

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月22日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700367

研究課題名（和文） レンチウイルスベクターによる視床大脳皮質シナプス結合の定量的解析

研究課題名（英文） Quantitative analysis of reciprocal connection between the thalamus and neocortex by using lentiviral vectors

研究代表者

日置 寛之 (HIOKI HIROYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00402850

研究成果の概要（和文）：

二種のタンパクを神経細胞特異的に共発現するレンチウイルスベクターの開発に着手した。先行研究で開発した「Double Lentiviral Vector Tet-Off Platform (Hioki et al., 2009)」を用い、Tet 応答性双方向性プロモーター (TREB)、脳心筋炎ウイルス由来の internal ribosomal entry site (IRES)、手足口病由来の 2A シグナルの 3 種を比較した。成体ラットによる発現解析で、Tet-Off システムを用いた共発現系には、2A シグナルが適していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

By using “Double Lentiviral Vector Tet-Off Platform (Hioki et al., 2009),” we developed dual expression system with bidirectional TRE-tight promoter (TREB), internal ribosomal entry site (IRES) derived from encephalomyocarditis virus or 2A sequence of foot and mouth disease virus. We compared the expression level of transgenes in vivo, and revealed that 2A sequence was suitable for dual expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は外界から絶えず様々な刺激入力を受けながら、認知・思考・記憶・感情といった高次機能を実現している。外界からの刺激は元来予測不能なものであり、そのような非平衡開放系に置かれた中枢神経系が、どのような戦略（情報処理システム）を採用しているかについては謎のままである。高次

機能を実現する素子・構成単位として、神経細胞を想定することは妥当であろう。しかし神経細胞一つ当たりの情報処理速度は高々 1KHz 程度であることから、神経細胞から構成されるネットワークにこそ、高次機能を生み出す原理があると考えられる。高次機能を実現する場として、大脳新皮質が一番重要であることは多くの研究者の意見が一致する

所であるが、視床の重要性も再認識され始めている。視床は皮質下からの情報を中継するだけの部位と考えられることが多いが、視床の活動性は覚醒状態・個体が置かれた環境によって変化し (McCormic et al., 1997; Steriade et al., 2000)、大脳新皮質からのフィードバック入力を介すことで、視床の活動が各種感覚情報の統合・個体の行動発現に関与しているとの研究報告もある (Jones, 2002; Alitto and Usrey, 2003; Temereanca and Simons, 2004)。そこで申請者らは視床皮質相互結合のうち、まずは視床皮質投射の包括的理解を目指し (領野・層構造への入力特性解析)、遺伝子改変シンドビスウイルスを用いて、単一視床神経細胞の投射様式について解析を進めてき (Kuramoto et al., 2009)。このシンドビスウイルスを用いる方法は、単一神経細胞の投射様式を解析するツールとしては非常に有用であるが (Kuramoto et al., 2009; Matsuda et al., 2009)、出力先の神経細胞種・数が解析出来ないという欠点があった。そこで本研究課題では、経シナプス順行性・逆行性トレーサタンパクを発現するレンチウイルスを開発・利用し、視床皮質神経回路におけるシナプス結合特性を単一神経細胞レベルで解析することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究課題では、経シナプス順行性・逆行性トレーサタンパクを発現するレンチウイルスを開発・利用し、視床皮質神経回路におけるシナプス結合特性を単一神経細胞レベルで解析することを目的とする。具体的には以下の通りである。

(A) 単一視床神経細胞が出力する皮質神経細胞の可視化 (*thalamocortical divergence*)

シナプスを介して順行性に輸送されるトレーサタンパクを用い、単一視床神経細胞が出力する皮質神経細胞を可視化する。経シナプストレーサタンパクには wheat germ agglutinin (WGA; Yoshihara et al., 1999) を用い、GFP を共発現するレンチウイルスを作成する。ウイルスに感染した細胞は GFP により標識され、その感染細胞が出力する細胞群は WGA により可視化される。その後、単一視床神経細胞が出力する皮質神経細胞種・数の定量的解析を行う。

(B) 単一皮質神経細胞に入力する視床神経細胞の可視化 (*thalamocortical convergence*)

シナプスを介して逆行性に輸送されるトレーサタンパクを用い、単一皮質神経細胞に入力する視床神経細胞群を可視化する。経シナプストレーサタンパクには tetanus toxin C fragment (TTC) と GFP を融合さ

