

# シンドビスウイルスベクターを用いた新しい単一神経細胞標識法 —運動性視床核ニューロンの完全再構築を例として

## Novel Single-Neuron-Tracing Method Using Sindbis Viral Vectors

倉本恵梨子<sup>a</sup>, 古田 貴寛<sup>a</sup>, 日置 寛之<sup>a</sup>, 藤山 文乃<sup>a, b</sup>, 金子 武嗣<sup>a</sup>

Eriko Kuramoto, Takahiro Furuta, Hiroyuki Hioki, Fumino Fujiyama and Takeshi Kaneko

<sup>a</sup>京都大学大学院医学研究科高次脳形態学教室

<sup>b</sup>JST, CREST

**要旨** 神経細胞は複雑に分岐する多数の突起—樹状突起と軸索を持つ。樹状突起は他の神経細胞から情報入力を受け、軸索は情報処理の結果を他の神経細胞へ出力するという重要な役割を果たしている。したがって、これらの突起を完全に可視化することは、神経細胞の情報処理メカニズムを解明するために欠かせない、基礎的なデータを提供するものと思われる。古くはゴルジ染色法により、近年では細胞内染色法が用いられ、様々な脳領域において単一神経細胞の形態解析が行われてきた。しかしながら長距離投射する神経細胞については再構築が非常に困難なため、完全には解明されてこなかった。本稿では、これまでの単一神経細胞標識法の欠点を克服すべく、当研究室で開発された新しい順行性トレーサーであるシンドビスウイルスベクターを紹介する。そして、その使用方法と単一神経細胞トレース研究の意義について、運動性視床核における研究成果を交えて解説を試みる。

**キーワード**：シンドビスウイルス、単一神経細胞トレース、膜移行性シグナル、視床皮質投射、運動性視床核

### 1. はじめに

成熟した神経細胞は複雑に分岐した樹状突起および軸索を持ち、非常にバリエーションに富んだ形態を示す。樹状突起は他の神経細胞からの情報入力を受け、軸索は他の神経細胞へ情報処理の結果を出力するという、重要な役割をそれぞれ担っている。したがって、神経細胞の樹状突起や軸索突起の形態を完全に可視化することは、神経細胞の情報処理メカニズムを明らかにするために欠かせない、基礎的なデータを提供するものと考えられる。古くは130年以上も昔の1873年に、イタリア人のCamillo Golgiが「黒い染色」と称して発表した鍍銀法、いまではゴルジ染色法と呼ばれている手法により、神経細胞は非常に発達した樹状突起を持っていることが明らかになり、神経解剖学は大きく発展した。しかしながら、ゴルジ染色法には以下に掲げるような欠点があった。

- 1) 軸索の染色が難しい。特に髄鞘を被った成熟した動物の軸索は染色されない。したがって、ゴルジ染色法を用いて行う軸索の解析は主に発達期の脳の研究になってしまう。
- 2) どの神経細胞が染色されるかは、まったくランダムに決定されるため、研究対象の脳部位において少数派となる神経細胞は、なかなか染色されず、研究の効率が極端に落ちる。

このようなゴルジ法の欠点を克服すべく、単一神経細胞の

染色法として開発されたのが細胞内染色法で、標識物質を充填したガラス微小電極を神経細胞に刺入し、標識物質を細胞内に電気泳動的に注入するものである。この方法で、さまざまな単一神経細胞の形態学的な研究がなされてきたが、安定して結果を得るためには脳スライスによる *in vitro* の系として実験する必要がある。これではもちろん軸索の完全な再構築は望めない。 *In vivo* で細胞内染色を行う試みも多くなされたが、記録と染色が不安定であり、完全に軸索を再構築できたと言える結果は少なかった。手技的にも高度の技量が要求され、多くの脳部位で行われるには至っていない。

こうした状況の中で、1990年代頃からようやく神経解剖学にも遺伝子工学が応用され始め、ウイルストレーサーを用いる単一神経細胞の解析が可能になった。以下では、筆者が所属する研究室で開発された、シンドビスウイルスベクターを用いて単一神経細胞を標識する方法について解説する。そして、この新しい手法を用いて実際に解析を行った例として、ラット運動性視床核、VA-VL核における研究を紹介したい。VA-VL核は、小脳および大脳基底核からの運動調節のための情報を、大脳皮質へと伝達する中継核である。VA-VL核において、小脳および大脳基底核からの情報はほとんどオーバーラップせず、それぞれ別々の領域に入力することが示唆されてきた<sup>1,2)</sup>。これら二つの情報がどのように大脳皮質の神経細胞に伝達され、統合されるのか明らかにするためには、それぞれのVA-VLニューロンの皮質投射軸索を、単一細胞レベルで詳細に比較する必要がある。しかしながら、これまでの手法、*in vivo* の細胞内染色法では、単一視床ニューロン由来の皮質投射軸索を完全に再構築できている保証はなかつ

