

審査の結果の要旨

氏名 柳下 (姜) 楠

本研究は長期記憶形成に必須である、神経活動依存的な遺伝子発現の時空間的な制御を明らかにするために、生きた動物において神経活動依存的な遺伝子発現を可視化する機能的個体観察法を確立し、学習課題における応用を試みたものである。

本研究により、以下の結果を得ている。

1. 神経活動依存的な遺伝子発現の指標として、最初期遺伝子 *Arc* のプロモーター領域に発光レポータータンパク質である **Emerald Luciferase(Eluc)**を付加したトランスジェニックマウス(**Eluc** マウス)を作成し、そのレポータータンパク質と内在性 *Arc* の **mRNA** およびタンパク質の発現を比較した。内在性 *Arc* とレポータータンパク質である **Eluc** はともに、定常状態において発現が低く、新規環境刺激によって、大脳皮質および海馬、歯状回で発現が上昇するという発現様式を示した。
2. **Eluc** マウスを用いた 1 ショットの発光観察において、視覚および体性感覚に対する刺激を行った場合に、視覚野および体性感覚野特異的な発光シグナルの上昇を観察した。このことより、**Eluc** マウスによって、刺激依存的な発光シグナルを観察できることが示された。
3. 長時間の発光観察を行うための発光観察系の立ち上げを行った。長時間持続して基質である **D-Luciferin** をマウス体内に注射するアダプタおよび無麻酔の動物を固定して観察できる脳固定観察ステージを作成した。また、長時間観察によって得られる発光シグナルを定量的に評価するために、内部標準として恒常的に **Eluc** を発現する **AAV** を局所導入し、参照領域として標準化した。また、この標準化したシグナルを用いて、同一個体における観察結果の差分画像を用いた、刺激依存的な変化領域の同定方法を示した。
4. この長時間発光観察法を用いて、視覚刺激依存的な視覚野の反応を観察した。長時間観察においても、刺激依存的なシグナル上昇を観察し、このシグナルは刺激によって新規に合成されたタンパク質に由来するものであることが示された。
5. 長時間発光観察法と組み合わせる学習課題として、匂い - 報酬連合学習課題を設定し、発光観察と組み合わせた場合における学習の成立と長期間の記憶の保持をトレーニングおよびテストを行った時の行動指標により確認した。
6. 匂い - 報酬連合学習課題を行う前とトレーニング完了後、また記憶保持期間が長くなった時点の観察としてトレーニング完了 30 日後における発光観察をそれぞれ行った。この時、トレーニング依存的な変化領域として、特にトレーニング完了 30 日後に

において報酬と連合させた匂いを提示し、記憶を想起させた時にトレーニング前と比較して前連合皮質や運動前野を中心とした大脳皮質で変化を示した。また、興味深いことに、この変化領域ではトレーニング 30 日後には動物間の変動が小さくなり、どの個体においても安定して該当領域におい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。

以上、本論文は今までに観察されていなかった、生きた動物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観察系を確立し、同一個体を繰り返し観察することによって、学習課題を行った動物における各時点での神経活動依存的な遺伝子発現の動態の変化を検出できる可能性を示した。実際に、学習課題の各時点における想起過程でのシグナルを検出しており、長期記憶の形成および再固定化における神経活動依存的な遺伝子発現の動的な制御が果たす意義の解明に重要な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。