せた GFP-TTC (Maskos et al., 2002) を用いる。RFP (赤色蛍光タンパク) を共発現するレンチウイルスを作成・使用することで、ウイルス感染細胞を RFP によって標識し、感染細胞に入力する細胞群を GFP-TTC によって可視化する。その後、単一皮質神経細胞がどれだけの視床神経細胞から入力を受けているかを定量的に解析する。また、TTC がシナプス前ニューロンに取り込まれた後、シナプス前ニューロンにてレポータータンパク等の発現を誘導する『molecular switch』の開発も視野に入れながら研究を進める。

3. 研究の方法

本研究課題では、視床皮質シナプス結合特性を単一神経細胞レベルで解析する目的で、(1) 経シナプストレーサタンパク (WGA もしくは GFP-TTC) とマーカータンパク (GFP もしくは RFP) を共発現するレンチウイルスベクターの作成、(2) 経シナプストレーサタンパク検出系の最適化を行う。特に、(1) 共発現型レンチウイルスの開発に力を入れて研究を進めた。

本研究で用いるレンチウイルスは HIV-1 由来であるが、長期発現が可能という利点はあるものの、発現量が他のウイルスベクターに比べて低いという欠点があった。そこで、神経細胞特異的かつ高発現型レンチウイルスの開発を行った (Hioki et al., 2007, 2009)。神経細胞特異的プロモーター (SYN プロモーター) の制御下で GFP を発現させた場合、ウイルス注入から一週間程度では GFP の蛍光輝度は非常に弱く、免疫染色法が必須となる。一方、SYN プロモーター下でテトラサイクリン調節性トランス活性化因子 (tTA: Tet-Off) を神経細胞特異的に発現させ、Tet 応答性プロモーター (TRE) 下で GFP を発現させると、その蛍光輝度は 40 倍程度まで増大した。8 週間に渡って GFP の発現を観察したが、神経細胞特異性に変化はなく、また細胞傷害性も認められなかった。よって本研究課題のように、目的遺伝子 (TTC や WGA) の強発現を必要とする実験系には、有用なツールであると言えよう。

この Tet-Off システムを用い、2 種の遺伝子を効率的に共発現するレンチウイルスの開発・検討を、成体ラット線条体にて行った。

4. 研究成果

Tet 応答性双方向性プロモーター (TREB) 下で GFP と mCherry を発現させた場合、両者の発現量は感染細胞間でバラツキが非常に大きかった。脳心筋炎ウイルス由来の internal ribosomal entry site (IRES) を用いた場合、発現量のバラツキは少なかったも

の、IRES 下流遺伝子の発現量が 20 分の 1 程度にまで低下した。手足口病由来の 2A シグナルを用いた場合、GFP・mCherry 共に強い発現を示した。よって現時点では 2A シグナルが共発現に最も適していると考えられる。

また、TRE プロモーター下で WGA もしくは TTC を単独発現するレンチウイルスを作成し、ラット線条体にて検出法の検討を行った。

(1) WGA の検出について

ウイルス注入から一週間後、注入部位では WGA に対する非常に弱い免疫活性が認められただけであった。そこで WGA の産生量増加を期待し、哺乳類細胞にコドン最適化した人工遺伝子を合成した。また、抗 WGA ウサギ・モルモット抗体を自身で作成・精製を行った。さらに高感度増感法 (PAP 法→TSA 法→ABC 法の組み合わせ) を利用した結果、WGA に対する免疫活性は注入部位である線条体だけでなく、シナプス後ニューロンが位置する淡層球外節でも認められた。この予備実験により、レンチウイルスを用いた系でも WGA が経シナプス逆行性輸送されることが確認出来たが、蛍光多重染色への応用を視野にいれ、より高感度に可視化する検出方法を検討する。

(2) TTC の検出について

TRE プロモーター下で GFP-TTC を発現するレンチウイルスを作成し、ラット線条体にて検討を行った。ウイルス注入から一週間後、注入部位では GFP に対し非常に強い免疫活性が認められた。一方、線条体入力源の一つである大脳皮質においては、通常の ABC 法では GFP に対する免疫活性を検出することが出来なかった。TTC は exocytosis によってシナプス間隙に放出された後、endocytosis によってシナプス前ニューロンに取り込まれる。その後 TTC は酸性下の小胞内に存在しながら、細胞体へと逆行性輸送される。ここで問題となるのが、酸による GFP の変性である。そこで変性 GFP に対する抗体 (Nakamura et al., 2008) を使い、高感度増感法 (PAP 法→TSA 法→ABC 法の組み合わせ) を利用することで、GFP に対する免疫活性を大脳皮質第 V 層に認めるが出来た。この予備実験により、本研究課題で使用する GFP-TTC が、レンチウイルスを用いた系でも確かに経シナプス逆行性輸送されることが確認出来たが、シナプス前ニューロンをより高感度に可視化する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