<sup>a</sup> 〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町

TEL: 075-753-4336; FAX: 075-753-4340

E-mail: kaneko@mbs.med.kyoto-u.ac.jp

2011年2月19日受付

た。そこで、シンドビスウイルスベクターによる新しい単一神経細胞標識法を用いて、VA-VL ニューロンの完全再構築を試みた。

## 2. 膜移行性シグナル付き蛍光タンパクを発現するシンドビスウイルスベクターの開発

1996年に中西のグループにより、神経細胞の樹状突起および軸索を効率よく標識するため、膜移行性シグナルを付加した緑色蛍光タンパク質 (GFP) が開発された<sup>3)</sup>。これは、膜タンパク質である GAP43 タンパクの N 末 20 残基に存在する palmitoylation site (膜移行性シグナル) を利用し、蛋白翻訳後の GFP に長鎖脂肪酸を添加して細胞膜に向かわせるというアイデアである。通常の GFP は水溶性タンパクであるため細胞質および核内において、び漫性に分布するのに対し、膜移行性シグナルにより修飾された GFP (palGFP) は細胞膜直下に局在するため、細胞の輪郭を縁取るように可視化できる (図 1A-B')。彼らは palGFP を発現するアデノウイルスベクターを作製し、培養神経細胞をゴルジ染色様に標識することに成功していた<sup>3)</sup>。

これを受け、筆者が所属する研究室では、palGFP を発現する非増殖性シンドビスウイルスベクターの開発を行った<sup>4)</sup>。シンドビスウイルスは、トガウイルス科アルファウイルス属に分類され、(+) 鎖 RNA をゲノムとして持ち、神経細胞を含む様々な細胞種に効率よく感染する。また、内在性の subgenomic promoter が強力なため、感染した細胞に大量の遺伝子産物を発現させることができる。実際に palGFP を発現するシンドビスウイルスベクターを作製し、ラット視床に注入して感染させたところ、palGFP によりゴルジ染色様に標識された多数の視床ニューロンが蛍光顕微鏡下で観察された (図 1C, D)。また、ここで注視すべきことは、この palGFP シンドビスウイルスベクターが非常に感度のよい順行性標識ツールとして機能した点である。GFP に対する抗体を用いて酵素免疫染色法を行い、シグナルを増強することで、視床ニューロン由来の投射軸索を大脳皮質において明瞭に可視化することができた (図 1E)。

現在では、膜移行性シグナル付き赤色蛍光タンパク (pal-mRFP) を発現するシンドビスウイルスベクターの開発にも成功しており、palGFP シンドビスウイルスとともに、感度の高い順行性トレーサーとして、多数の実験系で利用されている<sup>5~10)</sup>。この過程で、もしウイルス液を十分希釈して、たった一つの神経細胞に感染させることができれば、細胞内染色のような染色像が得られるのではないかと考えた。従来の順行性トレーサーは、注入量に比例して標識の強さが決まるため、ごく少数の神経細胞だけを標識するために注入量を減らすと、細胞体から離れるにつれ軸索の標識が弱くなり、末端まできちんと可視化できない。これに対して、ウイルストレーサーは感染した細胞自身が標識タンパクを大量に合成するため、たった一つの細胞であろうと感染しさえすれば、軸索末端まで強く標識できる。こうして、我々は今まで技術

