

論文の内容の要旨

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

中枢神経系において神経活動により誘導される新規遺伝子発現は長期記憶形成やその保持に必須であると考えられている。そのため、学習課題を行った際に神経活動依存的な新規遺伝子発現を呈する脳領域は、特に長期記憶形成に重要であると考えられる。この脳領域を同定するために、これまで、神経細胞において刺激を受けたのちに迅速に転写・翻訳調節が行われる最初期遺伝子(群)が注目され、その学習課題遂行時や記憶形成時での mRNA やタンパク質の発現、局在の組織化学的手法による解析が多数報告されている。しかし一方で、生きた動物における学習課題遂行時の転写活性化脳部位の経時的なダイナミクスを観察した例は少ない。そこで、本研究では、特に長期記憶形成とその保持期間の長期化による想起過程での神経活動依存的な遺伝子発現の時空間パターンの変化を可視化することを目指して、以下の利点を持った機能的個体発光観察法の開発を行った。

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

この個体観察法を設立するために、私は最初期遺伝子の中でも、シナプス可塑性や長期記憶形成に深く関与していることから、*Arc* (activity-regulated cytoskeleton protein) 遺伝子に着目した。*Arc* 遺伝子にはダイナミックに転写を制御している約 7kb のプロモーター領域があることを所属研究室で以前に報告している。このプロモーター配列に、レポータータンパク質として、分解促進シグナルを付加し半減期を 1.5 時間ほどに短縮した、高感度の発光を呈する 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。このトランスジェニックマウスを用いて、生きた個体における長時間発光観察法を開発し、感覚刺激および学習課題によって誘導される神経活動依存的な遺伝子発現を経時的に観察した。

機能的個体発光観察法の開発としては、低侵襲な処置により非麻酔・経頭蓋での観察を可能にした。また、持続的な基質 D-Luciferin の投与方法の開発により長時間の持続した発光観察

を実現した。しかし、Eluc の発光観察では、別個体間および同一個体でも観察の回ごとに発光強度にバラつきが生じてしまう。この変動を解消し、個体間や同一個体での各観察結果を定量的に扱うために、参照領域を設定した。参照領域は、神経活動非依存的な Eluc を AAV によって局所導入し、トランスジーン由来の発光強度を参照領域の発光強度で標準化することで、定量的な比較を可能にした。

この個体発光観察法を用いて、感覚刺激を与えた際の感覚野での遺伝子発現を観察した。特に視覚刺激を加えた際の長時間観察により、視覚野特異的な発光シグナルの経時的な上昇を観察した。さらに、同一個体において視覚刺激を与えた際の発光観察画像とコントロール条件での発光観察画像から差分画像を計算し、画像ベースで刺激による有意な変化部位を検出する t 値画像を作成した。この t 値画像からも経時的に視覚野での有意な変化が観察された。また、この視覚野におけるシグナルの上昇と t 値の上昇は、タンパク質合成阻害剤 Anisomycin を投与することで消失した。このことから、本研究で開発した個体発光観察法によって、神経刺激依存的な新規遺伝子発現を発光シグナルとして検出しており、またその変化を経時的に検出することが可能であることが示された。

次に、この発光観察法を用いて学習課題における発光シグナルの変化を観察した。学習課題として匂い・報酬連合学習課題を用いた。トレーニングの際に報酬を伴った S+ の匂いと報酬を伴わない S- の匂いの 2 種類の匂いを提示することでマウスに S+ の匂いと報酬の連合を学習させる。同一個体について、この課題を行う前後および、マウスで遠隔記憶が形成されていると考えられている期間である学習 30 日後で発光観察を行い発光シグナルの変化を t 値画像として計算した。S+ の匂いを提示した後に発光観察を行った時に、学習 30 日後における観察画像から学習前での観察画像を引いた差分画像を元に作成した t 値画像において前連合皮質(FrA)などに発光シグナルが有意に上昇している部位が検出された。興味深いことに、これらの部位では、学習 30 日後での発光シグナルから学習前に観察された発光シグナルを引いた差分における個体間での変動係数 CV がほかの条件に比べて低下していることが示された。本研究で開発された機能的個体発光観察法により、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このような解析が可能になった。変動係数の低下と記憶形成の関連性に関しては、安定した遺伝子発現をウイルス等を用いて攪乱させるといった介入実験を行い、その時の学習に対する影響を観察することなどで検討する必要があると考えている。また、本研究で用いている発光観察法はマウスの脳全体を巨視的に観察していることから、恣意性を含まずに新規遺伝子発現の変化している部位および様々な刺激に対する変動係数の挙動を検出することが可能であると考えている。

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、初めて経時的な神経活動依存的な遺伝子発現の変化を検出し、学習課題に依存した遺伝子発現の変化を観察

した。また、この発光観察法は他の刺激および課題にも適応可能であり、更なる拡張も期待できるものである。