

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20日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650064

研究課題名（和文） 脳機能解明に向けたソングバードの分子遺伝学的技術の改良

研究課題名（英文） Gene transfer techniques for study of songbird brain circuit

研究代表者

渡邊 大 (WATANABE DAI)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：90303817

研究成果の概要（和文）：

ソングバードをはじめ鳥類は、脳の発達と機能を研究するための魅力的なモデルである。従来、鳥類での遺伝子導入法としては、電気穿孔法やレトロウイルス（レンチウイルスを含む）が広く使われてきた。しかしながら、鳥類では神経細胞へ効率よくかつ選択的に遺伝子を発現させることは、いまだ困難である。本研究では、ソングバード胚での遺伝子操作の改良、新規ウイルスベクターの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

Avian species have provided an attractive model system to explore the development and function of brain circuits. Electroporation-mediated and retrovirus (including lentivirus) vector-mediated gene transfer techniques have so far widely been used for introducing genetic material into avian cells. However, it is still challenging to efficiently transduce avian postmitotic neurons without harming the cells. To overcome this problem, we searched a virus vector suitable for gene transfer into avian neurons, and characterize a novel recombinant virus vector, avian adeno-associated virus (A3V) vector.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：ソングバード

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする高等動物は、コミュニ

ティを形成し、他の個体と社会的に接触することで様々な能力を獲得する。しかしながら、その根底にある脳の発達プロセス、高次脳機

能発現について、その生物学的な基盤となるメカニズムは不明である。研究室の環境で飼育繁殖が容易なマウスなど従来の哺乳類モデル動物では、言語獲得や高度なスキル獲得に重要な模倣学習のようなプロセスを研究することが困難であることも一因である。このような観点から、ヒトの言語発達と良く似たプロセスにより音声コミュニケーションの能力を後天的に獲得する鳥類（ソングバード：鳴禽）は、新たなモデル動物として注目されている。ソングバードによる神経研究を遺伝子から行動レベルまで展開するには、ゲノムをはじめとするバイオインフォマティクスの整備と分子遺伝学的手法の確立が重要となる。2006年より米国ではゲノムプロジェクトが開始され、現在では完了しつつある。一方、遺伝子導入技術に関してはウイルスベクターを用いたトランスジェニック個体の作出についてはまだ緒についたばかりであり、さらに技術的制約を克服する必要がある。脳は、極めて多様な神経細胞から構成され、生後の発達の過程でダイナミックに変化する。したがって、その機能を明らかにするためには、組換え遺伝子の発現制御を正確に行うことが重要である。遺伝子組換え技術をソングバードの研究に適用するには、非常に多様な神経回路の中で特定の経路特異的な遺伝子発現をするような技術が必要であり、その開発が待たれている状況である。

2. 研究の目的

マウスでは、トランスジェニック動物個体にさらにウイルスベクターによる遺伝子導入を組み合わせるにより、中枢神経系での目的遺伝子の時間的・空間的な発現制御を行う手法が広く用いられている。一方鳥類の脳神経系では、哺乳類で用いられているこれらのウイルスベクターの感染効率等について未解明な点が多い。本研究では、ソングバードの脳での組換え遺伝子発現の時間的・空間的制御に適したウイルスベクターの探索を行う。すでに哺乳類で実績のあるレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター2型、に加えて鳥類より単離された新規アデノ随伴ウイルスベクターの3種類について、その遺伝子導入特性について比較を行う。

3. 研究の方法

(1) ウイルスベクターの作成：Rous sarcoma virus 由来のユビキタスなプロモーターおよびマーカー遺伝子 EGFP から構成される発現ユニット (RSV-EGFP) を含むレンチウイルスベクター (LV)、アデノ随伴ウイルス2型ベクター (AAV2) および鳥類より単離された新規アデノ随伴ウイルスベクター (A3V) の作

成を行った。

LV 粒子は、発現ユニットを含むプラスミド pLenti-RSV-EGFP-WPRE およびパッケージング等に必要の遺伝子をコードするプラスミド pMDL、pVSV-G、および pREV をリン酸カルシウム法により 293T 細胞へ遺伝子導入し、48 時間後に培地より Vivaspin と超遠心により濃縮回収した。ウイルス力価は one-step 定量的 real-time PCR により測定した。