的に非常に困難であった、長距離投射ニューロンを単一細胞レベルで完全再構築する実験系に着手した。

## 3. シンドビスウイルスベクターを用いた単一神経細胞の完全再構築の実際

学会において単一神経細胞標識の研究成果を発表した際に、よくされる質問が、「どのような手法により、たった一つの神経細胞にのみ、ウイルスを感染させているのか？」と

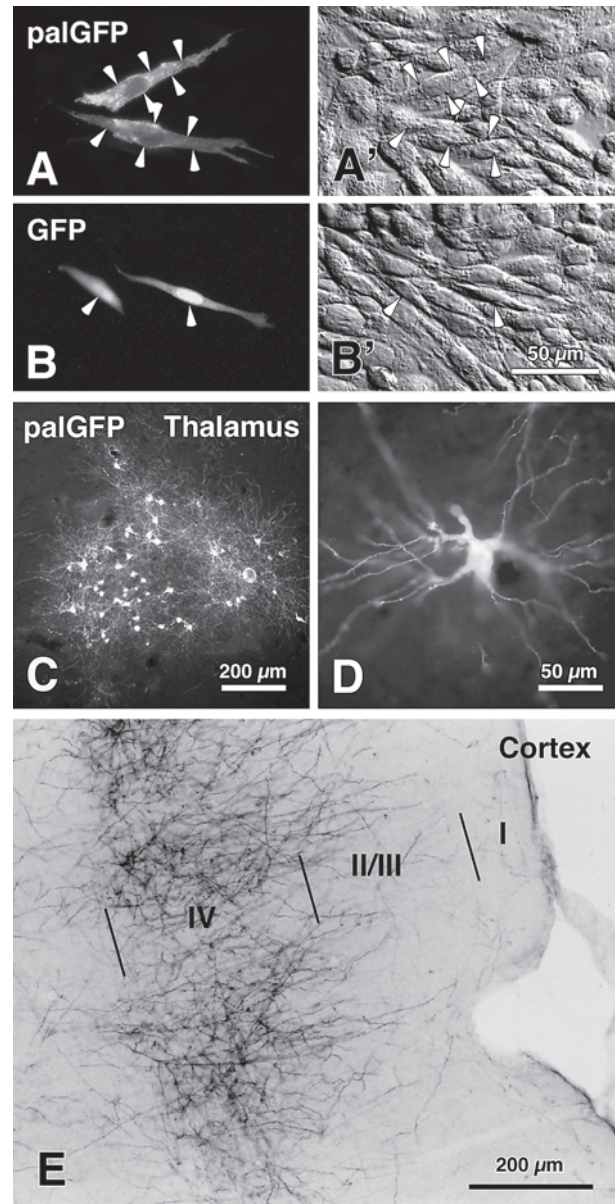


図1 非増殖性 palGFP シンドビスウイルスの作製とニューロンへの感染 (A-E : Furuta et al., 2001<sup>4)</sup> より改変)

A-B' : palGFP あるいは GFP 発現プラスミドをトランスフェクトした CHO 細胞。palGFP は細胞膜に局在して分布したのに対し、修飾されていない GFP は細胞質・核内において、び漫性に分布した。C, D : ラット視床に palGFP シンドビスウイルス液を注入して、視床ニューロンに感染させた。palGFP により、樹状突起および細胞体がゴルジ染色様に標識できた。E : 視床にウイルスを注入した例における大脳皮質の染色像。多くの視床皮質投射軸索が明瞭に可視化されている。

いうものである。残念ながら現時点では、確実に単一の神経細胞だけにシンドビスウイルスを感染させる方法を開発できていない。そのため、多数のラットの脳にウイルス液を注入し、偶然、目的の神経細胞がたった1個か、2個だけ感染して標識され、単一神経細胞由来の軸索が完全に再構築できたサンプルだけをデータとして使用している。したがって、目的の神経細胞がただ一つ感染する確率が少しでも高くなるよう、実験条件を調節することが肝要である。参考のため、筆者が運動性視床核ニューロンを単一細胞標識する際の実験方法と注意点を以下に記す<sup>11)</sup>。

#### (1) 注入用ウイルス液を調整する。

palGFP シンドビスウイルス ( $3 \times 10^5$  infectious units/mL; BHK 細胞において測定)、pal-mRFP シンドビスウイルス ( $3 \times 10^5$  infectious units/mL)、および0.5%牛血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入用ウイルス液とする。

ラット運動性視床核に上記のウイルス液を0.3  $\mu$ L 注入すると、最も効率よく単一の神経細胞が感染したサンプルが得られるが、あくまでこの条件は運動性視床核において最適化されたものである。他の脳領域でも同じ条件が最適とは限らないため、ウイルスの力価、注入量の条件検討を行い、目的の領域において最適化する必要がある。

単一の神経細胞だけが標識されたサンプルを得る確率を向上させるため、二種類のシンドビスウイルスを混合して使用している。もし、一方の蛍光タンパクに標識された神経細胞がゼロ、もしくは多すぎて単一神経細胞トレースに使えない場合でも、もう一方の蛍光タンパクにより、単一の神経細胞が標識されていれば、サンプルとして使用することが可能である。また、希釈液にBSAを混ぜるのは、ウイルス粒子がチューブやガラス針の壁に吸着され力価が低下するのを防ぐ、保護作用を期待するためである。

注入するウイルス液は用時調整とする。時間が経つにつれ力価が減少するため、使い切らずに余った注入用ウイルス液を保存しておいて後日、再使用することは避けるほうがよい。また、ウイルス原液は $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で長期保存可能である。しかし、凍結・溶解により、ウイルス粒子が壊れ、力価が低下してしまうので、なるべく凍結・溶解を繰り返さないよう気をつける。筆者が所属する研究室では、ウイルスの原液 ( $2 \times 10^{10}$  infectious units/mL) を10  $\mu$ L ずつチューブに分注し、使用直前まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存している。少量ずつ分注して保存することで、凍結・解凍の回数を少なくできる。

#### (2) ガラス針に注入用ウイルス液を0.3 $\mu$ L 充填する。

脳実質を大きく傷つけたり出血したりすると炎症が生じ、ウイルスに感染する細胞が激減する。そのため、なるべく細いガラス針を使用し、脳へのダメージを少なくすることが大事である。筆者は、針先端の外径が10~20  $\mu\text{m}$ 、内径が8~15  $\mu\text{m}$  でジャンクが長いガラス針を使用している。また、ガラス針にウイルス液を0.3  $\mu$ L 充填する際には、ハミルトンシリンジ (容量1  $\mu\text{L}$ ; 7001KH) の先端を、細長いディスパー

