

氏名	橋本隆紀
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	総研大甲第29号
学位授与の日付	平成4年 3月16日
学位授与の要件	生命科学研究科 生理科学専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	KAINIC ACID-INDUCED GENE EXPRESSION IN THE RAT HIPPOCAMPUS
論文審査委員	主査 教授 小幡 邦彦 教授 濱 清 教授 彦坂 興秀 教授 丹治 順(東北大学)

論文内容の要旨

記憶や学習の基盤と考えられている神経系の可塑的な変化には、蛋白およびmRNAの合成が必要であるといわれており、可塑性という現象の分子レベルでの解明には、神経細胞内にすでに存在するレセプターやチャンネル等の物質がどのように機能するのかという問題とともに、神経系への様々な刺激がどのような物質をどのような機序で細胞内に誘導するのかという問題が重要と考えられる。その意味で最近の痙攣や侵害刺激などでもたらされた神経活動の上昇後によるさまざまな物質およびそのmRNAの増加についての多くの報告は注目に値する。これらの現象には、神経活動そのものによる遺伝子発現の制御機構が関与しており、その解明は可塑性のメカニズムを知る上でも、重要と考えられる。

神経活動に伴う細胞内セカンドメッセンジャー系の変動は、核内において遺伝子の調節領域内の特異的な塩基配列を介してその発現に影響を及ぼすと考えられている。このようにして誘導される物質には、核内にて遺伝子発現を制御するc-fos等の転写因子があり、これらが更に他の遺伝子の発現を誘導することも知られている。著者はグルタミン酸アゴニストであるカイニン酸投与でもたらされる神経活動の上昇によるいくつかの物質のmRNAの発現をラット海馬にて空間的および時間的に、*in situ hybridization*法を用いて解析し、神経活動による遺伝子発現の調節について考察した。

カイニン酸は、全身投与により海馬を中心とした片縁系に強い電気活動を誘発し全身痙攣を引き起こす。著者は、カイニン酸投与後の海馬にて、ソマトスタチンのmRNAおよびペプチドが、本来これを発現していないとされる歯状回顆粒細胞およびアンモン角錐体細胞に発現することを見いだした。ソマトスタチン遺伝子の調節領域はセカンドメッセンジャーの変動により発現調節を受ける塩基配列を含むことが知られている。従来より神経系への様々な刺激により誘導されることが報告されている

転写因子であるc-fosはその遺伝子の調節領域に同様の塩基配列を持ち、なおかつそれ自身がソマトスタチン遺伝子の調節領域に影響を与える可能性も示唆されている。カイニン酸投与による神経活動でもたらされたセカンドメッセンジャーの変動およびそれにより誘導されたc-fosがソマトスタチンmRNAの新たな発現にどのように関与しているのか知るために、海馬でのソマトスタチンmRNAとc-fos mRNAの発現を比較した。

c-fos mRNAは正常の動物では海馬内での発現は認められず、投与後1.5—3時間で海馬内の全ての領域に於いて最大レベルの発現を示し、特に顆粒細胞層および錘体細胞層においてはほぼ全ての細胞に発現が認められた。これに対し、ソマトスタチンmRNAは正常の海馬に於いては、歯状回のhilusの細胞や、アンモン角のstratum oriens及びstratum radiatumの介在ニューロンの一部にのみ発現していたが、カイニン酸投与後、顆粒細胞および錘体細胞の一部に発現が認められ、発現細胞数は8—12時間後に最大を示した。この発現はCA3領域に特に顕著であり約半数の細胞に認められた。hilusに於いては、8時間以降発現細胞数が減少し、過剰興奮による細胞傷害が考えられた。c-fos mRNAの発現パターンの変化は、カイニン酸による神経活動の時間的及び空間的關係とよく一致しており、上記の塩基配列を介してセカンドメッセンジャー系による直接の制御を受けている事が考えられる。一方ソマトスタチン遺伝子の発現はc-fosに比べより遅い時間経過で限られた細胞群にのみ認められ、セカンドメッセンジャーによる直接の制御やc-fosによる制御のみでこのような発現パターンを説明する事は不可能である。

次に、痙攣をジアゼパム投与により、その初期に抑制する事により、過剰興奮の神経細胞へのダメージを軽減した系を用いて、ソマトスタチンmRNAに加え同様にセカンドメッセンジャーによる制御及びc-fosによる制御をうける塩基配列をその遺伝子の調節領域中にもつ、エンケファリン及びコレシストキニンのmRNAと神経細胞特異的細胞骨格蛋白である68kdニューロフィラメントのmRNAの発現を調べ、c-fos mRNAに加え同じく神経活動の上昇により増加する事が知られている転写因子で

