

論文の内容の要旨

氏名：小 林 秀太郎

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：A new method for determination of *Thy1*-GCaMP6s using two-photon microscopy in mice
(2光子励起顕微鏡を用いた新たな *Thy1*-GCaMP6s 発現判定法)

Thy1-GCaMP6s 遺伝子改変マウスは *Thy1* プロモーター制御下にカルシウム指示タンパク質である GCaMP6s を発現させたマウスである。主に大脳皮質及び海馬における興奮性神経細胞に発現する GCaMP6s は、カルシウム濃度上昇に応じてその緑色蛍光強度が上昇し、これを利用することで神経活動を蛍光強度の変化として可視化できる。神経科学領域ではこの遺伝子改変マウスと二光子励起顕微鏡を組み合わせることで、非破壊的に大脳皮質の多数の神経細胞活動の同時記録が可能となり、世界的に利用される頻度は増えつつある。*Thy1*-GCaMP6s マウスはヘミ接合体を交配に用いることから、得られる個体のうち半数は GCaMP6s を発現していない。そのため、得られた個体はイメージング実験に用いる前に、その表現型を同定する必要がある。しかし、大脳皮質の神経細胞における GCaMP6s の発現の有無を直接観察するのは、頭蓋骨に対する侵襲が大きい上に非効率的である。通常は、尾の生検を行い Polymerase Chain Reaction 法 (PCR 法) によって仔マウスの遺伝子型の判定を行うが、PCR 法による判定は、遺伝子型を判別できる確実な方法である一方、時間と費用がかかるため、研究を遂行する速度を低下させる要因ともなる。そこで、本研究では *Thy1* プロモーター制御下に GCaMP6s が末梢神経等においても発現している可能性に着目し、新たな同定法の開発を目指した。すなわち、末梢組織における GCaMP6s 発現を観察することで簡便に表現型を同定できると考え、尾の生検で得られたマウス尾断面を二光子励起顕微鏡を用いて撮像することによって表現型を判定する手法を開発した。

雄性ヘミ接合型 *Thy1*-GCaMP6s 遺伝子改変マウスと雌性野生型マウスを交配して得られた 3-4 週齢仔マウスの尾部先端約 2 mm を 4%イソフルラン麻酔下において切断し、得られた尾を 1 mm に再切断して得られる尾断面を二光子励起顕微鏡を用いて撮像した。励起波長は 940 nm に設定し、得られる光を GCaMP6s が発する蛍光の波長（緑色: 495-540 nm）と、それよりも長波長（赤色: 575-645 nm）に分離した。これら 2 つの蛍光画像の重ね合わせを行うと、赤色と緑色が重なることで橙色を呈する領域に加えて強い緑色蛍光を有する組織が認められる群 (type 1) と、橙色の組織のみが認められる群 (type 2) の 2 群が存在した。

2 群の違いを定量的に評価するため、緑色から赤色蛍光輝度値を減算した差分蛍光画像を作成したところ、type 1 では差分輝度値が正となる画素が多数存在したのに対して、type 2 ではほぼ 0 や負を示す画素が大半を占めた。さらに差分輝度値 50 を超えた画素数をマウス毎に集計したところ、画素数の分布は二峰性を示し、type 毎に異なる分布のピークが存在することが確認された。すなわち、重ね合わせた蛍光画像によって分類される type 1 と type 2 は、差分輝度画素数という客観的な指標によって判定できた。

次に、これらの尾断面から得られる分類が、実際の大脳皮質の神経細胞における GCaMP6s 発現と合致しているかどうかを確認した。尾断面で分類したマウスに対して、ウレタン麻酔下 (1.4-1.7 g/kg) で二光子励起顕微鏡を用いて大脳皮質の撮像を行い、GCaMP6s 発現の評価をした。type 1 では大脳皮質神経細胞に強い緑色蛍光を認め、自発的な神経活動に伴って蛍光強度の大きな変動を示したのに対し、type 2 では緑色蛍光の輝度変化を認めなかった。そこで、撮像領域の平均蛍光輝度値変化率 (dF/F) を用いた解析を行ったところ、type 1 では dF/F の不規則な大きい変動を示したのに対して、type 2 ではそのような変動は認められなかった。以上のことから、尾断面蛍光画像による分類は、大脳皮質の神経細胞における GCaMP6s の発現と一致することが明らかとなった。

二光子イメージングは光学的な観察手法であり、観察領域への血液の付着はしばしば観察を困難にする。そこで、尾断面を利用した表現型判定に影響する要因として、尾断面に付着した血液の影響を検討した。その結果、血液が付着している尾断面では、緑色蛍光画素数が減少していたことから、表現型を偽陰性として判定する可能性が示唆された。尾生検時に最初に行う切断面には、生活反応によ

って血液が付着するものの、その切除した尾を再度切断して得られる尾断面にはほぼ血液は付着していなかった。これらのことから、観察には2回目の切断面を利用することで、精度の高い判定ができると考えられた。

さらに、尾断面で緑色蛍光を発生している組織を同定するため、骨、表皮、毛包、筋等の組織構造を可視化できるモキシフロキサシンを用いて、尾部検体の二光子イメージングを行った。その結果、強い緑色蛍光を発する組織が尾骨と筋の間に存在した。その尾のスライス標本を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡によって観察したところ、強い緑色蛍光を発する組織内部に軸索を認めたことから、尾断面において観察される緑色蛍光は末梢神経に由来していることが示唆された。

最後に、type 1 と判定された尾断面を冷暗所にて24時間保管し、緑色蛍光組織の変化の有無を検討した。その結果、24時間経過後の尾断面では、緑色蛍光強度の減少が認められたことから、時間経過により緑色蛍光組織の視認性が低下すると考えられた。

本実験で得られた以上の結果から、*Thy1-GCaMP6s* マウスは、末梢組織においても *GCaMP6s* を安定して発現している組織を有しており、生検を行ってその発現を観察することで、交配で得られた仔マウスの表現型を判定できることが明らかとなった。一般的に遺伝子改変動物の遺伝子型判定は、PCR法によって行われるが、様々な試薬や機器が必要であり、判定結果を得るのに相応の時間と費用を要する。一方、本研究で考案された新たな表現型判定法は、一連の作業において特別な試薬を必要とせず、また、短時間かつ簡便に *GCaMP6s* 発現の有無を判定することができる。したがって、本研究で考案された表現型判定法は、短時間、低コストを実現するものであり、同系統の遺伝子改変マウスを用いた研究遂行速度を促進することに貢献するものである。