ザブルのチップ (Eppendorf microloader. 5242 956. 003) に差し込んで使用している。こうすると、ハミルトンシリンジ自体がウイルス液に触れないので、条件検討などで濃度や種類の異なるウイルス液を注入する場合には、ハミルトンシリンジを洗浄する必要がなく、スムーズに実験を行うことができる。(3) 目的の脳領域にウイルス液を注入する。

脳定位固定装置に麻酔をかけたラットを固定し、目的とする脳領域の直上の頭蓋骨を歯科用ドリルで削り、脳表面を露出する。硬膜を傷つけると浮腫や炎症を生じるため、傷つけないよう慎重に行う。ウイルス液を充填したガラス針を運動性視床核に刺入し、0.3  $\mu\text{L}$  のウイルス液を、ゆっくり時間をかけて注入する。

筆者の所属する研究室では、ウイルス液の注入に Picospritzer (General Valve) という装置を使用している。これは、圧縮窒素ガスポンペに接続した電磁弁バルブの制御により、任意の持続時間の空気圧パルスを発生することができる装置である。この装置にガラス針を接続し、空気圧によりガラス針中の液を脳内に注入する。筆者は、装置に供給する窒素ガスの圧力を40 psi (pound per square inch) に固定し、持続時間を30 msec に調節した空気圧パルスを約500回発生させることにより、0.3  $\mu\text{L}$  のウイルス液を約3分かけて注入している。ごく少量ずつ (約1 nL)、何回にも分けて液を注入することにより、注入部位に大きな圧力がかからずに済む。同じ設定の空気圧パルスでも、針の形状によって注入される液量は変化するため、各自でパルスの持続時間を調節する必要がある。(4) ウイルス液の注入から51時間経過した時点でラットを固定する。

シンドビスウイルスはタンパクの発現量が多いため、感染した細胞への毒性が強く、72時間を過ぎる頃には多くの神経細胞が変性し始める<sup>4)</sup>。かといって、早い段階で固定してしまうと軸索末端まできちんと標識されない。上記の51時間というのは、ラットの運動性視床核ニューロンが変性せず、かつ軸索を末端まで完全に標識できる条件である。目的の神経細胞に合わせて、ウイルス注入から固定までの時間を調節する必要がある。

筆者は、固定液として4%ホルマリン、75%飽和ピクリン酸を含む0.1 M リン酸緩衝液を使用し、同じ固定液を用いて $4^{\circ}\text{C}$ 、一晩にて、後固定を行っている。

#### (5) ラットの脳を厚さ40 $\mu\text{m}$ の連続浮遊切片とする。

30%スクロースを含むPBSによりクライオプロテクションを行った後、フリージングミクローームを用いて薄切する。

#### (6) ウイルスに感染し、標識された神経細胞の細胞体を含む切片をピックアップする。

目的の脳領域を含む切片をすべて蛍光顕微鏡下で観察する。シンドビスウイルスの高いタンパク発現能力のおかげで、免疫染色によりシグナルを増強せずとも、palGFPまたはpal-mRFPそのものが発する蛍光により、細胞体と樹状突起を確認できる。

#### (7) 標識された神経細胞が目的のものかどうか、同定する。

標識された細胞体を含む切片について、Propidium iodide もしくは NeuroTrace 500/525 green fluorescent Nissl stain (N-21480 ; Molecular Probes 社) を用いて蛍光ニッスル様染色を行う (図 2A, B).

(8) 免疫組織化学染色法により軸索を可視化する.

シンドビスウイルスはタンパク発現能力が高いとはいえ、何もせずに、そのまま蛍光顕微鏡で観察できるのは細胞体と

樹状突起、および細胞体近傍の軸索くらいで (図 1C, D, 2D), 投射先の軸索を完全に可視化するためにはシグナルを増強する必要がある. GFP または mRFP に対する抗体<sup>10,12)</sup> を使用して、すべての連続切片を酵素免疫染色法により可視化する (図 2D' -H). 筆者は、軸索末端まで完全に軸索を可視化するため、ABC-DAB 染色法に、さらに biotinylated tyramine (BT)-glucose oxidase (GO) amplification (BT-GO シグ

