

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19371

研究課題名（和文）投射経路特異的遺伝子発現法により解明する運動学習の神経基盤

研究課題名（英文）Revelation of the neuronal mechanism of motor learning using the methods to express genes in particular neuronal pathways

研究代表者

正水 芳人（Masamizu, Yoshito）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：90608530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々の目標は、投射経路特異的遺伝子発現法によって、運動学習の神経基盤を解明することである。我々は様々なセロタイプのアデノ随伴ウイルスを、げっ歯類および霊長類の脳に注入し、感染様式を調べた。我々は、一部のアデノ随伴ウイルスが、順行性経シナプス伝播することを明らかにした。将来、この感染様式を利用し、経路特異的に遺伝子発現させることによって、運動学習の神経基盤解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、げっ歯類および霊長類の脳に経路特異的に遺伝子発現させる方法を開発した。この方法を用いて、様々な精神・疾患モデルの脳に蛍光カルシウムセンサーを発現させて、顕微鏡下で脳の活動を計測することによって、疾患における神経ネットワーク変容の理解に役立てることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Our goal is to reveal the neuronal mechanism of motor learning using the methods to express genes in particular neuronal pathways. We investigated infection patterns of several types of adeno-associated viruses (AAV) in rodent and primate brains. We revealed that AAV exhibited anterograde transsynaptic spread properties. In the future, we would like to reveal the neuronal mechanism of motor learning using pathway-specific manners through their neuronal tropisms and infection patterns.

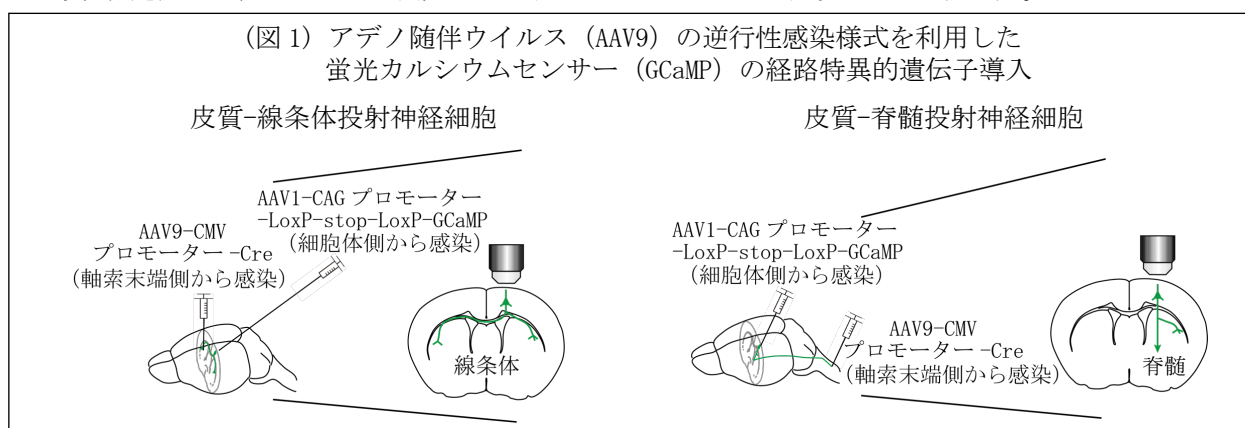
研究分野：神経科学

キーワード：in vivo カルシウムイメージング 運動学習 アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は、哺乳類のみに存在する大脳の表面を覆う領域で、多くの認知機能に関わる。6層構造からなる大脳新皮質は、各層の神経細胞が異なる入出力を持ち、学習・記憶が関与する認知課題をおこなう際には、様々な脳領域とネットワークを形成し、情報処理をおこなう。

これまでの研究で我々は、げっ歯類マウスが報酬をとる運動学習課題実行時・大脳新皮質運動野で *in vivo* 2光子カルシウムイメージングをおこない、運動学習の記憶が運動野第5層・皮質-線条体投射神経細胞に蓄えられることを明らかにした (Masamizu[#], Tanaka[#] *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2014, [#] co-first authors)。この研究で我々は、投射経路特異的に遺伝子発現させるために、アデノ随伴ウイルスのセロタイプ9 (AAV9) が軸索末端から逆行性に感染する様式を利用した遺伝子導入法 (Masamizu *et al.*, *Neuroscience*, 2011) を用いた。この方法で、反対側の線条体に投射している皮質-線条体投射神経細胞、もしくは脊髄に投射している皮質-脊髄投射神経細胞のみに蛍光カルシウムセンサー-GCaMP を発現させた (図1)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、アデノ随伴ウイルスの様々な特性を利用した経路特異的遺伝子発現法を開発し、げっ歯類のマウスおよび小型霊長類のコモンマーセットに応用し、運動学習の神経基盤を解明することである。

3. 研究の方法

頭部固定状態のげっ歯類 (マウス) および霊長類 (マーモセット) で *in vivo* イメージング、切片での組織染色によって、アデノ随伴ウイルスの感染様式を調べた。

4. 研究成果

最近、アデノ随伴ウイルスのセロタイプ1 (AAV1) が効率的に順行性経シナプス伝播することが明らかにされた (Zingg *et al.*, *Neuron*, 2017)。しかし、原因は不明だが、AAV1 では、Cre は効率的に順行性経シナプス伝播するが、GFP や GCaMP は移行しなかった。我々は、アデノ随伴ウイルスのセロタイプ9 (AAV9) では、Cre だけでなく、GFP や GCaMP でも順行性経シナプス伝播することを明らかにした。また、げっ歯類で効率的に軸索末端から感染することが知られている AAV2-retro (Tervo *et al.*, *Neuron*, 2016) が、マーモセットにも応用可能であることを明らかにした。

