

記憶やLTPの形成に伴って構造変化を起こす遺伝子のクローニング

Differential cloning of rearranged DNA in the brain from discrimination learning performed rat

研究代表者 埼玉医科大学第一生理助手 池田正明
Research Associate, Department of Physiology, Saitama Medical School
Masaaki IKEDA

To investigate the possibility of DNA rearrangement in forming learning and memory, we applied a novel and highly efficient method which is termed IGCR (in-gel competitive reassociation) to clone altered DNA fragment in the brain from discrimination learning performed rat. The method is based on subtractive reassociation in gel between target DNA fragments and large excess of reference DNA fragments. After third round IGCR, the third round subtracted library was constructed and several clones were obtained. Southern blot hybridization is in progress to examine differential expression of these clones.

研究目的

記憶やLTPの形成過程では、脳内で様々なリン酸化酵素の活性化に伴う蛋白質のリン酸化や、*fos*, *jun*, *zif/268*などの *immediately early genes* の発現、RNAの生合成、蛋白新生などの様々な変化が起こること、またこの時、蛋白新生を阻害するとLTPの形成やLTP形成時のシナプスの形態変化が起こらなくなることが報告されており、蛋白合成がLTPの形成に重要であると考えられている。さらに最近ではLTP形成時に染色体DNAの *rearrangement* が起きていることを示唆する知見も得られている。学習・記憶やLTP形成過程で、蛋白の発現や神経細胞の形態的变化ばかりでなく、染色体DNAにも構造変化が起こり、転写の活性化調節や特異的な遺伝子の発現などを制御

し、この現象が中枢神経系に特有な機能の発現や、脳の可塑性に深く関与している可能性がある。そこで、本研究ではこの仮定を検討するため、*amplification* や *recombination* によるDNAの構造変化部位を直接クローニングすることを可能とするために開発された *In Gel Competitive Reassociation (IGCR)* 法を応用し、記憶・学習過程で特異的に構造変化する遺伝子をクローニングし、その機能を検討することを目的とする。

研究経過 (実験方法)

1. 弁別学習能を獲得したラットの作成
学習実験はスキナー箱を用いて行った。スキナー箱右前面に付けたランプの点灯時にレバーを押すと餌ペレットが提示され

(R+)、消灯時にレバーを押しても餌ペレットは提示されない (R-)課題をラットに課す弁別学習系を用いた。学習成績は正反応率 $[R+/(R+)+(R-)] \times 100$ で比較した。ラットは午前7時点灯、午後7時消灯の12時間明暗サイクル、室温25°Cの条件下で飼育した。ラットはフィッシャー系雄性を用い、12週齢時に30日間の弁別学習課題を開始した。

2.脳パンチアウト

ラットは弁別学習課題終了翌日午前10時にエーテル麻酔下で断頭し、脳は液体窒素下で急速に凍結し-80°Cで保存した。脳は先ず-20°Cのチェンバー内で脳マトリックスを用いて1mm厚の冠状断スライスとした。ラット脳図譜を参照し、10~14ゲージの注射針を用いて海馬を含む微小部位をパンチアウトし、左右それぞれ別にサンプルチューブに採取し-80°Cに保存した。

3.DNA抽出

パンチアウトした脳微小片は200 μ l lysing buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.65% NP40)を加えボルトテックスにより細胞質を溶解し、マイクロ遠心器15,000rpm, 4°Cにて5分間遠心し、細胞質はRNA抽出に用い、ペレットを200 μ l TE溶液に懸濁しRNase処理した。核はproteinase KおよびSDS存在下で37°C、15分間インキュベートし、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)で2回抽出した後、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で1回抽出し、エタノール沈澱を行なった。DNAはTEN溶液(50mM Tris-

HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 150mM NaCl)に溶解した。

4.IGCR

IGCRは Yokota らの方法¹⁾に従って行った。target DNAおよびreference DNAとして弁別学習課題終了ラット、コントロールラットそれぞれより抽出したDNAを用い、それぞれをMseIで消化した。フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールで抽出した後、クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出し、エタノール沈澱した後TE溶液に溶解した。target DNAはBiotin-dUTPをKlenow fragmentによって取り込ませ、またreference DNAは bacterial alkaline phosphataseによって脱リン酸化した。

