

	ニシノ アスカ
氏 名	西野 明日香
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	連研第639号
学位授与年月日	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学専攻
学位論文題目	線虫の学習行動に与える活性酸素の影響と覚醒マウスを用いた新規イメージングシステムに関する生理学的研究（Effect of oxygen intermediates on learning behavior in nematodes and physiological study on new optical imaging systems using awake mice）
学位審査委員	主査 教授 松浦 哲也 副査 教授 一ノ瀬 充行 副査 准教授 牛田 千里 副査 教授 木村 直子

論文の内容の要旨

1. 線虫の学習に与える活性酸素の影響

線虫 *Caenorhabditis elegans* は全ゲノム配列が明らかとなっており、行動を制御する神経基盤や遺伝子の機能を解析するためのモデル動物として広く利用されている。線虫は、エサであるバクテリアが分解される際にわずかに生じる匂い物質ジアセチルに対して誘引行動を発現する。あらかじめこの物質をエサのない条件下で経験した線虫は、誘引反応の低下を示す（ジアセチル順応）。この行動は一種の学習である。線虫は飼育温度によって簡単に寿命を制御することが可能である。飼育温度の上昇は線虫の代謝速度を上げ、それにとまなう活性酸素の発生量も増加する。活性酸素は細胞に酸化ダメージをもたらし、老化の要因ともいわれる。そのため高温での飼育は寿命を短縮し、低温では延長させる。また、活性酸素による体内への酸化ダメージを多く保持する変異体の寿命は短く、活性酸素の少ない変異体の寿命は長い。本研究では順応の持続時間（記憶時間）および各成長段階における順応の成立（学習の成立期間）について解析し、活性酸素がこれらに与える影響について評価した。

(1) 線虫のジアセチル順応の持続時間に与える活性酸素の影響

活性酸素発生レベルの違いが線虫のジアセチル順応の持続時間に及ぼす影響について解析した。はじめに、ジアセチル条件付け後の飼育温度を変えた場合の順応の持続時間を解析した。その結果、温度に比例した順応の持続時間の延長が認められた。飼育温度の上昇は、活性酸素の増加をもたらす。したがって、活性酸素発生レベルの違いが線虫における順応の持続に関与している可能性がある。そこで、ミトコンドリア電子伝達系の変異により寿命が異なる変異体線虫を使用し、同様の解析を行った。活性酸素発生レベルの高い短寿命変異体の順応の持続時

間は延長し、活性酸素発生レベルの少ない長寿命変異体の順応の持続時間は短縮した。さらに、抗酸化剤によって活性酸素レベルを低下させた線虫では、順応の持続時間の短縮が認められた。以上の解析結果から、ジアセチル順応の持続（記憶保持）には活性酸素が必要であると結論づけた。

(2) 線虫の順応獲得時期に関わる活性酸素の影響

線虫を 20℃で飼育すると、ジアセチル順応は成虫となったヤングアダルト (YA) 期から成立し、成虫脱皮後 5 日目 (A5 期) まで引き起こされ、飼育温度を変化させた場合、ジアセチル順応は、どの温度条件下においても YA 期からの成立が認められた。幼虫期では学習獲得に必要な神経系の構成が未熟であることが示唆される。各温度で飼育した線虫のジアセチル順応は、15℃の飼育において A3 期まで獲得することができ、25℃の飼育では A7 期まで獲得が可能であった。以上の結果は、順応の成立期間が飼育温度に比例することを意味している。飼育温度の上昇は、体内の活性酸素レベルを増加させることから、順応の成立期間には活性酸素が影響している可能性が高い。ミトコンドリア電子伝達系に関わる変異体線虫を使用した同様の実験においても、活性酸素発生レベルの高い短寿命変異体では順応成立期間が延長し、活性酸素発生レベルの少ない長寿命変異体では短縮した。抗酸化剤を用いて、活性酸素レベルを減少させた線虫においても、順応の成立期間に短縮が認められた。このことから、ジアセチル順応の成立期間には活性酸素が関与していることが示唆される。一方で、過度な活性酸素の増加は生体内に悪影響をもたらす。本研究で得られた結果は、活性酸素の適度なバランスが学習の成立に重要であることを示している。

