

[ 別紙 1 ]

## 論文の内容の要旨

論文題目：

### BDNF upregulation during declarative memory formation in the inferior temporal cortex of the monkey

和訳 サル下部側頭葉における認知記憶形成時の BDNF 発現誘導

指導教官 宮下保司教授  
東京大学大学院医系研究科  
平成 7 年 4 月入学  
医学博士課程  
機能生物学専攻  
氏名 徳山宣

## 序文

知識や経験に関する記憶（陳述的記憶）は大脳皮質に蓄えられる。記憶の形成は神経回路の構造的、機能的な再編成によって担われていると考えられているが、この過程にはタンパク質の新たな合成が必要である。陳述的記憶の検査法のひとつに、対連合課題 [pair-association (PA) task] がある。サルを用いた電気生理学的研究や破壊実験から、対連合記憶が下部側頭皮質に蓄えられることが示されている。しかし、霊長類における記憶形成の分子的基盤に関する研究はわずかにしかなされていない。神経栄養因子は神経細胞の生存維持以外にも、シナプス可塑性に関与することが示唆されている。神経栄養因子の記憶形成への寄与を検討するため、視覚性対連合記憶課題遂行中のサル大脳視覚関連領野における神経栄養因子遺伝子の発現誘導を定量的に解析した。

遺伝子の発現量には個体差があり、異なる個体間での比較は困難である。今回の実験では、この問題を克服するために日本ザルの大脳交連線維を外科的に切断することにより分離脳動物を作成し、同一個体の左右の半球間で遺伝子の発現量を比較する方法を用いた。また、コントロール課題として異なる視覚記憶課題を用いるこ

とにより、遺伝子発現に影響しうる視覚入力、注意、運動などに伴う神経活動を左右半球間でコントロールした。

## 方法と結果

ニホンサル 7 頭を用い、大脳半球間の交連線維である前交連および脳梁の全長を外科的に切断し分離脳ザルを作成した。前交連および脳梁が離断されていることは、手術後の MRI および脳摘出後の組織切片を Gallyas 法で染色することにより確認した (Gallyas 法では神経線維が染色される)。分離脳ザルは視覚性対連合課題とコントロール課題である視覚弁別課題 [visual discrimination (VD) task] の二つの課題を行った。サルの眼位は電磁誘導式の測定装置を用いて測定した。サルが画面中央の固視点を注視している間に視覚刺激を片側の視野に提示した。この条件では視覚入力は一側の半球に限局し、対側の半球に伝わらないことが示されている。従って、各分離脳ザルに対連合課題を一方の半球 (PA 半球) で、コントロール課題をもう一方の半球 (VD 半球) で学習させることが出来る。対側の半球に視覚刺激が入らないようにするため、サルの眼位が固視点よりも 0.75 度以上動いた場合には課題が中止するようにした。視覚刺激には 2 度×2 度の大きさのフーリエ図形を用いた。分離脳ザルは対連合課題およびコントロール課題を 8 対からなる刺激図形セットを順に 3 セット学習していった。第 1, 第 2 セットを用いた学習により、各記憶課題の要求およびそれらを解くためのルールを理解させ、サルに両方の課題に十分に習熟させる。その後新たな刺激図形セット (第 3 セット) を学習させ、さらにサルが第 3 セットの学習途上、つまり成績が十分にチャンスレベル (正答率 50%) よりも高く、かつ成績が上限に達する前に脳を摘出することにより、純粋な対連合記憶の形成に伴う遺伝子の発現を評価することが可能となる。

課題終了の直後にサルをペントバルビツールで麻酔し、4°C に冷やした PBS を経心的に灌流し、脳を摘出した。摘出した脳は直ちにドライアイスで凍結させた後、約 5 mm 厚の切片にした。第一次視覚野 (V1)、V4、側頭連合野 (TE 野)、傍嗅野 (36 野)、海馬 (Hippocampus) の 5 つの視覚関連領野を左右大脳半球それぞれの切片より切り出した。切り出した組織は guanidinium thiocyanate 溶液中でホモジナイズし、Cesium-TFA 超遠心法で total RNA を抽出した。各領野における mRNA の発現量は共増幅 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて定量した。共増幅 RT-PCR 法では目的遺伝子と内部標準遺伝子を 1 本の反応チューブで同時に増幅し、目的遺伝子の量を内部標準遺伝子の量で標準化した。内部標準遺伝子の量で標準化することにより PCR の増幅に伴う誤差を排除し、正確に遺伝子の発現を定量することが出来る。ラットの total RNA を用いた Northern blot analysis と ribonuclease protection assay 法の結果との比較実験より、この方法の定量性は確か

