

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06878

研究課題名（和文）複数脳領域からの入力を統合する神経細胞を標識・操作・計測する技術の開発

研究課題名（英文）Viral method to label, manipulate, and measure neurons that integrate convergent synaptic inputs from multiple brain regions

研究代表者

北西 卓磨 (Kitanishi, Takuma)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：90722116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：多くの脳領域は、上流の複数の脳領域から入力を受けとる。こうした脳領域には、各上流領域から直接にシナプス入力を受ける神経細胞がしばしば存在し、これらの細胞は受けとった情報の統合に重要であると考えられる。本研究は、「げっ歯類の脳において、2領域から単シナプス入力を受ける神経細胞を選択的に標識・操作・計測するウイルスベクター技術」を開発した。具体的には、順行性経シナプス感染を示すAAV1と、2種類の組換え酵素Cre, Flpにより駆動されるCon/Fon遺伝子発現カセットとを組み合わせることで、上記技術を実現した (Kitanishi et al., Commun Biol, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳はさまざまな情報を統合することで、新たな情報を生成する。2領域から単シナプス入力を受ける神経細胞は、こうした情報の統合に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、これまで、こうした神経細胞に選択的に遺伝子を導入して細胞の機能を調べることはできなかった。本研究は、これを実現するウイルスベクター技術を確立した。この技術を用いることで、単シナプス入力を統合する神経細胞について、発火活動を計測したり、光操作をおこない周辺の神経活動や動物行動に与える影響を調べたりすることが可能になる。したがって、本研究において開発した技術は、脳内の情報統合の仕組みを解明するために有用な技術となる。

研究成果の概要（英文）：Most brain regions receive synaptic inputs from multiple upstream brain regions. Such brain regions often contain neurons that receive mono-synaptic inputs from each of the upstream areas, and thus these cells may play fundamental roles in integrating the received information. In this study, we developed a viral vector-based method to selectively label, manipulate, and measure neurons that receive convergent monosynaptic inputs from two upstream regions in the rodent brain. We established this method by combining an anterograde transsynaptic viral vector, AAV1, and Cre/Flp-dependent intersectional gene expression with a Con/Fon expression cassette (Kitanishi et al., Commun Biol, 2022).

研究分野：システム神経科学

キーワード：経シナプスウイルスベクター AAV1 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

脳は、多くの脳領域のあいだの情報伝達により機能を発揮する。一般に、個々の脳領域は複数の上流領域から情報を受けとり、これらの情報を統合する。こうした脳領域には、上流領域のそれぞれから単シナプス入力を受ける神経細胞（以下、情報統合細胞）が存在すると想定される。情報統合細胞は、複数領域からの情報を統合して処理するために重要な役割を果たすと予想される。ところが、これまで情報統合細胞を特異的に標識する手法は存在しなかった。そのため、多くの脳領域において、そもそも情報統合細胞がどれほど存在するのか、存在するならどのような機能を持つかは分かっていない。

情報の統合は、脳機能のほぼすべての側面にかかわる基礎的な演算といえる。情報統合細胞は、こうした脳の情報処理に普遍的に重要な役割を果たすと想定される。そのため情報統合細胞の役割を明らかにすることは、脳情報処理の理解に著しく貢献する。

2. 研究の目的

本研究は、情報統合細胞を標識する手法が存在しない現状を打破することを目的とした。すなわち、「2 領域から単シナプス入力を受ける神経細胞を選択的に標識・操作・計測する新たなウイルスベクター技術」を開発することを目的とした。

この技術は、アデノ随伴ウイルスベクター1 型による順行性経シナプス感染 (Zingg et al., *Neuron*, 2017) と、Cre と Flp による交差発現法 (Fenno et al., *Nature Methods*, 2014) とを、マウス脳において組み合わせることで実現する。これら両技術は、別個の研究の文脈で開発されてきたものであり、これまでに両技術を組合わせて用いた報告はなかった。これらの技術に、さらに、研究代表者が培ってきた *in vivo* 大規模活動計測 (Kitanishi et al., *Neuron*, 2015) と光遺伝学 (Kitanishi et al., *J Neurosci*, 2017) とを組み合わせることで、この新規手法を、有用性の高い技術へと発展させる。これにより、2 領域から直接にシナプス入力を受ける情報統合細胞について、微細形態の可視化や神経活動の光操作を実現する。また、本手法が、さまざまな神経経路に適用できる汎用性を持つことを実証する。

3. 研究の方法

マウス脳において「順行性経シナプス交差発現」を実現することで、複数脳領域からシナプス入力を受ける神経細胞を選択的に標識した。これには、下の2つの技術を組合わせた(図1)。