2. 覚醒マウスを用いた血流動態および脳酸素代謝の新規光イメージングシステムの構築

ポジトロン断層画像法 (PET) を用いたヒトの脳血流量や脳血液量、脳酸素消費量の測定は、臨床研究での病態診断・評価に重要な役割を担っている。本研究では、臨床 PET 研究で測定される脳内現象をさらに詳細にするため、動物を用いた脳の同測定部位における脳血流量や脳血液量、脳酸素消費量の変化を評価できる新たな光イメージングシステムを構築した。さらに、麻酔の影響のない高精度な測定データを得るために、これまでに確立されている覚醒マウスを用いた実験系を組み込んで計測を行った。高速 CCD カメラを用いたレーザースペックルイメージング (LSI) による脳血流量と内因性信号イメージングによる脳血液量の同時測定は、先行研究で明らかにされているレーザードップラー血流計による脳血流と赤血球濃度の結果とよく一致した。フラビン蛋白蛍光イメージングによる酸素代謝と LSI による脳血流量の関係はヒトの PET 研究で得られた結果ともよく一致した。新規光イメージングシステムで得られた脳血流、脳血液量、および酸素代謝は、これまでに得られた研究結果と一致しており、病態疾患を解明するための基礎研究に有効であることが示された。

論文審査の結果の要旨

動物の多くは、生命活動に必要なエネルギーを得るため、ミトコンドリアにおいて好気性代謝を行い、絶えず酸素を消費している。酸素の一部は、その代謝過程において反応性の高い活性酸素に変換される。発生した活性酸素は、非特異的な化学反応により細胞損

傷を誘発する。一方、生体外から侵入した微生物の排除や細胞内シグナル伝達に活性酸素が機能していることが明らかになっており、これらを応用した治療や創薬への期待が高まっている。本研究では、活性酸素が非連合学習である嗅覚順応に与える影響を明らかにする目的でモデル動物である線虫を用いて研究を展開した。関連して、脳における酸素供給と血流増加量のアンカップリングに関する課題の解決に向けた新規イメージングシステムの開発も行った。本研究では、以下に示すような注目すべき結果を得ている。

1. 活性酸素発生レベルの違いが線虫の嗅覚順応の持続時間に及ぼす影響について野生型線虫を用いて調査した結果、活性酸素発生レベルの違いが線虫における順応の持続に関与している可能性を見出した。そこで、ミトコンドリア電子伝達系に変異がある変異体個体を使用して解析を行った。その結果、活性酸素発生レベルの高さに比例した順応の持続時間の延長が観察された。抗酸化剤によって活性酸素レベルを低下させた線虫では、順応の持続時間の短縮が認められたことから、嗅覚順応の持続には活性酸素が重要な役割を担っていることを発見した。

2. 線虫の嗅覚順応獲得における活性酸素の影響について解析し、嗅覚順応の成立期間が活性酸素レベルに比例することを明らかにした。各種変異体を使用した実験や抗酸化剤を用いた実験でも、活性酸素の発生レベルが高いほど嗅覚順応の成立期間が延長しており、順応の成立期間に活性酸素が強く関与していることを明らかにした。過度な活性酸素の増加は生体内に悪影響をもたらすが、活性酸素の適度なバランスが学習の成立に重要であることを示唆している。

3. 覚醒マウス脳における脳血流量や脳血液量、脳酸素消費量の変化を同時に評価できる新たな光イメージングシステムの構築に成功した。脳血流量および脳血液量は、高速 CCD カメラを用いたレーザースペックルイメージングと内因性光計測法により、脳酸素消費量はフラビントパク質の蛍光イメージングにより計測している。新規イメージングシステムで得られた解析結果は、他の方法で得られた個別結果と一致しており、病態疾患を解明するための基礎研究への利用が期待できる。

線虫を用いた研究成果は、活性酸素が学習の持続や成立に関与していることを明らかにした初めての知見である。また、新規イメージングシステムの開発は、循環生理学分野における研究を飛躍的に進展させる可能性がある。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（学術）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Nishino,A, Kanno,R and Matsuura,T (2013) The role of oxygen intermediates in the retention time of diacetyl adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology* 319A:431-439