

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		革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
研究開発課題名		革新的な投射経路特異的遺伝子発現制御法の開発と回路機能操作による機能マップ作成
機関名		国立大学法人名古屋大学
研究開発	所属 役職	環境医学研究所 教授
担当者	氏名	山中 章弘

2. 研究開発成果の内容

① 逆行性経シナプス Cre リコンビネースとフリップース(Flp)の開発

② 順行性経シナプス Cre リコンビネースとフリップース(Flp)の開発

①と②の両方のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター作成において、超遠心を用いた濃縮精製を行った。Vertical rotor (VT50)を用いて密度勾配遠心を行い、AAV ベクターを濃縮精製した。Optiprep と粗精製 AAV 溶液を用いて密度勾配を作製した。フラクションに分け、Real-time PCR を用いてコピー数を調べたところ、 1×10^{13} particles/ml の分画を得た。マウスでは投与部位において炎症反応がほとんど起きないなど、以前の粗精製と比べると非常に純度の高い AAV を得ることができており、マーモセット脳への投与、局所感染においても使用可能な純度と濃度を得ることができた。

③ 多重選択によって遺伝子発現を誘導するベクター開発

tTA と Cre と Flp が存在する時に遺伝子発現を行う AAV-TetO3G BI-FLEX-hrGFP/dFRT-mCherry を開発した。この AAV ベクターでは tTA と Cre が存在する時に緑色蛍光タンパク質(hrGFP)が発現し、tTA と Flp が存在している時に、赤色蛍光タンパク質(mCherry)が発現する。特定の神経細胞において tTA を発現する各種遺伝子改変マウスにおいて逆行性もしくは順行性の Cre/Flp と用いることで、特定の神経細胞のうち、投射経路特異的に遺伝子発現を誘導することが可能となった。

④ マウス、ラットを用いた多重選択による投射経路別遺伝子発現制御法の開発

マウスでは、青斑核に投射するオレキシン神経を対象として実験を行った。オレキシン神経特異的に tTA を発現するマウスの青斑核に逆行性 Cre 発現 AAV を感染させ、オレキシン神経の存在する視床下部に Cre 依存的蛍光タンパク質発現 AAV を感染させた。その結果、青斑核に投射するオレキシン神経細胞において、蛍光タンパク質発現が認められた。

一方、ラットでは、超遠心作製した高純度高濃度 AAV の逆行性 Cre の機能を、島皮質から線条体へ投射する神経系に適用して評価した。逆行性 Cre を線条体の B 細胞に発現させ、島皮質に Cre 依存的に蛍光タンパク質(hrGFP)を発現する AAV を感染させた。島皮質の神経細胞において hrGFP を発現する神経細胞体が認められ、線条体に投射する島皮質神経の標識に成功した。平成 26 年度に行

った粗精製 AAV と比較し、島皮質において hrGFP を発現する神経細胞数が増加した。

⑤ マーモセットを用いた多重選択による投射経路別遺伝子発現制御法の応用

国立大学法人名古屋大学においてマーモセット飼育実験施設を新設した。飼育と実験に必要な物品を設置した。環境医学研究所の動物実験委員会と国立大学法人名古屋大学の動物実験小委員会において飼育方法・実験手法などの審査を受けた。委員会の指摘を受けて、公益財団法人実験動物中央研究所（実中研）において実験補助員の1名がマーモセット飼育のための研修を受講し、また、マーモセット飼育の経験がある実験補助者を新たに雇用して飼育開始に向けて準備を整えた。また、マーモセットを用いた実験に向けて、参画研究者1名が大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所と基礎生物学研究所で行われたマーモセット実験講習会に参加した。野生型マーモセット2頭を日本クレアから購入し、日本クレアと共同で飼育を開始した。実中研の佐々木えりか先生と共同で遺伝子改変マーモセット(*Orexin-Cre*)を作製している。遺伝子改変マーモセット作製のためのコンストラクト作製を担当した。平成26年度-平成27年度にかけて試したレンチウイルスベクターを用いた方法では発現が認められなかったため、PiggyBAC法を用いた手法に切り替えた。改めてPiggyBACに用いるベクターにコンストラクトを載せ替えた。また、学校法人慶應義塾岡野先生、近藤先生との共同研究において、マーモセットの脳に感染するAAVセロタイプとしてSr9が最適であることを同定した。

⑥ 特定神経回路操作のためのマーモセット用小型無線光照射・生体電位取得装置開発

Bluetoothを用いて無線小型光照射装置・生体電位取得装置を開発した。1号機と比べてそれぞれ、65%と78%の軽量化に成功した。光刺激と脳波取得のためのソフトウェアを開発した。光照射のタイミングやパターンが制御できること、生体電位計測として脳波計測ができることを確認した。また、マウスに実装し、脳波記録を行った。

⑦ プロジェクトの総合的推進

班長の大学共同利用機関法人自然科学研究機構松崎先生と連絡を密にし、共同研究において開発したAAVを提供した。技術個別課題の国立大学法人埼玉大学中井先生と共同研究を行い、プラスミドベクターを供与して貰い、作製したウイルスベクターを供与した。