められている (Appendix 参照)。

神経栄養因子の遺伝子発現量を RT-PCR 法で定量するため、まず日本ザルの脳由来神経栄養因子 (BDNF), 神経栄養因子 (NGF), NT-3 および BDNF の特異的受容体である TrkB 遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。特異的プライマーはそれらの塩基配列を基にして設計した。本実験では内部標準遺伝子に、脳内に広く、均等に発現していることが知られているグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) を用いた。G6PD においても、ニホンザルの遺伝子を単離し、塩基配列決定後、特異的プライマーを設計した。2種類の遺伝子を PCR 法で共増幅する際にプライマー同士による相互作用を引き起こす可能性があるため、プライマーの特異性を確認する必要がある。RNA 逆転写産物を用い、目的遺伝子および内部標準遺伝子がともに特異的に増幅されていることを確認した。また、共増幅した際に目的遺伝子と内部標準遺伝子が同じ増幅率で増幅されていること、その増幅率が PCR の理論的増幅率である 2 になっていることも確認した (BDNF,  $1.998 \pm 0.015$ ; G6PD,  $1.994 \pm 0.012$ )。さらに、一定量の G6PD に段階的に希釈した BDNF を加えたサンプルを用意した。これらを PCR で共増幅することにより、内部標準で標準化した BDNF の値がサンプルに加えた BDNF の量と比例していること ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.0001$ )、すなわちわずかな BDNF の量の差でも見いだすことが可能であることを確認した。

この RT-PCR 法を用い、PA および VD 半球の視覚関連領野における BDNF 及び *trkB* mRNA の発現量を定量し、発現量の差を各動物の左右半球間で比較した。下部側頭皮質の傍嗅皮質 36 野において対連合課題学習中の半球間に有意な BDNF mRNA の発現誘導が見られた (paired *t*-test,  $p < 0.05$ )。側頭葉連合野 TE 野や海馬では半球間での発現量には差が認められなかった。視覚情報処理の早期段階にある V1 や V4 での発現量には差が認められなかった (V1,  $p > 0.60$ ; V4,  $p > 0.87$ )。この結果は、BDNF の 36 野における発現誘導が視覚入力によるものではないことを示す。また、その受容体である *trkB* mRNA も傍嗅皮質 36 野において PA 半球における発現が VD 半球に比し高かったが、統計的有意差は認められなかった ( $p = 0.26$ )。残りの領野においても *trkB* mRNA の発現誘導は見られなかった ( $p$  values, 0.23-0.69)。他の神経栄養因子 NGF および NT-3 は発現量が低いため傍嗅皮質 36 野および海馬のみしか定量できなかったが、いずれにおいても発現誘導は見られなかった ( $p$  values, 0.19-0.84)。内部標準遺伝子である G6PD 自身の発現に変動がないことを確かめるために、発現量が神経活動により変化しないと考えられるアクチン遺伝子の発現量も調べた。アクチン遺伝子の発現量はいずれの視覚領野においても左右半球間での差を認めなかった ( $p$  values, 0.47-0.95)。

さらに、*in situ* hybridization 法を用いて BDNF および *trkB* mRNA を発現している細胞の分布を調べた。PA 半球の傍嗅皮質 36 野では強く BDNF mRNA を発現している細胞がパッチ状に集積していた。この集積は V/VI 層に顕著だが、II/III

層にも見られた。一方の VD 半球の傍嗅皮質 36 野では BDNF を発現している細胞は広く均一に見られた。傍嗅皮質 36 野における BDNF の発現の差を grain counting 法により確かめたところ、PA 半球では一定レベル以上の BDNF mRNA を発現している細胞の割合が VD 半球に比べて約 2.5 倍高いことが示された ( $\chi^2$  test,  $p < 0.001$ )。また、*trkB* mRNA は下部側頭皮質の II 層から VI 層にかけて広く発現が見られ、両半球間での発現分布に差は見られなかった。V1 における BDNF mRNA の分布を調べたが、視覚刺激を提示している範囲に受容野を持つと考えられる皮質領域においても両半球間での発現の違いは認められなかった。海馬においても、両半球間に BDNF mRNA の分布の違いは認められなかった。

## 考 察 と ま と め

本研究では分離脳ザルを用い、動物間での遺伝子の発現量の差を克服することにより、対連合学習により BDNF の発現が傍嗅野において誘導されることを示した。電気生理学および行動学的研究から、傍嗅皮質 36 野は認知記憶の形成・保持に重要な役割を果たすことが示されている。一方で BDNF はシナプスの伝達効率を修飾する、軸索終末の形態変化を引き起こすなど神経の可塑的变化に関与することが示唆されている。以上のことから、対連合学習により発現誘導された BDNF が霊長類の神経回路の機能的、構造的な再構築を引き起こし、陳述的記憶の形成へ関与していることが示唆される。