以下、全て査読有り。

【1】 Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka Y, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, *Kaneko T. A Morphological Analysis of Thalamocortical Axon Fibers of Rat Posterior Thalamic Nuclei: A Single Neuron Tracing Study with Viral Vectors. *Cereb Cortex*. in press.
DOI: 10.1093/cercor/bhr356

【2】 Li Z, Ge S, Zhang F, Zhang T, Mizuno N, Hioki H, Kaneko T, *Gao G, *Li J. Distribution of Gephyrin-Immunoreactivity in the Trigeminal Motor Nucleus: An Immunohistochemical Study in Rats. *Anat. Rec.* 295(4), 641-651 (2012).
DOI: 10.1002/ar.22426

【3】 Kameda H, Hioki H, Tanaka YH, Tanaka T, Sohn J, Sonomura T, Furuta T, Fujiyama F, *Kaneko T. Parvalbumin-producing cortical interneurons receive inhibitory inputs on proximal portions and cortical excitatory inputs on distal dendrites. *Eur. J. Neurosci.* 35(6), 838-854 (2012).
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08027.x

【4】 Ma YF, *Hioki H, Konno M, Pan SX, Nakamura H, Nakamura KC, Furuta T, Li J-L, Kaneko T. Expression of Gap Junction Protein Connexin36 in Multiple Subtypes of GABAergic Neurons in Adult Rat Somatosensory Cortex. *Cereb Cortex*. 21(11), 2539-2549 (2011).
DOI: 10.1093/cercor/bhr051

【5】 Kuramoto E, Fujiyama F, Nakamura KC, Tanaka Y, Hioki H, *Kaneko T. Complementary distribution of glutamatergic cerebellar and GABAergic basal ganglia afferents to the rat motor thalamic nuclei. *Eur J Neurosci.* 33(1), 95-109 (2011).
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07481.x

【6】 Ge S-N, Ma Y-F, Hioki H, Wei Y-Y, Kaneko T, Mizuno N, *Li J-L, *Gao G-D. Co-expression of VGLUT1 and VGLUT2 in trigeminothalamic projection neurons in the principal sensory trigeminal nucleus. *J Comp Neurol.* 518(15), 3149-3168 (2010).
DOI: 10.1002/cne.22389

〔学会発表〕(計32件)

【1】田中康裕、田中康代、今野美知輝、藤山文乃、岡本-古田敬子、菌村貴弘、亀田浩司、日置寛之、古田貴寛、中村公一、金子武嗣
皮質視床投射神経細胞への皮質内入力に現れるサブカラム構造

第116回 日本解剖学会・全国学術集会
2011年3月28日 震災のため、紙上開催

【2】越水義登、古田貴寛、日置寛之、中村公一、藤山文乃、金子武嗣
ウイルスベクターを用いたラット単一視床下核ニューロンの形態学的解析

第116回 日本解剖学会・全国学術集会
2011年3月28日 震災のため、紙上開催

【3】大野幸、倉本恵梨子、藤山文乃、古田貴寛、日置寛之、田中康裕、菌村貴弘、梶山加綱、金子武嗣

視床後核群ニューロンの皮質投射：ウイルスベクターを用いた単一ニューロンの形態学的解析

第116回 日本解剖学会・全国学術集会
2011年3月28日 震災のため、紙上開催

【4】日置寛之、亀田浩司、今野美知輝、岡本慎一郎、鳥生直哉、藤山文乃、金子武嗣

BAC 遺伝子改変マウスを用いた、パルプアルブミン発現皮質神経細胞への抑制性入力の分類

2011年3月28日 震災のため、紙上開催

【5】大野幸、倉本恵梨子、藤山文乃、古田貴寛、日置寛之、田中康裕、菌村貴弘、梶山加綱、金子武嗣

組換えウイルストレースターによる単一細胞標識法を用いて、ラットの視床後核群ニューロンの軸索分布を解析する

第86回日本解剖学会 近畿支部学術集会
2010年11月27日 大阪府立大学

【6】Kuramoto E, Fujiyama F, Furuta T, Unzai T, Hioki H, Tanaka Y, Kaneko T.

Single-neuron tracing study of thalamocortical projections arising from the rat ventral medial nucleus by using viral vectors.

