

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650208

研究課題名(和文) 単一軸索上のシナプス分布は一様か？

研究課題名(英文) Do synapses distribute uniformly along axonal branches?

研究代表者

畠 義郎 (HATA, Yoshio)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40212146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)： 投射軸索の形態解析は神経回路研究で広く使われる方法であるが、軸索投射の多寡が機能的インパクトの強弱を反映するかどうかは不明である。そこでマウスの視床-皮質単一軸索をモデルとして、軸索上にシナプス部位をマップすることを計画した。本課題ではまず、視床ニューロンに電気穿孔法によってプラスミドを導入する新たな手法を開発した。この方法は対象とする脳部位を電気生理学的に同定した上で遺伝子導入を行なうことができ、数個以下の少数ニューロンに軸索末端まで観察できる強度で蛍光タンパクを発現させることができる。さらに複数プラスミドの同時導入も可能であり、げっ歯類のみならずネコなど他種の動物にも適用可能である。

研究成果の概要(英文)： Morphological analysis of axonal projection is commonly used in the research of neural circuitry. To determine whether the density of axonal branches represents functional significance of the projection, I made a plan to map the location of synapses on axonal branches using thalamocortical projections of mice. In the present study, I have developed a novel method to introduce a plasmid into thalamic neurons using in vivo electroporation technique. The present method enables to target a few cells in the deep brain region which is identified physiologically and induce a strong expression of fluorescent proteins enough to visualize entire axonal arborization. Multiple plasmids could be introduced simultaneously using this method. Also, the present method can be applicable not only to mice but also to higher mammals as cats.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学/神経・筋肉生理学

キーワード：シナプス 神経回路 電気穿孔法

1. 研究開始当初の背景

脳機能は神経回路として実装されており、神経回路の有様を理解することで脳を理解しようとするアプローチは、神経科学の重要な手法である。研究代表者はこれまで、経験が脳発達に影響する仕組みを明らかにするため、大脳皮質視覚野の神経回路が視覚経験により再編される様子を研究してきた。具体的には、発達期の哺乳類に片眼視覚遮断を施すと、視覚野のニューロンは遮蔽眼への反応性を失い、さらに視床の外側膝状体から視覚野への入力軸索のうち、遮蔽した眼の情報を運ぶ軸索が退縮する。この時、退縮した入力軸索の、皮質ニューロンに対する機能的インパクトは減少しているであろう。

このように、軸索投射の多寡が機能的インパクトの強弱を反映すると一般的に考えられている。しかし実際には、軸索密度がシナプス密度を反映するという仮定を支持する根拠はない。例えば、マウス視覚系の視床-皮質投射軸索は、皮質ニューロンの受容野の大きさから推定されるより、はるかに広い皮質領域に投射する。このことは、軸索投射領域がそのまま機能的入力であると考えられる。これまでの仮定に疑問を投げかけるものである。

2. 研究の目的

マウスの視床外側膝状体-皮質投射での、入力軸索の皮質上の広がりや、皮質ニューロンの受容野サイズの食い違いを考えると、入力軸索においては、軸索そのものは皮質内に広く分枝しているが、皮質ニューロンへのシナプス結合はより限局した分布を持つ可能性もあるのではないかとこの可能性は、軸索投射の有無や多寡を手掛かりに機能連絡を推定しようとする、よく用いられるアプローチに疑問を投げかける重要なものである。そこで、マウスの膝状体-皮質単一軸索上にシナプス部位をマップすることを計画した。この可能性が正しければ、軸索形態の解釈を再考する必要が出てくる。一方、軸索上では均一にシナプスが分布するのであれば、これまでの前提が確認されることとなり、やはり神経回路の研究に資するであろう。

単一の軸索上に、シナプス部位をマップするためには、1本あるいはごく少数の軸索について、その軸索分枝を標識し、その分枝の全体像とシナプス部分を同時に標識する必要がある。そのため、視床ニューロンに蛍光タンパクと蛍光標識したシナプスマーカータンパクを同時に発現させる方法を検討した。