あるNGFI-AのmRNAの発現と比較した。

ソマトスタチンmRNAは、この実験に於いては、CA3錘体細胞層に新たな発現が、投与後12—24時間を最大に、この領域の約半数の細胞群に認められ、顆粒細胞層には発現は見られなかった。エンケファリンmRNAは、正常では顆粒細胞層の小数の細胞及びhilusの細胞やstratum oriens及びstratum radiatumの介在ニューロンの一部に発現が認められた。カイニン酸投与後の変化は、主に顆粒細胞層に認められ、この領域に於ける発現細胞数が著明に増加し、12—24時間後ほぼ全ての細胞に発現が認められるようになった。また同じ時間経過でhilusに於いても発現細胞数が増加した。コレシストキニンmRNAは正常ではhilusやstratum oriensやstratum radiatumのごく小数の介在ニューロンとCA1の錘体細胞層に発現が認められ、カイニン酸投与後12—24時間後CA1領域の錘体細胞層にて発現が著明に増加した。68kdニューロフィラメントmRNAは顆粒細胞層、hilus及び錘体細胞層等に於いて正常でも発現が認められ、カイニン酸投与後1.5—6時間という早い時間経過で顆粒細胞層に於ける発現が増加した。

転写因子であるc-fos mRNAとNGFI-A mRNAのカイニン酸投与後の発現の空間的及び時間的パターンは、非常によく似ていた。両者とも1.5時間後にすでに海馬内の全ての領域に最大レベルの発現が認められ、特に顆粒細胞層や錘体細胞層ではほぼ全ての細胞がc-fosおよびNGFI-Aの発現を示した。3時間後顆粒細胞層で発現に減少が認められ、6時間以降他の領域にても発現は急速に消退した。NGFI-Aの遺伝子もその調節領域にc-fosと同様、セカンドメッセンジャーによる制御を受ける塩基配列を持ち、カイニン酸投与後の電気活動およびグルコース代謝を考慮にいれるとこれらの転写因子はカイニン酸による神経活動によりこの塩基配列を介して誘導されるとかんがえられる。これに比べ上記3つの神経ペプチドの遺伝子発現の時間経過は一樣に遅く、その発現のみられる海馬内の領域がそれぞれに異なり、変化の様式も異なっていた。また68kdニューロフィラメントの変化も海馬内の限局された部位で認めら

れた。

以上より神経ペプチドである、ソマトスタチン、エンケファリン、コレシストキニンの遺伝子発現にはc-fosやNGFI-Aのようにセカンドメッセンジャーによる直接のあるいはc-fosやNGFI-Aによる制御のみでなく、海馬内の領域や細胞種により異なる制御機構が関わっていると考えられる。また68kdニューロフィラメントmRNAの発現調節については、転写の促進のみでなく分解の抑制による制御もとくに短時間の変化では認められており今回の変化にも関与している可能性がある。また、変化は顆粒細胞層のみで認められ、この領域における特異的な調節が考えられる。

論文の審査結果の要旨

近年、神経興奮によって引き起こされる遺伝子発現が神経系の長期的機能変化の基盤にあると考えられているが、本論文は強力な神経興奮としてカイニン酸でラットに誘発されるけいれんをとり上げ、脳の可塑性に深く関わっている海馬において6種の遺伝子の発現の時間的部的変化をin situハイブリダイゼーション法により検討し、いくつかの新知見を得たものである。

検出したmRNAはimmediate early geneのc-fosとNGFI-A、神経ペプチドのソマトスタチン、エンケファリン、コレシストキニン、細胞内骨格蛋白のニューロフィラメント蛋白Lサブユニットである。カイニン酸投与で辺縁系けいれんを発生させ、その持続時間はジアゼパム投与で調節した。in situハイブリダイゼーションはジゴキシゲニン標識cRNAによる非アイソトープ法の条件を検討し、高解像力を得たので、これをカイニン酸投与後1.5—48時間の海馬に施行した。c-fos、NGFI-Aの発現、消失に続いて、神経ペプチドが発現したが、とくに介在ニューロンのペプチドであるソマトスタチンが主要ニューロンの錘体細胞と顆粒細胞にも発現することを見出した。また構造蛋白質として変化が少ないと考えていたニューロフィラメント蛋白のmRNAがc-fos、NGFI-Aと同様な速い経過で出現することを見出した。これらの所見とけいれん後の細胞傷害や発芽などの可塑的变化への関与を考察した。

以上のごとく、本研究は神経科学領域において注目を集めている神経活動による遺伝子発現調節機構の先駆的研究である。その成果の一部は学会発表や論文発表 (Neuroscience Research、12:514-527、1991) によっても評価を得ており、博士 (学術) の学位に値するものと判定した。