題を用いて(Heather et al., 2001)、トレーニングを行う前とトレーニング完了後、更にはマウスで遠隔記憶が形成されていると考えられているトレーニング完了30日後以降での発光観察を行い、同一個体における保持期間が異なる時点での想起による神経活動依存的な新規遺伝子発現の変化を経時的に観察することを試みた。

2.8 本研究で確立した機能的個体発光観察法とその応用

上述のように、長期記憶形成に伴う神経活動依存的な新規遺伝子発現について、IEG を使った組織化学的手法は広く行われているが、生きた動物で新規遺伝子発現を経時的に観察した例は少ない。これは、今までに、神経活動依存的に発現を制御し、*in vivo* のイメージングに耐えうるプロモーターの選択肢がほとんどなかったことや長時間の個体観察に対する技術的な改善が必要であったことなどが課題として残っていたためである。この課題に取り組むために、私は以下の利点を持った今までにない可視化法の開発を行った。

1. 同一個体を繰り返し長期間に渡って観察できること
2. 数時間オーダーの比較的長時間に渡って観察できること
3. 非麻酔の動物で観察できること
4. 神経活動依存的な遺伝子発現の変化を定量的に比較・評価できること

この利点をもった発光観察法を確立するために、所属研究室で報告している、神経活動依存性の高い *Arc* 遺伝子の約 **7kb** のプロモーターを用い、レポータータンパク質として、高感度の発光を呈するヒカリコメツキムシ由来の改変型 **Luciferase** である、**Emerald Luciferase(Eluc)**を付加したトランスジェニックマウスを作成した。また、レポータータンパク質には、分解促進シグナルを付加し半減期を 1.5 時間ほどに短縮することにより、迅速な **Arc** タンパク質の発現を反映するように工夫した。更に、観察系や基質の投与方法の開発、定量的な比較・評価方法の導入を行い、長時間の機能的個体発光観察法を確立した。

この観察法を用いて、感覚刺激を与えた時の感覚野での神経活動依存的な新規遺伝子発現を経時的に可視化した。また、学習課題として匂い-報酬連合学習課題と発光観察を組み合わせることで、学習課題依存的な新規遺伝子発現の変化を観察した。興味深いことに、トレーニング完了 30 日後という長期間記憶が保持された状態において、トレーニング前に比べて報酬と連合させた匂いに曝露した時に有意な変化が生じることを観察した。このような現象は、本観察法の

同一個体で長期に渡って観察を行えるという利点と定量的な比較が可能であるという利点から初めて観察されたものである。

以上のことから、本研究によって開発された機能的個体発光観察法を用いて、神経活動依存的な新規遺伝子発現を初めて経時的および空間的に観察した。また、本観察法の学習課題への適応における可能性を示した。

第3章 材料・方法

3.1 *Arc* プロモータートランスジェニックマウス

SARE 配列を含む *Arc* のプロモーター領域 7000 塩基にヒカリコメツキムシ由来の Luciferase (Emerald Luciferase, Eluc) (Toyobo) と分解促進シグナル (PEST 配列) をつなげたレポーターコンストラクトを遺伝子導入したマウス (*Arc*7000-Eluc Tg) を使用した (Kawashima et al., 2009 および未発表)。トランスジェニックマウス作製においては、pGL4.11-*Arc*7000-Eluc-PEST (Kawashima et al., 2009) から制限酵素 ClaI と AseI で切断した約 9kb の断片を C57BL/6J の受精卵にインジェクションした (日本エスエルシー株式会社に委託)。

また、特別の指示がない限り、動物は 25°C に保たれたアイソレーター内で飼育し、水、餌ともに自由に摂取できるようにした。全ての動物実験は、東京大学の動物実験実施規則に則って行い、東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の審査、承認のもとに行った。

3.2 Luciferase 活性測定法

Luciferase 活性測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) の推奨プロトコルに従って行った。マウスの組織可溶化液での Luciferase 活性測

定の場合、単離したマウス脳(約 15 mg)に可溶化バッファー(Passive Lysis Buffer)を 500 μ l 加えて超音波破碎機で破碎し、組織可溶化液とした。18 μ l の可溶化液に発光基質溶液(Luciferase Assay Reagent II)を 80 μ l 加えたときの Luciferase 活性をプレート型ルミノメーター(Fluoroskan Ascent FL)を用いて計測した。

この時、タンパク量の補正のため、BCA Protein Assay Reagent Kit(Pierce)を用いてタンパク質定量を行い、Luciferase 活性測定値をタンパク質量で割って標準化した。

3.3 ウェスタンブロット

マウス脳サンプルは 3.2 で作製した組織可溶化液を用い、Laemmli バッファー(50 mM Tris-HCl pH6.8、2% SDS、10% glycerol、0.1% BPB、20% 2-mercaptoethanol)を加え、95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱した。

サンプルは 10% Bis-Tris polyacrylamide gel にて展開し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動後、PVDF メンブレンに転写し、2.5%スキムミルクをふくむ TBST (50 mM Tris-HCl pH7.6、150 mM NaCl、0.05% Tween-20) で 1 時間ブロッキングした。一次抗体を一晩 4 $^{\circ}$ C で反応させ、洗浄後、HRP 標識二次抗体で室温 2 時間反応させた。洗浄後にメンブレンを ECL Plus Western

Blotting Detection Reagents(GE Healthcare)を用いて化学発光させ、ルミノイメージャー(LAS-4000mini、FUJIFILM)でシグナルを検出した。

3.4 免疫組織化学法

3.4.1 脳組織切片の作成

マウスは過剰量のネンブタール麻酔の後、胸部を切開し、ペリスタポンプを用いて左心室から PBS および 2% paraformaldehyde(PFA) / 0.1M phosphate buffer(PB)をかん流し、組織を固定した。脳を単離し、後固定として 2%PFA / 0.1M PB 溶液に 12 時間浸し、sucrose / PBS 溶液を 10%, 20%, 25%と段階的に高濃度へ移行しながら 12 時間程度ずつ浸した。クライオスタットで 30 μ m の切片を作製し、染色作業まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

3.4.2 抗体反応

作製した切片を PBS で洗ったのち、2% Hydrogen peroxide(H₂O₂)を含む PBS に室温 15 分反応させた。ブロッキング液(5% Normal Goat Serum, 1% Bovine serum albumin, 0.3% Triton-X 100, in PBS)に室温 1 時間反応させ、ブロッキング液に希釈した抗 Arc 抗体に 4 $^{\circ}$ C72 時間反応させた。PBS-T(0.3% Triton-X 100 in PBS)で洗ったのち、二次抗体に 4 $^{\circ}$ C一晩反応させた。

3.4.3 DAB 発色反応

ABC 発色キット(Vector)の推奨プロトコルに従い、室温 1 時間反応させた。50mM Tris-HCl (pH7.6)で洗ったのち、DAB 反応液(50mM Tris-HCl (pH7.6), 0.02% Diaminobenzidine(DAB))に室温 10 分間反応させ、終濃度 0.003%となるように H₂O₂ を添加し、4 分間反応させ、更に終濃度 0.01M になるように Imidazole を添加し、更に 1 分間反応させた。0.1M PB で洗ったのち、ゼラチンでコートしたスライドガラスに切片をマウントした。これを一晩完全に乾くまで乾燥させた。70%、80%、90%、95%、100%の Ethanol に順番にスライドガラスを浸し、最後に Xylene に 5 分間 2 回浸して、パーマウント(Fisher Scientific)を滴下しカバーガラスをかけて封入した。

3.4.4 画像解析

得られた蛍光染色組織切片は正立顕微鏡 BX51(Olympus)および顕微鏡用デジタルカメラ(DP70)からなるシステムを用いて画像取得を行った。対物レンズは、4x および 10x (すべて Olympus)を用いた。取得画像の解析には画像解析ソフト ImageJ を用いた。取得画像から歯状回と扁桃体中心核における Arc 陽性細胞の個数を multi-point selection tool を用いてカウントした。1 個体につき各領域で 3 視野からカウントを行い、その平均値を個体の代表値とした。

3.5 抗体

本研究で使用した抗体および希釈率は以下の通りである。

抗 Arc ポリクローナル抗体：リコンビナント Arc タンパク質を抗原として、本研究室で作製された抗 Arc ウサギ抗体、OP-1 のアフィニティー精製品(ウエスタンブロットでの希釈率 1:4000 で使用)および新バッチ精製品(免疫組織化学法での希釈率 1:1000 で使用)を用いた(Okuno et al., 2012)。

二次抗体：免疫組織化学法ではビオチン標識抗ウサギ二次抗体 (Vector)を希釈 1:200 で使用した。ウエスタンブロットにおいては、Horseradish Peroxidase 標識二次抗体(GE Healthcare)を希釈率 1:5000 で使用した。

3.6 double *in situ* hybridization(dISH)

3.6.1 ISH プローブの調製

Eluc プローブのテンプレートとして pcDNA3-Eluc-PEST プラスミドを、内在性 Arc のプローブのテンプレートとして pcDNA3-Arc-UTR を用いた。pcDNA3-Eluc-PEST を BamHI で、pcDNA3-Arc-UTR を HindIII で 37°C 2 時間処理した。この制限酵素処理産物を精製し、アンチセンス用のテンプレートとして、MAXIscript(Ambion)と DIG RNA Labeling Mix(Roche Applied Science)または FITC RNA Labeling Mix(Roche Applied Science)を用いて

37°C2 時間で転写させ、Arc プローブは DIG 標識を、Eluc プローブは FITC 標識したアンチセンス RNA プローブを作製した。また、Eluc プローブについては NotI 処理産物を、Arc プローブについては XbaI 処理産物を用いてセンス RNA プローブを作製し、ネガティブコントロールとして用いた。同様に、標識していない核酸を用いて非標識のセンス、アンチセンスプローブを作製して競合実験に用い、シグナルの特異性を確認した。

3.6.2 脳組織切片の作成

マウスは過剰量のネンブタール麻酔の後、胸部を切開し、ペリスタポンプを用いて左心室から PBS および 4% PFA / 0.1M PB をかん流し、組織を固定した。脳を単離し、後固定として 4%PFA / 0.1M PB 溶液に 12 時間浸し、sucrose / PBS 溶液を 10%, 20%, 25% と段階的に高濃度へ移行しながら 12 時間程度ずつ浸した。クライオスタットで 20 μ m の切片を作成し、染色作業まで -80°C で保存した。

3.6.3 dISH

切片を 12 ウェルプレートに移し、0.1M PB 溶液で 10 分間洗浄した。この作業を 2 回繰り返す、さらに 0.75% Glycine / 0.1M PB 溶液で 15 分間 2 回処理した。0.3% TritonX-100 / 0.1M PB 溶液に 20 分間、PK buffer(0.1M Tris-HCl

pH8.0, 50mM EDTA) で薄めた 0.1 μ g / ml Proteinase K で 37 $^{\circ}$ C 30 分間処理し、アセチル化溶液(1.3% Triethanolamine, 0.17% HCl, 0.25% Acetic anhydride) で室温 10 分反応させた。0.1M PB で洗浄し、ハイブリバッファー(750 mM NaCl, 75 mM Sodium citrate, 0.1% Ficoll , 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 0.2 mg/ml yeast tRNA, 0.5 mg/ml salmon sperm DNA, 0.05 mg/ml polyA, 50% formamide)で室温 1 時間インキュベーションし、その後それぞれ 0.5 ng/ml の Arc プローブおよび Eluc プローブを含むハイブリバッファーで 56 $^{\circ}$ C、一晩反応させた。56 $^{\circ}$ C に温めた 50% formamide, 0.1% N-Lauroylsarcosine sodium を含む 2x SSC(0.3 M NaCl, 33 mM Sodium citrate)で洗浄後、RNaseA(10 μ g/ml)で 10 分間処理し、0.1% NLS を含む 2x および 0.2x SSC で洗浄した。2% H₂O₂ を含む 2x SSC で室温 15 分反応させ、ブロッキング溶液(0.3% Triton X-100, 3% アルブミンを含む PBS)で室温 1 時間処理し、Anti-FITC Horseradish Peroxidase 標識抗体で 4 $^{\circ}$ C 一晩反応させた。Peroxidase の酵素反応を TSA Plus Fluorescence System(Perkin Elmer)で増感し、FITC の蛍光シグナルを得た。もう一度ブロッキング溶液で処理し、Anti-Digoxigenin-Peroxydase-Fab fragment 抗体で 4 $^{\circ}$ C 一晩反応させた。再度、Peroxidase の酵素反応を TSA Plus Fluorescence System(Perkin Elmer)で増感し、Cy3 の蛍光シグナルを得た。

得られた蛍光染色組織切片は正立顕微鏡 BX51(Olympus)および顕微鏡用デジタルカメラ(DP70)からなるシステムを用いて画像取得を行った。対物レンズは、4x および 10x、40x UPlan Fl、20x UPlanSApo (すべて Olympus)を用いた。

3.7 アデノ随伴ウイルス(AAV)作成

定量的な長時間発光観察を行うために、刺激非依存的なプロモーターである human SynapsinI のプロモーターによって Eluc を発現させる AAV を作製し、Eluc マウスに局所導入した(図 4、B および図 8、C)。AAV の作成手法としては、近年 Kotin らによって開発された、昆虫細胞を用いて安定的に高タイトーの AAV を得られる手法に基づいた(Urabe et al., 2002; Smith et al., 2009)。所属研究室ではこれを更に改変し、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞での簡便な AAV 大量発現および大量精製法を確立した(鈴木ら、未発表データ)。

3.7.1 バキュロウイルスの作成

エントリーベクターとして、pBluescriptII のベクターに human SynapsinI のプロモーターと Eluc、PEST 配列と WPRE 配列を挿入し、さらにこのカセットを AAV 発現ベクターである pFBAAV にサブクローニングした。この

pFBAAV-hSynI-Eluc-PEST-WPRE をケミカルトランスフォーメーションにより、DH10Bac に導入し、X-Gal プレートに撒いて青白コロニーアッセイを行った。このコロニーから精製したバクミドを Sf9 昆虫細胞に感染させ、Grace Medium(Invitrogen)中で 27°C4 時間保温し、培地上清を新しい 10%ウシ胎児血清を加えた Grace Medium(Invitrogen)に換え、27°Cで 5 日間保温し、この培地上清からバキュロウイルスの P1 ストックを得た。P2 ストックを作成するためには、75cm² T フラスコ(イワキ)にて 12ml の培地量で Sf9 細胞を培養し、培地上清にバキュロウイルス P1 ストックを 400μl 加え、5 日間ほど 27°Cで保温する。この培地上清からバキュロウイルス P2 ストックを得た。

3.7.2 rAAV の作成および精製

得られたバキュロウイルス P2 ストックと、同様に作成した AAV ヘルパータンパク質を発現させるバキュロウイルスとをそれぞれ MOI2 で、300ml 蓋付き三角フラスコ(イワキ)に 80ml スケールで培養した Sf9 細胞(1.5×10^6 cells/well)に感染させ、27°Cで 3 日間振盪培養した。この細胞を回収し、遠心沈殿を PBS で洗ったのち、もう一度遠心した。その沈殿に Hypotonic Buffer 40ml (20mM HEPES(pH8.0), 3mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 500units Benzonase)で懸濁し、37°C30 分保温した。バキュロウイルスを不活性化させる

ために、60°Cで20分保温し、AVBセファロースを2ml加え、室温で1時間程度ローテータで回転させた。この液をカラムに充填し、PBSで2回ほど洗ったのち、Elution Buffer(50mM Glycine (pH3.0))を10mlずつ2回に分けてカラムに通し、1M HEPES (pH7.5) 1ml, 5M NaCl 220μlで中和した。回収したウイルス液を0.2μmフィルターでフィルトレーションし、PBSで洗いながらAmicon Ultra 100K-15遠心フィルターで200~300μlになるまで濃縮した。この濃縮ウイルス液のタイターをqPCRで測定し、4°Cに保存して使用した。AAVのタイターとしては、 1×10^{12} genome copy(gc)/ml前後のタイターを得た。

3.8 発光観察

3.8.1 AAV インジェクション

マウスを400mg/kg抱水クロラル(腹腔内注射)及び2mg/kgキシラジン(皮下注射)で麻酔し、頭皮を除毛した後、脳定位固定装置に外耳で固定した。頭皮を正中で切開し、頭蓋骨を露出させ、インジェクションする場所に印をつけた。この時、観察する刺激によってインジェクション部位を変えた。視覚刺激に供する動物は視覚野での発光シグナルを観察しやすくするために、視覚野を避けるようにブレグマから前方に1mm、左側に1mmの場所にウイルスインジェクション部位を設けた。匂い-報酬連合学習に供する動物は、前頭前野を中心とし

た領域を観察したいという目的のもと、ブレグマから後方に 3mm、左側に 3mm の場所にインジェクション部位を設けた。ドリルでインジェクション部位付近に穴を開け、針先にウイルスを充填した自作のガラス針(針先の直径約 50 μm になるようにプレーで製作した)を脳表から深さ 0.6mm の所まで差し込み、10 分間静置した。分速 0.05 μl で 1×10^{10} gc/ml に薄めたウイルス液を 0.5 μl 注入し、更に 10 分静置した。頭皮を縫合しケージに戻して通常飼育条件で 4 週間飼育した。

3.8.2 マウス脱頭皮手術

ウイルスインジェクション 4~5 週間後、マウスを 400mg/kg 抱水クロラル(腹腔内注射)及び 2mg/kg キシラジン(皮下注射)で麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を大きく露出するように頭皮を切除し、スーパーボンド C&B セット(サンメディカル)中の表面処理剤グリーンを頭蓋骨に塗布し、すぐにミリ Q 水で良く洗い流した。小脳上部にかかる筋肉を切除し、塩ビチューブ(内径 2.5mm 外径 3mm)を小脳上部の頭蓋骨上に置き、露出させた頭蓋骨全体とともにスーパーボンド C&B(サンメディカル)を塗布した。更に、首のすぐ後方の背中の皮を一部切開し、0.8mm バーブ間コネクタ(バイオラッド)にタイゴンチューブ(内径 1.59mm 外径 3.18mm)を取り付けた D-Luciferin 注射アダプタを差し

込み、背中の中の皮の切開部分とアダプタとを一緒にスーパーボンドで上記塩ビチューブに固定させた(図 5、B)。ケージに戻して通常飼育条件で飼育した。

3.8.3 無麻酔発光観察

無麻酔のマウスで発光観察を可能にするために、動物固定装置を作成した。ブレッドボードとポストおよびポストクランプ(全てソーラボ)で土台を作成し、脱頭皮手術後のマウス頭部に設置した塩ビチューブを挟み込む形で固定するマウス固定装置を土台に組み合わせた。無麻酔の固定によるストレスを軽減するために、マウスは 15cm² ディッシュ(イワキ)に細目コルクシートを張り付けたディスクの上に乗るように配置した。このディスクはブレッドボードに取り付けたネジ(ソーラボ)およびベアリング(バンダイ)に載せ、自由に回転できるように中央に穴を開けた(図 5、C)。

イメージングに際しては、脱頭皮手術を施したマウスに PBS で希釈した 0.1M D-Luciferin ナトリウム塩を 100 μ l 腹腔内投与し、この固定装置に固定し、固定装置ごと実体顕微鏡下に設置してイメージングを行った。この時、背中皮下に設置したチューブに 23G 翼状針を挿して 0.1M D-Luciferin を分速 2 μ l でシリンジポンプから持続注射した。実際のイメージングを行う前にマウスを固定装置に慣れさせるため、1 日おきに 2 日間、2 時間程度固定装置に固定した状態で頭

微鏡下に保持した。

観察には、暗箱内に設置した実体顕微鏡 SZX12(Olympus)に搭載した EM-CCD カメラ ImagEM (浜松ホトニクス)を用いて撮像した(図 5、A)。本研究においては EM-CCD カメラの設定は読み出しクロックレート 690kHz、EM 増幅 200 倍、Binning-2 の条件で行い、5 分の露光で 1 枚の画像を取得した。取得した画像はオフラインで画像解析ソフト MetaMorph(Molecular Devices)および ImageJ(NIH)を用いて解析を行った。

以下に個々の発光観察の際の手順を示す。

1. 新奇環境刺激での 1 ショットイメージング(麻酔下)