40th Society for Neuroscience Annual Meeting
2010年11月16日 San Diego

【7】Tanaka Y, Tanaka Y, Konno M, Fujiyama F, Okamoto-Furuta K, Sonomura T, Kameda H, Hioki H, Furuta T, Nakamura KC, Kaneko T.

Subcolumnar structures in local inputs of pyramidal neurons onto corticothalamic neurons in rat barrel cortex.

40th Society for Neuroscience Annual Meeting
2010年11月16日 San Diego

【8】Watakabe A, Takaji M, Nakagami Y, Hioki H, Kaneko T, Kato S, Koboyashi K, Kawashima T, Okuno H, Bito H, Kitamura Y, Yamamori T.
"TET-OFF" LENTIVIRAL VECTORS DRIVE HIGH-LEVEL TRANSGENE EXPRESSION IN MARMOSSET BRAINS.

40th Society for Neuroscience Annual Meeting
2010年11月16日 San Diego

【9】田中康裕、田中康代、今野美知輝、藤山文乃、岡本-古田敬子、菌村貴弘、亀田浩司、日置寛之、古田貴寛、中村公一、金子武嗣

皮質視床投射神経細胞への皮質内入力に現れるサブカラム構造

第33回日本神経科学大会

2010年9月2日 パシフィコ横浜

【10】篠原亮太、Dean Thumkeo、上條博史、金子奈穂子、澤本和延、日置寛之、金子武嗣、渡辺啓介、竹林浩秀、石崎敏理、古屋敷智之、成宮周

神経発生における Rho 標的分子 mDia の役割

第33回日本神経科学大会

2010年9月2日 パシフィコ横浜

【11】馬雲飛、日置寛之、今野美知輝、潘世秀、中村悠、中村公一、古田貴寛、李金蓮、金子武嗣

ラット第一次体性感覚野における connexin36 発現神経細胞の化学的解析

第33回日本神経科学大会

2010年9月2日 パシフィコ横浜

【12】日置寛之、亀田浩司、岡本慎一郎、今野美知輝、藤山文乃、金子武嗣

BAC 遺伝子改変マウスを用いた、パルプアルブミン発現皮質神経細胞への抑制性入力の分類

第33回日本神経科学大会

2010年9月2日 パシフィコ横浜

【13】大野幸、倉本恵梨子、藤山文乃、古田貴寛、日置寛之、田中康裕、菌村貴弘、梶山加綱、金子武嗣

組換えウイルストレースターによる単一細胞標識法を用いて、ラットの視床後核群ニューロンの軸索分布を解析する

第33回日本神経科学大会

2010年9月2日 パシフィコ横浜

【14】渡我部昭哉、高司雅史、仲神友貴、日置寛之、金子武嗣、加藤成樹、小林和人、川島尚之、奥野浩行、尾藤晴彦、北村義浩、山森哲雄

TET-OFF レンチウイルスベクターによるマーマセト脳への遺伝子導入

第33回日本神経科学大会

2010年9月2日 パシフィコ横浜

【15】今野美知輝、日置寛之、岡本慎一郎、亀田浩司、金子武嗣
大脳新皮質第 Va 層錐体細胞のゴルジ染色様標識：BAC 遺伝子改変動物の作製
第 33 回日本神経科学大会
2010 年 9 月 2 日 パシフィコ横浜

【16】越水義登、古田貴寛、日置寛之、中村公一、藤山文乃、金子武嗣
ウイルスベクターを用いたラット単一視床下核ニューロンの形態学的解析
第 33 回日本神経科学大会
2010 年 9 月 3 日 パシフィコ横浜

【17】倉本恵梨子、藤山文乃、古田貴寛、雲財知、日置寛之、田中康裕、金子武嗣
ラット視床内側腹側核ニューロンの軸索投射を単一ニューロンレベルで解析する
第 33 回日本神経科学大会
2010 年 9 月 3 日 パシフィコ横浜

【18】渡我部昭哉、高司雅史、仲神友貴、日置寛之、金子武嗣、加藤成樹、小林和人、川島尚之、奥野浩行、尾藤晴彦、北村義浩、山森哲雄
TET-OFF レンチウイルスベクターによるマーマセツ脳への遺伝子導入
第 16 回日本遺伝子治療学会
2010 年 6 月 1 日 栃木