3. 研究の方法

(1) ウィルスベクターを用いた遺伝子導入

まず、アデノ随伴ウィルス(AAV)ベクターを用いて、マウス視床に蛍光タンパクを発現させることを試みた。赤色蛍光タンパク mCherry と、緑色蛍光タンパク EGFP とシ

ナプスマーカータンパク synaptophysin の融合タンパクの遺伝子を含む AAV を視床外側膝状体に局所注入し、これらを共発現させることができた。しかしウィルスベクターを用いた発現系では、個々のニューロンでの発現強度と発現ニューロン数が比例しており、標識ニューロンが少なく単一軸索を観察できる標本では、発現が弱すぎてそれぞれの軸索形態を評価することができなかった。また、十分な強度の発現を得ようすると標識されるニューロン密度が高くなり、個々の軸索を分離するのが難しいという問題があった。

(2) in vivo 電気穿孔法

そこで新たに、少数の視床ニューロンに電気穿孔法によってプラスミドを導入する新たな手法を開発した。

先端内径15~20 μ mのガラスピペットを作成して、電気生理学的記録が可能なオートインジェクターに装着し、先端から数 μ lのプラスミド液を充填した。プラスミドは、CAGプロモータ下でEGFPを発現するプラスミド(pCAG-EGFP)を用いた。プラスミド濃度が0.2~2.0 μ g/ μ lになるように調製し、場合により、神経トレーサーや核膜孔を拡張する試薬 Trans-1, 2-cyclohexanediol (TCHD) を混合した。

生後27から405日齢のマウス、あるいは生後34から38日齢のネコを用いた。プラスミド液を充填したガラスピペットを用いて麻酔下で電気生理学的記録を行い、標的とする視床外側膝状体の位置を生理学的に同定した。その後、ガラス管の位置をそのまま変えず、オートインジェクターに接続されている配線を記録用のものから電気パルスを与えるものへつなぎかえた。そして、プラスミド液を微量圧注入し、すぐにガラス管の先端から電気パルスを与えた。数日~数週間後に動物を灌流固定して、脳を取り出し、凍結脳切片を作成した。必要に応じてEGFPの免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

この方法はウィルスベクターを用いないため簡便であり、かつ出生後の動物に遺伝子を導入できる方法である。また、外側膝状体には両眼からの入力が入射しているが、それぞれの領域は異なっている。本手法では電気生理学的に脳部位を特定するので、特定の眼に対応する領域のみに遺伝子導入することも可能である。

4. 研究成果

(1) in vivo 電気穿孔法による視床ニューロンへの遺伝子導入

電気穿孔法を行ってから2週間後に標的とした視床外側膝状体を観察すると、プラスミド溶液に混合した神経トレーサーで標識された部位付近にEGFP発現ニューロンを確認できた(図1)。