ヒゲおよび眼球の除去に関しては、イソフルランで呼気麻酔を施したマウスに除去処置を行い、十分な回復を待ってから光を遮るよう暗幕で囲ったホームケージで 2~4 日間飼育した。この動物を蛍光灯点灯下の新奇物体を置いた新奇ケージに指定の時間曝露し、400mg/kg 抱水クロラール(腹腔内注射)及び 2mg/kg キシラジン(皮下注射)で麻酔し、頭皮を切開して、0.1M D-Luciferin を 100 μ l 腹腔内投与し、発光観察を行った。

2. フリッカー刺激による麻酔の有無でのイメージング

マウスを固定装置に固定して、パソコン画面から 3cm 幅の白黒の縞模様を

8 方向に秒速 24cm で移動させるフリッカー刺激映像を 2 時間提示した前後での発光観察を 1 ショットずつ行った。この時、麻酔条件として 400mg/kg 抱水クロラル(腹腔内注射)及び 2mg/kg キシラジン(皮下注射)で麻酔した。

3. 新奇環境刺激前後での長時間イメージング

イメージングに供するマウスを事前に暗箱の中で 2~4 日間飼育した。このマウスを赤色灯の中で固定装置に固定し、2 時間イメージングした後、蛍光灯の光を灯した部屋に置いた新奇環境ケージに 30 分曝露し、再び固定装置に戻して 4 時間イメージングを行った。コントロールとしては、暗所飼育した同一個体で別日に 2 時間のイメージングの後、暗幕で覆ったホームケージに 30 分曝露し、光刺激を入れないように再び固定装置に戻して、4 時間イメージングを行った。

3.8.4 画像解析

画像解析には画像解析ソフト ImageJ を用いた。連続発光画像の中からウイルス由来の発光シグナルを囲う ROI を作製し、元の発光画像の各ピクセル値をウイルス ROI の発光シグナル平均値で標準化した。これを Luminescence Intensity Ratio(LIR)とした(図 4、B)。なお、Anisomycin 導入の発光観察結果

のみ、嗅球由来のシグナルによる標準化を採用した。これは、図 10 の結果から、新奇環境刺激では、視覚野でのみ有意な発光シグナル変化を認め、嗅球およびその他の部位での変化は観察されなかったため、図 10 の結果において、ウイルス由来のシグナルを用いて標準化した結果と嗅球由来のシグナルを用いて標準化した結果とを比較した結果では同じ傾向を示したためである。

また、長時間発光観察結果のセッション間での解析方法に関しては、結果 4.3.2 および図 9 参照。

3.9 匂い - 報酬連合学習課題

マウスは餌摂取量の制限のため、ケージ内の床敷上に 1 日約 2.5g の餌ペレットを与えた。水は自由に摂取できるようにした。

匂い・報酬連合学習課題に関しては、先行研究を参考にトレーニングおよびテストを行った(Heather et al., 2001)。また、発光観察の処置を施した **Eluc** マウスにトレーニングを行い、その前後での発光観察を行った。

3.9.1 トレーニング

連合学習のトレーニングには、報酬と同時に提示する匂い(S+)と報酬無しで提示する匂い(S-)とを用意した。**Propylene glycol** を溶媒として 15%に希釈した

Linalool または Phenyl acetate(全てナカライテスク)を提示する匂いとして使用し、どちらの匂いが S+になるのかは動物によって無作為に振り分けた。匂いの提示には、3cm²に切ったろ紙に匂い液を 50 μ l 滴下し、6cm²ディッシュ(イワキ)に熱した 23G シリンジ針(テルモ)で等間隔で 10 個の穴を開けた匂いポッドの中に、ろ紙を入れ、ケージの任意の場所に設置した。S+の匂いの場合には、この匂いポッド上に報酬として約 1cm 角のスクロースの結晶を 10 粒ほど置き、上から床敷としてペパークリーンを敷き詰めた。トレーニングにおいては、S+または S-どちらかの匂いを入れた匂いポッドをケージに設置し、そのケージにマウスを 10 分間曝露させた。その後ホームケージに戻し、10 分間休ませた。この組み合わせを 1 セッションとして、1 日に S+と S-の匂いをそれぞれ 2 セッションずつ計 4 セッション行った。また、この 1 日のセッションを 4 日間行った。なお、トレーニングの最初のセッションのみスクロース結晶を床敷の上に置いた。匂いポッドのケージ内での置き場所は 4 隅の任意の場所とし、1 日のトレーニングの中でセッションごとに異なるように配置した。また、S+または S-の提示する順番も乱数表を用いてランダムに割り振り、いつも決まった順番にならないよう注意した。発光観察に用いた個体については、トレーニングセッション中の行動をビデオで計測した。

3.9.2 テスト

69×20×20cm の透明アクリル板で作製したテストケージを用いた。テストケージは3つの区画に分かれており、それぞれの仕切り板には6×5.5cm のオープンスペースが開けられており、スライドドアを設置した。左右の区画にはそれぞれ S+または S-のどちらかの匂いポッドを設置し、中央の区画には床敷のみを敷き詰めた。マウスを中央の区画に置き、両方のスライドドアを同時に開け、マウスがどちらの区画の匂いポッドをどのくらいの時間探索するかを3分間測定した。テストケージに慣れさせるため、テスト前日に匂いポッドを置かないテストケージに5分間曝露させた。またテスト当日にも匂いポッド無しテストケージに5分間曝露させた。匂いポッド無しでの馴化中およびテスト中のマウスの行動をビデオ計測した。

3.9.3 匂い - 報酬連合学習課題におけるイメージング

トレーニング遂行前(A)および完了後(B)またはトレーニング完了 30~35 日後(C)(以後便宜的にトレーニング完了30日後と呼ぶ)にトレーニングで用いた匂いケージと同じケージに報酬と連合させた S+の匂いまたは報酬を提示しない S-の匂いどちらかのみ1種類を入れ、報酬はどちらの匂いの場合にも入れずに、マウスを10分間曝露させた。その後すぐに固定装置に固定して4時間イメージ

ングを行った。同じ個体で別の匂いでイメージングを行うときには、最短で中 1 日空けてイメージングを行った。S+および S-になる匂いは動物により無作為に振り分けた。また、A のイメージングの際には、S+または S-になる匂いのどちらを先に提示してイメージングするのも動物によって無作為に振り分けた。B および C のイメージングの際には、A でのイメージングと同じ順序で S+ または S-の匂いを提示してイメージングを行った。更に、A での匂い提示の順序とトレーニング中の匂い提示の順序も完全に乱数表を用いてランダム化した。

3.9.4 ビデオ動画解析

解析としては、匂いポッド探索開始潜時として、それぞれのトレーニングセッションにおいてマウスがケージに入れられてから匂いポッドの場所に着いて探索を開始するまでの時間をビデオから計測した。

また、テスト中の 3 分間でのそれぞれの匂いポッド探索時間をビデオから計測し、集計した。

3.10 統計解析

データ解析には ImageJ、Excel 2010(Microsoft)、および統計解析ソフト

GraphPad Prism6(GraphPad Software)を用いた。グラフ作成には Excel 2010 および GraphPad Prism6 を用いた。データ間に対応がある検定については正規分布が仮定される群間について **paired-t test** を行った。また、3 群間以上の平均の差の検定には、ANOVA と必要に応じてそれに続くコントロールとの比較として **Dunnett** 法を用いた。

第4章 結果

4.1 *Arc* プロモータートランスジェニックマウスの特徴付け

所属研究室では以前に、*Arc* の神経活動依存的な発現制御機構を詳細に解析し、約 7kb のプロモーター配列(*Arc7000*)が顕著に活動依存性を呈することを示した(Kawashima et al., 2009)。培養神経細胞においても、*Arc7000* にレポーターを付加したコンストラクトを遺伝子導入し、刺激培地(100 μ M 4-Aminopyridine、30 μ M Bicuculline、100 μ M Glycine、1 μ M Strychnine を含む培養培地)を添加することで、時間依存的なレポータータンパク質の発現を確認している。この *Arc7000* プロモーターは先行研究でも示されている約 2000 塩基の *Arc* プロモーター(Waltereit et al., 2001)の活性をはるかにしのぎ、また 1000 塩基ごとに上流に延長した *Arc* プロモーターの中でも最もダイナミックに神経活動依存性を示す。また、*Arc* 発現の特徴の一つである神経細胞特異性もこの約 7000 塩基のプロモーターによって規定されていることが示唆された(Kawashima et al., 2009)。

所属研究室はこの *Arc7000* プロモーター配列にレポータータンパク質を付加したトランスジェニックマウスを作製し、生きた動物における遺伝子発現の動態を観察することを目指した。レポータータンパク質としては、同じ動物で操

り返し、脳全体を巨視的に観察したいという目的のため、励起光による光毒性がないことなどから **Luciferase** を採用した。中でも、ホタル由来の **Luciferase** に比べて発光強度が高いヒカリコメツキムシ由来の **Emerald Luciferase(Eluc)** を採用している。この **Eluc** にはタンパク質分解を促進する **PEST** 配列が付加されており、半減期が約 1.5 時間と短いことが示されている。この **Eluc** を **Arc7000** プロモーターに付加したトランスジェニックマウスを作製した(**Arc7000-Eluc Tg** マウス、図 4、A)。常法に従い、計 277 個の胚にマイクロインジェクションを行ったところ、15 匹のマウスが得られ、このうち 3 つの個体でトランスジェンが確認された。この 3 個体は全て次世代にトランスジェンを伝播することができ、3 つのラインを得た。また、これらのいずれの個体においても、脳・神経系をはじめとする体の各器官における形成異常や行動の異常等は観察されていない。

私は、この 3 つのラインのコピー数およびレポータータンパク質の発現を検討した(姜、修士論文)。これにより、3 つのラインの中でも大脳皮質において基底状態での **Eluc** の発現と刺激依存的な発現上昇の比率などをもとに、ラインを 1 つ選定し、以後の実験に用いることとした。これを以後 **Eluc** マウスとする。この **Eluc** マウスの特徴づけを更に行った。

4.1.1 Eluc マウスの刺激依存的な Arc と Eluc の発現

Eluc マウスの視覚および触覚を活性化させる刺激として、蛍光灯点灯下での新奇環境刺激を行った。この刺激によって、海馬歯状回およびバレル野、視覚野を主とした大脳皮質で内在性の *Arc* mRNA およびタンパク質の発現が上昇することが、先行研究および予備実験により観察されている。暗所飼育により、視覚野の活動を抑えた Eluc マウスを新奇環境に 1 時間または 3 時間曝露させた。また、対照として暗状態を維持したままの個体もちいた。各条件曝露後、脳を取り出し、ブレグマから後方半分の視覚野およびバレル野を含む大脳皮質を単離・破碎して抗 *Arc* 抗体によるウエスタンブロットと *Luciferase* 活性アッセイを行い、それぞれのタンパク量の定量を行った(図 6、A)。また、新奇環境 3 時間曝露後にかん流固定を行い、内在性の *Arc* とレポーター-Eluc の mRNA を検出するプローブを用いた *double in situ hybridization*(dISH)を行い、それぞれの mRNA の局在を観察した(図 6、B)。

ウエスタンブロットと *Luciferase* 活性アッセイの結果から、暗条件に比べて、新奇刺激 1 時間後では *Arc* タンパク質の発現量はほぼ同程度であり、Eluc の発現量は同程度か少し増えていた。新奇環境 3 時間後では、*Arc*、Eluc とともに暗条件に比べて 2 倍程度の有意な発現上昇を認めている。この *Arc* のウエスタンブロットのバンド強度比と Eluc の *Luciferase* 活性比を各個体においてプロット

し、各個体での Arc と Eluc 発現の関係を示した(図 6、A、右グラフ)。

また、dISH の結果でも、暗条件に比べて、新奇環境曝露 3 時間後には、海馬 CA1 および歯状回、大脳皮質で Arc、Eluc とともに mRNA の発現上昇を観察しており、拡大図により共局在していることを確認している(図 6、B)。これらの結果から、Eluc マウスにおいて、レポータータンパク質である Eluc が内在性の Arc の発現を再現し、Arc7000 プロモーターによって刺激依存的に発現誘導されていることが示された。

4.2 Eluc マウスの刺激依存的な発光観察

上記で観察された刺激依存的な Eluc の発現上昇を、基質 D-Luciferin を腹腔注射した個体で発光観察により観察できるかを検討した。ヒゲや眼球を所定の箇所除去した Eluc マウスにおいて、暗所飼育後、蛍光灯点灯下の新奇環境に 3 時間曝露した(図 7)。この動物に麻酔をかけて、頭皮を切開・除去し、D-Luciferin を腹腔内注射により投与し、実体顕微鏡にて発光観察を行った。両側の眼球と右側のヒゲを全て除去したマウスでは、視覚野(白矢頭)でのシグナル上昇は観察されなかった。また、バレル野(白矢印)では、除去された左側のヒゲに対応する右側のバレル野でのシグナルは抑えられているのに対して、左側のバレル野でシグナル上昇が観察された。これに対して、両側のヒゲと右側の眼球を除去し

たマウスでは、バレル野でのシグナルは両側ともに低いのに対して、視覚野でのシグナルは右側で大幅に上昇しているのが観察された。このパターンはヒゲ、視覚刺激ともに動物間で保存されており、他の個体においても同様のパターンを観察した。Eluc の発光強度に関しては、動物間および同一個体内でも別の回に観察した場合には 1.5 倍程度の範囲内ではばらつくことを確認している。これは回ごとに D-Luciferin を腹腔投与することから、投与された腹腔内での位置や麻酔のかかり具合、および D-Luciferin を注射してから観察を始めるまでの時間差などによる血流量の変動によるものと考えられる。また、バレル野と視覚野に挟まれた領域でシグナルが上昇しているのは、前後肢や体幹をはじめとした、一次体性感覚野における反応と考えられる。これらの結果から、Eluc マウスを用いた発光観察によって、刺激依存的な視覚野やバレル野といった機能領域単位での同定が可能であることが示された。

4.3 長時間発光観察による刺激依存的な遺伝子発現の可視化

Eluc マウスを用いて数時間オーダーの長時間発光観察を行い、刺激依存的なシグナルの検出を試みた。

4.3.1 長時間定量的発光観察の導入と麻酔の有無の検討

発光観察を長時間行うには、基質である **D-Luciferin** を長時間動物に持続投与しなければならない。先行研究で行われている **Luciferase** 発光観察はほぼすべてが **D-Luciferin** を 1 回腹腔注射し、あるタイムポイントでの発光を 1 ショット撮影するという手法であり、発光シグナルを長時間連続観察している例はほとんど見られない。そこで私は **D-Luciferin** の投与方法の検討から行った(図 8、A)。標準的な **Luciferase** イメージングの **D-Luciferin** 投与方法としては、0.1M の **D-Luciferin** を腹腔に 100 μ l 注射するというものである。この方法で **D-Luciferin** を 1 回投与し、発光シグナルの観察を行ったところ、イメージング開始後 30 分前後でシグナルはピークに達し、その後は徐々に減衰していく。この減衰を抑え、ある程度一定した発光シグナルを持続して得るために、シリンジポンプを用いた **D-Luciferin** の持続注射を導入した。方法に示したように、**D-Luciferin** を安定して皮下注射できるように、背中皮下に **D-Luciferin** 注射アダプタを導入した(図 5、B)。シリンジポンプからの投与速度を様々にふって検討したところ、このアダプタからの 0.1M **D-Luciferin** の毎分 2 μ l 投与を最初の 100 μ l **D-Luciferin** 腹腔投与と合わせることで、長時間安定した発光シグナルが得られるようになった。この時、典型的なシグナルの変動の仕方として、100 μ l 腹腔内注射によると思われるシグナル上昇があり、10~20 分前後でピークに達

し、その後ある程度一定のシグナル強度値で比較的安定状態になり、それ以下には減衰しない(図 8、A)。

この **D-Luciferin** 持続投与法を用いて、同一個体および個体間での長時間発光観察を行った。ホームケージ飼育マウスをイメージング固定装置に固定し、**D-Luciferin** 持続投与による発光強度を 2 時間観察した(図 8、B)。個体間および同一個体内でも別の回では、定常状態に近い状態に至った後での発光強度の変動の仕方および定常状態に至る初速にばらつきがみられている。

この変動をキャンセルして個体間や別の回の発光観察画像の定量的な比較を行うために、個体の内部標準指標として、AAV を用いた恒常的に **Eluc** を発現する参照領域の導入を行った(図 4、B)。内部標準としては、感覚刺激に対応する感覚野での活動のように、活性化される部位が確立されているような刺激においては、活性化される部位以外の領域の発光シグナルを用いることでも標準化が可能であると考えられる。しかし、学習課題のように活性化する部位が未知であるような場合には、標準化に用いる部位を選択することが困難になるため、AAV により外来性に参照領域を導入することとした。図 8、B の発光シグナルを参照領域の発光シグナルで標準化した結果を示す(図 8、C)。この時、AAV はブレグマから左側 3mm 後方に 3mm の場所に打っている。最初の 30 分以内に下向きの傾向を示す計算上のアーティファクトが観察されているが、その後は

どの回においても変動が軽減されており、15%以内の変動率で定常状態に達していることが示された。最初の30分間のアーティファクトに関しては、オリジナルの画像での参照領域の **Eluc** の発光強度が他の部位に対して高くなっているため、100 μ l の **D-Luciferin** 投与による図 8、B で見えている最初のピークも参照領域ではより大きくなり、これを標準化の際に分母に用いることで下向きの傾向が表れていると考えられる。よって、以下の結果では発光観察開始直後の30分間の定量結果は除いて示すこととした。

また、イメージングの際の麻酔についても検討を行った(図 8、D)。抱水クロラルとキシラジンの麻酔によって、2時間程度安定して麻酔状態を維持することが可能であるが、麻酔をかけてから視覚刺激として縞模様のフリッカー刺激を2時間与えても、視覚野での顕著なシグナル上昇が観察出来なかった。これに比べ、非麻酔で同じ刺激を与えた場合、視覚野でのシグナル上昇を観察した。この傾向は他の個体によっても観察されている。

よって、以後の長時間発光観察においては、上記の **D-Luciferin** 投与条件および **AAV** 由来のシグナルによる標準化方法を用い、非麻酔で観察を行った。

4.3.2 長時間発光観察の画像解析方法

更に、同一個体内でのイメージングセッション間および個体間でのイメージン

グ結果を定量的に比較・評価するために、標準脳の規格を作成し、全てのイメージング画像を同じ標準脳規格に合わせる操作を行った(図 9、A)。取得した明視野画像を、ブレグマを中心とし、正中線を垂直方向に中央になるように回転させた 255 ピクセル平方の画像に変換しなおした。この画像における冠状縫合からブレグマまでの距離を 80 ピクセルになるように画像の比率を変更し、この変更をすべて発光画像に当てはめた。この作業を各個体からの画像に対して行うことにより、すべての画像を同じ比率かつ同じ位置に補正した。個体間での画像の比較を行う場合には、補正で排除しきれなかった位置のずれを解決するために、2 ピクセルのメディアンフィルタと 5 x 5 のビニングをかけた(図 9、A)。これによって、画像ベースで各観察画像の比較を行えるようになった。また、画像ベースで刺激依存的な発光シグナルの変化を検出するために、ウイルス参照領域で標準化した LIR 画像において、同じ個体における刺激条件での連続画像からコントロール条件での連続画像を引いた差分画像における t 値を計算し、画像ベースでマッピングした(図 9、B)。t 値画像の作製においては、LIR 画像を用いて、同じ個体での刺激条件での連続 Ratio 画像からコントロール条件での連続 Ratio 画像を引いた差分画像を作製した。この差分画像を個体数 N 個についてそれぞれ作成し、その平均値画像(\bar{d})と個体間での標準偏差値(s)を表す画像を作製した。この画像から、以下の式(1)を用いて t 値を表す連続画像を作成し

た(図 9、B)。

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{s^2/N}} \quad \dots (1)$$

この解析で、自由度と t 値の兼ね合いから、有意な点として表出する部位は、コントロールに比べて刺激依存的に変化した部位と考えられる。なお、今後の解析としては、刺激条件でコントロール条件に比べて **LIR** 値が正になる点のみを考慮して、片側検定を行い、アーティファクトを排除した閾値として有意水準として特に指定がある場合を除き p 値 0.01 未満を表す点を示した。ちなみに、以下の解析で差分画像が負の値をとり、有意になる部分は観察されなかった。

4.3.3 長時間発光観察を用いた刺激依存的な発光シグナルの観察

光および新奇環境刺激によって視覚野およびバレル野を含む体性感覚野でのシグナルの上昇を上記の条件を用いた長時間非麻酔観察法で観察できるかを検討した。刺激として、30 分の蛍光灯点灯下での新奇環境刺激を行い、コントロールとして、30 分間の暗所ホームケージ曝露を行った(図 10)。事前に暗所で飼育し、暗い状態を保ったまま刺激前イメージングを 2 時間行った。暗所飼育によって、視覚野を含む後頭部で参照シグナルとの比で表される **Luminescence**

