

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23650175
研究課題名（和文）
単一神経細胞が示す入出力特性の定量的解析に向けた、ウイルスベクターの開発
研究課題名（英文）
Development of a viral vector towards the quantitative analysis of the input-output characteristics which a single nerve cell shows.
研究代表者：金子 武嗣（KANEKO TAKESHI）
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90177519

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、経シナプス逆行性・順行性トレーサタンパクを発現するウイルスベクターを作成し、単一神経細胞に入力する・出力する神経細胞群を可視化し、その入出力特性を定量的に解析する方法論の開発を目指した。経シナプストレーサタンパクがシナプスを越えて運ばれた像を確認することは出来たが、高感度な検出法を用いてもシグナルは弱く、定量的解析は困難であった。検出法も含め、引き続き技術開発作業に取り組む必要がある。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we developed viral vectors, which express transsynaptic tracer protein, tetanus toxin C fragment (TTC) or wheat germ agglutinin (WGA). We then injected the viral vectors into the neocortex of the wild rats or Cre Tg mice, and observed the immunoreactivity for TTC or WGA. We could observe the transsynaptic transfer of TTC or WGA, but unfortunately the signal intensities were too weak to analyze the cell types and numbers even with high-sensitive detection method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学（1102A）

キーワード：1) レンチウイルス、2) アデノ随伴ウイルス、3) 神経細胞、
4) 局所神経回路、5) 定量的解析

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の作動原理を理解するためには、その構造的基盤である局所神経回路の知識が不可欠である。小脳皮質では従来のゴルジ染色法によって、局所回路のアウトラインを個々の神経細胞レベルで描くことに成功している。そして、小脳皮質の作動原理の仮説が提唱され、小脳機能の本質が理解されるに至っている。一方、特に大脳新皮質など他の脳部位については、旧来の解剖学的手法では局所回路の解明が困難であったことから、解析があまり進んでいない。本研究課題では、形態学的解析に遺伝子工学技術を積極的に取り入れることで、神経解剖学の新たな方法論の確立を模索するものである。

2. 研究の目的

中枢神経系の作動原理を理解するためには、その構造的基盤である局所神経回路の知識が必要不可欠である。本研究課題では、形態学的解析に遺伝子工学技術を積極的に取り入れ、神経解剖学の新たな方法論の確立を目指す。具体的には、次の二つの課題に取り組む。(A) 単一神経細胞への入力特性：Cre 存在下で経シナプス逆行性トレーサタンパクを発現するウイルスベクターを、Cre 発現遺伝子改変動物に注入し、単一神経細胞への入力特性を定量的に解析する方法論の開発。(B) 単一神経細胞からの出力特性：経シナプス順行性トレーサタンパクを発現するウイルスベクター・Cre 発現遺伝子改変動物を用い、単一神経細胞の出力特性を定量的に解析する方法論の開発。本研究課題を通じ、神経解剖学の新たな方向性・可能性を提示したい。

3. 研究の方法

本研究課題では、ウイルスベクターと Cre 発現遺伝子改変マウスを用い、単一神経細胞の入出力特性を定量的に記述する方法論の確立を目指す。遺伝子改変マウスについては、作出・入手済みのものを利用する。ウイルスベクターには、主に Lentivirus を用いるが、AAV2 も同時に進める予定である。(1) 共発現型ウイルスベクターの開発：神経細胞特異的・高発現型ウイルスベクターの開発に成功しており、双方向性プロモーターを用いることで、共発現を実現する。(2) 検出系の最適化：自作抗体の利用や各種シグナル増幅法を徹底的に検討し、現在よりも高感度かつ特異的な可視化法を確立する。(3) 経シナプストレーサタンパクの改変：エンドソーム中に局在する TTC を細胞質に移行する方法の開発 (endosomal escape)、および WGA に代わ