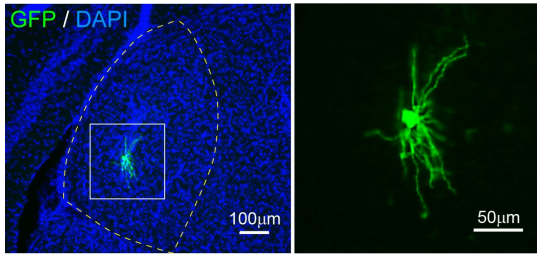


図1．視床外側膝状体（左図点線内）に確認された投射ニューロンの例。右はその拡大像。

また、外側膝状体ニューロンの投射先である一次視覚野を観察すると、EGFP 発現軸索が見られ、軸索膨大部や軸索末端等、微細な構造も確認できた（図2）。

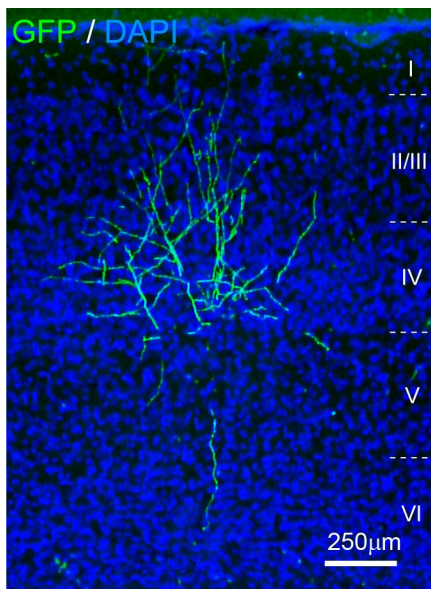


図2．大脳皮質視覚野で確認された投射軸索の例。

(2) 電気穿孔パラメータによる遺伝子導入効率の検討

この方法により、電気穿孔を行なった各部位で少数のニューロンに蛍光タンパク発現が見られた（平均 1.2 個）。遺伝子導入の成功率は約 36%であった。また、グリア細胞へも同程度の成功率で遺伝子導入が認められた。

電気穿孔のパラメータの影響を調べるために、電圧を 50-200V、プラスミド濃度を 0.2-2.0 μg/μl の範囲で変えて調べたが、成功率に変化は無かった。

核輸送効率を増加させる試薬である TCHD を plasmid 溶液に混入し併用しても成功率は変化しなかった。しかし、TCHD を用いた場合、発現蛍光強度が高くなる傾向が見られ、免疫組織化学染色無しでも標識ニューロンの樹状突起や軸索を観察することができた。

緑色蛍光タンパク(EGFP)と赤色蛍光タンパク(mCherry)の遺伝子を含む plasmid 溶液

を混合して電気穿孔を行なったところ、両タンパクが共発現するニューロンを観察する事ができた。

さらに、この方法はマウスだけでなくネコにも適用することができ、外側膝状体の特定の層を標的として数個の細胞に遺伝子導入することができた。

今回開発した電気穿孔法を用いると、電気生理学的に同定した脳領域において、少数のニューロンだけに遺伝子導入できるため、標的とする領域の個々のニューロンの詳細な形態解析が可能である。生後動物における少数のニューロンへの遺伝子導入法としては、これまでに単一ニューロン電気穿孔法が報告されているが、それらはパッチクランプ法や二光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージング法、juxtacellular 記録法のような高度な技術を必要とする。今回開発した方法は一般的な細胞外記録法の技術があれば可能であり、比較的短時間で処置が完了する。

また、この方法は生後発達期の動物に用いることはできたが、生後 60 日齢以上の成熟動物には適用できなかった。この原因として、ニューロンの成熟により細胞膜の電気パルスへの感受性が低下したことや、細胞外マトリクスの発達によりプラスミドが細胞膜へ接触しにくいことが予想される。しかし、生後 7 週齢の動物では遺伝子導入が可能であることや、遺伝子導入されたニューロンにおいて処置から 1 か月後においても十分な蛍光発現が観察できたことから、成熟期における神経回路形態の観察も十分可能であると考えられる。さらに、この方法を他の薬理的あるいは遺伝的な操作と組み合わせることで、神経回路の発達や可塑性に関与する分子メカニズムの解明に大いに役立つと期待できる。

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 1 件)

Ohmura N., Kawasaki K., Satoh T. and Hata Y.

"In vivo electroporation to physiologically identified deep brain regions in postnatal mammals."

Brain Structure and Function (印刷中)、査読有、doi: 10.1007/s00429-014-0724-x.

〔学会発表〕(計 2 件)

Ohmura N., Satoh T., Kawasaki K. and Hata Y.

"Gene transfer using electroporation in the deep brain regions of postnatal mammals" 第 43 回北米神経科学大会、2013/11/11、San Diego Convention Center、米国 San Diego

川崎一葉、大村菜美、佐藤武正、畠 義郎
"生後動物における生理学的に同定した脳部
位への遺伝子導入法"
第 65 回日本生理学会中国四国地方会、
2013/11/02、川崎医科大学、岡山県倉敷市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

畠 義郎 (HATA, Yoshio)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40212146

(2)研究分担者

佐藤 武正 (SATO, Takemasa)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80346345