Intensity Ratio (LIR)が他の部位に比べ低くなっていることが観察された。光刺激を 30 分行った後、刺激後イメージングを行ったところ、イメージング開始 4 時間後では刺激前に比べて後頭部での LIR が上昇していることが観察された。コントロールとして、同じ動物での 30 分暗状態曝露ではこの上昇は見られなかった。Paxinos らのアトラスを参考に再構成した一次視覚野(V1)領域の ROI を適用し、その ROI における LIR の変動をグラフに示した(Paxinos et al., 2001)(図 10、B)。このグラフにおいても、光刺激条件での視覚野での LIR の上昇が観察された。

また、画像ベースで光刺激依存的な発光シグナルの変化を検出するために、同じ個体における光刺激条件での連続画像から暗所曝露条件での連続画像を引いた差分画像における t 値を画像ベースでマッピングした。これより、片側検定で有意水準 1%未満を示す領域を黄色で示した(図 11)。有意水準を満たすスポットが、刺激前および刺激後 60 分ではほぼ観察されないのに対して、刺激後 120 分から視覚野で立ち上がり始め、240 分後には視覚野での有意な差が検出されている。また、この t マップにおいても各機能領域を示す ROI を適用すると、有意なスポットは主に一次視覚野を示す ROI を中心に観察された。このことにより、長時間発光観察により、刺激依存的なシグナルの変化を鋭敏に観察することに成功した。

4.3.4 長時間発光観察の新規遺伝子発現依存性

発光観察によって得られたシグナルが新規遺伝子発現によるものであるかどうかを検討するため、タンパク質合成阻害剤 **Anisomycin** を用いた実験を行った(図 12)。図 10 と同様に蛍光灯点灯下での新奇環境刺激を 30 分行い、刺激後 1 時間の時点で 150mg/kg の **Anisomycin** および溶媒として PBS を腹腔注射し、引き続き発光観察を行った。一次視覚野領域の ROI を適用し、その ROI における LIR の変動をグラフに示した。同一個体における PBS を打ったコントロールでは図 10 と同様に視覚野での LIR の上昇が観察されるのに対し、同じ個体に **Anisomycin** を投与した回ではその上昇がみられていない。画像ベースの t マップからでも **Anisomycin** 投与に比べて溶媒投与では視覚野の発光シグナルが上昇していることが確認された。このことから、観察された視覚野でのシグナル上昇は刺激によって新規に合成された **Eluc** タンパク質によるものであることが示された。

4.4 匂い - 報酬連合学習課題における発光観察

この発光観察系を用いて、学習課題における発光観察を行い、学習依存的な活性化部位の探索を試みた。

課題として、匂い - 報酬連合学習課題を用いた。報酬とともに提示する匂い

(S+)と報酬を伴わない匂い(S-)にそれぞれ Eluc マウスを曝露することで、S+の匂いと報酬の連合を学習させた。また、このトレーニングを行う前後、およびトレーニング完了 30 日後に S+および S-の匂いのみをトレーニングケージにおいて 10 分間提示し、直後から 4 時間の発光観察を行った(図 13、A)。この発光観察を行った個体においてトレーニングセッション 1 日間での S+、S-それぞれの匂いポッド探索開始までの平均時間をプロットした(図 13、C 左側)。S+のセッションではトレーニング 1 日目に比べて、2 日目 3 日目 4 日目とトレーニングの時間経過に伴って有意に潜時が短くなっており、効率的に報酬を得ていることがわかる。また、S-ではこのような潜時の短縮は見られなかった。さらに、全ての発光観察セッション終了後に 3 チャンバーから成る、匂い嗜好性テストを行ったところ、S+として用いた匂いポッドの探索時間が有意に長くなった(図 13、C 右側)。これらのことから、4 日間のトレーニングによって発光観察を行った Eluc マウスは報酬と匂いの連合を学習し、S+を選択的に探索すること、またその記憶を 30 日間保持することが示された。

4.5 匂い曝露の順序による発光シグナルの変化

匂い - 報酬連合学習課題と発光観察の組み合わせにおいて、トレーニング前の A におけるイメージング第 1 回目では、マウスは初めて匂い刺激に曝露される

ことになる。そこで、トレーニング前 A でのイメージング 1 回目と 2 回目の発光シグナルに変化があるかどうかを、イメージング 2 回目の連続画像から 1 回目の連続画像を引いた差分画像での t 値画像を作成して検証した(図 14)。この結果から、イメージング開始 120 分後から有意なスポットが観察され始め、イメージング 210 分から 240 分の間で嗅球および視覚野の一部にスポットが観察された。代表値として視覚野の一部で t 値上昇のスポットが観察された部位を含む ROI を指定し、その部位での差分画像の平均値を経時的にプロットした結果においても、120 分前後から有意に 0 より大きい値をとることを観察した。このことから、発光シグナルは 1 回目の匂い曝露より 2 回目の匂い曝露において特に嗅球および視覚野の一部で高くなる傾向が示された。これは、初めて触れる匂いに対する反応を反映していると考えられる。

A において匂いを曝露する順序はマウスによってランダム化しており、発光観察に用いたものとしては、第 1 回目に後のトレーニングで S+となる匂いを提示された群と S-を提示された群のそれぞれ 2 群に分けられる。図 13 の結果から、A での匂い提示の順序が発光シグナルに影響を与える可能性があるため、上記の 2 群を分けて別々に以下の解析を行った。

4.6 トレーニング依存的な発光シグナルの変化

4.6.1 トレーニング完了からの経過時間による発光シグナルの変化

トレーニングに対する発光シグナルの変化を検証するため、**B** または **C** の条件での **S+** および **S-** を提示した際の観察画像から **A** の条件での **S+** および **S-** を提示した際の観察画像を引いた差分画像から t 値画像を作成した。**A** において 1 回目に **S-** を提示した群についてはどの条件においても有意なスポットは観察されなかったのに対して(図は割愛)、1 回目に **S+** を提示した群では、**C** - **A** の **S+** を提示した際に有意水準 0.5%未満を示す顕著なシグナルが観察された(図 15)。なお、トレーニングの際の匂い提示順序は、**A**、**B** および **C** での **S+**、**S-** の提示順序とは関係なく完全に無作為にしている。有意なスポットシグナルは前頭葉側を中心に見られ、また、観察開始後 150 分前後から嗅球(**OB**)においても検出された。

4.6.2 海馬および扁桃体の Arc の発現の変化

この、**C** - **A** における **S+** の匂いを曝露した際に有意なシグナルの変化を得たことに関して、**B** - **A** の **S+** を曝露した際には、発光シグナルの主な観察源であると考えている、大脳皮質上部での遺伝子発現の変化が小さいと考えられる。類似の匂い連合学習を用いたラットにおける先行研究から、**B** の時点ではむしろ

ろ、海馬や扁桃体での遺伝子発現が上昇している可能性が考えられる(Hess et al., 1995; 1997)。そこで、参考実験として、野生型のマウスに匂い - 報酬連合学習のトレーニングを行い、その習得後(B 時点に相当)および、習得完了 30 日後(C 時点に相当)に再度 S+または S-の匂いに曝露し、90 分後にかん流固定したのち、内在性の Arc タンパク質の発現を免疫染色により評価した。顕著な Arc 発現細胞が観察された海馬歯状回(DG)と扁桃体中心核(CeA)における Arc 発現細胞の数をカウントした(図 16)。なお、この時、トレーニングによる報酬との連合学習と Arc 発現の関係を見るために、コントロールとして、報酬を伴わない匂い曝露のみのトレーニングを行った個体群とした。この結果、両領域において有意な差は検出されなかったが、特に扁桃体中心核において、トレーニング完了後に再度 S+を曝露した群で Arc 発現細胞数が多い傾向を示した。

4.6.3 各領域における発光シグナルの経時的变化

図 15 で観察された有意なシグナルを示す領域において実際の発光シグナルの変化を検証するため、各機能領域での t 値画像作成に用いた差分画像での LIR 平均値および個体間での発光シグナルの変動を検証するために、変動係数 CV の経時的变化を示した(図 17、18、19)。

図 15 で有意なスポットが観察されている領域において、A でのイメージング

第 1 回目で S+ を提示した群における、LIR 差分値と個体間 CV について検証した。

右側の FrA 領域においては、LIR の平均差分値は C - A の S+ 提示時は、B - A の S+ 提示時に比べて有意水準 5% で変化していることが示された。また、C - A の S+ 提示の時にのみ、個体間の変動係数である CV が低い値を示した(図 17)。

右側 M2 後側領域においては、LIR の平均差分値は C - A の S+ 提示時は、C - A の S- 提示時に比べて有意に変化していることが示された。この時、CV 値は C - A の S+ 提示の時にのみ低い値を示していた(図 18)。

嗅球においては、LIR の平均差分値は C - A の S+ 提示時において、B - A の S+ 提示時および C - A の S- 提示時に比べて有意水準 5% で変化していることが示された(図 19)。

以上より、トレーニングおよび記憶保持期間依存的な個体間での神経活動依存的な新規遺伝子発現の上昇と変動の低下が本研究で開発された機能的発光観察法を用いることで観察された。また、興味深いことに、この現象はマウスが初めて匂いに接する順序に依存することが示唆された。

第5章 考察

5.1 機能的個体発光観察法の確立

本研究では、神経活動依存的な新規遺伝子発現を生きた動物で長時間安定して可視化するという目的のもと、機能的個体発光観察法の確立とその応用を目指した。本研究では、同じ動物を繰り返し何度もイメージングに供することが可能であるという利点を生かして、現在までに見られていなかった、遠隔記憶の時空間的なダイナミクスを見出せる可能性を示した。

機能的個体発光観察法を確立するにあたり、大脳皮質での発光の観察を主な目標として、経頭蓋で大脳皮質全体を観察する系を作製した。この時、同じ個体を繰り返し、1か月以上に渡る長期間観察できるようにするために、できる限り低侵襲かつ生理的な条件下で観察を行える系を目指した。歯科用ボンドを使用することで頭皮切開処理後2か月前後においても、切開処理直後と大きな遜色のない、クリアなシグナルを得ることに成功している。

用いる **Eluc** マウスのラインについても、大脳皮質での発光観察を念頭に、大脳皮質で刺激依存的にレポーターの発現が顕著に上昇するラインを選定した。このラインでは、**dISH** の結果から見られるように、海馬でのシグナル上昇は大脳皮質でのシグナル上昇に覆われてしまう可能性が高いと考えられ、海馬など

の皮質下領域由来のシグナルを見るには適さないと考えられる。私は修士課程での研究において、このライン以外にも大脳皮質での基底状態の **Eluc** の発現がさらに低いラインを同定しており、大脳皮質以外の、海馬等をターゲットにした発光観察では、大脳皮質のシグナルを超えて深部のシグナル上昇が得られる可能性のある、こちらのラインの方が適している可能性も考えられる。または、深部のイメージングには、ファイバースコープを埋め込む等の新たな改造を系に加える必要があると考えられる。

私は、新規遺伝子発現の可視化として、遺伝子発現の立ち上がりから定常状態に至るまでを観察するために、長時間の持続的な発光観察が必要であると考えた。このため、個体の **Luciferase** イメージングの常法として用いられてきた基質 **D-Luciferin** の投与方法を検討し、持続注射アダプタを導入することで今までに例のない、長時間発光観察を可能にした。更に、麻酔による検討および恒常的な **Eluc** 発現部位をウイルスにより導入することで、定量性のある、安定した長時間発光観察を可能にした。

5.2 発光シグナルの刺激依存性

本研究により開発された機能的個体発光観察法を用いて、視覚や触覚といった、生理的な刺激条件での大脳皮質における発光シグナルを 1 ショットおよび

長時間イメージングにより示した(図 7、10、11)。刺激を加えられた体側からの入力を受ける一次感覚野では、実際に、刺激を加えられていない体側の一次感覚野に比べて、シグナルの上昇を確認することができた。また、この両側でシグナルが変化している領域はある程度限局しており、ほかのモダリティに対する刺激においても領野レベルで同定することが出来る可能性を示唆している(図 7)。

視覚刺激に対する発光シグナルの変化は、長時間の発光観察によっても確認されている(図 10)。明条件から暗条件を引いた差分画像からなる、t 値画像では、有意に変化した部位として、視覚野に限局したシグナル変化を観察している(図 11)。この時、明条件刺激として蛍光灯点灯下での新奇環境での自由行動 30 分を、暗条件として暗幕で囲ったホームケージでの自由行動 30 分を用いている。そのため、バレル野をはじめとした一次体性感覚野での変化も想定されたが、ヒゲ等の除去は全く行っていないため、イメージング開始前の暗所飼育時および暗条件刺激での自由行動時にも一次体性感覚野での活動が起こっており、この領域のシグナルに関しては、結果的には明条件での結果と大きく差が生じなかったため、t 値画像に反映されなかったと考えられる。

上記の結果から、同一個体内の左右側での刺激入力有無によるコントロールと別々の回での刺激条件によるコントロールから、発光観察におけるシグナル

の刺激依存性が確認された。つまり、本研究により開発された発光観察法の発光シグナルは刺激依存的に変化していることが示された。

5.3 新規遺伝子発現による発光シグナルであることの確認

発光シグナルが本当に新規遺伝子発現を反映しているか確認するため、上記と同様の明条件刺激における長時間イメージングを行い、刺激の 1 時間後にタンパク質合成阻害剤である、**Anisomycin** を投与した(図 12)。この結果より、コントロールの PBS 投与と比較して、**Anisomycin** 投与では、視覚野でのシグナル上昇が 3~4 時間後で見られていない。この結果は、**Anisomycin** による新規タンパク質の合成阻害により、刺激依存的に誘導された視覚野の **Eluc** が合成出来なくなったためと考えられる。PBS 投与画像から **Anisomycin** 投与画像を引いた画像の t 値画像は、やはり視覚野でのシグナル変化を示しており、刺激によって新たな誘導を受けた部位が視覚野に限局していることが示された。よって、本研究で観察している発光シグナルは新規遺伝子発現を反映していると考えられる。

よって、上記のことから、この発光観察法で観察されるシグナルは、刺激によって誘導された新規遺伝子発現を数時間オーダーで観察しているものであり、コントロールとの差分を用いることにより、刺激特異的に変化している部位を

検出することが可能であると考えられる。

5.4 匂い - 報酬連合学習課題遂行とそのイメージング

機能的個体発光観察法の応用として、匂いと報酬の連合学習課題における神経活動依存的な遺伝子発現の時空間的なダイナミクスを可視化することを目指した。この課題を採用した理由としては、繰り返しの連合学習であること、マウスは特に嗅覚が発達しており、匂いと報酬の学習は比較的自然な学習であること、匂い刺激は音などの刺激に比べてコントロールしやすいこと、また、嗅覚刺激に反応する一次感覚野は脳の深部にあるため、純粹に連合学習による大脳皮質での反応を観察できることを期待したためである。

今回の研究で立ち上げた個体発光観察法を用いて、匂いと報酬の連合がトレーニングによって学習され、連合記憶の保持期間の異なる 2 つの時点における発光観察を行うことで、現在までに見いだされていない、長期記憶が遠隔記憶に移行する過程での、記憶の保持期間が短い時点と長く経過した時点での想起のフェーズにおける発光観察を行い、記憶の保持期間における遺伝子発現の時空間的な制御に迫りたいと考えたためである。このような、学習課題に対する反応は視覚刺激などに対する反応と比べ、変化が小さく、検出が難しいことが考えられる。そのため、本研究で立ち上げたような個体発光観察法を用いるこ

とで、同一個体による発光観察を保持期間が異なる時点で行い、同一個体内で評価することで、観察間での個体差の議論を打ち消すことができるため、より微妙な変化を検出することが期待できると考えられる。

訓練中の匂いポッドへの到達時間の推移から、4日間のトレーニングで連合学習が成立していることが示された。また、訓練完了30日後でもテストでの有意なS+の匂いへの嗜好性が示されている(図13)。このことから、発光観察を行ったElucマウスにおいても、匂いと報酬の連合を学習し、S+とS-の匂いを識別して、その記憶を30日間保持していることが示された。これは、野生型C57Bl/6Nおよび他の系統を用いて行われた先行研究にも合致する結果である(Heather et al., 2001)。また、訓練完了30日後という時間間隔は、様々な先行研究からマウスでは遠隔記憶が形成されていると考えられる。

発光観察の結果から、匂いに初めて触れる場合(Aでのイメージング1回目)での発光シグナルと異なる匂いではあるが、2回目に匂いに触れる場合での発光シグナルでは強度に差があることが示された(図14)。これは2回目の匂い提示におけるマウスのモチベーションの上昇などを反映しているのかもしれない。または、2回目に提示された匂いが1回目に提示された匂いと異なるものであることを識別するために何らかの反応が起こっているのかもしれない。S+およびS-に用いる匂いは個体によってランダム化しており、特定の匂いに対する反

応ではないと考えられる。また、この反応の差が同じ匂いを繰り返し提示した際や様々な匂いを 1 度ずつ提示した際などにどのように変化するのは検討の余地がある。

参考実験により、脳のより深部における Arc タンパク質の発現とトレーニング完了後の経過時間を免疫染色により評価した(図 16)。有意な差は検出されなかったものの、特に B の S+に相当する時点では、扁桃体中心核において Arc 発現細胞数が多い傾向を見出した。今回の結果を参考にすると、図 15 の発光観察による結果においても、B の時点では扁桃体中心核を中心とした領域において遺伝子発現が亢進しており、C の時点に向って時間が経過するにつれて想起時の遺伝子発現の上昇する部位が大脳皮質の、特に FrA や M2 を中心とした前頭前野領域に移行する可能性を示唆している。

また、図 15 で見られた S+の匂いを提示した時の B と C の時点における観察結果の違いは、学習が成立してからの記憶の保持期間の違う時点における想起段階での反応の違いを観察していると考えられる。B の時点においても、記憶のエンコーディングではなく固定化されてから後の想起段階であるとする根拠としては、B での観察においても、報酬を伴わない匂いのみの刺激提示を行っているという点や、B での観察の前のトレーニングの段階において、匂いポッドの探索開始までの潜時の減少曲線から、学習としてはほぼサチュレートして

おり、記憶のエンコーディングの過程は終了していると考えられる点があげられる。むしろ、**B** および **C** の時点で、報酬を伴わない匂いのみの刺激を行っているので、記憶の消去が誘導されている可能性が考えられるが、すべての観察が終了した後のテストにおいても、有意に **S+** の匂いを探索する行動をとっていることから、消去のフェーズも完全には引き起こされていないと考えられる。

図 15 の **t** 値画像で見られた、**C - A S+** 提示時の有意なシグナルから、**OB** および **FrA**、**M2** をはじめとした大脳皮質では、トレーニング前の同じ匂いを提示した時と比較して神経活動依存的な遺伝子発現が上昇していることが示唆された。

しかし、この時、**LIR** 差分値を他の条件と比較すると、全体的に **C - A S+** 提示条件で大きくなる傾向を示しており、実験系としてトレーニング後に **S+** を提示した場合やトレーニング完了 30 日後に **S-** を提示した場合に比べて部位特異性を示すことは困難であった。なお、図 17、18 にも見られるように、**C - A S+** 提示条件では図 15 で有意なシグナルを示した部位において個体間 **CV** 値が低下しており、トレーニング前に **S+** の匂いを提示した際に比べてトレーニング完了 30 日後に **S+** の匂いを提示した際には、**FrA** や **M2** をはじめとした領域で個体間の変動が小さく安定して遺伝子発現が上昇することを示唆していると考えられる。この **CV** 値の低下は他の条件では見られないことから、トレーニング完了

後に記憶の保持期間が長くなった時に報酬と連合した匂いによって想起させた時に個体間で安定した遺伝子発現を呈する可能性を示唆している。

この S+を提示した際の C - A の特異的な反応は、A の時に 1 回目で S+を提示した群でのみ観察されることから、A のイメージングの環境において最初に経験した匂いが強固に環境と連合され、その匂いに対して報酬があることを学習し、ある一定の期間が経過した時にのみロバストな遺伝子発現を呈する領域が表出するというを示唆していると考えられる。