AAV2 および A3V 粒子は、発現ユニットを含むプラスミド pAAV2-あるいは pA3V-RSV-EGFP-WPRE およびヘルパープラスミドを 293T 細胞へリン酸カルシウム法により遺伝子導入し、細胞体より回収した。iodixanol を用いた密度勾配遠心法により精製し、PBS 透析後に Vivaspin により濃縮精製を行った。ウイルス力価は定量的 real-time PCR により測定した。

(2) 細胞培養：ゼブラフィンチ (*Taeniopygia guttata*) およびニワトリ (*Gallus gallus*) の前脳の初代培養を行った。ゼブラフィンチについては生後 0-1 日のヒナの前脳を用い、ニワトリについては 7.5 日の胎児の前脳を用いた。30U/ml papain にて 30 分処理後、Neurobasal 培地にて分散培養を行った。

(3) ウイルス感染実験：ゼブラフィンチおよびニワトリ前脳細胞の初代培養、293T 細胞に対して各ウイルスを 10^3 genome copies (GC)/cell の割合で投与し、72 時間後の EGFP 発現について解析を行った。

4. 研究成果

LV、AAV2 および A3V の遺伝子導入特性の比較をゼブラフィンチとニワトリ由来の神経細胞と 293T 細胞を用いて比較検討を行った。各ウイルスベクターには、Rous sarcoma virus 由来のユビキタスなプロモーター下にマーカー遺伝子を発現するコンストラクトを用いた (図 1)。

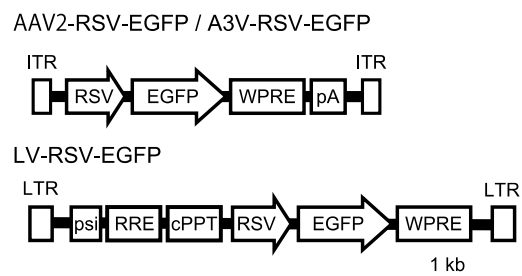


図 1

EGFP の発現強度と発現細胞頻度を指標に定量的に各ウイルスの遺伝子導入特性を解

析したところ、A3V が鳥類への神経細胞への遺伝子導入効率が高いことが明らかになった (図2)。これとは対照的に、哺乳類由来の AAV2 については、鳥類細胞でのマーカー遺伝子の発現がほとんど検出できなかった (図2)。本実験に用いた A3V と AAV2 の違いは、ウイルスゲノム両端の ITR (inverted terminal repeat) の塩基配列とカプセルを構成する cap タンパクのみである。したがって、このような種特異性は、これらの違いによって生じることを示している。

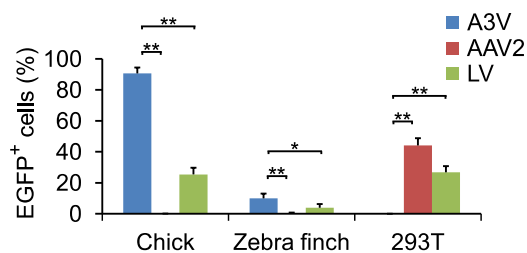


図2

一方 LV では、鳥類の神経細胞に対してもある程度の遺伝導入が観察された (図2)。ところで、前脳からの初代培養系には、神経細胞のみならず、アストロサイトなど非神経細胞も含まれている。さらに A3V と LV について、神経細胞への遺伝子導入効率を解析するために、神経細胞のマーカーである MAP2 の抗体により免疫蛍光標識実験を行った。その結果、A3V 投与による EGFP 陽性細胞は、ほぼすべてが MAP2 陽性であり、A3V が神経細胞選択的に遺伝子導入することを示している。一方、LV では EGFP 陽性細胞の約 3 割は非神経細胞であった (図3)。

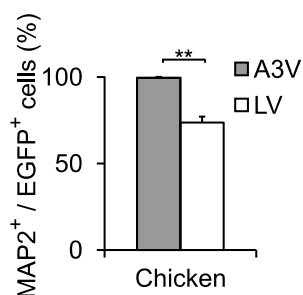


図3

以上の結果より、鳥類での神経細胞への遺伝子導入ウイルスベクターとして A3V が優れていると考えられた。鳥類由来のアデノ随伴ウイルスもすでに数種報告されており、ソングバードの脳でより効果的なウイルスベクターの開発も今後期待できると考えられる。

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 5 件)

① Murata K, Imai M, Nakanishi S, Watanabe D, Pastan I, et al. (2011) Compensation of depleted neuronal subsets by new neurons in a local area of the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 31: 10540–10557. 査読有.
doi:10.1523/JNEUROSCI.1285-11.2011.