【19】日置寛之 (招待講演)
神経解剖学におけるウイルスベクターの利用
日本顕微鏡学会 第 67 回学術講演会
2011/5/16 博多 福岡国際会議場

【20】浅井将、八幡直樹、北岡志保、高橋和利、浅香勲、日置寛之、金子武嗣、丸山敬、西道隆臣、中畑龍俊、朝田隆、山中伸弥、岩田修永、井上治久
iPS 細胞由来神経細胞における A β 産生とセクレターゼ阻害剤に対する応答
第 16 回日本病態プロテアーゼ学会
2011/8/26 豊中

【21】日置寛之、今野美知輝、岡本慎一郎、亀田浩司、倉本恵梨子、藤山文乃、金子武嗣
パルプアルブミン発現皮質神経細胞に対する、各種抑制性入力様式の免疫組織化学的検討
第 34 回日本神経科学学会
2011/9/17 横浜 パシフィコ横浜

【22】倉本恵梨子、大野幸、藤山文乃、古田貴寛、雲財知、日置寛之、田中康裕、金子武嗣
ラット視床内側腹側核ニューロンの軸索投射-シンドビスウイルスベクターを用いた単一ニューロンレベルでの解析
第 34 回日本神経科学学会
2011/9/17 横浜 パシフィコ横浜

【23】浅井将、八幡直樹、北岡志保、高橋和利、浅香勲、日置寛之、金子武嗣、丸山敬、西道隆臣、中畑龍俊、朝田隆、山中伸弥、岩田修永、井上治久
iPS 細胞由来神経細胞における A β 産生とセクレターゼ阻害剤に対する応答
第 84 回日本生化学会大会
2011/9/24 京都 国立京都国際会館

【24】豊田洋輔、篠原 亮太、Dean Thumkeo、上條博史、日置寛之、金子武嗣、石崎敏理、古屋敷智之、成宮周
mDia, a Rho effector and actin nucleator, is critical for growth cone retraction in ephrin-induced axonal repulsion.
第 54 回日本神経化学会
2011/9/26 石川県加賀市 瑠璃光

【25】倉本恵梨子、大野幸、藤山文乃、古田貴寛、雲財知、田中康裕、日置寛之、金子武嗣
ラット運動性視床核 VM の皮質投射：単一ニューロンの形態学的解析
第 87 回日本解剖学会・近畿支部学術集会
2011/12/3 兵庫医科大学西宮キャンパス

【26】日置寛之 (招待講演)
局所神経回路構造の解明
トランスジェニックラットを応用した脳科学研究の最先端
2011/12/5 東京大学医学部総合中央館

【27】Hioki H, Konno M, Okamoto S, Sohn J, Kameda H, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T
Cell-type specific inputs to somatic or dendritic compartment of PV-expressing neuron in mouse neocortex.
The 59th NIBB Conference "Neocortical Organization"
2012/3/12 岡崎カンファレンスセンター

【28】倉本恵梨子、藩世秀、古田貴寛、日置寛之、金子武嗣
Single-neuron tracing study of thalamocortical projections arising from the rat mediodorsal nucleus.
第 117 回日本解剖学会・全国学術集会
2012/3/26 甲府

【29】大野幸、倉本恵梨子、古田貴寛、日置寛之、田中康裕、藤山文乃、菌村貴弘、植村正憲、相山加綱、金子武嗣
A Morphological Analysis of Thalamocortical Axon Fibers of Rat Posterior Nuclei: A Single Neuron Tracing Study with Viral Vectors.
第 117 回日本解剖学会・全国学術集会
2012/3/27 甲府

【30】日置寛之、今野美知輝、岡本慎一郎、孫在隣、亀田浩司、倉本恵梨子、藤山文乃、金子武嗣

コレシストキニン発現皮質神経細胞からパルプアルブミン発現皮質神経細胞に対するシナプス入力様式

第117回日本解剖学会・全国学術集会

2012/3/27 甲府

【31】田中康裕、田中康代、今野美知輝、藤山文乃、菌村貴弘、岡本-古田敬子、亀田浩司、日置寛之、古田貴寛、中村公一、金子武嗣

皮質視床投射神経細胞への局所回路内興奮性入力

第117回日本解剖学会・全国学術集会

2012/3/28 甲府

【32】田中康裕、田中康代、今野美知輝、藤山文乃、菌村貴弘、岡本-古田敬子、亀田浩司、日置寛之、古田貴寛、中村公一、金子武嗣

皮質視床投射神経細胞への局所回路内興奮性入力

第89回日本生理学会大会

2012/3/30 松本

[その他]

ホームページ等

<http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日置 寛之 (HIOKI HIROYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00402850

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し