刺激や学習課題などにおける個体間の神経活動や神経活動依存的な遺伝子発現の変動を観察している知見はあまり報告されていないが、例えば、記憶障害を呈するアルツハイマー病モデルマウス(hAPPJ20)を用いた Arc タンパク質の免疫組織化学による観察から、hAPPJ20 マウスは約 90%の個体では海馬歯状回での Arc の発現は野生型に比べて減少しているが、約 9%の個体では Arc の発現が異常に亢進していることが示された。これは、海馬歯状回における基底状態での観察であるが、アルツハイマー病モデルマウスといった病的な状態では、Arc の発現が極端に分かれ、個体間での変動が大きくなる傾向にあることを示唆していると考えられる(Palop et al., 2007)。また、ヒトの fMRI の研究においても、健常者と統合失調症の患者間での比較として、前頭前野背外側部(dorsolateral prefrontal cortex; dlPFC)での活動が患者で低下しているという

知見がある一方で、患者の dlPFC では活動自体が下がっているわけではなく、活動する場所が患者間で変動しているために、見た目の平均値として低下しているように見えているという指摘が報告されている(Manoach et al., 2000; Manoach, 2003)。この報告も病的な状態によって、個体間での変動が大きくなってしまふことを示唆していると考えられる。

また、今回の観察から S+を提示した際の C-A で有意なスポットを呈した部位はおおよそ、FrA および M2 領域と見られる。また、この M2 領域は ROI 中に前帯状回皮質(ACC)を含んでおり、この ACC 領域からの発光シグナルによる寄与も考えられる。これらの部位はマウスの前頭前野に含まれていると考えられており、ヒトやげっ歯類の研究などから、特に ACC および M2 は相互作用しながら意思決定や遠隔記憶の保持に働いていると考えられている(Acuña et al., 2010; Weible, 2013)。

このような知見からも、今回の報酬と連合した匂い依存のおよび保持期間依存的に個体間の変動が上記の部位で小さくなるという観察結果は、認知機能における個体間での神経活動および神経活動依存的な遺伝子発現の変動における新たな知見と成り得る可能性があると考えている。CV 値の低下と記憶形成に関しては、CREB を恒常的に活性化させるウイルス等を用いた介在実験などにより、今回観察された領域での遺伝子発現を操作することで、学習および学習完

了 30 日後でのパフォーマンスに対して影響が出るか否かといった実験を行い、その関連性を検討する必要がある。

また、連合学習を形成しないように報酬を伴わない匂い曝露のみのトレーニングをさせたコントロールなどで同様の検討を行う必要がある。

5.5 本観察法の発展と展望

5.5.1 本観察法の特長と問題点

私は神経活動依存的な新規遺伝子発現を生きた動物で経時的に観察する観察法を確立し、記憶・学習課題における応用を示した。この発光観察法では、神経活動のみを観察していた時には、見えてこなかった新しい責任部位や遺伝子発現様式の変化の検出に大変有力なツールになると考えている。本観察法の利点としては、同一の個体を繰り返し長期に渡って観察でき、生理的で微妙な変化を検出する際にどうしても影響が大きくなってしまいう個体差の影響を、同一個体での差分画像を用いるという手法を用いて最小限にとどめることが可能になると考えている。また、ウイルスによる恒常的に **Eluc** を発現する参照領域の導入とその発光輝度による標準化によって、**D-Luciferin** 投与やその他の影響によって振れ幅が生じてしまう発光シグナルの絶対値では比較出来なかった、個体間の定量的な比較が可能となった。また、本研究で用いている発光観察では、

脳全体を巨視的に観察しており、部位を限定せずに遺伝子発現を観察している。このことより、活動部位が同定されていない記憶学習課題などへの適用度が高いと考えられる。実際に、学習依存的な個体間での変動係数の低下という興味深い現象を観察している。本観察法の問題点としては、時間分解能と空間分解能が決して鋭敏とは言いがたい点にある。本研究においては **Eluc** マウスから十分なシグナル強度を得るために、露光時間 5 分間の積算を 1 枚の画像として取得している。また、空間分解能においても、今の段階では視野を特定するレベルの分解能しか有していない。また、今回の観察で得られたシグナルは主に大脳皮質からの発光と考えられるが、海馬などの深部のシグナルを得るには、上述のような更なる工夫が必要である。

5.5.2 疾患モデルにおける遺伝子発現の制御機構解明への寄与への期待

また、疾患モデルにおいても神経活動依存的な遺伝子発現について、時空間的に観察した例はないため、病態によるその変化などについては明らかになっていないことが多い。例えば、アルツハイマー病においても、モデルマウスにおいてアミロイドプラークの周辺における神経活動依存的な遺伝子発現細胞の動態を観察した先行研究はあるが、遺伝子発現を長時間継続して観察した例はない(Rudinskiy et al., 2012)。このようなことから、例えば疾患モデルマウス

と **Eluc** マウスとの掛け合わせにより、個体発光観察を行うことが出来れば、視覚などの感覚刺激および学習課題における発光シグナルが **Eluc** マウス単独に比べて立ち上がりに変化があるかどうか、または発光シグナルを呈する領域が異なるといった時間的、空間的な差異が観察できる可能性が考えられる。また、今回の学習課題における発光観察で観察されたような CV の低下といった、個体間で保存されて遺伝子発現を呈する領域が疾患モデルでは保存されていないといったことが検出できる可能性が考えられる。このようなことが観察できれば、疾患における遺伝子発現の制御機構の解明の端緒となり、記憶障害等の発病メカニズム解明につながるのではと考えている。

第6章 引用文献

Acuña C, Pardo-Vázquez JL, Leborán V. Decision-making, behavioral supervision and learning: an executive role for the ventral premotor cortex? *Neurotox Res.* 18(3-4):416-27. (2010)

Bayley PJ, Hopkins RO, Squire LR. Successful recollection of remote autobiographical memories by amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Neuron.* 38(1):135-44. (2003)

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell.* 87:1203-14. (1996)

Bito H, Takemoto-Kimura S. Ca^{2+} /CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival. *Cell Calcium.* 34:425-30. (2003)

Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*.52:445-59. (2006)

Clark RE, Broadbent NJ, Zola SM, Squire LR. Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *J Neurosci*. 22(11):4663-9. (2002)

Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*. 96:518-59. (1984)

Debiec J, LeDoux JE, Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*. 36(3):527-38. (2002)

Doucette W, Gire DH, Whitesell J, Carmean V, Lucero MT, Restrepo D. Associative cortex features in the first olfactory brain relay station. *Neuron*. 69(6):1176-87. (2011)

Eguchi M, Yamaguchi S. In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. *Neuroimage*.44:1274-83. (2009)

Grinevich V, Kolleker A, Eliava M, Takada N, Takuma H, Fukazawa Y, Shigemoto R, Kuhl D, Waters J, Seeburg PH, Osten P. Fluorescent *Arc/Arg3.1* indicator mice: a versatile tool to study brain activity changes in vitro and in vivo. *J Neurosci Methods*.184:25-36. (2009)

Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*.2:1120-4. (1999)

Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. Inhibition of activity-dependent *arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci*.20:3993-4001. (2000)

Guzowski JF, Miyashita T, Chawla MK, Sanderson J, Maes LI, Houston FP,

Lipa P, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*103:1077-82. (2006)

Heather M. Schellinck HM, Forestell CA, LoLordo VM. A simple and reliable test of olfactory learning and memory in mice. *Chem Senses.* 26(6):663-72. (2001)

Hess US, Lynch G, Gall CM. Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *J Neurosci.* 15(12):7796-809. (1995)

Hess US, Gall CM, Granger R, Lynch G. Differential patterns of c-fos mRNA expression in amygdala during successive stages of odor discrimination learning. *Learn Mem.* 4(3):262-83. (1997)

Izumi H, Ishimoto T, Yamamoto H, Nishijo H, Mori H. Bioluminescence

imaging of Arc expression enables detection of activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. *Brain Struct Funct.* 216(2):91-104. (2011)

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294:1030-8. (2001)

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106:316-21. (2009)

Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science.* 5057:675-7. (1992)

Kobayashi H, Yamamoto S, Maruo T, Murakami F. Identification of a cis-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *Eur J Neurosci.*22:2977-84. (2005)

Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.92:5734-8. (1995)

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*.14:433-45. (1995)

Manoach DS, Gollub RL, Benson ES, Searl MM, Goff DC, Halpern E, Saper CB, Rauch SL. Schizophrenic subjects show aberrant fMRI activation of dorsolateral prefrontal cortex and basal ganglia during working memory performance. *Biol Psychiatry*. 48(2):99-109. (2000)

Manoach DS. Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. *Schizophr Res*. 60(2-3):285-98. (2003)

McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev.* 102(3):419-57. (1995)

McCurry CL, Shepherd JD, Tropea D, Wang KH, Bear MF, Sur M. Loss of Arc renders the visual cortex impervious to the effects of sensory experience or deprivation. *Nat Neurosci.* 13(4):450-7. (2010)

Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science.* 324(5929):951-5. (2009)

Nadel L, Moscovitch M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol.* 7(2):217-27. (1997)

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 6797:722-6.

(2000)

Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell*. 149(4):886-98. (2012)

Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*. 55(5):697-711.

(2007)

Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, Chowdhury S, Kaufmann W, Kuhl D, Ryazanov AG, Huganir RL, Linden DJ, Worley PF. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD.

Neuron. 59(1):70-83. (2008)

Paxinos G, Franklin K BJ, The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Second edition. (2001)

Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bösl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. Neuron.52:437-44. (2006)

Ramirez S, Liu X, Lin PA, Suh J, Pignatelli M, Redondo RL, Ryan TJ, Tonegawa S. Creating a false memory in the hippocampus. Science. 6144:387-91. (2013)

Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT. Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA

receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*.52:461-74. (2006)

Rodríguez JJ, Davies HA, Silva AT, De Souza IE, Peddie CJ, Colyer FM, Lancashire CL, Fine A, Errington ML, Bliss TV, Stewart MG. Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur J Neurosci*.21:2384-96. (2005)

Rudinskiy N, Hawkes JM, Betensky RA, Eguchi M, Yamaguchi S, Spires-Jones TL, Hyman BT. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2012 15(10):1422-9. (2012)

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 20(1):11-21. (1957)

Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*.

68:821-61. (1999)

Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*.52:475-84. (2006)

Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther*. 17(11):1888-96. (2009)

Squire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 5(2):169-77. (1995)

Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*.21:741-51. (1998)

Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce

adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther.* 13(16):1935-43.

(2002)

Wada M, Watanabe S, Chung UI, Higo N, Taniguchi T, Kitazawa S.

Noninvasive bioluminescence imaging of c-fos expression in the mouse barrel

cortex. *Behav Brain Res.* 208(1):158-62. (2010)

Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G,

Bundman M, Kuhl D. Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP

requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular

regulated kinase activation. *J Neurosci.*21:5484-93. (2001)

Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S.

In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation

specificity in visual cortex. *Cell.* 126(2):389-402. (2006)

Watson RJ, Clements JB. A herpes simplex virus type 1 function

continuously required for early and late virus RNA synthesis. *Nature.*

5763:329-30. (1980)

Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM. Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*. 59(1):84-97. (2008)

Weible AP. Remembering to attend: the anterior cingulate cortex and remote memory. *Behav Brain Res*. 245:63-75. (2013)

Wu J, Petralia RS, Kurushima H, Patel H, Jung MY, Volk L, Chowdhury S, Shepherd JD, Dehoff M, Li Y, Kuhl D, Huganir RL, Price DL, Scannevin R, Troncoso JC, Wong PC, Worley PF. Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent β -amyloid generation. *Cell*. 147(3):615-28. (2011)

謝辞

統計解析においては、東京大学大学院医学系研究科 公共健康医学専攻 生物統計学分野の上村(田中)夕香理特任助教に大変お世話になりました。様々な有意義なディスカッションを頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。

また、所属研究室である尾藤研究室の皆様にご感謝申し上げます。

特に、この研究の遂行を推し進めて下さり、大変なご助言とディスカッションを賜り、常に叱咤激励して下さった尾藤晴彦教授にご感謝申し上げます。

また、一から研究手法に関して様々なご教授、ご助言を頂き、本研究をともに推進して下さった現京都大学奥野浩行特定准教授に御礼申し上げます。

さらに、様々な実験手法や解析方法に関して親身にご助言頂いた竹本 - 木村さやか助教、藤井哉助教に御礼申し上げます。

また、実際の実験および日々の実務において多大なるご助力を頂いた、スタッフの岡村さん、近藤さん、齋木さん、大橋さん、刑部さん、金原さんにお礼申し上げます。

最後に、博士課程進学までずっと応援し続け、遠く北海道から経済的精神的に支えてくれた両親にご感謝します。また、研究者として先輩でもあり、よき相談相手として、また家庭内の様々なサポートをしながら見守ってくれた夫・柳下聡介にご感謝します。

参考図・図説

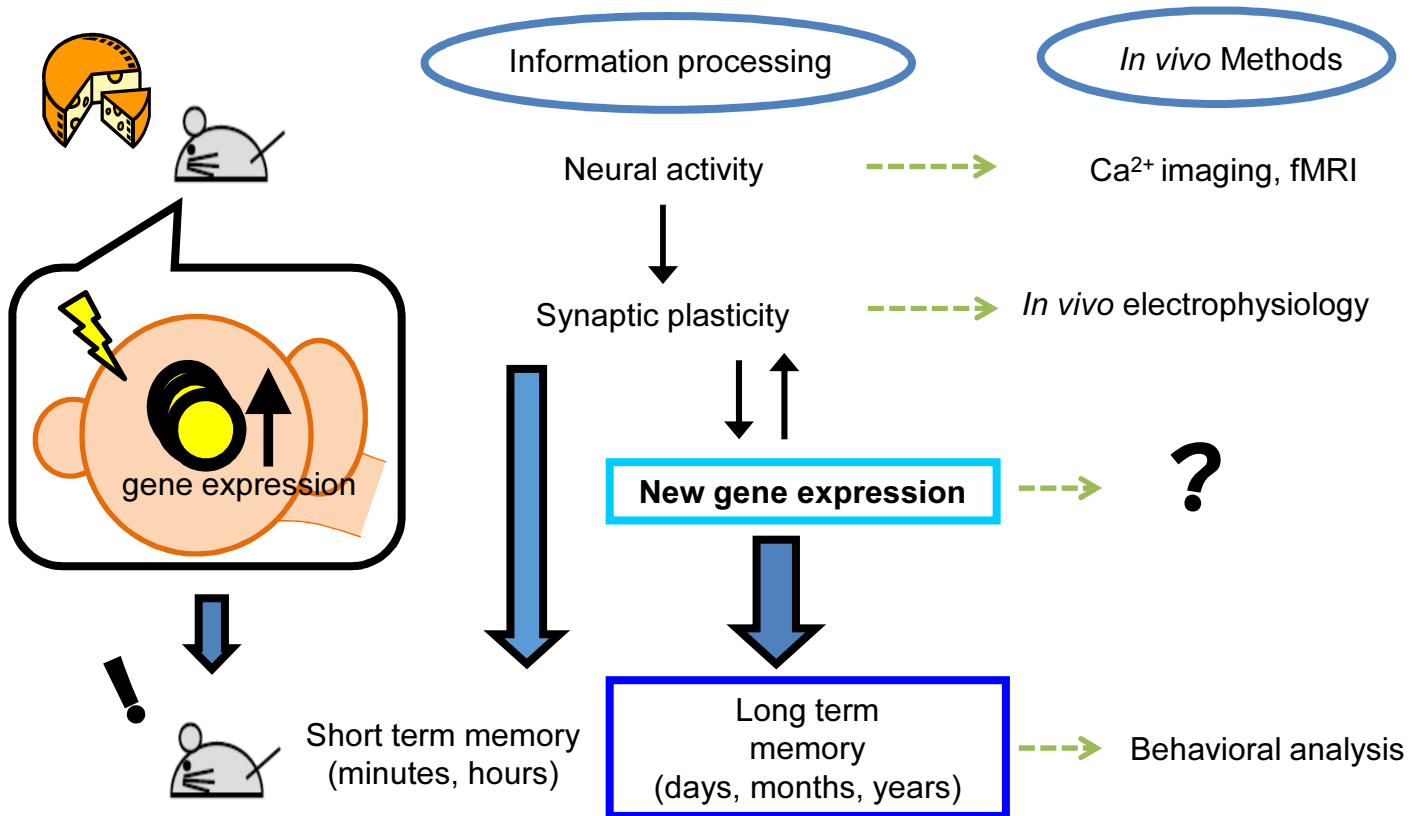


図1 記憶形成における新規遺伝子発現の関係とその探求手法

脳の情報処理は、神経活動によって引き起こされたシナプスの一時的な変化により、短期記憶が形成される。この時、繰り返し神経活動が起こった神経細胞では、新規遺伝子発現が誘導され、合成されたタンパク質が更なる長期的なシナプスの変化を引き起こす。この新規遺伝子発現とその働きによるシナプス可塑性により、長期記憶が形成されると考えられている。これらの各段階については、個体レベルにおいても様々な手法で解析が進んでいるが、長期記憶形成過程において生きた動物で経時的に神経活動依存的な新規遺伝子発現を観察した例はない。

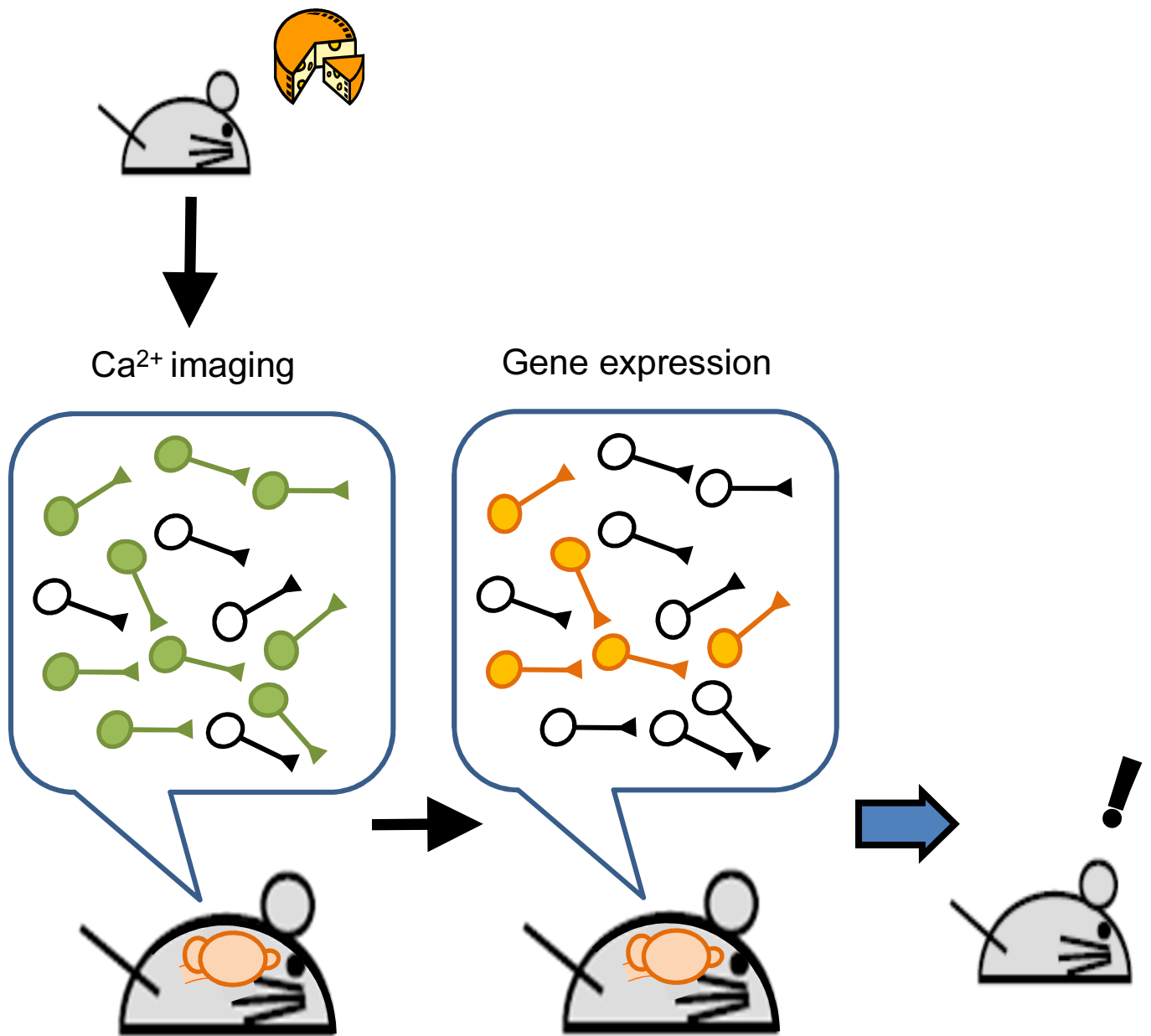


図2 神経活動とそれによって誘導される新規遺伝子発現の可視化

神経活動の可視化ツールとして良く観察されているCa²⁺イメージングではCa²⁺流入の起こった細胞はすべてラベルされる。この中でも特に、長期記憶形成に関わる細胞群においては新規遺伝子発現が誘導されることから、この遺伝子発現を可視化することができれば、記憶学習課題を行った際の長期記憶形成に関わる重要な領域を特異的に抽出することが可能になるかもしれない。

