

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

Analyses of architecture and functions of cerebral networks by target neuron-selective activity suppression and tract-tracing approaches

高田 昌彦 (TAKADA MASAHIKO)
京都大学・霊長類研究所・教授



研究の概要

霊長類大脳ネットワークの構築と機能を解明するため、様々なウイルスベクターシステムを応用して、特定のニューロン群を選択的に不活化し、課題遂行中のサルにおける行動異常やニューロン活動変化を解析するとともに、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、神経路選択的かつ逆行性越シナプスのトレーシングを実現する。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経情報処理

1. 研究開始当初の背景

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系統的に理解する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されるが、個々の入力が入力されるかについては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

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、神経路選択的かつ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、これらの先端的技術を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。

3. 研究の方法

神経路選択的な活動抑制法の確立と応用を目指した研究では、逆行性感染型レンチウイルスベクターを利用して、ニューロン活動の不活化を誘導するタンパク質を特定のニューロンに導入するシステムの開発を行った。ニューロン活動の不活化を誘導するタンパク質として、当初ショウジョウバエアトラクタチン受容体を用いることを計画していた。しかしながら、様々な検討を加えた結果、このタンパク質を霊長類脳において長期的に発現させると細胞毒性を示すため、課題遂行中のサルにおける行動変化を解析するような慢性実験には適さない可能性が示唆された。そこで、代替としてテタヌストキシン軽鎖フラグメントを用いることを考案した。

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を目指した研究では、まず有用な越シナプスのトレーサーとして使用されている狂犬病ウイルス CVS 株の改変を可能にするため、CVS 株のフルゲノム配列のシーケンシングとクローニング、および構成遺伝子のクローニングを行い、ベクターとして利用できるようにウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子を得る cDNA 発現系を構築した。

4. これまでの成果

神経路選択的活動抑制法の確立と応用を目指した研究では、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ス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ス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。

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を目指した研究では、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。

また、以上の研究計画と並行して、開発されたベクターシステムを速やかに霊長類の大脳皮質や大脳基底核の入力ネットワークの解析に適用するため、既存の狂犬病ウイルス CVS 株を用いて、前頭前野および高次視覚野への多シナプス性入力様式を解析した。開発されたトレーシングシステムを用いることにより、多様な認知機能の神経基盤や、bottom-up および top-down の視覚情報処理機構の統合的理解に貢献できると考える。

5. 今後の計画

神経路選択的活動抑制法の確立と応用においては、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、テタヌストシキ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野（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。

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においては、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。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

- Yumoto N, Lu X, Henry T, Miyachi S, Nambu A, Fukai T, Takada M (2011) A neural correlate of the processing of multi-second time intervals in primate prefrontal cortex. PLoS ONE, in press.
- Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2011) Differential architecture of multisynaptic geniculo-cortical pathways to V4 and MT. Cereb Cortex, in press.
- 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.
- 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.

ホームページ等

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