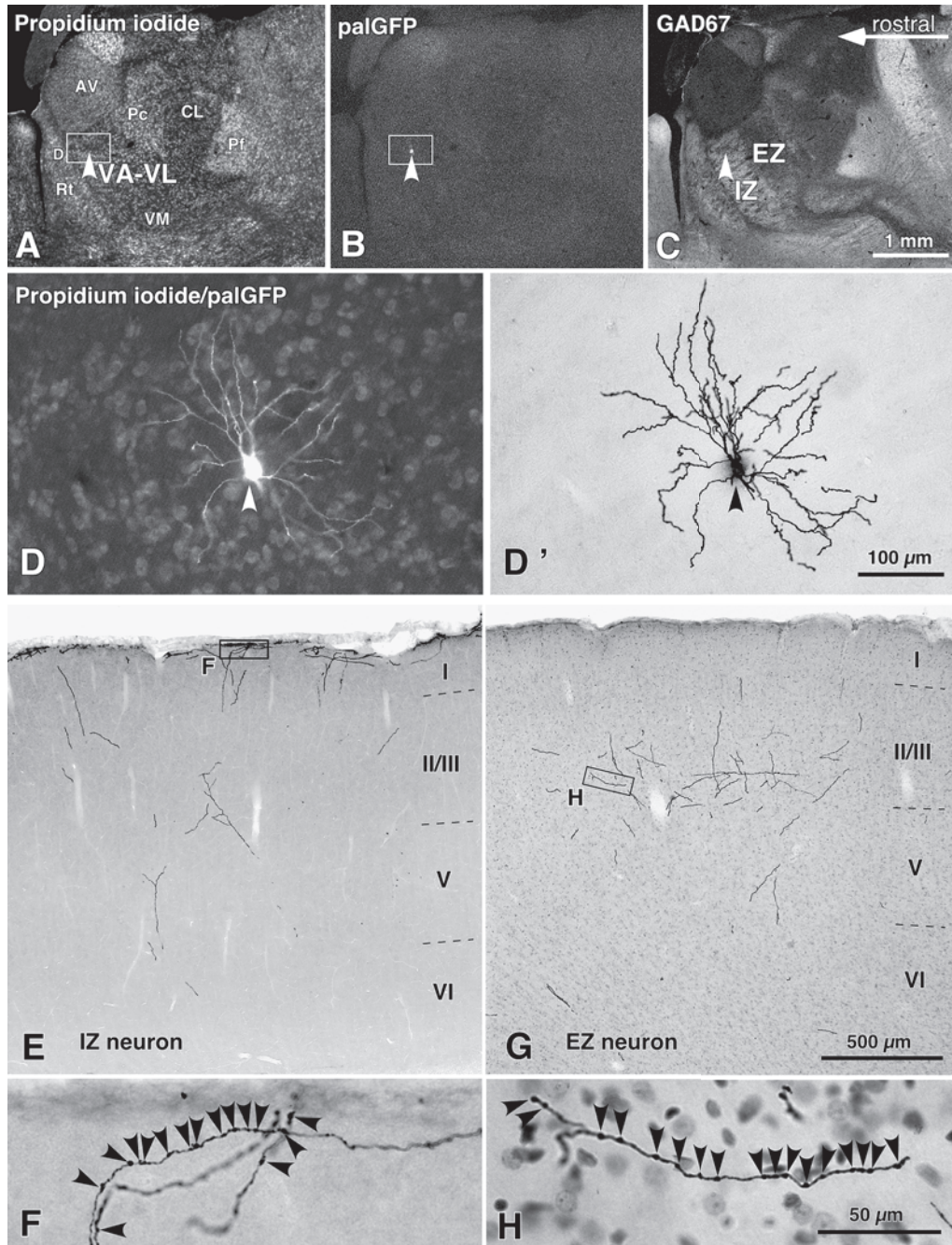


図 2 単一の運動性視床核が palGFP シンドビスウイルスに感染した例 (A-H : Kuramoto et al., 2009<sup>11)</sup> より改変)

ラット運動性視床核, VA-VL 核 (A) の中でも、大脳基底核の出力核からの抑制性終末を主に受ける領域 inhibitory input-dominant zone (IZ; C) において、単一の神経細胞が感染している (A-D ; 矢頭). 自家蛍光では細胞体と樹状突起しか観察されない (D) が、GFP に対する抗体を用いて免疫染色すると、細胞体、樹状突起だけでなく、大脳皮質において視床皮質投射軸索が明瞭に観察され (D'-H), 終末様構造も確認できる (F, H ; 矢頭). EZ, excitatory subcortical input-dominant zone (小脳核からの興奮性入力を主に受ける領域) ; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67 (抑制性, GABA 作動性のマーカー).

ナル増幅法)を組み合わせている<sup>11)</sup>。染色手順およびBT-GOシグナル増幅法の詳細については、図3を参照していただきたい。

(9) 単一神経細胞の完全再構築を行い、形態解析する。

染色の終了した、すべての連続切片を順番通りスライドガラスに貼り付け、封入した後、描画装置を取り付けた明視野顕微鏡下で一枚一枚、切片を観察しながら軸索を再構築し、

軸索長や、ブトン密度の計測など、形態解析を行う(図4)。

以上が、シンドビスウイルスベクターを用いた単一細胞標識法の実際である。難しい特殊な実験技術は必要とされないが、すべてのステップを丁寧に、失敗なく実施することが要求される。例えば、脳を薄切して連続切片を作成する段階で、標識された軸索が分布する切片を一枚でも失うと、軸索の完全再構築が不可能になる。毎回、精度の高い手術を行うよう

