

## 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 6 月 11 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：23650176

研究課題名（和文）機能的神経回路を同定するための新技術の開発

研究課題名（英文）Development of new technology to analyze neural circuits

研究代表者

松田 孝彦（MATSUDA TAKAHIKO）

京都大学・ウイルス研究所・研究員

研究者番号：40313093

研究成果の概要（和文）：脳神経系における神経ネットワークを解析するための技術開発を目的とし、神経ウイルスの長所を取り入れた新規の神経回路トレーサー遺伝子の創製を試みた。神経ウイルスの構造蛋白質とGFPレポーターとの融合蛋白質を作製し、その挙動を詳細に調べた結果、一部のGFPレポーター融合蛋白質は元の神経ウイルスと似た挙動を示した。しかし、神経回路トレーサーとして実用化するためには、検出感度の点で更なる改良が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：To develop a new method for analyzing complex neural circuits in the central nervous system (CNS), novel neural circuit tracer genes derived from neurotropic viruses, which spread via neural networks, were constructed. Some of the neural circuit tracers behaved like the original neurotropic viruses in the CNS. However, their spreading efficiency was not high enough to clearly visualize functional neural circuits.

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	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：総合領域

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、網膜、ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

ニューロン間の複雑なネットワークを明らかにするための手段としては、微細形態学的手法や電気生理学的手法を始めとする複数の方法が挙げられるが、シナプスを通じて連結ニューロン間を伝播する「経シナプストレーサー」を用いる方法が最もシンプルかつ簡便であると考えられる。「経シナプストレーサー」をコードする遺伝子は、特定のニューロンや特定の神経領域特異的なプロモーターと組み合わせることで利用できるという（すなわち、経シナプストレーサーを発現するトランスジェニック（Tg）動物が作製できるという）長所を持つため、その応用範囲は広い。

しかしながら、多くの神経科学者に望まれているにもかかわらず、「高性能・高感度」の経シナプストレーサーの開発はあまり進んでいない。歴史的に見ると、1999年に理研の吉原良浩博士らのグループにより、順行性経シナプストレーサーとして知られていた小麦麦芽レクチン（Wheat Germ Agglutinin; WGA）遺伝子を発現するTgマウスが作製され、WGA遺伝子が特定の神経を起点とする神経回路の可視化に利用できることが報告された（Yoshihara *et al.* 1999）。引き続き2002年、逆行性シナプストレーサーとして知られる破傷風毒素Cフラグメント（Tetanus Toxin C-Fragment; TTC）遺伝子

のTgマウスがフランスのBrulet博士らのグループにより作製され、TTC遺伝子も神経回路同定に利用される可能性が示された(Maskos *et al.* 2002)。しかしながら、これらのトレーサーの経シナプス伝播効率は非常に低く、神経回路網の可視化が困難なケースが多いことがその後の研究によって明らかになり(Luo *et al.* 2008)、論文発表当初に期待されたほどWGAやTTC遺伝子の利用が広まっていないのが現状である。そのため、より高性能な新規の経シナプストレーサー遺伝子の開発が望まれている。

一方、神経細胞に感染し、シナプスを介して伝播する性質を持つ狂犬病ウイルスやヘルペスウイルスを利用した組換えウイルスベクターは、高感度で神経回路網を明らかにするためのツールとして注目されている。しかしながら、これらの方法は、神経組織へのウイルス注射という操作が伴うため、目的のニューロンのみウイルスを感染させることが困難であるという弱点を持つ。米国Salk研究所のCallaway博士らのグループは2007年、狂犬病ウイルスのコート蛋白(G)の遺伝子をGFPに置換した複製不能型狂犬病ウイルスを試験管内で作製し、コート蛋白(G)を人為的に発現させたニューロンに感染した場合のみウイルスが増幅するシステムをNeuron誌に発表して注目を集めた(Wickersham *et al.* 2007)。しかしながら、この方法では組換えウイルスとコート蛋白(G)両方を同一ニューロンに導入する必要があり、理論的には優れているものの、現実的には多くの問題を抱えている。また、多くの実験においては毒性が弱まった変異株をベースにした組換えウイルスが用いられているとはいえ、元々は重篤な症状を引き起こす危険なウイルスに由来するものであり、安全性や法規制の面から利用にあたっての敷居が高いのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス遺伝学との組み合わせが可能であるという既存の経シナプストレーサー遺伝子の長所と、効率よくシナプスを介して伝播するという狂犬病ウイルスやヘルペスウイルス等の神経ウイルスの長所を組み合わせ、新規の神経回路トレーサー遺伝子の創製を計画した。

経シナプストレーサー候補の*in vivo*での機能スクリーニングには、比較的単純な神経回路であるマウス網膜を用いる。マウス網膜に*in vivo*電極ポレーション法を用いて簡便かつ迅速に遺伝子導入する手法は既に報告している(Matsuda *et al.* 2004)。また、網膜の様々なニューロンに特異的なプロモーター断片を多数単離しており、経シナプストレーサー

遺伝子を狙った特定の網膜ニューロン選択的に発現させるシステムを既に確立している(Matsuda *et al.* 2007, Kim, Matsuda *et al.* 2008)。このような独自に開発してきた遺伝子導入技術と、単純な神経回路であるために解析が圧倒的に容易である網膜を組合せ、経シナプストレーサー開発を大幅に前進させる事を目指した。