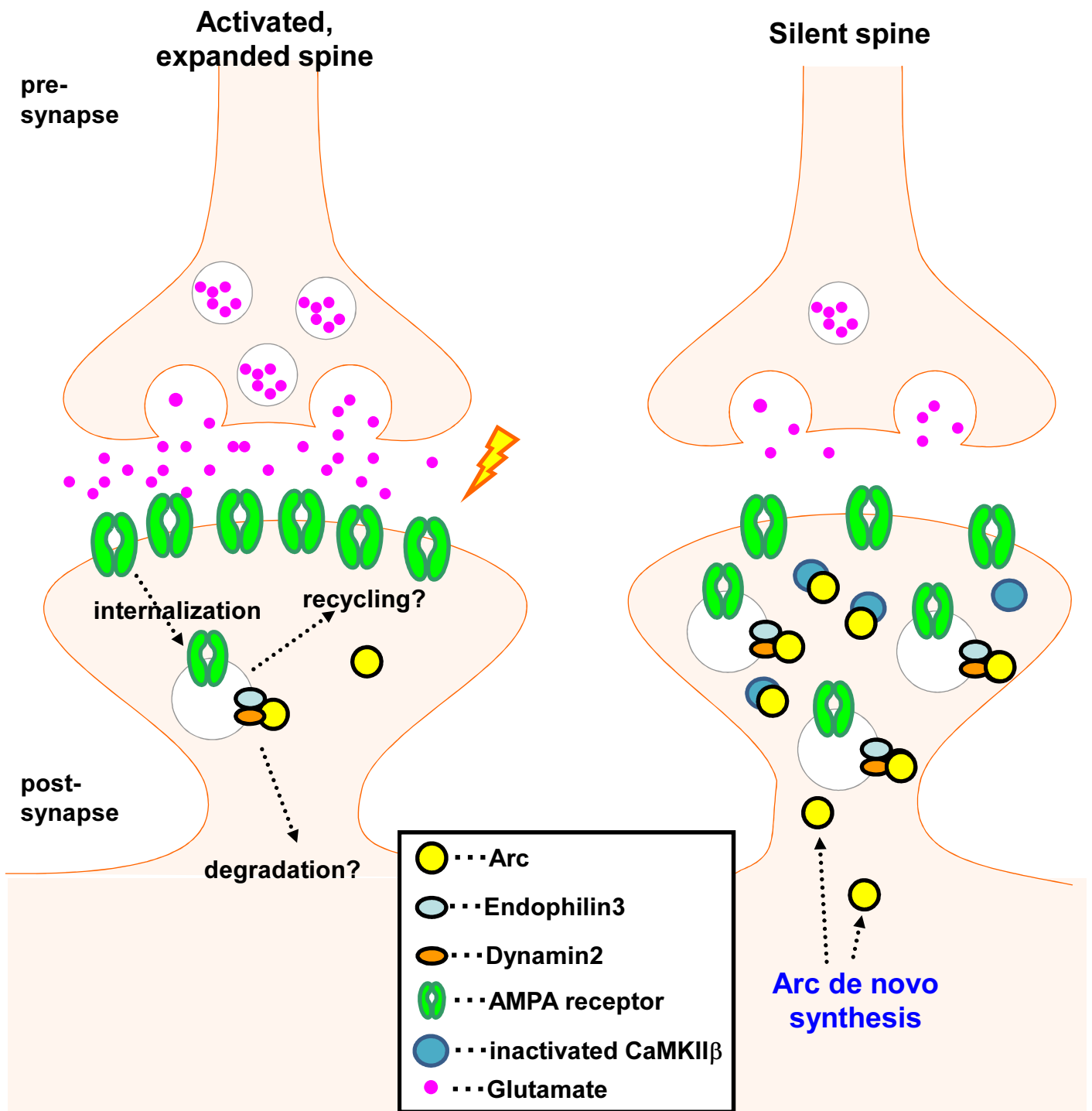
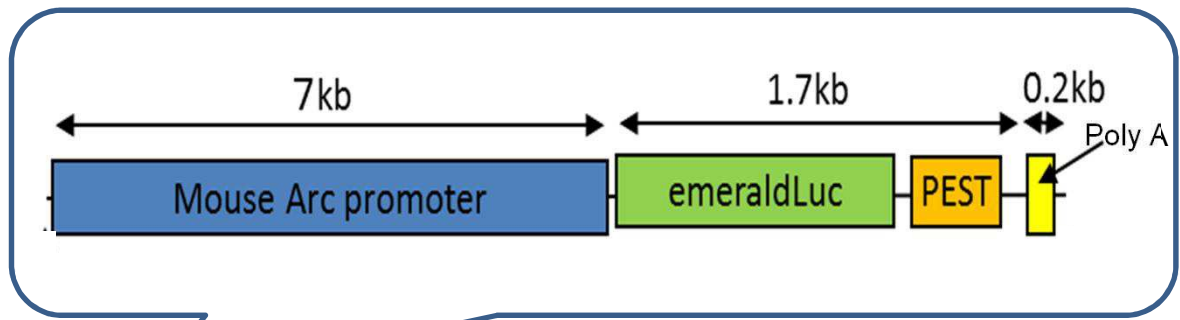


図3 神経活動依存的なArcの発現とAMPA型グルタミン酸受容体の内在化

Arcは神経活動依存的に転写・翻訳され、非活性型のCaMKIIβと結合し、神経活動を受けた樹状突起の中でも、非活性のスパインに蓄積し、AMPA型グルタミン酸受容体の内在化に働いていると考えられる。この働きにより、非活性スパインと活性スパインのAMPA型グルタミン酸受容体の量比を調節し、スパイン強度の比を大きくするのに貢献していると考えられる。

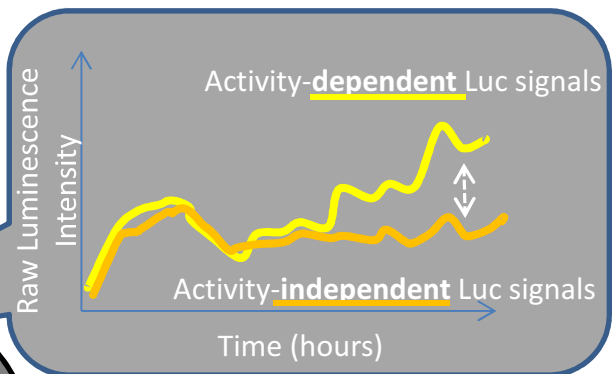
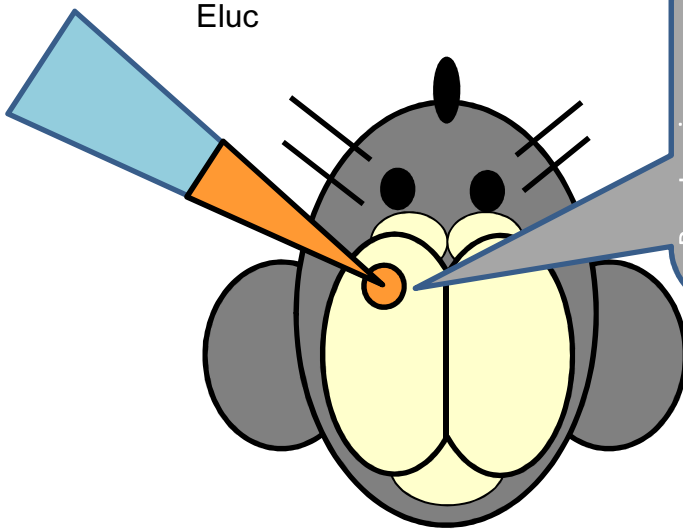
(A)



Activity-dependent Luminescence

(B)

AAV injection of
constitutively expressing
Eluc



$$\text{Luminescence Intensity Ratio (LIR)} = \frac{\text{Eluc signals from Arc7kb promoter}}{\text{Eluc signals from AAV injection site}}$$

図4 作製したトランスジェニックマウスとウイルスによる参照領域導入のモデル図

(A)作製したトランスジェニックマウスの概略図。Arcの刺激依存的な発現調節を担う、7kbのプロモーター領域にレポータータンパク質としてヒカリコメツキムシ由来のEmerald Luciferase (Eluc)を付加した。

(B)長時間の定量的な発光観察を行うために、AAVにより恒常的に発現するElucを局所導入し参照領域とした。実際の観察から得られる発光シグナルは血流などの影響により変動が生じるが、参照領域として導入するウイルス由来の恒常的な発光シグナルで割ることで標準化を行い、その値をLuminescence Intensity Ratio (LIR)とした。

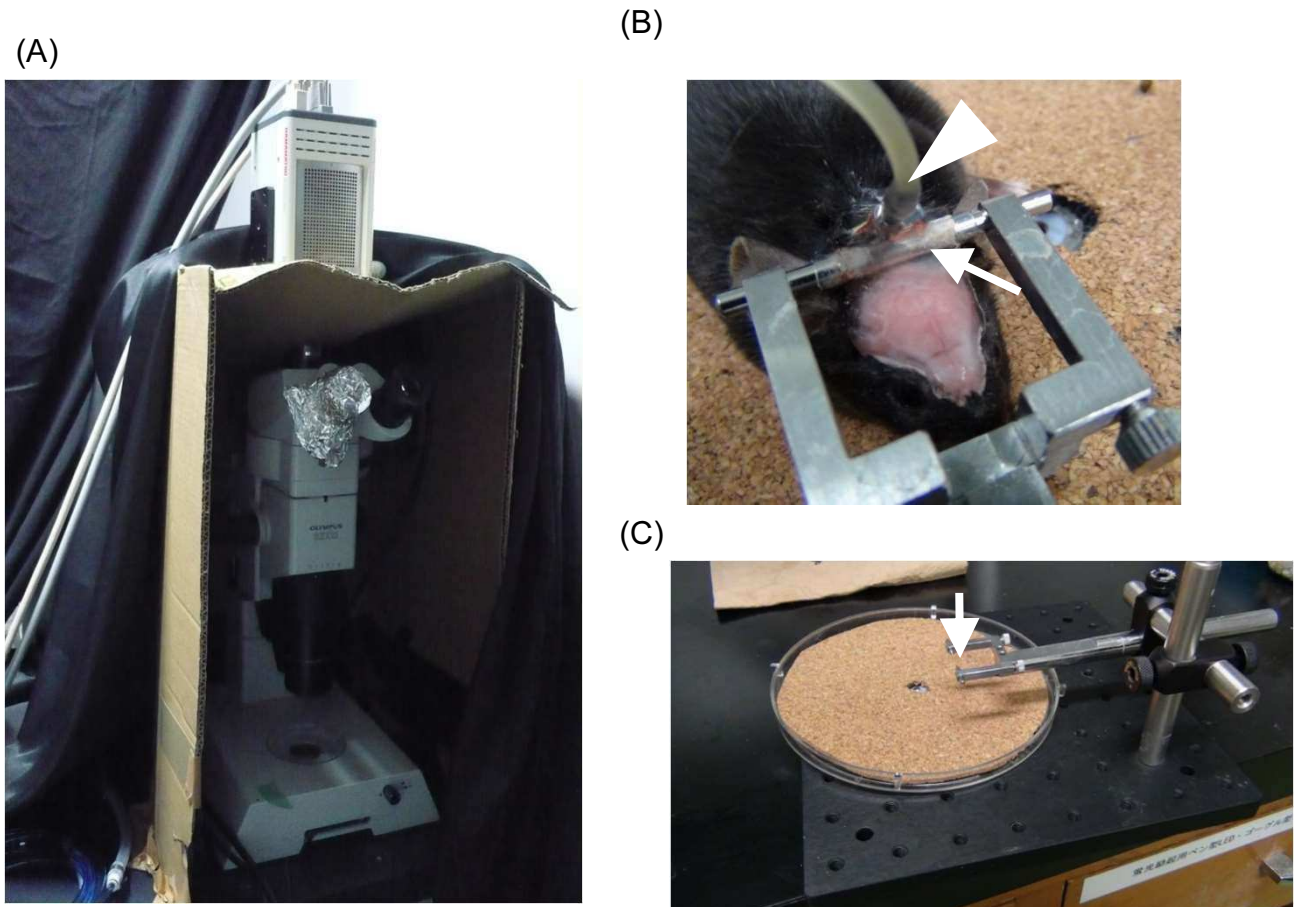


図5 観察装置と固定装置図

(A)発光観察に用いている実体顕微鏡とCCDカメラの組み立て。発光シグナルを得るために、外来の光ノイズを遮断する、自作の暗箱を作製し、その中で観察を行っている。

(B)トランスジェニックの頭皮除去処置。頭皮を切開・除去し、固定装置取付用チューブ(白矢印)とルシフェリン投与アダプタ(白矢頭)とともに歯科用ボンドで固定した。

(C)マウス固定装置。固定装置取付用チューブを矢印部分で挟み込み、動物を無麻酔状態で固定する。下部の円盤状の部分は抵抗無く回転する回転盤になっており、トレッドミルの役割を果たし、マウスの力を分散させ、固定ストレスを減少させる。この固定装置を(A)の顕微鏡下に設置し、暗幕を全て閉め切り発光観察を行う。

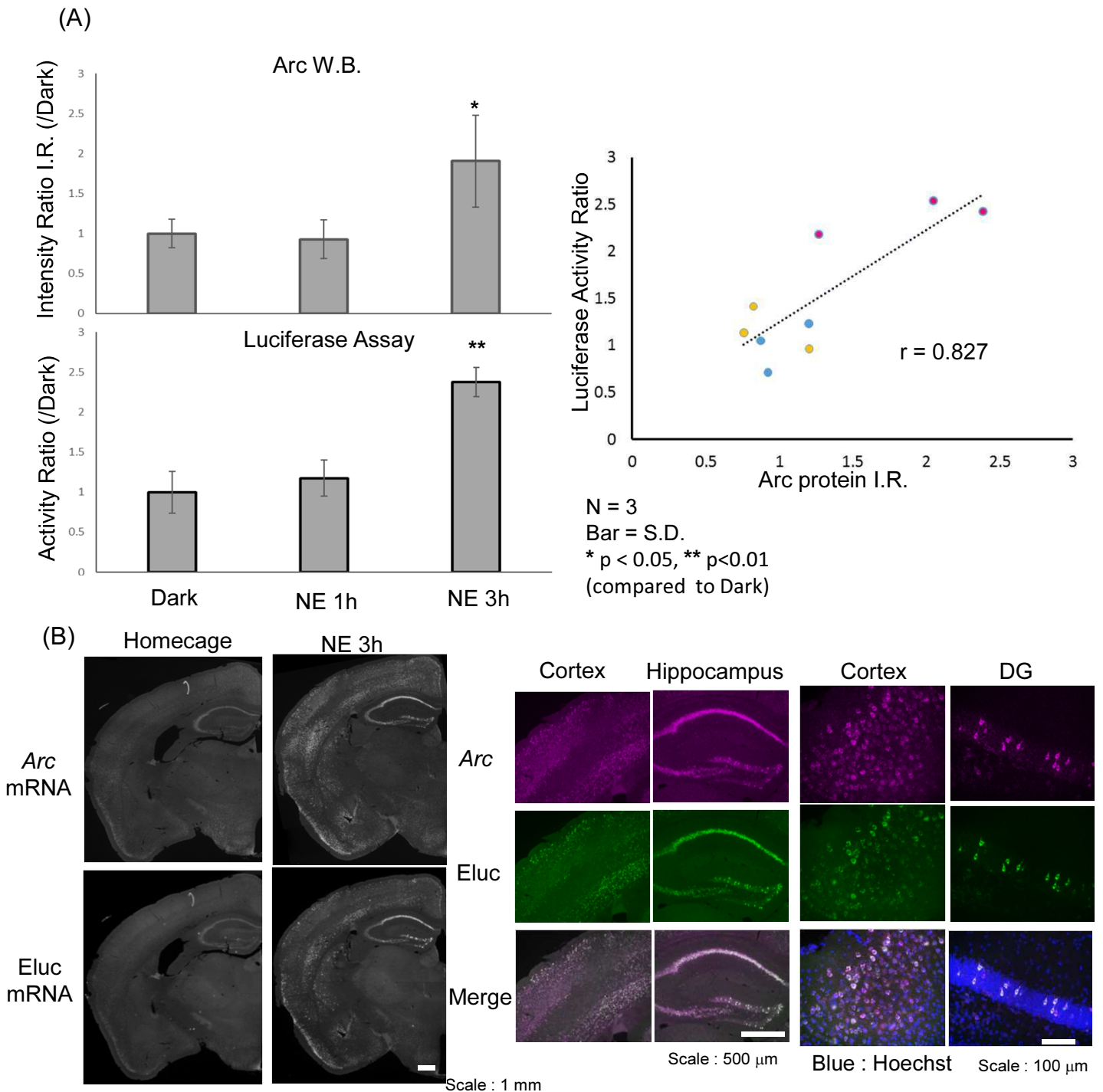


図6 刺激依存的な内在性ArcとElucの発現解析

(A) 蛍光灯点灯下での新奇環境刺激(New Environment, NE)による、視覚野を含む大脳皮質破碎液での抗Arc抗体によるウェスタンブロットによる内在性Arcの発現量と、Luciferase活性アッセイによるElucの活性の定量結果。Arc、Elucともに暗所条件(Dark)に比べてNE3時間で有意に上昇していることが示された。(one-way ANOVA, Dunnett法) また、定量結果を横軸にArcの発現量比、縦軸にElucの活性比をプロットした。なお、グラフ上の点はそれぞれ、青(Dark)、黄(NE 1h)、マゼンタ(NE 3h)を表す。

(B) ホームケージ飼育条件とNE3時間曝露での内在性ArcとElucのmRNAの発現をdouble *in situ* hybridizationにより観察した。Arc、ElucともにNEにより大脳皮質、海馬CA1領域および歯状回での発現上昇が観察された。NE3hでの拡大図でもその共局在が観察された。