### 軸索可視化のための免疫染色のプロトコール

1. すべての連続切片を、1%過酸化水素を含むPBSにて1時間クエンチング
2. PBSで切片を洗う
3. 以下の一次抗体のどちらかと、一昼夜、反応する  
 rabbit anti-GFP antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Tamamaki et al., 2000)  
 rabbit anti-mRFP antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Hioki et al., 2010)  
 抗体希釈用のバッファーとして、0.3% Triton X-100, 0.12% lambda-carrageenan, 1% donkey serum, 0.02% sodium azideを含むPBS (PBS-XCD)を使用する。
4. 0.3% Triton X-100 を含むPBS (PBS-X) で切片を洗う
5. 以下の二次抗体と最低1時間反応する  
 ビオチン標識された goat anti-rabbit IgG antibody (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Vector)  
 抗体希釈用のバッファーとして、PBS-XCDを使用する。
6. PBS-X で切片を洗う
7. ABC Elite (PBS-Xで100倍希釈; Vector) と1時間反応する
8. PBS で切片を洗う
9. 0.1 M リン酸緩衝液 (PB; pH 7.4) で切片を洗う
10. BT-GOシグナル増幅反応  
 BT-GO反応準備用の液に切片を5分間浸す  
 2 mg/mL beta-D-glucose を加えて反応開始  
 30分間反応する
11. 0.1 M PB で切片を洗う
12. PBS で切片を洗う
13. 再びABC Elite と1時間反応する
14. PBS で切片を洗う
15. DAB発色  
 上記のすべての操作を室温で行う。

BT-GO反応準備用の液

1.25  $\mu\text{M}$  biotinylated tyramine, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glucose oxidase (259 U/mg), 1% BSA を含む 0.1 M PB

biotinylated tyramine の作製方法

1. 10.4  $\mu\text{mol}$  (1.83 mg)のtyramine hydrochloride (Sigma)を36.5  $\mu\text{L}$ の dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かす。
2. 10  $\mu\text{mol}$  (3.41 mg) の biotin-NHS (EMD biosciences) を36.5  $\mu\text{L}$ の DMSOに溶かす。
3. (1) と (2) を混合し、一昼夜、室温で攪拌する。
4. 翌日、7  $\mu\text{L}$ の monoethanolamineを混ぜる。
5. 最終的に、125 mM の biotinylated tyramine を含む 80  $\mu\text{L}$ の溶液が作製できる。4°Cで約2ヶ月間、保存可能である。

BT-GOシグナル増幅法の原理

組織タンパクのチロシン残基と結合

通常のABC-DAB染色

**A**

BT-GOシグナル増幅法

**B** 50  $\mu\text{m}$

図3 軸索を末端まで完全に可視化するための免疫染色法、およびBT-GOシグナル増幅法の原理と、biotinylated tyramineの作製方法  
 右下の写真において、BT-GOシグナル増幅を行わなかった切片(A)に比べて、増幅を行った切片(B)では、視床皮質投射軸索が明瞭に観察される。

注意し、ウイルス液の力価、および注入する液量のバラツキをできる限り少なくすることが大切である。また、ウイルス液注入の結果、何個の神経細胞が感染したのかを毎回チェックし、フィードバックをかけて、ウイルスの希釈倍率、注入液量を微調節することも、実験効率の向上のために大事である。

注意しなければならない問題として、シンドビスウイルス

ベクターによる単一細胞標識法は、ゴルジ染色法と同様、目的とする神経細胞がその領域で少数派であった場合には、極端に標識される効率が悪くなるという欠点がある。シンドビスウイルスはランダムに、ほとんどの細胞に感染する。つまり、グリアでも神経細胞でも、種類を選ばず感染する<sup>4)</sup>。このため、多数を占める細胞種ほど標識される確率が高く、少数派の細胞種は標識される確率が低くなる。