これらの技術をマーモセットに応用し、投射経路特異的に蛍光カルシウムセンサーを遺伝子発現させて *in vivo* 2光子カルシウムによって、運動学習の神経基盤運動学習過程の神経基盤を解明するためには、頭部と胴体を固定した状態で運動課題をおこなわせる必要があった。従来のアクリル板による固定方法では、コモンマーモセットがストレスを感じて行動課題をおこなわなかった。このため、これまで用いられていた頭部と胴体を固定する装置の胴体部分を改良し、ストレスを低減させるためにジャケットを着させて胴体を拘束する方法に変更した。

さらに、頭部固定状態前におこなう訓練方法を確立した (Ebina[#], Masamizu[#] *et al.*, *Nature Communications*, 2018, [#] co-first authors)。コモンマーモセットは、一度、嫌な記憶ができてしまうと、その記憶が長期間維持され、訓練をおこなわなくなってしまうため、徐々に難易度を上げていく段階を踏んだ訓練が重要である。以下に頭部固定状態前の訓練方法と注意点を説明する。

(1) 胴体拘束に対する馴化

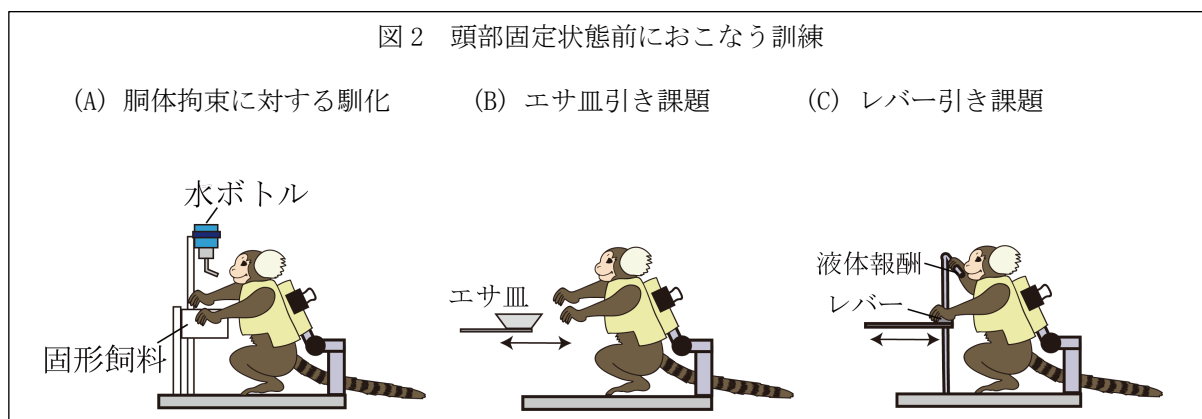
頭部固定はおこなわず、ジャケットによる胴体拘束のみで、固形のエサと水を飲める状況で馴化する (図 2A)。注意点として、コモンマーモセットが胴体拘束を嫌がる場合、エサを固形飼料からマシュマロ等の指向性が高い食べ物に変更した方が良い。それでも嫌がる場合は、長期間の拘束はせず、早めにケージに戻すべきである。

(2) エサ皿引き課題

エサが置いてある皿を、コモンマーモセットが手で引くと、エサを得ることができる課題を学習させる (図 2B)。次に、エサが置いてない皿を手で引くと、実験者からエサを得ることができる課題を学習させる。注意点として、皿はコモンマーモセットの手が届く範囲でなるべく遠くに置いた方がいい。この状況で、コモンマーモセットは、皿を引いたら報酬を得ることができることを学習する。

(3) レバー引き課題

レバーを手で引くと、ノズルから液体報酬 (ジュース) を得ることができる課題を学習させる (図 2C)。注意点として、コモンマーモセットが集中して課題をおこない、頭部をあまり動かさなくなるまで、ポール引き課題の訓練をおこなった方がいい。そうでないと、頭部固定状態で課題をおこなうことが難しい。



今後、この訓練方法と経路特異的遺伝子導入を組み合わせ、運動学習の神経基盤解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ebina Teppei, Obara Keitaro, Watakabe Akiya, Masamizu Yoshito, Terada Shin-Ichiro, Matoba Ryota, Takaji Masafumi, Hatanaka Nobuhiko, Nambu Atsushi, Mizukami Hiroaki, Yamamori Tetsuo, Matsuzaki Masanori	4. 巻 116
2. 論文標題 Arm movements induced by noninvasive optogenetic stimulation of the motor cortex in the common marmoset	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 22844 ~ 22850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1903445116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 構成的アプローチによって脳の情報処理機構を解明するための基盤技術開発
3. 学会等名 行動の多様性を支える神経基盤とその動作様式の解明
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 Two-photon calcium imaging in the motor cortex of common marmosets during upper-limb movement tasks
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 Two-photon calcium imaging in the motor cortex of non-human primates during movement task
3. 学会等名 The 9th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 正水 芳人(担当:分担執筆, 範囲:霊長類脳のin vivo 2光子カルシウムイメージング)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 クバプロ	5. 総ページ数 20
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー 2020	

1. 著者名 正水 芳人、松崎 政紀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 6
3. 書名 マーモセットラボマニュアル、6.2 2光子顕微鏡を用いた脳のin vivoカルシウムイメージング	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------