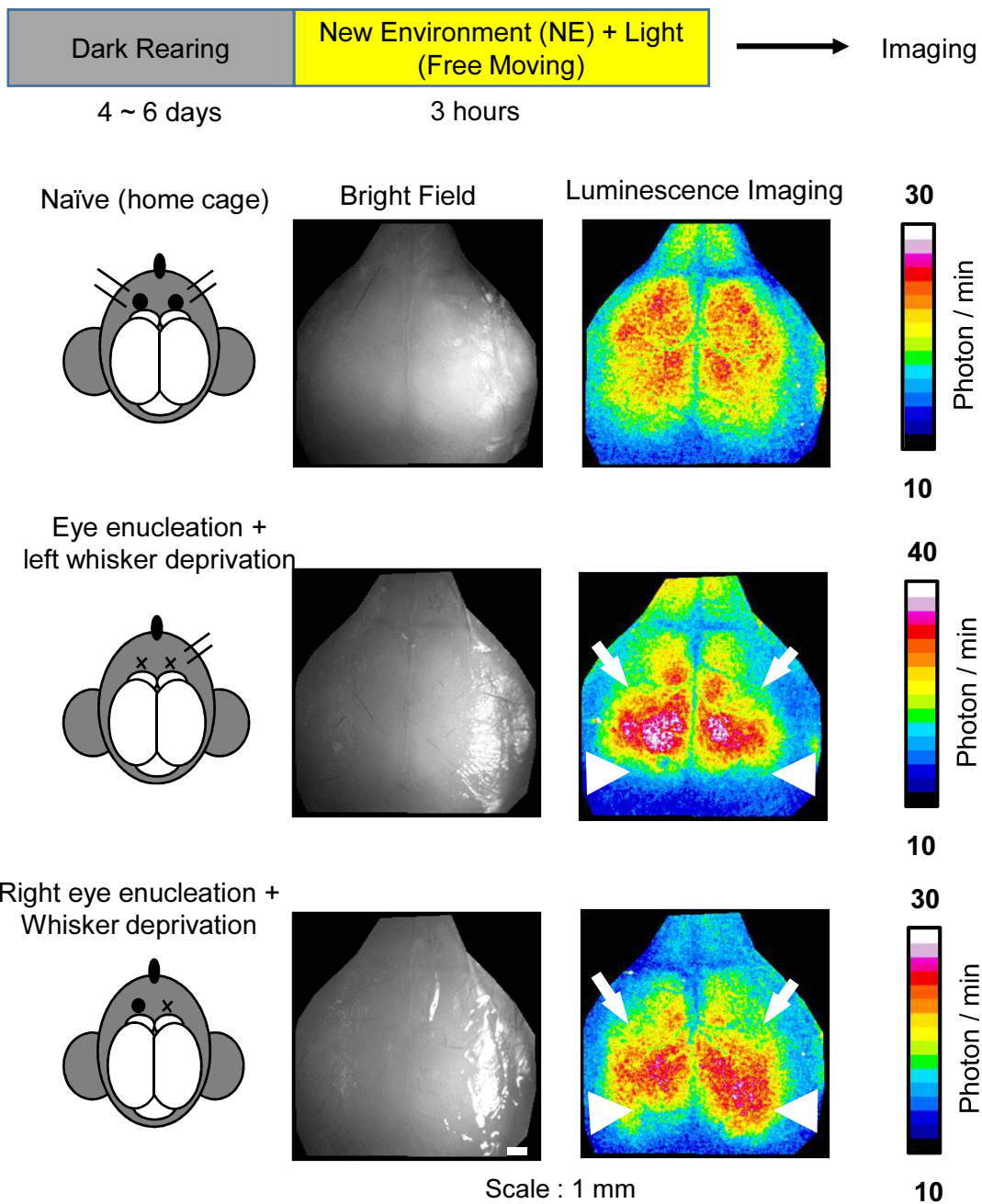


図7 異なるモダリティ刺激による発光観察

視覚および触覚刺激を伴う蛍光灯点灯下での新奇環境刺激を用いたヒゲおよび眼からの入力による1ショットの発光観察を行った。ホームケージ飼育条件で操作を施していない個体において基底状態での発光パターンを観察した。両眼および左側のヒゲを除去した個体でのNE3時間後の発光パターンは視覚野(白矢頭)での顕著なシグナルの減少と左側に比べて右側のバレル野(白矢印)でのシグナルの減少を認めた。これに対して、右側の眼と両側のヒゲを除去した個体では、バレル野と左側の視覚野のシグナル減少と右側のシグナル上昇を観察した。このように、異なるモダリティからの入力による発光パターンを観察することが可能になった。

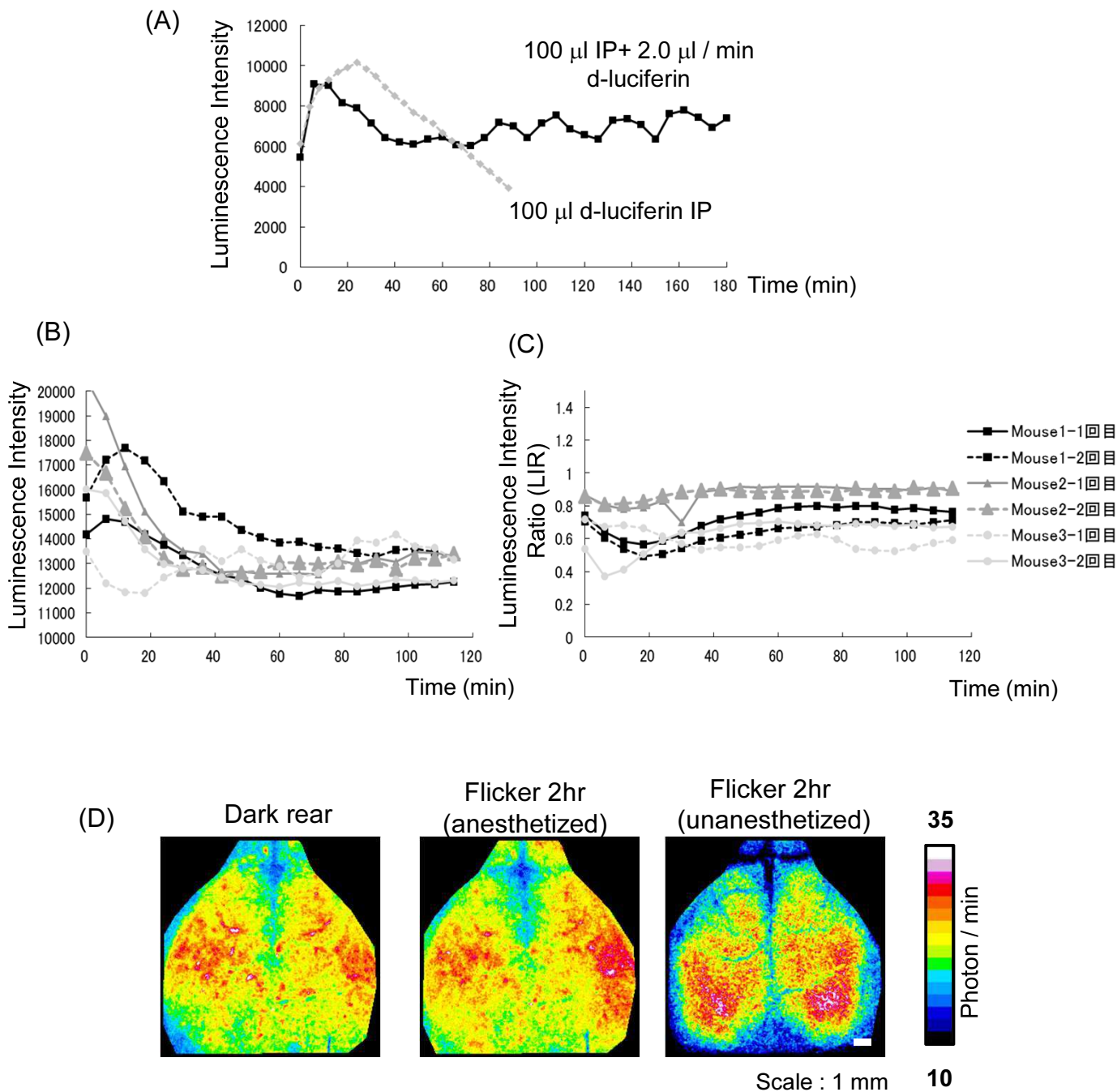


図8 長時間定量的発光観察の導入と麻酔の有無の検討

(A)1回の腹腔内D-ルシフェリン投与と持続D-ルシフェリン投与とでの発光シグナルの経時的変化の典型例。

(B)同一個体および別個体間におけるルシフェリンの持続投与での発光シグナルの経時的変化。刺激を加えていない個体での発光シグナルの経時的変化を観察した。

(C)(B)における発光シグナルを参照領域の発光シグナルで標準化し、経時的変化を示した。

(D)麻酔の有無による視覚刺激への応答性。暗所飼育した個体を、固定具に固定状態で2時間フリッカー刺激を行った。抱水クロラールとキシラジンによる麻酔状態で刺激を行った場合と無麻酔状態とでの発光観察像を示す。

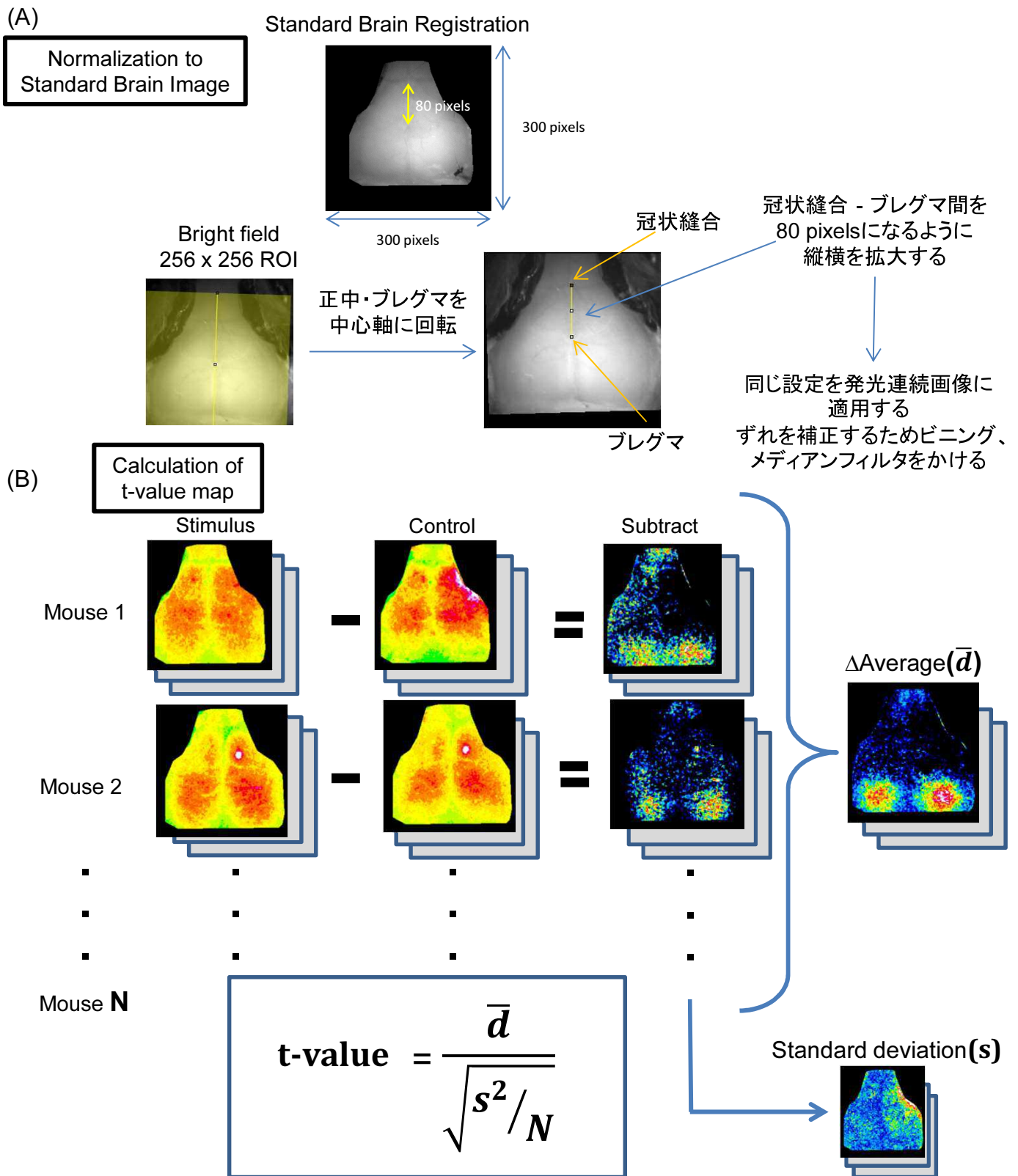


図9 画像を用いた刺激依存的な発光シグナルの変化の検出方法

(A)各個体の観察像の標準脳への合わせ方。観察では毎回、発光画像とともに明視野画像を取得している。明視野画像を元に各観察画像をStandard Brain Registrationと同じ大きさに合わせた。

(B) 同一個体差分画像からのt値画像の作製方法。同一個体での刺激を加えた際の観察画像からコントロール条件での観察画像を引いた差分画像を作成し、差分画像同士の平均画像と標準偏差画像を作成した。

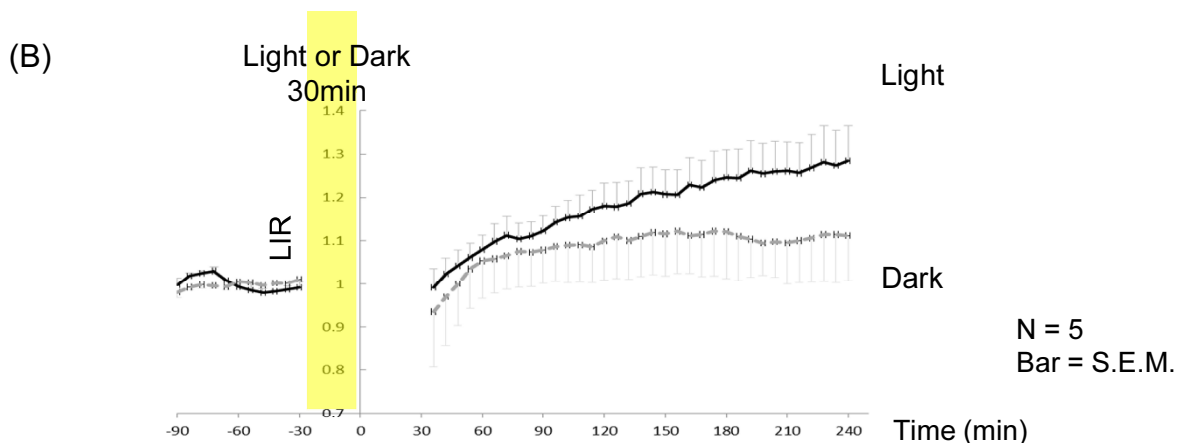
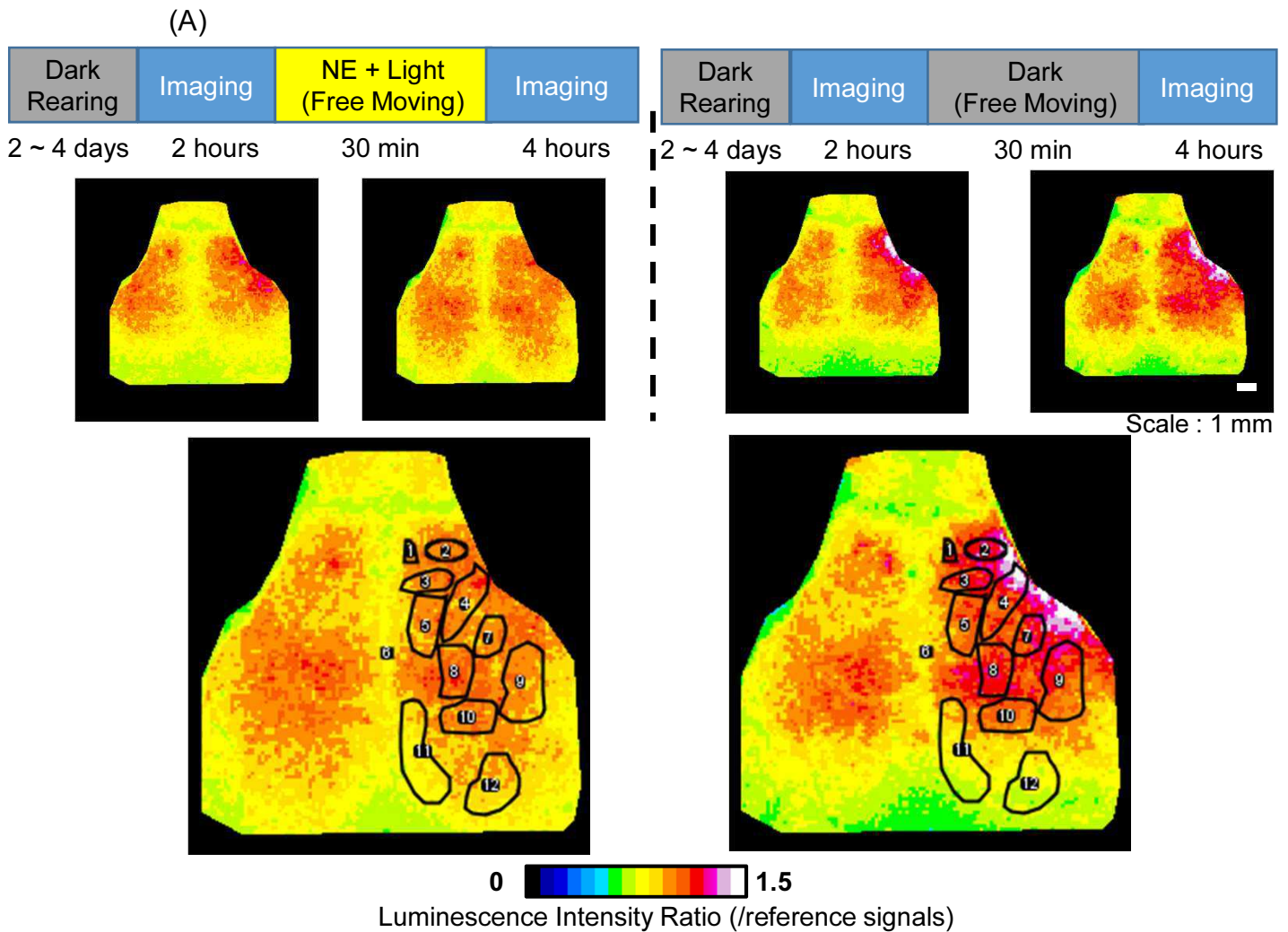
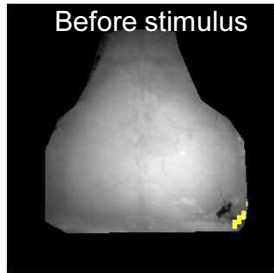


図10 視覚刺激に対する長時間発光観察

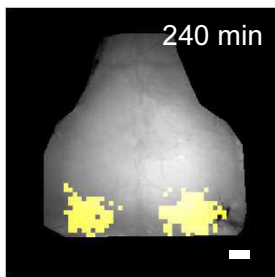
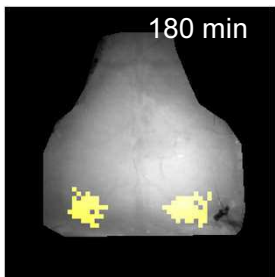
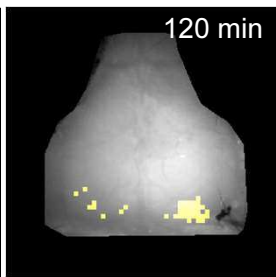
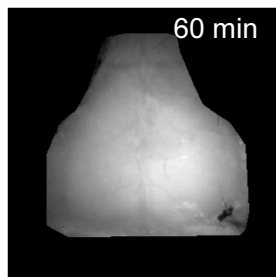
(A) 暗所飼育した動物での蛍光灯点灯下での新奇環境刺激および暗所曝露30分でのそれぞれの長時間発光観察画像。発光画像のカラースケールはウイルス由来領域で標準化したLIRを示している。また、Paxinosらのアトラスから再構成した各機能領域を示すRegion Of Interest (ROI)を観察画像に重ね合わせた結果を示す。なお、各番号が示す機能領域は以下の通り。1:前辺縁皮質 2:前連合皮質, 3:運動前野(前側), 4:一次運動野, 5:運動前野(後側), 6:ブレグマ, 7:一次体性感覚皮質(前肢), 8:一次体性感覚皮質(後肢), 9:一次体性感覚皮質(前肢), 10:一次体性感覚皮質(バレル), 11:脳梁膨大後部皮質, 12:一次視覚野

(B) 一次視覚野(ROI12)における経時的な発光シグナルプロット。

t-map of
Light - Dark



Light or Dark
30 min



Yellow : $p < 0.01$

N = 5

Scale : 1mm

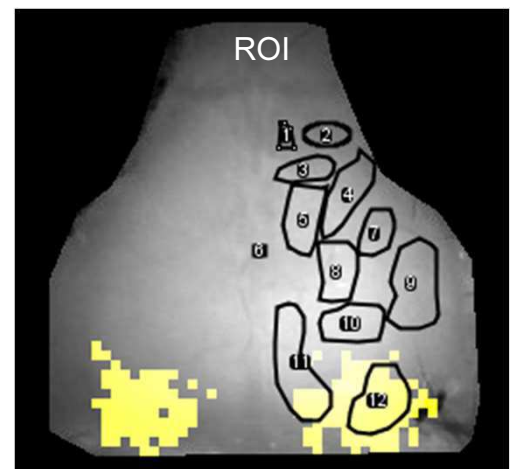


図11 視覚刺激に対する長時間発光観察における変化領域の同定

明刺激条件から暗条件を引いた差分画像から作成したt値画像。この刺激条件におけるN=5でのt値画像の経時的な変化を示す。黄色のピクセルが有意水準1%未満の値を示す。また、図10と同様のROIと刺激240分後のt値画像との重ね合わせを示す。