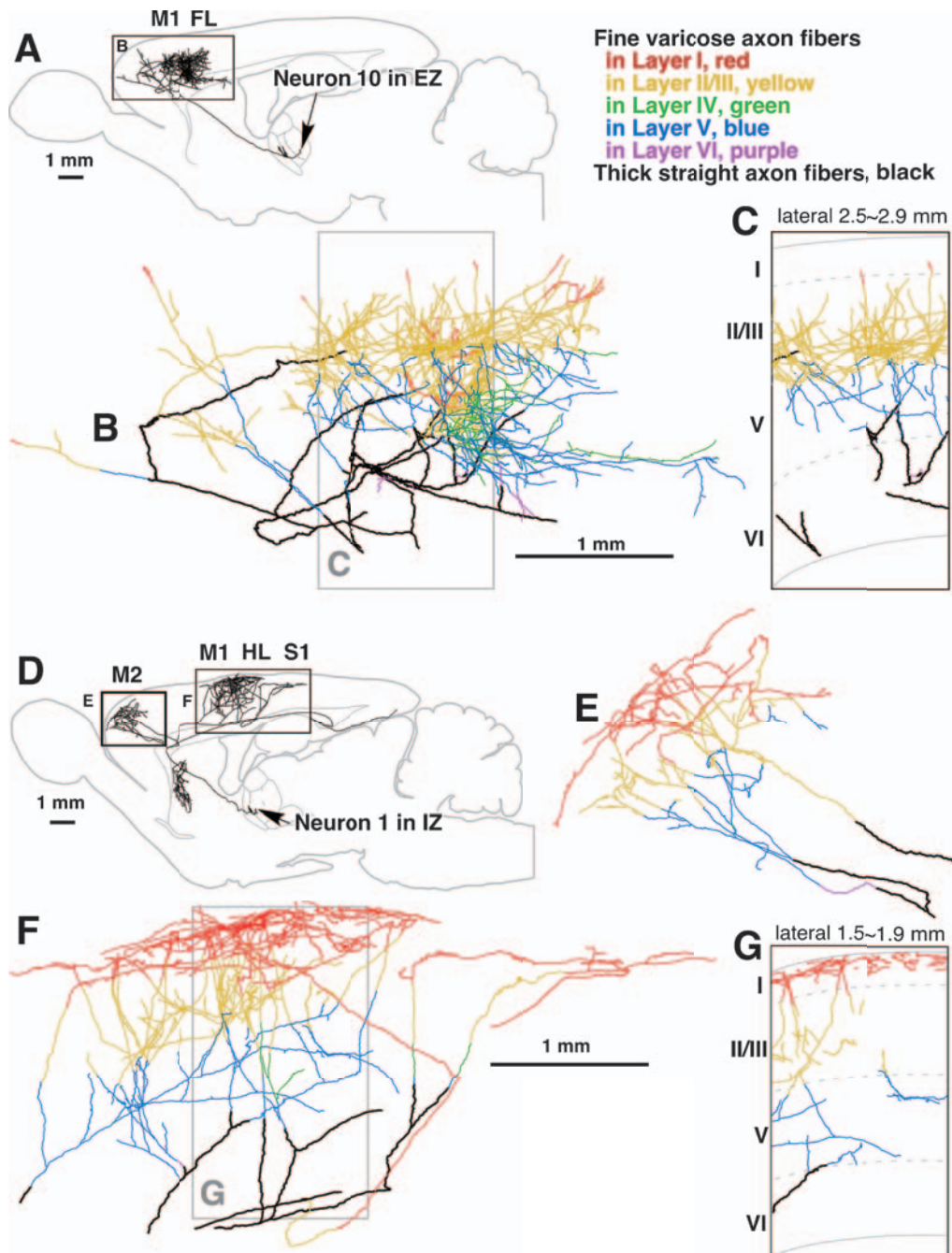


図4 単一視床投射ニューロンの軸索投射の再構築像 (A-G: Kuramoto et al., 2009<sup>11)</sup> より改変)

A-C: EZニューロンは線条体に軸索側枝を出すことなく、大脳皮質の運動関連領域において広範に軸索を分布させる。軸索は皮質第1層にはほとんど分布せず、第2~5層に終始する。D-G: 一方、IZニューロンは、EZニューロンと異なり、線条体に軸索側枝を分布させた。また、大脳皮質では軸索の50%以上が皮質第1層に投射している点もEZニューロンと大きく異なる。運動関連領域を中心にして、広範に軸索を分布させる点はIZニューロンもEZニューロンと同じである。FL, forelimb region of primary somatosensory-motor area; HL, hindlimb region of primary somatosensory-motor area; M1, primary motor area; M2, secondary motor area; S1, primary somatosensory area.

#### 4. 運動性視床核ニューロンの単一細胞レベルでの形態解析の結果

筆者の所属する研究室では、シンドビスウイルスベクターを使用し、さまざまな脳領域において単一神経細胞の完全再構築を試みる研究を行っており、成果が得られつつある<sup>11,13,14)</sup>。ここでは一例として、ラット運動性視床核、VA-VL核の研究成果について解説する<sup>11)</sup>。

先に述べた方法で、シンドビスウイルスベクターをラットVA-VL核に注入し、一個の神経細胞だけを標識し(図2A-D)、免疫染色を行うことで、その視床ニューロンの細胞体と樹状突起だけでなく軸索投射の全体像を可視化できた(図2D'-H)。この研究により、以下のことが新たに判明した(図4)。