② Fujimoto H, Hasegawa T, Watanabe D (2011) Neural coding of syntactic structure in learned vocalizations in the songbird. *J Neurosci* 31: 10023–10033. 査読有.
doi:10.1523/JNEUROSCI.1606-11.2011.

③ Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Uneo S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T (2011) miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci* 14: 1125–1134. 査読有.
doi:10.1038/nn.2897.

④ Abe K, Watanabe D (2011) Songbirds possess the spontaneous ability to discriminate syntactic rules. *Nat Neurosci* 14: 1067–1074. 査読有.
doi:10.1038/nn.2869.

⑤ Kaneda K, Kasahara H, Matsui R, Katoh T, Mizukami H, Ozawa K, Watanabe D, Isa T (2011) Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin. *PLoS ONE* 6: e18452. 査読有.
doi:10.1371/journal.pone.0018452.

[学会発表] (計 11 件)

① 脳の情報処理を 1 細胞の精度で調べる (ポスター)

Watanabe D.

第 4 回脳プロ公開シンポジウム (東京)

2/4/12

② Neural coding of syntax in learned vocalizations in the songbird. (ポスター)

Watanabe D., Fujimoto H.

Neuroscience 2011 (Washington D.C.)

11/13/11

③ Approach to neural circuit mechanism underlying natural learned behavior. (口頭)

Watanabe D.

第34回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜)
9/17/11

④ Disturbance of dexterous hand movement of macaque monkeys induced by the pathway-specific blockade of the signal transmission through the mid-cervical propriospinal neurons. (口頭)

Kinoshita M., Matsui R., Kato S., Kasahara H., Isa K., Nishimura Y., Watanabe D., Kobayashi K., Isa T.

第34回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜)
9/17/11

⑤ Efficient gene transfer into the chick brain using avian adeno-associated virus vector. (ポスター)

Matsui R., Watanabe D.

第34回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜)
9/17/11

⑥ Neural coding of syntactic structure in learned vocalizations in songbirds. (ポスター)

Fujimoto H., Watanabe D.

第34回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜)
9/15/11

⑦ Optogenetically induced suppression of neural activity in the macaque primary motor cortex.

木下正治、金田勝幸、笠原洋起、畑中伸彦、松井亮介、知見聡美、伊佐かおる、水上浩明、小澤敬也、渡辺大、南部篤、伊佐正

北米神経科学年会 (San Diego)

2010年11月12-16日

⑧ Pathway specific optical inhibition of retino-collicular transmission by halorhodopsin expressed with viral vectors in mice

金田勝幸、笠原洋紀、松井亮介、加藤智子、水上浩明、小澤敬也、渡辺大、伊佐正

北米神経科学年会 (San Diego)

2010年11月12-16日

⑨ マカクザル第一次運動野ニューロン活動の光遺伝学的抑制

木下正治、金田勝幸、笠原洋起、畑中伸彦、松井亮介、知見聡美、伊佐かおる、水上浩明、小澤敬也、渡辺大、南部篤、伊佐正

Neuro2010 (神戸)

2010年9月2-4日

⑩ ウイルスベクターを介したハロロドプシンの発現によるマウス網膜-上丘シナプス伝達の経路特異的抑制

金田勝幸、笠原洋紀、松井亮介、加藤智子、水上浩明、小澤敬也、渡辺大、伊佐正

Neuro2010 (神戸)

2010年9月2-4日

⑪ Expression of halorhodopsin for suppression of neuronal transmission in the central nervous system of the mouse and monkey with viral vectors

木下正治、金田勝幸、笠原洋起、畑中伸彦、松井亮介、知見聡美、伊佐かおる、水上浩明、小澤敬也、渡辺大、南部篤、伊佐正

日本遺伝子治療学会 (栃木)

2010年7月1-3日

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 大 (WATANABE DAI)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：90303817

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし