

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム  
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語) 新規逆行性遺伝子操作法によるマカク大脳連合野・基底核回路への機能的介入・記録技術の開発  
(英語) Development of functional intervention and recording techniques with a novel retrograde gene-manipulation method for the macaque prefrontal and basal ganglia networks

研究開発担当者 (日本語) 理化学研究所脳科学総合研究センター チームリーダー 田中 啓治  
所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Brain Science Institute, Team Leader, Keiji Tanaka

実施期間： 平成 28 年 11 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

遺伝子操作法を利用して、マカク属サルの前頭前野の領野間投射に適用可能な投射特異的・可逆的機能ブロック法および細胞活動記録中の投射先同定法を開発し、ウィスコンシンカード分類課題における前頭前野の領野間投射の機能的役割を明らかにすることを目指している。今期は、技術開発のテスト系として左右半球の運動前野背側前部 (F7) 間の交連投射を使うこととし、アデノ随伴ウイルス (AAV) にコレラ毒サブユニット B (CTB)、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA、実際には TeT-On 3G)、標識用タンパク (HA) を組みこんだベクター (AAV-CTB-rtTA-HA) と、AAV にテトラサイクリン応答因子 (TRE)、シナプス伝達の阻害タンパク質である破傷風毒 (TeTX、実際には eTeNT)、標識用タンパク質 (\*) を組みこんだベクター (AAV-TRE-TeTX-\*) を作成し、一側の F7 に AAV-CTB-rtTA-HA を、反対側の F7 に AAV-TRE-TeTX-\* を注入した。複数のウイルスベクター注入による選択的遺伝子発現誘導の成否はウイルスのタイターに依存することから、先ず最適なウイルスタイターの検討を行っている。具体的には、高タイターの AAV-TRE-TeTX-EGFP と低タイターの AAV-TRE-TeTx-mCherry を混合した液を同一個体のサルに注入し、ドキシサイクリン投与中および投与なしに灌流し、mCherry および

EGFP に対する免疫組織化学的染色を施して、逆行輸送された CTB-rtTA-HA によってドキシサイクリン依存的に誘導される TeTX 発現の最適条件を検討している。第2に、TeTX によるシナプス伝達のブロックおよびそのドキシサイクリンによるスイッチを検証するために、電気刺激による誘導電場電位を記録する電気生理学的アッセイ法を開発した。細胞活動記録中の投射先同定法については、投射特異的にチャンネルロドプシン (ChR2) を発現するためのウィルスベクターの組み合わせ (AAV-CTB-tTA-HA と AAV-TRE-ChR2-EYFP) を作成し、また硬膜を貫通して刺入するオプトロードを試作した。また、硬膜を切開することなしにウィルスベクターを皮質の目標の深さに注入するために、強化ファイバー管と記録電極を組み合わせたインジェクトロードを試作した。

We develop techniques of functional blockage and *in-vivo* projection identification applicable to projections between prefrontal regions in macaque monkeys by using gene-manipulation methods and apply the techniques to study the functional roles of the projections between prefrontal regions during the performance of the Wisconsin Card Sorting Task. In 2016FY, we decided to use the commissural projections between the rostradorsal premotor area (F7) in the left and right hemispheres, produced a virus vector combining the cholera toxin subunit B (CTB), reverse tetracycline transactivator (rtTA, actually TeT-On3G), and labeling protein (HA) with adeno-associate virus (AAV), and a virus vector combining tetracycline response element (TRE), tetanus toxin, which is a synapse-blocking protein (TeTX, actually eTeNT), and labeling protein (\*) with AAV, and injected the AAV-CTB-rtTA-HA into F7 of one hemisphere and AAV-TRE-TeTX-\* into F7 of the other hemisphere. As the success of selective gene expression based on the interaction of multiple virus vectors depends on the titer of viruses, we first conducted injection-staining experiments to determine the optimal titer condition. More concretely, we injected a mixture of high-titer AAV-TRE-TeTX-EGFP and low-titer AAV-TRE-TeTX-mCherry, perfused the animal during and without the application of doxycycline, stained brain sections immunohistochemically either for EGFP or for mCherry, and examined the titer condition in which TeTX is expressed by the interaction with retrogradely transported CTB-rtTA-HA only under the presence of doxycycline. Secondly, to confirm that the expressed TeTX is transported to the axon terminals and blocks the synaptic transmission depending on the doxycycline application, we developed an electrophysiological assay method in which the responses evoked by the electrical stimulation are recorded as local-field-potentials. As for the *in-vivo* identification of projection target, we made a combination of virus vectors (AAV-CTB-tTA-HA and AAV-TRE-ChR2-EYFP), and the optorodes that can penetrate through the dura into the cortex. Also, to inject virus vectors, without the confusions caused by dissection of the dura, to the intended depth of the cortex, we made injectrodes fusing a recording fiber to an injection pipe of reinforced fiber.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Lehyk SR, Tanaka K. Neural representation for object recognition in inferotemporal cortex. *Current Opinion in Neurobiology*. 2016, 37, 23-35, doi: 10.1016/j.conb.2015.12.001
2. Wan X, Cheng K, Tanaka K. The neural system of postdecision evaluation in rostral frontal cortex during problem-solving tasks. *eNeuro*. 2016, 3, 1-24. doi: 10.1523/ENEURO.0188-16.2016

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The role of frontal pole cortex in primate goal-directed behaviour、口頭、Mansouri FA, Tanaka K、第39回日本神経科学大会、2016/7/20、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、国内
2. エキスパートの直観を司る神経ネットワーク、口頭、田中啓治、第39回日本神経科学大会、2016/7/21、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、国内
3. Columnar scale representation of faces in the human inferotemporal cortex、ポスター、Tanskanen T, Kao CH, Waggoner RA, Ueno K, Tanaka K, Cheng K、第39回日本神経科学大会、2016/7/21、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、国内
4. Columnar organization of face orientation procession I human occipital face area、ポスター、Kao CH, Tanskanen T, Ueno K, Waggoner RA, Tanaka K, Cheng, K、第39回日本神経科学大会、2016/7/22、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、国内
5. Synchronous beta oscillations in the fronto-striatal loop for behavioral rule switching in macaque monkeys、ポスター、Gerard-Mercier F, Tanaka K、第39回日本神経科学大会、2016/7/21、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、国内
6. Brain Mechanisms of intuitive problem solving in experts、口頭、Tanaka K、IBS Conference on Systems Neuroscience & Neuroimaging, The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Science、2016/9/29、KINTEX、Seoul、Korea、国外
7. Changes in deoxygenation level of bloods and cortical tissues following neuronal activity changes as the bases for intrinsic optical recordings and fMRI、口頭、田中啓治、国際シンポジウム「脳科学の未来」 2017/3/3、東北大学、仙台市、宮城県、国内

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 将棋棋士やサッカー選手の直観思考の仕組み、田中啓治、第6回 CiNet シンポジウム「おもろい脳科学」、2016/6/18、グランフロント大阪、大阪市、大阪、国内
2. エキスパートの直観を司る神経回路、田中啓治、サイテックサロン、2016/11/5、駒場ファカルティハウス、渋谷区、東京、国内

#### (4) 特許出願