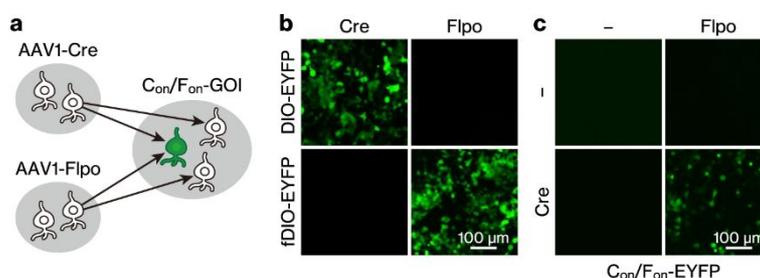


図1 実験系 (a) 順行性経シナプス交差発現の概念図。(b, c) Cre, Flp, Con/Fon カセットによる遺伝子発現の確認。Kitanishi et al., *Commun. Biol.*, 2022 より。

(1) 順行性経シナプス感染：アデノ随伴ウイルスベクター1 型 (AAV1) は、感染細胞の軸索終末から後シナプス細胞へと、順行性にわずかにシナプスを超えて伝搬する (Zingg et al., 2017)。そこで、上流脳領域に AAV1-Cre を、下流領域には Cre 依存的に蛍光タンパク質を発現する AAV を、それぞれ導入することで、下流領域のなかで上流領域から単シナプス入力を受ける細胞のみを標識できる。

(2) 交差発現：交差発現とは、部位特異的組換え酵素 Cre, Flp や転写活性化因子 tTA などの遺伝子発現のドライバーが、特定の組み合わせで複数導入された際にのみ目的遺伝子の発現を誘導する発現制御系である。Cre, Flp の両方が存在する場合に発現する Con/Fon カセット (Fenno

et al., 2014) や、Cre, Flp, tTA の 3 者がそろった場合にはじめて発現する TRE-FSF-FLEX カセット (Madisen et a., 2015) による交差発現ができる。

上記の両技術を組み合わせて、本研究の「順行性経シナプス交差発現」を実現した。具体的手順を以下に記す。まず、2 つの上流領域に AAV1 に搭載した Cre, Flp をそれぞれ導入した。すると、順行性経シナプス感染により、Cre と Flp がそれぞれ 1 シナプス下流の細胞集団に発現した。ここで、下流の領域には、Cre と Flp が同時に存在する場合に目的遺伝子 (蛍光タンパク質など) を発現する Con/Fon 交差発現カセットを導入しておいた。これにより、上流 2 領域の両方から単シナプス入力を受け、Cre と Flp の両方が存在する情報統合細胞のみに目的遺伝子を発現させた。

4 . 研究成果

AAV1-Cre, AAV1-Flpo, AAV-Con/Fon-EYFP の 3 種類のウイルスベクターを作製し、麻酔下でマウス脳に微量注入することで、順行性経シナプス感染を実現した。具体的には、(i) 網膜と一次視覚野の両方から単シナプス入力を受ける上丘の神経細胞 (図 2a-2d) や、(ii) 左右運動野からの単シナプス入力を受ける背側線条体の神経細胞を、選択的に標識することに成功した (Kitanishi et al., Communications Biology, 2022)。

(i) の実験において、静脈への投与で全脳に感染する PHP.eB-Con/Fon-EYFP を活用することで、上流の 2 領域 (網膜と一次視覚野) から単シナプス入力を受ける神経細胞を、全脳にわたり検索できることを示した (図 2e, 2f)。また、AAV1-Flp ベクターの注入部位を一次視覚野から聴覚野に変更すると、上丘の神経細胞は標識されなかったことから、シナプス特異性のあることが示された (図 2g-2k)。さらに、発現させる遺伝子を EYFP から ChR2-EYFP へと変更し、光ファイバーを介して上丘に光照射をおこなうことで神経活動を惹起できる (c-Fos が発現する) ことを示した。また、(ii) の実験において、細胞種マーカーとなるタンパク質の免疫組織化学染色を実施することで、シナプス入力を統合する神経細胞の種類を同定できることを示した。

以上の結果により、本研究は、2 か所の脳領域からの入力を統合する神経細胞を標識・操作する汎用的な新手法を確立した。この技術は、生体脳における情報の統合の仕組みを解明するために有用な技術となる。