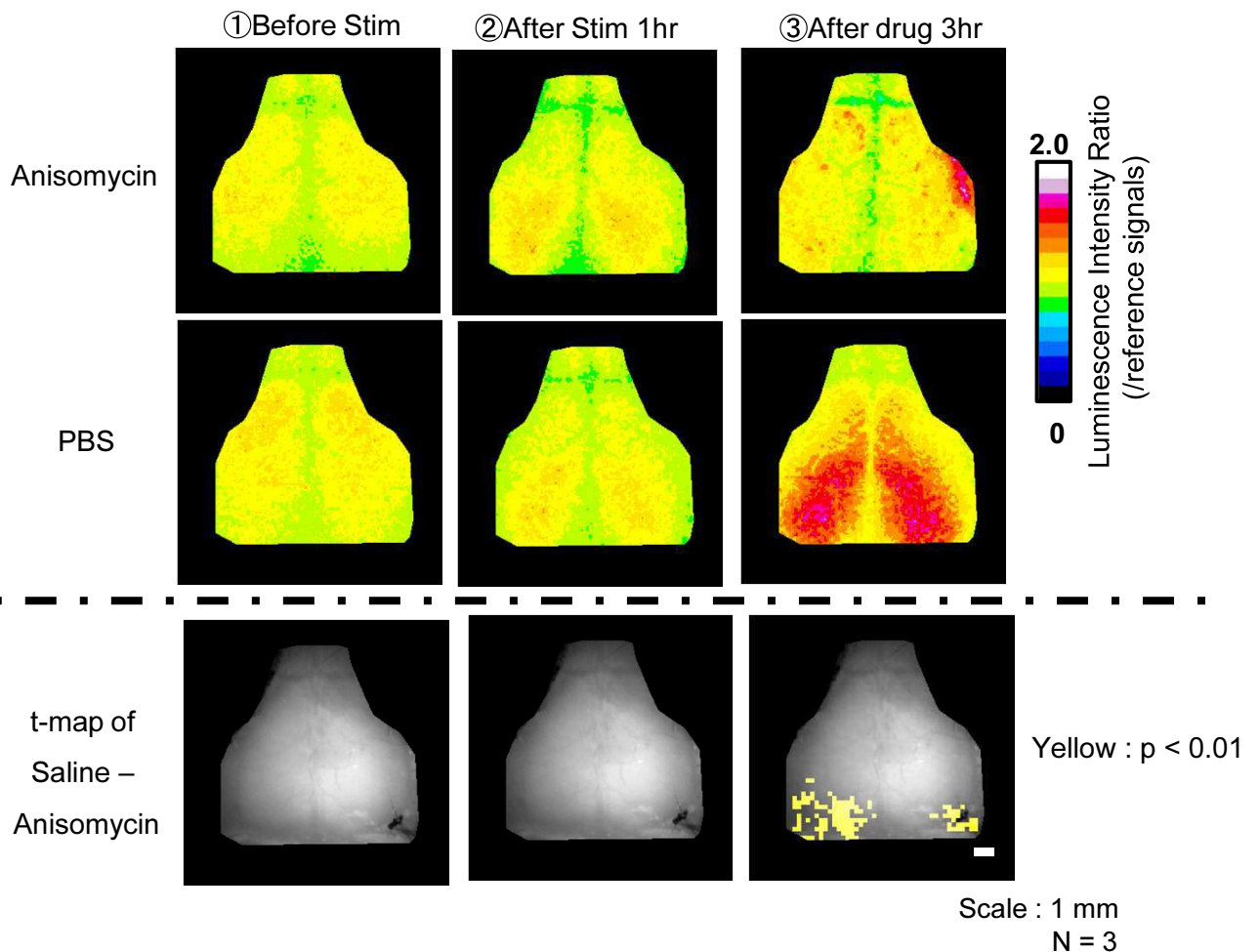
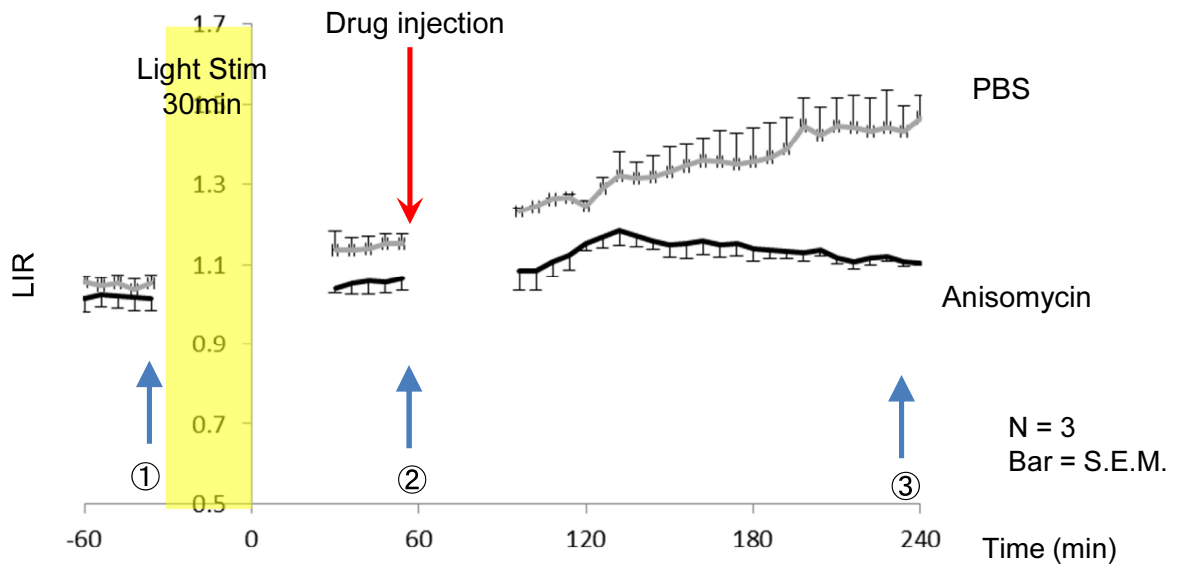


図12 タンパク質合成阻害剤による刺激依存的な発光シグナルの減少

図10と同様に蛍光灯点灯下での新奇環境刺激30分間における長時間発光観察を行い、タンパク質合成阻害剤であるAnisomycinの有無による影響を観察した。刺激1時間後に150 mg/kgアノソマイシンおよびPBSを腹腔内注射で投与し、引き続き観察を行った。

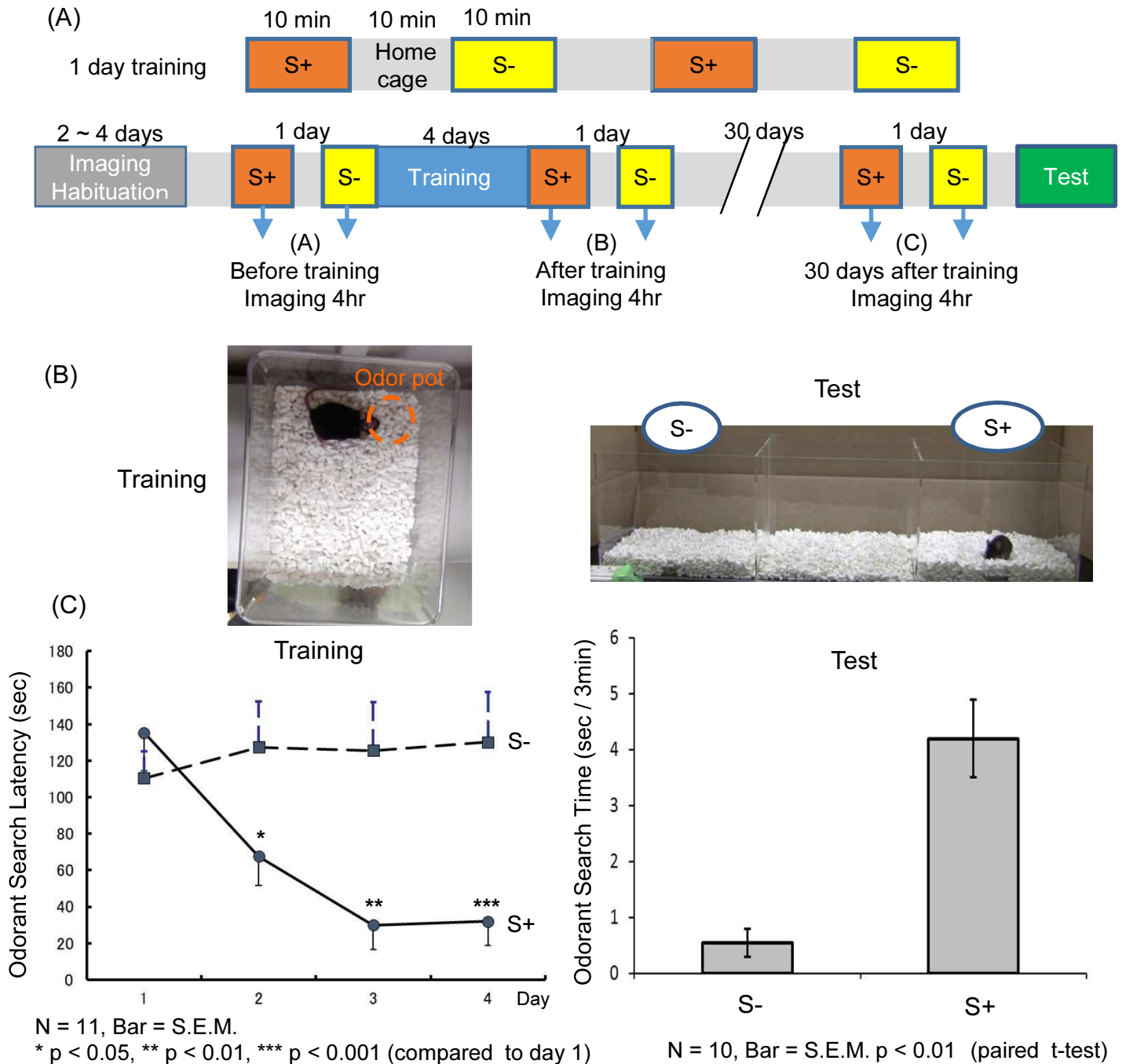
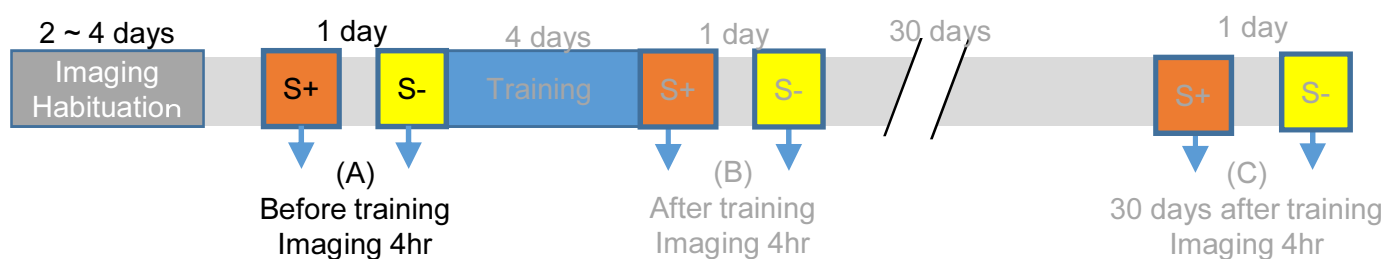


図13 匂い-報酬連合学習課題の設定とElucマウスによる遂行

(A) 匂い-報酬連合学習課題と発光観察を組み合わせたタイムスケジュール。上段は1日のスケジュールを表しており、報酬と連合させる匂い(S+)と報酬を伴わない匂い(S-)をそれぞれ10分間2回ずつ提示する。この提示の順番は毎回ランダム化している。このセッションを4日間行い、その前後および学習完了30日後に発光観察およびテストを行った。

(B) トレーニングおよびテストの試行の様子。

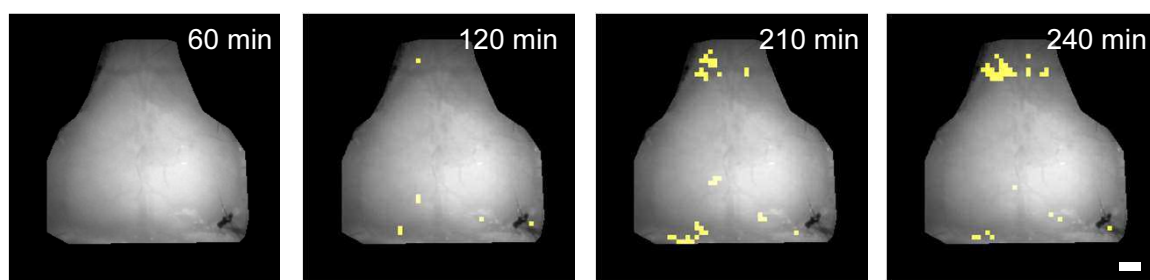
(C) 発光観察を行ったElucマウスのトレーニング期間4日間での、マウスが匂いポッドを探索し始めるまでの潜時とテストにおける各匂いに対する探索時間とのプロット。1日2回の提示分の平均値をプロットしている。S+については、1日目の潜時に比べ、2日目、3日目、4日目では有意に潜時が短くなっている(repeated one-way ANOVA, Dunnett法)。また、テストでの探索時間では有意水準1%で有意にS+をより長く探索しており、S+への嗜好性が確認された。



t-map

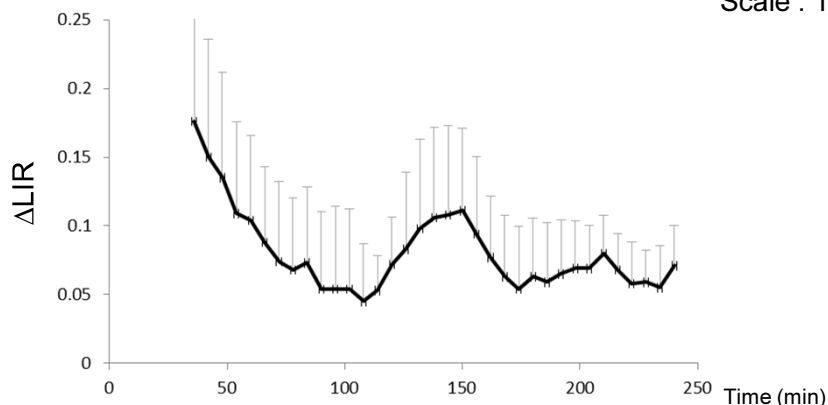
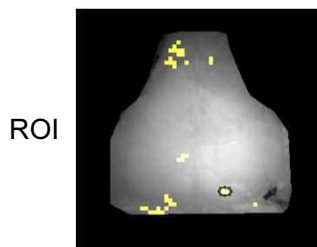
(A)におけるImaging 2回目 - 1回目

Yellow : $p < 0.01$



Scale : 1 mm

N = 8



Bar = S.E.M.

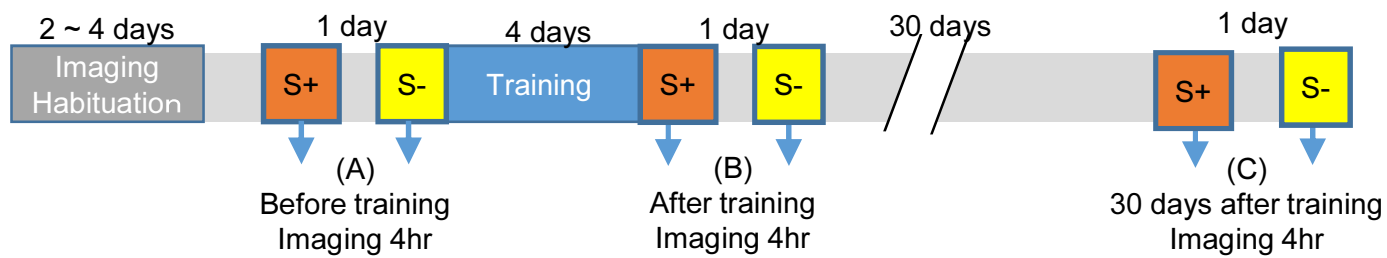
図14 匂い曝露の順序による発光シグナルの変化

トレーニング前のイメージング(A)は、後にS+またはS-となる匂いに対して、マウスを各々10分間曝露することで実施し、1日4時間の観察を、2日間かけて実施した。マウスが初めて匂い刺激に曝露されることになる1回目のイメージングと2回目のイメージングとの間で発光シグナルに変化があるかどうかを検証するため、イメージング2回目の連続画像から1回目の連続画像を引いた差分画像でのt値画像を作成した。黄色のピクセルが有意水準1%未満の値を示す。また、有意水準1%を示すスポットを含むROIでの差分の平均値を経時的にプロットした。その結果、時間依存的に有意なスポットを示す部位が観察された。

これは1回目のイメージングに比べて2回目のイメージングで有意に発光シグナルが高くなる部位があることを示している。この時、S+とする匂いおよび曝露する順序は動物によってランダムにしておき、(A)のイメージングで1回目にS-に曝露する群と1回目にS+に曝露する群の2群に分けられる。発光シグナルにおいて曝露する順番に依存する変化があると考えられるため、以下では1回目にS-に曝露する群と1回目にS+に曝露する群との2群にわけて解析することとした。

図15 匂い-報酬連合学習課題における長時間発光観察(トレーニングによる変化)

同一個体でのS+およびS-に曝露した時の発光観察画像を用いて、トレーニング完了後の発光観察画像からトレーニング開始前の発光観察画像を引いた差分画像(B)-(A)、または、トレーニング完了30日後の発光観察画像からトレーニング開始前の発光観察画像を引いた差分画像(C)-(A)を用いたt値画像を示す。ここでは、(A)の時に1回目でS+を提示した群でのみを示す。黄色のピクセルが有意水準0.5%未満の部分を示す。