0.1 μ g target DNAと10 μ g reference DNAを混合した後HydroLink gelで電気泳動を行った。泳動後0.3~1KbのDNA fragmentをdenature 溶液(0.5M NaOH, 0.6M NaCl, 10% w/v PEG 8000)に30分間、2回、室温で処理し、次にreassociation 溶液(50% v/v formamide, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.8, 1M NaCl, 5mM EDTA, 10% w/v PEG 8000)で洗浄した後、reassociation溶液中で45°C、24時間インキュベートした。DNAはelectroelutionによって回収した。エタノール沈澱の後DNAはTE bufferに溶解した。得られたDNA fragmentにNotI siteのあるblunt endアダプターをライゲーションし、反応溶液の一部をストレプトアビジンでコートしたチューブに移しピオチンを含むDNAを回収した。このDNAを鋳型としてアダプターの配列を含むプライマーを用いてPCR

反応を行い、スピнкаラムとエタノール沈澱を用いてPCR産物を精製した。PCR産物はMseIで消化した後2回目のIGCRのtarget DNAとして用い、またNotIで消化したものはBluescript II KS-にライゲーションして subtracted library とした。

研究成果

IGCRは2種類のゲノムの間で或る制限酵素で切断される断片が異なる場合、それらの断片を濃縮することを可能にする新しい手法である^{1),3)}。この方法は特定のプローブを用いることなく構造変化のあるゲノムをクローニングすることが可能であることに特色がある。脳のゲノムの構造変化に関してはトランスジェニックマウスを用いて recombination を証明しようとした試み²⁾があるが、直接 recombination などのゲノムの rearrangement を検索しようとする報告はない。

本研究では特に記憶学習形成過程でゲノムの rearrangement の有無を検索しようとする試みである。

今回解析に用いた弁別学習を行ったラットの学習成績が図1である。正反応率は30日の課題終了時に約80%であった。この弁別学習を行ったラット脳よりDNAを抽出しIGCRに用いた。IGCRはYokotaらの方法に従って行い、reference DNAとして弁別学習課題を課さないラットのパンチアウトした脳切片より抽出したDNAをプールしたものを、target DNAとして学習課題を終了したラット海馬より抽出したDNAを用

いた。

3サイクルのIGCRを行い subtracted library を得た。現在この library から30個のクローンをピックアップし発現状態をサザンブロットにより検討している。

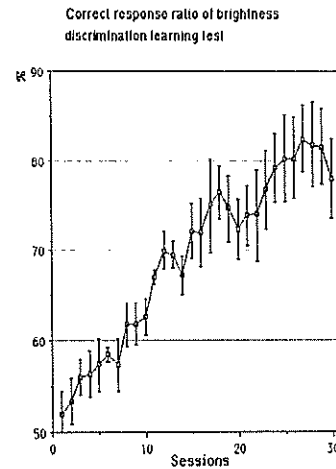


図1 スキナー箱にあるランプの光が、ONおよびOFFの状態を弁別させる学習課題を行った正反応率

今後の課題と発展

今回は海馬より抽出したDNAをIGCRに用いた。得られたクローンの発現状態を学習課題達成の有無による相違を検討中である。発現の相違がみられるクローンに関して genomic library より全長のクローニングを行う予定である。

脳のゲノムの rearrangement は起こるのか、起こるとすればどのような部位で起こるのか、起こると仮定したときどのような脳内変化(刺激)が必要なのか、あるいはどのような脳内変化に伴って起こるのか等の疑問に対して明確な回答はない。得られたクローンの詳細な検討によりこれらの疑問に

答えられることを期待したい。

本研究中、ラット学習実験は、埼玉医科大学第一生理 野村正彦教授の指導のもとに、堀 耕治博士と共同で行われたものである。

文献

- 1) Yokota, H. et al. (1994). A Differential cloning procedure of complex genomic DNA fragments. *Anal. Biochem.* 219, 131-138.
- 2) Matsuoka, M. et al. (1991). Detection of somatic DNA recombination in the transgenic mouse brain. *Science* 254, 81-86
- 3) Lisitsyn, N. et al. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259,946-951.