

## 平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

## 1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		脳科学研究戦略推進プログラム
研究開発課題名		遺伝子改変マーマセットの汎用性拡大および作出技術の高度化とその脳科学への応用（脳科学研究に有用性の高い遺伝子改変マーマセットの創出）
機関名		大学共同利用機関法人自然科学研究機構
研究開発	所属 役職	基礎生物学研究所 教授
担当者	氏名	松崎 政紀

## 2. 研究開発成果の内容

## ① 脳科学研究に有用性の高い遺伝子改変マーマセットの創出

## 1) Tet-On, Tet-Off マーマセットのライン化

大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所マーマセット施設において、H28.4.1 現在までに、Tet-On の F0 個体 4 頭すべてから F1 個体を得て、F1 は合計 14 頭となった（平成 26 年度実績報告書では 2 頭）。そのうち人工授精が 1 頭、子宮還流法により得られた受精卵移植により産まれた個体が 2 頭、他はすべて自然交配によって誕生した。これら 14 頭のうち 9 頭については、FISH 解析を行い TG 遺伝子の染色体への導入部位を同定した（1 個体あたり 1～6 箇所）。また Tet-Off の F0 個体 1 頭から 2 頭の F1 個体を得、毛根から GFP 遺伝子を PCR によって検出した。F1 個体のうち 7 か月齢を過ぎた 1 頭に関して、その大脳皮質に対して AAV-TRE-GCaMP を注入した。ドキシサイクリン投与後、一部の脳皮質神経細胞で蛍光発現が見られたが、強い発現は見られなかった。この F1 の脳を灌流固定し、tTA 発現パターンを調べたところ、抗体染色では TetR の発現を確認できなかったが、ISH で弱い発現を海馬歯状回、海馬傍回、尾状核、視床で検出することができ、シグナル源は主としてニューロンであった。TG マーマセットの脳組織において、tTA が確かに発現していることが判明したことから、大脳皮質で強く発現している、脳科学研究に有用性の高い Tet-On マーマセット系統を見つけるため、残りの F1 個体においてどの順番で AAV-TRE-GCaMP を注入して大脳皮質での発現を調べていくかのスケジュールを立てた。

## 2) 2重 TG 個体の作成

Tet-On マーマセットの配偶子と野生型配偶子を交配した受精卵に、レンチウイルスベクターを用いて直接 TRE-ChR 等を導入し、イメージングや光遺伝操作が可能な 2重 TG 個体を作成する系を開発することを目的として、TRE-ChR レンチウイルスベクターと卵注入用ウイルスを作製し、TG マーマセットの作製を行った。その結果、7 個の受精胚を移植し妊娠が 1 頭、出産が 1 頭となった。出産した 1 頭の毛根で ChR の遺伝子発現を確認したことから、2重 TG マーマセットの作出に成功したと結論した。

### 3) 個体マーモセット脳での 2 光子イメージングと光誘発法の確立

**Tet-On, Tet-Off** マーモセットのライン化を進めるのに並行して、**AAV** を用いて遺伝子導入を行い、個体マーモセット脳で **GCaMP** 発現細胞の活動を 2 光子イメージングし、**ChR2** 発現細胞の活動を光誘発する系を確立することを目的とし、これを達成した。遺伝子発現を増幅でき、かつその時間制御が可能である **Tet** システムをコンストラクトにもつ **AAV** の大脳皮質への直接導入を行った。その結果、成獣マーモセットの大脳皮質への遺伝子導入後 10 日目以降から十分蛍光の強い 2 光子イメージングを麻酔下で行うことができ、単一細胞レベルでの活動をカルシウム蛍光上昇として検出することに成功した。さらに **Tet** システムでの遺伝子転写能力をオンオフするドキシサイクリンを水に混ぜることで実際に **GCaMP** 発現を増減できること、このことで長期的な高発現による細胞毒性を下げ、約 4 か月後に同じ細胞集団の活動を計測することを可能とした。タンパク質発現量が十分高いため、3次元イメージングによって 2 層と 3 層での 400 個以上の神経細胞活動を同時計測すること、単一の樹状突起や軸索からの蛍光上昇を検出することもできた。体性感覚野においては、手や足の感覚刺激によって単一細胞、単一軸索レベルで刺激部位特異的な活動を計測することができた。これは霊長類でサブ細胞レベルの空間解像度で神経細胞活動を世界で初めて検出したものであり、結果を **Cell Reports** 誌に発表した。この結果を受け、**ChR2** の発現においても **AAV-Tet** システムを用いた。**AAV** を注入した大脳皮質部位において、脳表への青色光照射によって細胞活動が誘発されることを電極記録によって確認した。従って、脳研究に有用性が高い **TG** システムを見出す実験系が確立したことになる。

1) で記載した 1 頭は発現量が低く有用性が高いものではなかった。平成 28 年度以降引き続き、有用性が高い **TG** システムの決定を目指す。