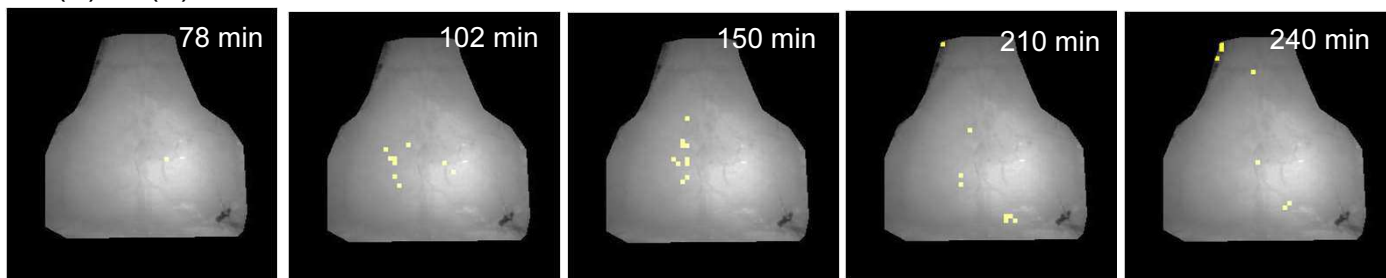


t-map

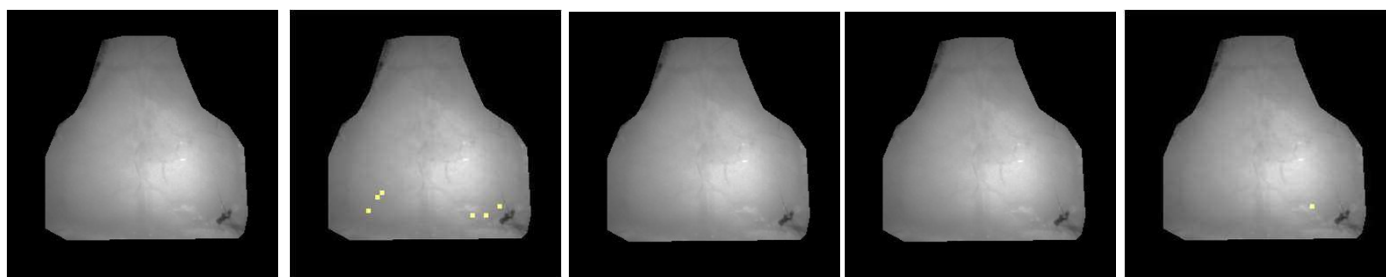
(A)におけるImaging: 1回目S+

(B) - (A) S+

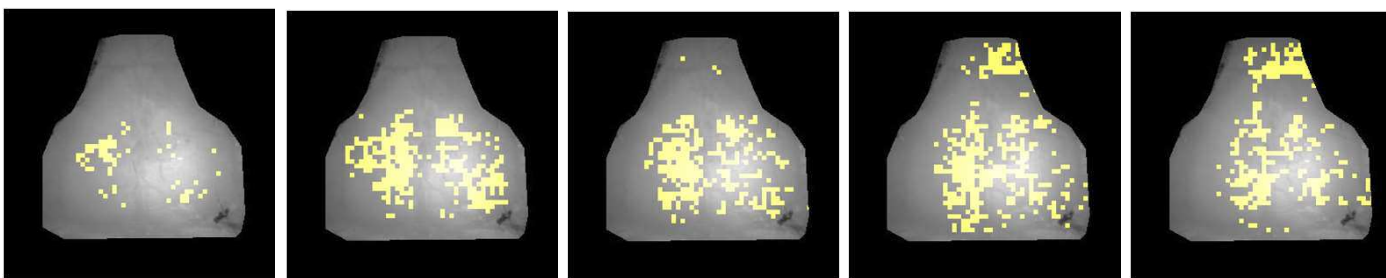
Yellow : $p < 0.005$



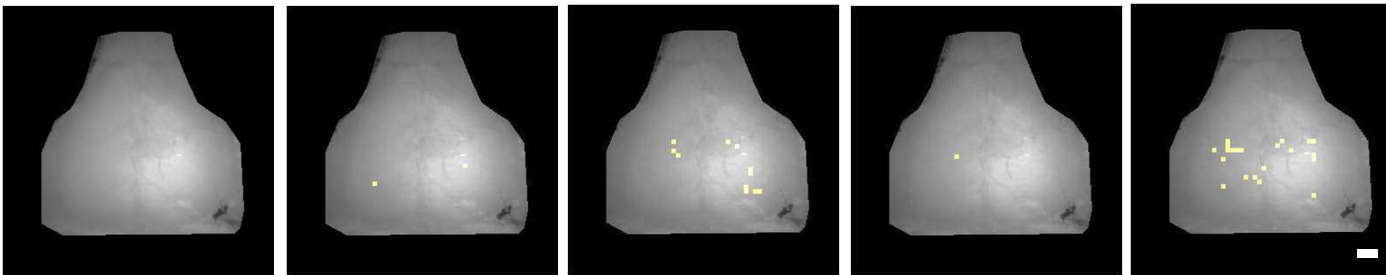
(B) - (A) S-



(C) - (A) S+



(C) - (A) S-



Scale : 1 mm
N = 8

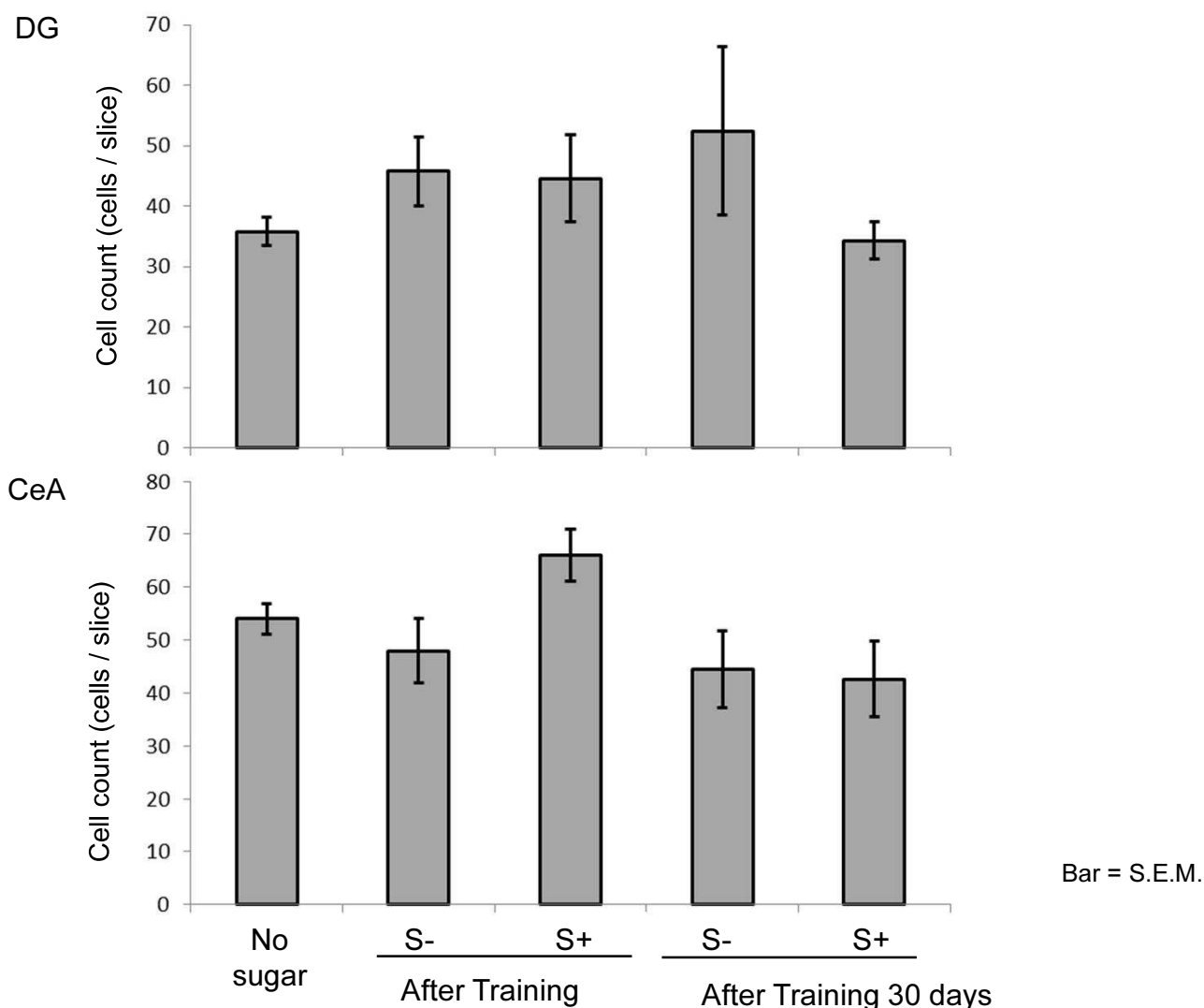


図16 匂い-報酬連合学習課題における固定切片でのArc発現細胞のカウント

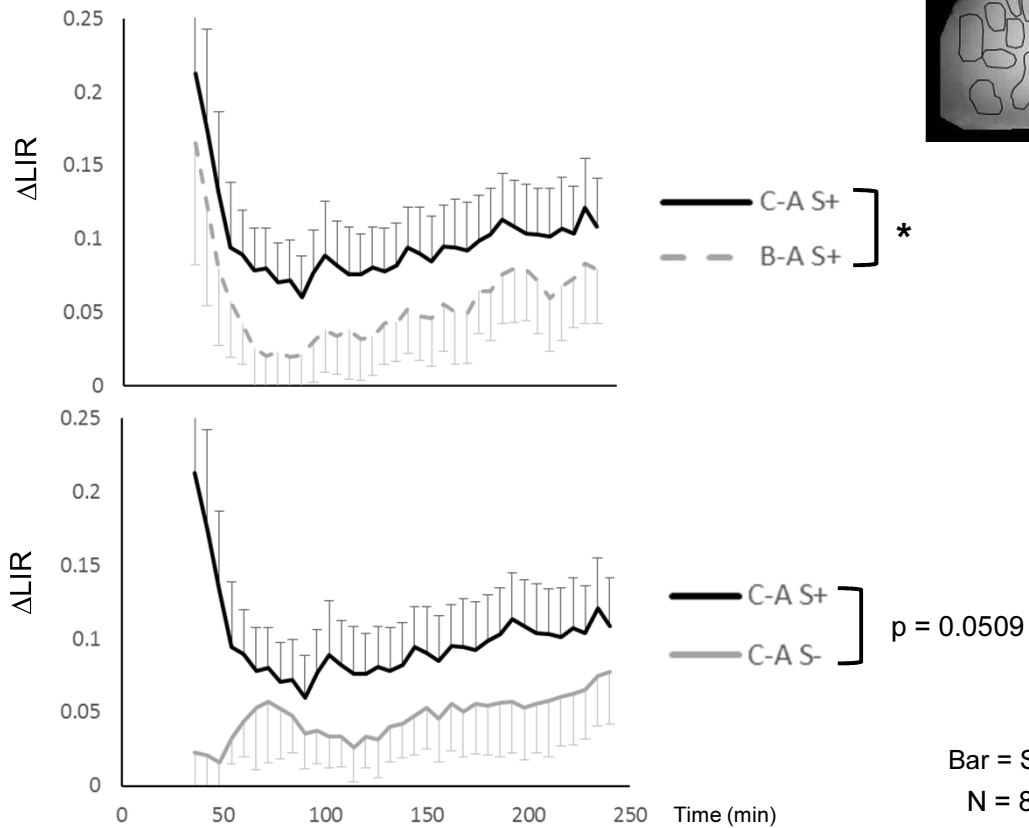
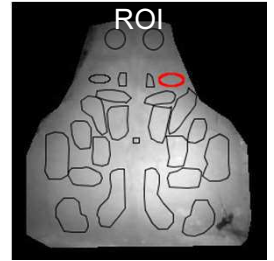
野生型のマウスにおいて、匂い-報酬連合学習課題のトレーニングを行い、トレーニング完了後および完了30日後においてS+またはS-の匂いのみ10分間曝露し、ホームケージに戻して90分後にかん流固定し、抗Arc抗体で免疫染色を行った。また、No sugar群はトレーニングの際にどの匂いにおいても報酬を提示せずトレーニングを行った群である。歯状回(DG)および扁桃体中心核(CeA)におけるArc発現細胞の数をカウントした。

DG : No sugar (N = 3), After Training S- (N = 5), S+ (N = 6), After Training 30 days S- (N = 4), S+ (N = 5), CeA : No sugar (N = 3), After Training S- (N = 5), S+ (N = 6), After Training 30 days S- (N = 4), S+ (N = 4)

また、one-way ANOVAにおいて条件間のp値はそれぞれDG : 0.4881, CeA : 0.0659であった。

LIR ΔAverage

Right FrA



CV plot

$$\text{CV (coefficient of variation)} = \frac{\text{Standard deviation (between individuals)}}{\Delta\text{Average}}$$

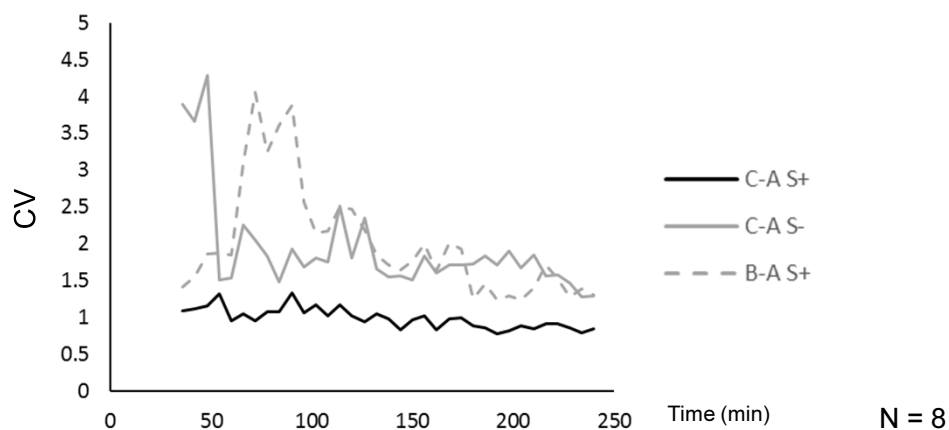
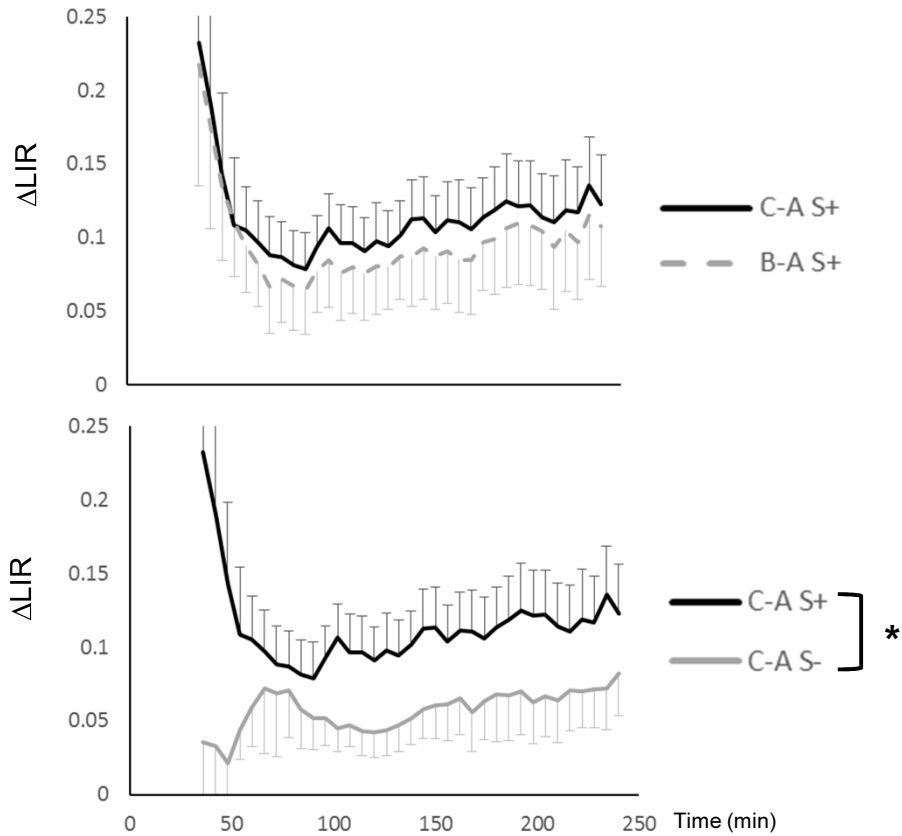
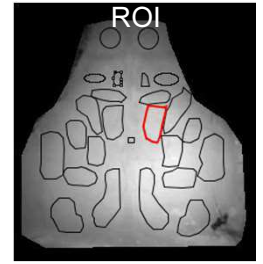


図17 匂い-報酬連合学習課題における長時間発光観察の経時的変化(右側FrA領域)

右側前連合皮質を示すROIにおける、差分値の平均と動物間の変動係数CVの経時的変化をプロットした。Aのイメージング1回目にS+を提示した群での結果を示す。なお、差分値に関しては、S+におけるC-AとB-Aの比較においてrepeated two-way ANOVAにおいて有意差を見出している。(* $p < 0.05$)

LIR ΔAverage

Right M2(posterior)



CV plot

$$\text{CV (coefficient of variation)} = \frac{\text{Standard deviation (between individuals)}}{\Delta\text{Average}}$$

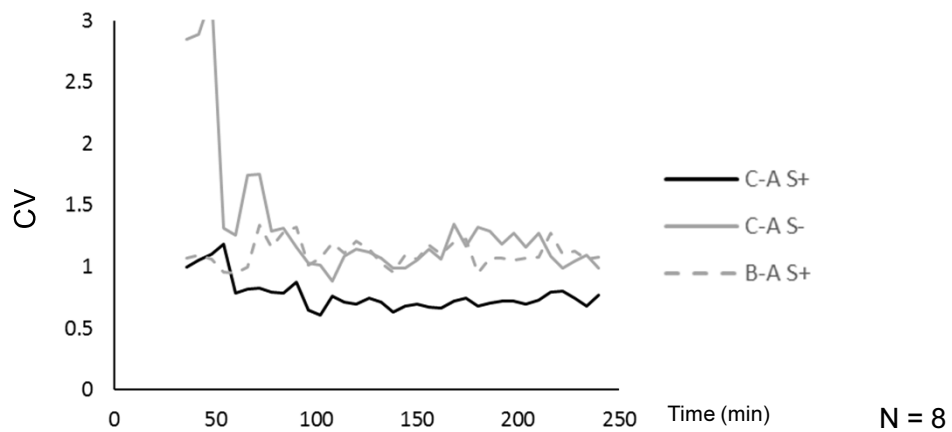
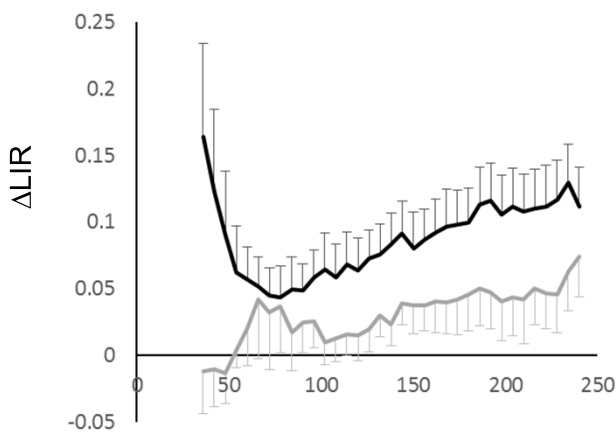
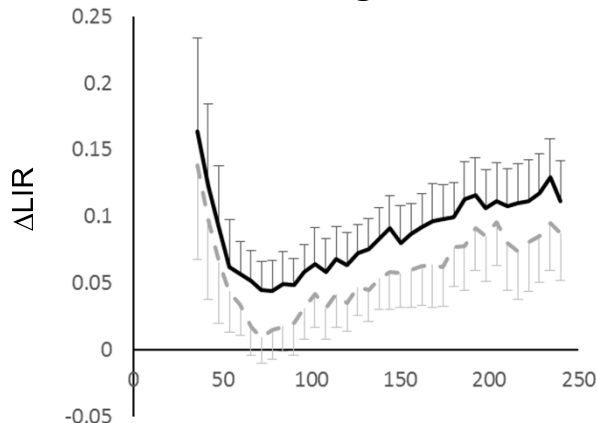
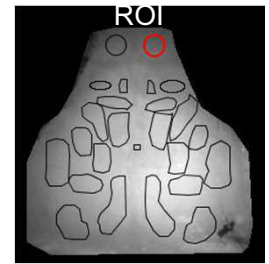


図18 匂い-報酬連合学習課題における長時間発光観察の経時的変化(右側M2領域)

右側運動前野後側を示すROIにおける、差分値の平均と動物間の変動係数CVの経時的変化をプロットした。Aのイメージング1回目にS+を提示した群での結果を示す。なお、差分値に関しては、C-A S+とC-A S-の比較においてrepeated two-way ANOVAにおいて有意差を見出している。(*p < 0.05)

LIR ΔAverage

Right OB



Bar = S.E.M.
N = 8

CV plot

$$\text{CV (coefficient of variation)} = \frac{\text{Standard deviation (between individuals)}}{\Delta\text{Average}}$$

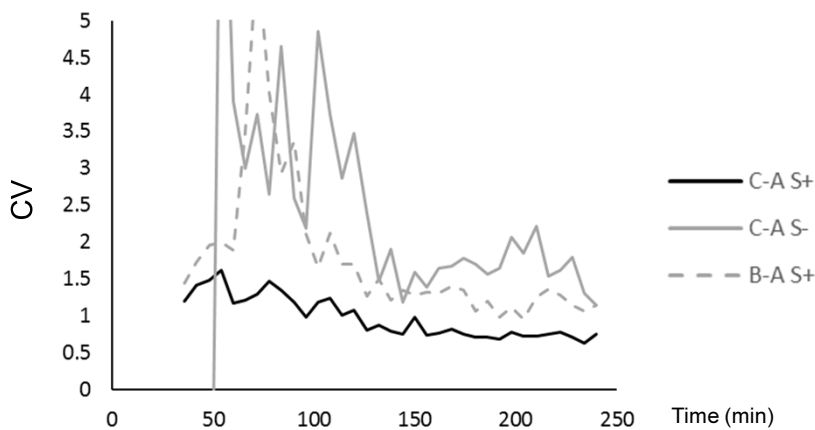


図19 匂い-報酬連合学習課題における長時間発光観察の経時的変化(右側OB領域)

右側嗅球を示すROIにおける、差分値の平均と動物間の変動係数CVの経時的変化をプロットした。Aのイメージング1回目にS+を提示した群での結果を示す。なお、差分値に関しては、S+におけるC-AとB-AおよびC-A S+とC-A S-の比較においてrepeated two-way ANOVAにおいて有意差を見出している。(* $p < 0.05$)