る経シナプス順行性トレーサタンパクの開発も同時に進める。

4. 研究成果

中枢神経系の作動原理を理解するためには、その構造的基盤である局所神経回路の知識が必要不可欠である。本研究課題は、形態学的解析に遺伝子工学技術を積極的に取り入れ、神経解剖学の新たな方法論の確立を目指すものである。具体的には、次の二つの課題に取り組んだ。(A) 単一神経細胞への入力特性：Cre 存在下で経シナプス逆行性トレーサタンパクを発現するウイルスベクター (Lentivirus, AAV2) を、Cre 発現遺伝子改変動物に注入し、単一神経細胞への入力特性を定量的に解析する方法論の開発。(B) 単一神経細胞からの出力特性：経シナプス順行性トレーサタンパクを発現するウイルスベクター、及び Cre 発現遺伝子改変動物を用い、単一神経細胞の出力特性を定量的に解析する方法論の開発。本研究課題を通じ、神経解剖学の新たな方向性・可能性を提示したいと考えている。

H24 年度は、前年度に開発したウイルスベクター (floxed) では下流遺伝子のリーク発現が認められたため、flex タイプを中心に研究開発を進めた。(A) 経シナプス逆行性トレーサタンパクがシナプスを越えて運ばれた像を確認することは出来たが、高感度な免疫染色を用いてもシグナルは弱く、定量的解析は困難であった。今後はウイルスベクターの改良や (さらに高発現)、さらに高感度な染色法を検討する必要があるであろう。(B) 線条体において検討を行った。抗体を自作するなど、経シナプス順行性トレーサタンパクがシナプスを越えて運ばれた像は確認できなかった。既に報

告・実績のある嗅覚系や小脳で検証実験を続ける予定である。

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 9 件)

①Kaneko T,
Local connections of excitatory neurons in motor-associated cortical areas of the rat. *Frontier in Neural Circuits*, 査読有, in press, DOI:10.3389/fncir.2013.00075

②Sonomura T, Furuta F, Nakatani I, Yamamoto Y, Unzai T, Matsuda W, Iwai h, Correlative analysis of immunoreactivity in confocal laserscanning microscopy and ion beam milling. *Frontiers in Neural Circuits*. 査読有, vol. 7, article 26, February 25, 2013 DOI:10.3389/fncir.2013.00026

③Ge S-N, Li Z-H, Tang J, Ma Y, Hioki H, Zhang T, Lu Y-C, Zhang F-X, Mizuno N, Li J-L. Differential expression of VGLUT1 or VGLUT2 in the trigeminothalamic or trigeminocerebellar projection neurons in the rat. *Brain Structure and Function*, 査読有, in press, 2013 DOI 10.1007/s00429-012-0495-1

④Koshimizu Y, Fujiyama F, Nakamura KC, Furuta T, Kaneko T. A quantitative analysis of axon bouton distribution of subthalamic nucleus neurons in the rat by vector. *The Journal of Comparative Neurology*, 査読有, vol. 521 (no. 9), pp. 2125-2146, June 15, 2013, DOI 10.1002/cne.23277

⑤Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T. Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *The Journal of Neuroscience*, 査読有, vol. 33 (no. 2), pp. 544-555, January 9, 2013, DOI:10.1523/JNEUROSCI.2255-12.2013

⑥Kameda 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. *European Journal of Neuroscience*, 査読有, vol. 35 (no. 6), pp. 834-854, March, 2012. DOI:10.1111/j.1460-9568.2012.08027.x

⑦Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. Morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: A single neuron tracing study with viral vectors. *Cerebral Cortex*, 査読有 vol. 22, pp. 2840-2857, December, 2012 DOI:10.1093/cercor/bhr356

⑧Tanaka YR, Tanaka YH, Konno M, Fujiyama F, Sonomura T, Okamoto-Furuta K, Kameda H, Hioki H, Furuta T, Nakamura KC, Kaneko T. Local connections of excitatory neurons to corticothalamic neurons in the rat barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, 査読有 vol. 31 (no. 50), pp. 18223-28236, Dec 14, 2011. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3139-11.2011

⑨Tanaka YH, Tanaka YR, Fujiyama F, Furuta T, Yanagawa Y, Kaneko T. Local connections of layer 5 GABAergic interneurons to corticospinal neurons. *Frontier in Neural Circuits*, 査読有 vol. 5, article 12, 29 September, 2011

[学会発表] (計 10 件)

①日置寛之、王濤、孫在隣、岡本慎一郎、亀田浩司、倉本恵梨子、藤山文乃、金子武嗣
Excitatory and Inhibitory Inputs to Parvalbumin-Expressing Interneurons in the Mouse Primary Motor Cortex
パルブアルブミン発現皮質神経細胞に対する興奮性・抑制性入力様式を定量的に解析する
第 118 回 日本解剖学会・全国学術集会
2013 年 3 月 28 日、高松

②倉本恵梨子、藩世秀、大野幸、田中康裕、雲財知、古田貴寛、日置寛之、中村公一、藤山文乃、金子武嗣
運動系視床皮質投射の神経回路
第 118 回 日本解剖学会・全国学術集会
2013 年 3 月 28 日、高松

③孫在隣、日置寛之、岡本慎一郎、金子武嗣
Preprodynorphin-producing interneurons
constitute a subpopulation of
somatostatin-positive neurons in the
mouse neocortex

大脳皮質ソマトスタチン陽性抑制性細胞の
一部はプレプロダイノルフィンを産生する
第 118 回 日本解剖学会・全国学術集会 2013
年 3 月 29 日、高松

④中村佳子、日置寛之、片岡直也、金子武嗣、
中村和弘 Optogenetic stimulation of
neurons in the preoptic area inhibits
metabolic heat production.

オプトジェネティクスを用いた視索前野ニ
ューロンの刺激による代謝性熱産生の抑制
第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27～
29 日 タワーホール船堀 東京

⑤Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H,
Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, T. Kaneko
T. Cell type-specific inhibitory inputs to
dendritic and somatic compartments of
parvalbumin-expressing neocortical
interneuron.

The 42nd Society for Neuroscience Annual
Meeting, October 13-17, 2012,
New Orleans, MI, USA.

⑥Sohn J, Hioki H, Okamoto S, Kaneko T.
Preprodynorphin-producing neocortical
interneurons constitute a subpopulation
of somatostatin-expressing neurons.
The 42nd Society for Neuroscience Annual
Meeting, October 13-17, 2012, New
Orleans, MI, USA.

⑦Nakamura K, Kataoka N, Hioki H, Kaneko,
T. Optogenetic stimulation of medullary
rapheprojecting axons of dorsomedial
hypothalamic neurons elicits thermo-
genic and cardiovascular responses.
Optogenetics and Pharmacogenetics in
Neuronal Function and Dysfunction
October 11, 2012, Hilton Riverside, New
Orleans, MI, USA.

⑧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 by using a
Sindbis viral vector.

ラット視床 MD 核から大脳皮質への軸索投射
を単一ニューロンレベルで形態解析する：シ
ンドビスウイルスベクターを用いて
第 35 回日本神経科学学会 (Neuro2012) 2012
年 9 月 18 日 名古屋国際会議場 名古屋

⑨ Mandy Siu Yu Lung, Hiroyuki Hioki,
Takeshi Kaneko
Activation of Catecholaminergic Nuclei in
the Brainstem of the Rat by Acute Sustained
Hypoxia.

第 35 回日本神経科学学会 (Neuro2012) 2012
年 9 月 18 日 名古屋国際会議場 名古屋

⑩豊田洋輔、篠原亮太、タムケオ ディーン
上條博史、西丸広史、日置寛之、金子武嗣、
石崎敏理、古屋敷智之、成宮周
The loss of mDia, a Rho effector and actin
nucleator, disrupts Ephrin-mediated axon
guidance, leading to defective left-right
limb alternation during locomotion.

第 35 回日本神経科学学会 (Neuro2012)
2012 年 9 月 21 日名古屋国際会議場 名古屋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

金子 武嗣 (KANEKO TAKESHI)

研究者番号：90177519

(2) 研究分担者

日置 寛之 (HIOKI HIROYUKI)

研究者番号：00402850