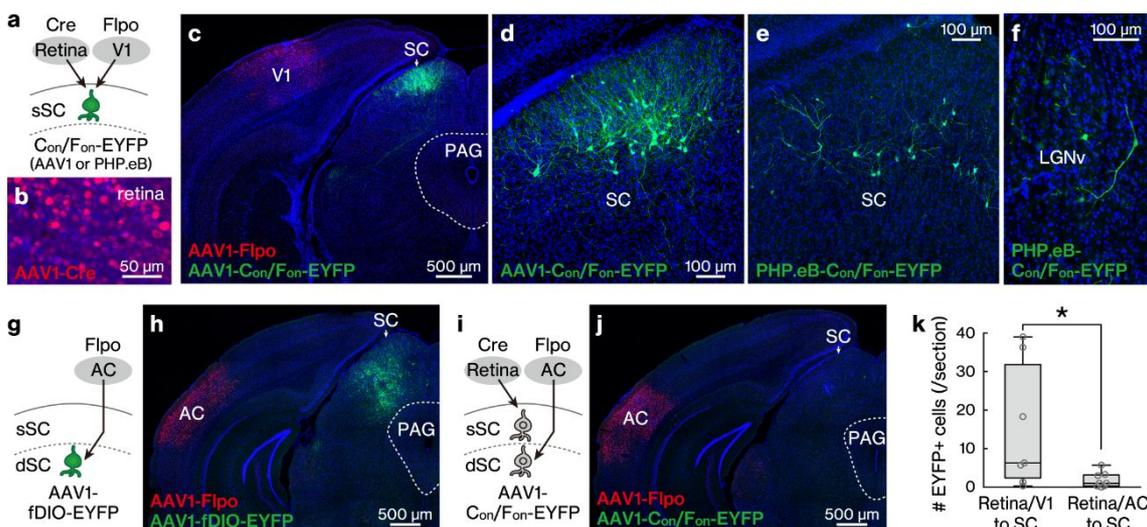


図 2 網膜 (retina) と一次視覚野 (V1) の両方から単シナプス入力を受ける上丘 (SC) の神経細胞の標識 (a) 実験の概念図。 (b-d) EYFP により標識された上丘の神経細胞。 (e, f) 静脈投与により全脳に感染する PHP.eB-Con/Fon-EYFP を用いて、単シナプス入力を統合する神経細胞を全脳で検索した。 (g-k) AAV1-Flp の注入部位を、一次視覚野から聴覚野 (AC) に変更すると、上丘における EYFP 標識は焼失した。 Kitanishi et al., Commun. Biol., 2022 より。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizuseki Kenji, Kitanishi Takuma	4. 巻 75
2. 論文標題 Oscillation-coordinated, noise-resistant information distribution via the subiculum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Neurobiology	6. 最初と最後の頁 102556 ~ 102556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.conb.2022.102556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitanishi Takuma, Tashiro Mariko, Kitanishi Naomi, Mizuseki Kenji	4. 巻 5
2. 論文標題 Intersectional, anterograde transsynaptic targeting of neurons receiving monosynaptic inputs from two upstream regions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03096-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitanishi Takuma, Umaba Ryoko, Mizuseki Kenji	4. 巻 7
2. 論文標題 Robust information routing by dorsal subiculum neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf1913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf1913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umaba Ryoko, Kitanishi Takuma, Mizuseki Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 Monosynaptic connection from the subiculum to medial mammillary nucleus neurons projecting to the anterior thalamus and Gudden's ventral tegmental nucleus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 中井槇也、北西卓磨、水関健司
2. 発表標題 海馬台における空間情報を表現する神経多様体
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北西卓磨、田代麻里子、北西なおみ、水関健司
2. 発表標題 2領域から単シナプス入力を受ける神経細胞の標識・操作法
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井槇也、北西卓磨、水関健司
2. 発表標題 海馬台における多様な空間情報を表現する神経多様体
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 海馬から海馬外への経路選択的な空間情報の送出
3. 学会等名 生理学研究所研究会「大脳皮質を中心とした神経回路：構造と機能、その作動原理」（岡崎、web）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 海馬台からの経路選択的な情報送出：投射先を光同定した大規模活動計測による解析
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会「多様な光受容体とオプトジェネティクスの最前線」(Web) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水関健司、北西卓磨、馬場良子
2. 発表標題 海馬台からの経路選択的な情報送出
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会「海馬と嗅内皮質の間に埋め込まれた情報を解読する」(Web)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北西卓磨、馬場良子、水関健司
2. 発表標題 海馬台からの経路選択的な情報送出：投射先を光同定した大規模活動計測による解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会/第98回日本生理学会 (Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北西卓磨、馬場良子、水関健司
2. 発表標題 海馬台からの経路選択的な情報送出：投射先を光同定した大規模活動計測による解析
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 (Web)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------