高性能な新規の順行性(anterograde)や逆行性(retrograde)の経シナプストレーサー遺伝子が開発出来れば、様々な神経研究に大きく貢献できる。例えば、Creリコンビナーゼ依存的に新規回路トレーサー遺伝子を発現するTgマウスを作製すれば、既存のTgマウスのリソース(特定の神経細胞あるいは神経領域特異的にCreを発現するTg)を利用することによって、狙った神経細胞を介した回路網の同定が飛躍的に進むと考えられる。更に、マウスやラット等の哺乳動物のみならず、ゼブラフィッシュやカエルといった下等脊椎動物や、ハエや線虫といった無脊椎動物の神経回路研究にも適用できる可能性があり、より幅広い応用が期待出来る。また、経シナプストレーサー遺伝子を恒常的に発現するES/iPS細胞から神経細胞を試験管内で作製すれば、それらを動物に移植した際に既存の機能的神経回路網に組み込まれるのか否かを容易に判定出来ると予想される。

多くの研究者に使ってもらえるような神経回路同定のための有用な新規ツールの開発に挑戦し、脳研究の発展に貢献しようというのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

神経間を伝播する新規のトレーサー遺伝子を開発するために、シナプスを介して神経間を順行性(出力ニューロン方向)、もしくは逆行性(入力ニューロン方向)に伝播する様々なウイルスの外側のコート蛋白質の発現ベクターを作成し、神経組織で産生させた組換えウイルス蛋白質が経シナプストレーサーとして機能するか否かを検証した。なお、比較的単純な神経回路であるマウス網膜を利用して経シナプストレーサーとしての機能評価を行った。

具体的にはまず、シナプスを介して神経間を出力ニューロン方向、もしくは入力ニューロン方向に伝播する様々なウイルスの外側のコート蛋白質とGFPとの融合蛋白質cDNAを作成した。次に、GFP融合蛋白質遺伝子を申請者が単離した網膜双極細胞特異的なプロモーターにつなぎ、これを生後間もないマウスの網膜に*in vivo*電極ポレーション法で導入した。

そして細胞分化完了後の生後2週間目に網膜を摘出して網膜切片を解析した。

双極細胞は網膜の神経回路の中間に位置するニューロンなので、GFP融合蛋白質がシナプスを介して出力ニューロンあるいは入力ニューロンへ輸送されれば容易に識別出来る（図1）。すなわち、GFP融合蛋白質がシナプスを介して出力ニューロン方向に輸送されれば、双極細胞に加えてアマクリン細胞と神経節細胞が標識される。一方、GFP融合蛋白質が入力ニューロン方向に輸送されれば、双極細胞に加えて視細胞が標識される。

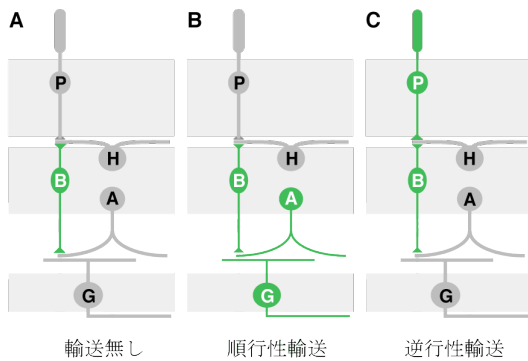


図1 網膜双極細胞特異的プロモーターを用いたtranssynaptic tracer (TST)のスクリーニング

- (A) TST候補遺伝子を双極細胞特異的プロモーターを用いて網膜に発現させ、シナプスを介した輸送が全く起こらなかった場合、双極細胞のみがGFPで標識される。  
 (B) TSTが双極細胞と連結するニューロンに順向性に輸送された場合、アマクリン細胞や神経節細胞も標識される。  
 (C) TSTが双極細胞と連結するニューロンに逆行性に輸送された場合、視細胞も標識される。

P:視細胞、B:双極細胞、H:水平細胞、A:アマクリン細胞、G:神経節細胞

網膜双極細胞からシナプスを介して他のニューロンへの輸送が観察された遺伝子産物に関しては、申請者が既に単離している網膜の他のニューロン特異的プロモーター（視細胞、アマクリン細胞それぞれに特異的なプロモーター）に繋いで網膜に導入し、予想通りの挙動を示すか否かを調べた。

#### 4. 研究成果

シナプスを介してニューロン間を伝搬する性質を示す様々なウイルスの構造蛋白質遺伝子を、PCR法を用いて増幅・単離し、GFPレポーター遺伝子との融合蛋白質cDNAを作製した。これらを網膜の双極細胞特異的プロモーターにつないだ発現ベクターを構築し、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いて出生直後のマウス網膜内に導入した後、発現させた融合蛋白質の挙動をGFPの局在を指標にして詳細に解析した。すなわち、GFPが双極細胞以外の網膜ニューロンでも観察されるか否かを調べた。

その結果、一部のGFPレポーター融合蛋白質は元のウイルスと似た挙動を示した。しかしながら、これらGFP融合蛋白質の明るさは、オリジナルのGFPと比べて暗く、検出感度の点で課題を残した。神経回路トレーサーとして実用化するためには、ウイルスの構造蛋白質遺伝子とGFP遺伝子との繋ぎ方（例えばリンカー配列の長さや配列）を検討する等、更なる改良が必要と考えられた。また、ニューロン間の伝播効率の点においても、更なる改良が必要と考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

(1) 松田孝彦、羊土社、実験医学別冊 遺伝子導入プロトコール、2012、pp 121-130

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 孝彦 (MATSUDA TAKAHIKO)  
京都大学・ウイルス研究所・研究員  
研究者番号：40313093

(2) 研究分担者

該当無し ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し ( )

研究者番号：