

自己評価報告書

平成23年4月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20220006

研究課題名（和文） 神経路選択的な活動抑制とトレーシングによる大脳ネットワークの構築と機能の解明

研究課題名（英文） Analyses of architecture and functions of cerebral networks by target neuron-selective activity suppression and tract-tracing approaches

研究代表者

高田 昌彦（TAKADA MASAHIKO）

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：00236233

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳基底核、大脳皮質、神経回路、行動制御、ウイルスベクター、狂犬病ウイルス、逆行性越シナプスのトレーシング、霊長類

1. 研究計画の概要

脳を構成する複雑かつ精緻な神経回路（ネットワーク）の枠組みを解明することは、それを基盤にして獲得される多様な脳機能をシステムの理解の上できわめて重要である。特に、高次脳機能の発現・制御機構を解明するためには、大脳を巡るネットワークの基本的構築、すなわち、大脳皮質領域における入出力様式や大脳皮質（特に前頭葉）と強い結合を有する大脳基底核における情報処理様式を解析し、その動作原理と機能的役割を知ることが本質的である。例えば、大脳基底核の入力部である線条体には、前頭葉を中心とする皮質領域と視床からグルタミン酸作動性入力、黒質からドーパミン作動性入力が入力するが、個々の入力が入力系にどのような役割を担っているかについては未だ不明な点が多い。

大脳皮質と大脳基底核を繋ぐ特定のネットワークあるいはそれを構成する特定のニューロン群が実際にどのような機能に関与しているかを明らかにするため、ターゲットニューロン選択的な不活化を行い、運動課題や認知課題を遂行中のサルにおける行動異常や課題に関連して応答するニューロン活動の電気生理学的変化を解析するシステムを確立することにより、大脳基底核における入力情報処理機構の解明を目指す。神経路選択的な活動抑制法によって同定された線条体ニューロンへの入力系を明らかにするため、組換え狂犬病ウイルスベクターを利用して、特定のニューロン群への多シナプス性入力を検出できる、神経路選択的なON制御型の逆行性越シナプスのトレーシングを実現するシステムの確立を目指す。さらに、それ

を発展させて、特定の神経路を選択的にマスクするOFF制御型の逆行性越シナプスのトレーシングシステムや、ON制御型トレーシングをmulti-colorで行うシステムを確立し、これらの先端技術と組み合わせることにより、線条体への入力ネットワークを機能解剖学的に検証する。

2. 研究の進捗状況

（1）神経路選択的な活動抑制法の確立と応用
細胞内導入用レセプター遺伝子としてヒトインターロイキンタイプ2受容体 α サブユニットを用いて、このタンパク質をターゲットとする抗体にテタヌトシキン軽鎖フラグメントを結合したタンパク質によりニューロン活動の不活化を誘導するシステムと、Tet-OnまたはOffシステムを利用してドキシサイクリン濃度依存的に特定のニューロン群にテタヌトシキン軽鎖フラグメントを発現させて、ニューロン活動の不活化を誘導するシステムを作製した。

（2）神経路選択的な逆行性越シナプスのトレーシングの実現と応用

特定の神経路を選択的にラベルするON制御型逆行性越シナプスのトレーシングシステムを確立するため、感染伝播能を欠損させた逆行性ウイルスベクターとして、ウイルスのエンベロープタンパクをコードする遺伝子であるG遺伝子をウイルスゲノムから欠損させた改変狂犬病ウイルスベクターを作製した。その際、ウイルス回収率が低く霊長類に適用する力価が容易に得られないことが問題となったが、逆行性感染型レンチウイルスベクターの開発の際に確立した濃縮・精製法を応用することにより、高力価のG遺伝

子欠損狂犬病ウイルスベクターの回収効率を向上させることに成功した。現在、この G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスベクターにマーカー遺伝子とともに Cre リコンビナーゼあるいはテトラサイクリン制御性トランス活性化因子を組み込んだベクターと、感染伝播制御用ベクターとして狂犬病ウイルスのゲノムの一部と G 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを共感染させることにより、特定の神経路において ON 制御型逆行性越シナプスのトレーシングが実現できることを検証するための実験を計画している。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

研究開始から 2 年目に当たる平成 21 年度初めに、研究代表者が東京都神経科学総合研究所から京都大学霊長類研究所に異動したことに伴い、新しい研究室の立ち上げと研究環境の整備、特に霊長類専用感染実験室の設置および稼働に多大な時間を要したため、神経路選択的活動抑制法と神経路選択的な逆行性越シナプスのトレーシングのいずれにおいても、当初は平成 21 年度～ 22 年度に予定していた、霊長類を用いた検証実験や応用実験の多くの部分を平成 23 年度以降に実施することになった。しかしながら、現在では本研究目的の達成に最適化した実験設備が導入され、作業効率が格段に向上している。また、平成 22 年度までに進めてきたベクター開発や狂犬病ウイルスを用いた基礎的研究がほぼ終了し、それぞれ発表段階に入っている。したがって、研究開始当初の予定どおり、研究期間が終了するまでの間にほぼ研究目的を達成できる見込みである。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 神経路選択的活動抑制法の確立と応用
平成 22 年度より認知過程を含む眼球運動課題および上肢運動課題の 2 種類の行動課題のトレーニングを行っているサルを用いて、テタヌストキシン軽鎖フラグメントの選択的導入による神経活動抑制が行動に及ぼす影響を解析する。これまでに得られている神経解剖学的研究の結果を踏まえ、眼球運動課題では前頭葉眼球運動関連領域（前頭眼野や補足眼野）からの出力系をターゲットとし、上肢運動課題では線条体および前頭前野領域（特に背外側部と背内側部）への入力系をターゲットとする。

(2) 神経路選択的な逆行性越シナプスのトレーシングの実現と応用

まず蛍光タンパク質を用いた越シナプスの多重トレーシング法を用いて、前頭葉眼球運動関連領域（前頭眼野や補足眼野）および前頭前野領域（特に背外側部と背内側部）へ

の多シナプス性入力様式を解析する。また、平成 23 年度前半には抗狂犬病ウイルス細胞内抗体を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、特定の神経路を選択的にマスクする OFF 制御型逆行性越シナプスのトレーシングシステムを霊長類において確立する。

5. 代表的な研究成果

(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 11 件)

- ① Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2011) Differential architecture of multisynaptic geniculo-cortical pathways to V4 and MT. Cereb Cortex, in press.
- ② Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K (2011) A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. Hum Gene Ther 22:197-206.
- ③ Saga M, Hirata Y, Takahara D, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E (2011) Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor area in macaques. Eur J Neurosci 33:285-297.

〔学会発表〕(計 50 件)

- ① 井上謙一、加藤成樹、高原大輔、遠藤 歩、奥田泰宏、小林憲太、小林和人、高田昌彦 逆行性感染型レンチウイルスベクターを用いた神経路選択的細胞操作法の開発、第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 4 日、神戸

〔図書〕(計 10 件)

- ① 高田昌彦、井上謙一、宮地重弘 (2010) 狂犬病ウイルスによる多シナプス性神経路の解析法. Brain and Nerve「特集 神経回路解析法の最近の進歩」、62:221-230.

〔その他〕

ホームページ

http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html