

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 2 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：63905
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700419
 研究課題名（和文） 単一細胞にシナプス入力する神経回路と視覚機能を同時に可視化し解析する試み
 研究課題名（英文） Simultaneous visualization of visual responses and mono-synaptic circuits
 研究代表者
 森 琢磨（MORI TAKUMA）
 生理学研究所・生体情報研究系・助教
 研究者番号：70545798

研究成果の概要（和文）：糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスを開発し、それを用いて、大脳新皮質2/3層錐体細胞に直接シナプス結合するシナプス前細胞の可視化を行った。エレクトロポレーション法によってプラスミドを2 / 3 層錐体細胞へ導入されたマウスにシュードタイプされた糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスを注入した結果、2 / 3 層錐体細胞は、4 層神経細胞および5 層神経細胞からおもなシナプス入力を受けている事が明らかになった。さらに、神経細胞形態をゴルジ染色様に可視化できる本ウイルスベクターの特性を活かし、細胞形態の詳細な解析を行った。

研究成果の概要（英文）：I developed a new glycoprotein-deleted rabies virus based on a human vaccine strain, HEP-Flury. I visualized monosynaptic neuronal circuits of neocortical layer 2/3 pyramidal neurons using the virus. I electroporated plasmids into pyramidal cells in cortical layer 2/3 of mouse and injected EnvA-pseudotyped rabies virus. These neurons receive direct synaptic inputs from layers 2/3, 4 and 5. The virus enabled to observe the detail of the neuronal morphology. I analyzed the morphological characteristics of these presynaptic neurons.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

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

(1) 一次視覚野 2 / 3 層錐体細胞が、同じ方位選択性をもつ神経細胞からシナプス入力を受けるのか (図 1、灰色実線) それとも異なる方位選択性の神経細胞からもシナプス入力を受けるのか (図 1、黒色点線) そしてそのシナプス結合頻度は不明であった。

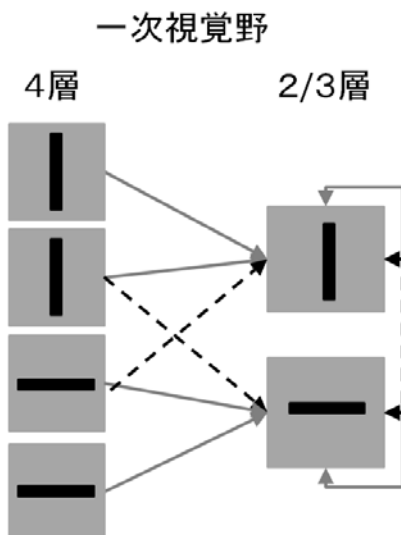


図 1 方位選択性形成に関わる神経回路

(2) 申請者らは、実際にシナプス結合する機能的神経回路を可視化することを、遺伝子改変狂犬病ウイルスを用いて、単一神経細胞に実際にシナプス結合するシナプス前細胞を可視化する、「機能的神経回路トレース法」を開発した。

2. 研究の目的

(1) より効率的な機能的神経回路トレース法を開発するために、狂犬病ウイルスベクタ

ーを改良する。

(2) 一次視覚野 2 / 3 層錐体細胞が構成する機能的神経回路を可視化するための遺伝子導入法を確立する。

(3) 一次視覚野 2 / 3 層錐体細胞に入力するシナプス前細胞の視覚反応特性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 弱毒化された狂犬病ウイルスヒトワクチン株、HEP-FLURY のゲノムをコードするプラスミドから糖タンパク質遺伝子を除き、GFP 遺伝子で置換し、培養細胞内でウイルスを作製した。

(2) より効率的なウイルス感染を可能にするために、異なる狂犬病ウイルス実験株に由来する糖タンパク質遺伝子を用い、それぞれの糖タンパク質を利用した状況でのウイルス粒子作製効率を比較した。

(3) 最も効率的なウイルス産生効率を示した糖タンパク質、SADcG を用いて、子宮内エレクトロポレーション法で 2 / 3 層錐体細胞にプラスミドを導入した。

(4) EnvA でシュードタイプされたウイルスを注入する事で、シナプス前細胞を可視化した。

(5) 可視化された細胞を蛍光顕微鏡で観察した。特に、樹状突起形態を解析し細胞サブタイプを分類する。

4. 研究成果

(1) 狂犬病ウイルスのRNA + 鎖ゲノムを産生させるために用いたプラスミドの5末端に位置するハンマーヘッド型リボザイム配列を変更する事で、産生効率を向上させた。

(2) 通常、神経細胞への感染効率が低いHEPFLURY株の糖タンパク質の代わりに、より神経親和性の高いSAD株由来の糖タンパク質SADcGを用いることで、より効率的な神経トレースを可能にした。

(3) 子宮内エレクトロポレーションで、TVA受容体、SADcG糖タンパク質を新皮質2/3層錐体細胞特異的に導入した(図2A)。そしてEnvAでシュードタイプされた狂犬病ウイルスを感染させる事で、2/3層錐体細胞に直接シナプス入力する神経細胞を可視化した(図2B)。狂犬病ウイルスがコードするGFPによってゴルジ染色様に可視化された神経細胞の樹状突起形態を解析した結果、5層にはスレンダータイプの錐体細胞が多く見られた。また、それら5層スレンダーサブタイプ錐体細胞は、2/3層の錐体細胞より空間的に広く分布していた。このことから、広範囲に分布する皮質領野投射型の錐体細胞が2/3層錐体細胞にシナプス入力する事が明らかになった。

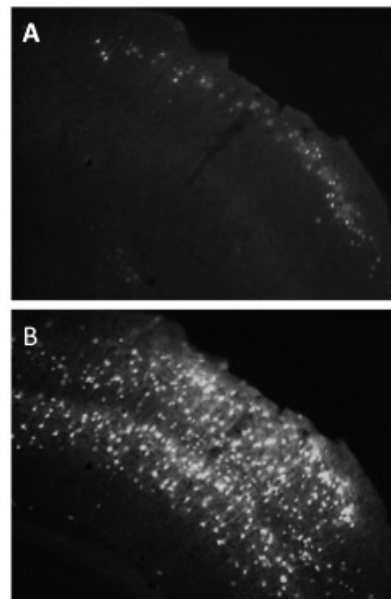


図2 A), 遺伝子導入された新皮質2/3層錐体細胞。B), A)にシナプス結合する神経細胞群。

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)

〔学会発表〕(計3件)

1 学会発表(ポスター、英語)

題名:異なる株に由来する狂犬病ウイルス糖タンパク質により糖タンパク質欠損型狂犬病ウイルス作成効率は影響を受ける。

発表者: 森 琢磨、吉村 由美子

第89回日本生理学会大会(2012年3月31日、松本)

2 招待講演(シンポジウム、日本語)

題名:遺伝子改変狂犬病ウイルスを用いた制限型逆行性越シナプストレー ス法とその応用。

発表者: 森 琢磨

第 1 1 4 回日本解剖学会学術集会(2 0 1 2
年 3 月 2 6 日、山梨)

3 招待講演(シンポジウム、日本語)

題名:単シナプス性神経回路を可視化する狂
犬病ウイルスベクター。

発表者: 森 琢磨

第 8 4 回日本生化学会大会、(2 0 1 1 年 9
月 2 1 日、京都)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森 琢磨 (MORI TAKUMA)

生理学研究所・生体情報研究系・助教

研究者番号 : 70545798

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者