- 1) VA-VL核は、小脳核からの興奮性入力を主に受ける領域 excitatory subcortical input-dominant zone (EZ) と、大脳基底核の出力核からの抑制性終末を主に受ける領域 inhibitory input-dominant zone (IZ) に二分されるが<sup>2)</sup>、EZニューロンの樹状突起の分岐の数は、IZニューロンの分岐の数より多い。
- 2) 大脳皮質において、EZニューロンもIZニューロンも運動関連領野を中心として軸索投射していたが、その投射範囲は従来考えられていたものよりもはるかに広範であり、感覚系の視床皮質投射にみられるようなカラム様構造は認められなかった(図4A-G)。この事実は大脳皮質の情報処理単位として従来考えられてきたカラム状のモジュール構造が、少なくとも運動関連皮質への入力に関しては存在していないことを示唆する。
- 3) EZニューロンの軸索は皮質第3層を中心に中間層に分布し(図4B;黄色の線)、IZニューロンの軸索はその50%以上が皮質第1層に分布していた(図4E, F;赤色の線)。したがって、EZニューロンの主なターゲットは錐体ニューロンの基底樹状突起であり、IZニューロンのそれは先端樹状突起であると考えられる。すなわち、VA-VL核の視床皮質投射はカラム構造ではなく、層構造に基づいて組織化されていることが判明した。
- 4) EZニューロンは線条体を通過するものの、いっさい軸索側枝を出さなかったのに対し、すべてのIZニューロンは線条体に多量の軸索側枝を出していた(図4A, D)。

まとめると、EZニューロンを介した小脳からの情報とIZニューロンを介した大脳基底核からの情報は、それぞれ大脳皮質の異なる層に入力する。そして、これら二つの情報は皮質ニューロンの神経回路網において統合され、協調的に働くことで、最終的に皮質脊髄投射ニューロンが適切な運動命令を出力できることが示唆された。このように、1個のニュー

ロンを可視化することによって得られる情報には、ほかの手法によっては得られなかったことが豊富に存在する。

#### 5. おわりに

以上のように、筆者の所属する研究室で最近開発された新しい順行性トレーサー、遺伝子改変シンドビスウイルスにより、今までの手法では非常に困難であった、「長距離投射する単一ニューロンの軸索の完全可視化」が可能となった。しかしながら、目的とする神経細胞に、しかも単一の神経細胞だけに、シンドビスウイルスを感染させる方法は確立できておらず、サンプルが得られる効率はあまりよくない。そのため、この手法による単一神経細胞レベルでの形態解析には、かなりの実験量を必要とするが、最終的には、それに見合った興味深い結果を得ることができる。

#### 文 献

- 1) Deniau, J.M., Kita, H. and Kitai, S.T.: *Neurosci. Lett.*, 144, 202-206 (1992)
- 2) Kuramoto, E., Fujiyama, F., Nakamura, K.C., Tanaka, Y., Hioki, H. and Kaneko, T.: *Eur. J. Neurosci.*, 33, 95-109 (2011)
- 3) Moriyoshi, K., Richards, L.J., Akazawa, C., O'Leary, D.D.M. and Nakanishi, S.: *Neuron*, 16, 255-260 (1996)
- 4) Furuta, T., Tomioka, R., Taki, K., Nakamura, K., Tamamaki, N. and Kaneko, T.: *The J. Histochem. Cytochem.*, 49, 1497-1507 (2001)
- 5) Nakamura, K., Matsumura, K., Hübschle, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogkői, Z., König, M., Thiel, H.J., Gerstberger, R., Kobayashi, S. and Kaneko, T.: *J. Neurosci.*, 24, 5370-5380 (2004)
- 6) Ito, T., Hioki, H., Nakamura, K., Tanaka, Y., Nakade, H., Kaneko, T., Iino, S. and Nojyo, Y.: *J. Comp. Neurol.*, 502, 113-125 (2007)
- 7) Kuramoto, E., Fujiyama, F., Unzai, T., Nakamura, K., Hioki, H., Furuta, T., Shigemoto, R., Ferraguti, F. and Kaneko T.: *J. Comp. Neurol.*, 500, 908-922 (2007)
- 8) Furuta, T., Timofeeva, E., Nakamura, K., Okamoto-Furuta, K., Togo, M., Kaneko, T. and Deschênes, M.: *J. Neurosci.*, 28, 1789-1797 (2008)
- 9) Nishino, E., Yamada, R., Kuba, H., Hioki, H., Furuta, T., Kaneko, T. and Ohmori, H.: *J. Neurosci.*, 28, 7153-7164 (2008)
- 10) Hioki, H., Nakamura, H., Ma, Y.F., Konno, M., Hayakawa, T., Nakamura, K.C., Fujiyama, F. and Kaneko, T.: *J. Comp. Neurol.*, 518, 668-686 (2010)
- 11) Kuramoto, E., Furuta, T., Nakamura, K.C., Unzai, T., Hioki, H. and Kaneko, T.: *Cereb. Cortex*, 19, 2065-2077 (2009)
- 12) Tamamaki, N., Nakamura, K., Furuta, T., Asamoto, K. and Kaneko, T.: *Neurosci. Res.*, 38, 231-236 (2000)
- 13) Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K.C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R. and Kaneko, T.: *J. Neurosci.*, 29, 444-453 (2009)
- 14) Fujiyama, F., Shon, J., Nakano, T., Furuta, T., Nakamura, K.C., Matsuda, W. and Kaneko, T.: *Eur. J. Neurosci.*, 33, 668-677 (2011)