

# 学 位 論 文 要 約

In vivo electroporation to physiologically identified deep brain regions in postnatal mammals

(生後哺乳類の生理学的に同定した脳深部領域へのin vivo電気穿孔法)

(著者：大村菜美、川崎一葉、佐藤武正、畠義郎)

平成26年 Brain Structure and Function 掲載予定

電気穿孔法は培養細胞や生体の様々な臓器への遺伝子導入技術として広く使われている。哺乳類の脳における電気穿孔法は、主に齧歯類で行われ、胎生期の脳に遺伝子導入を行う子宮内電気穿孔法が主流である。生後の脳への電気穿孔法はそのほとんどが出生直後の動物で行われている。発達期や成熟後の動物で行われる電気穿孔法は報告が少なく、また遺伝子導入できる場所が皮質、海馬、脳室に面した部位と限定されており、視床のような脳深部にある構造を標的にすることは難しいとされてきた。我々は生後の動物において電気生理学的に同定した脳領域の少数の細胞への遺伝子導入を可能にする新しいin vivo 電気穿孔法を開発した。

## 方 法

先端内径15~20 $\mu\text{m}$ のガラスピペットを作成して、電気生理学的記録が可能なオートインジェクターに装着し、先端から数 $\mu\text{l}$ のプラスミド液を充填した。プラスミドは、CAGプロモータ下でEGFPを発現するプラスミド (pCAG-EGFP) を用いた。プラスミド濃度が0.2~2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように調製し、場合により、神経トレーサーや核膜孔を拡張する試薬 (TCHD) を混合した。生後27日齢から405日齢のマウス、あるいは生後34日齢から38日齢のネコを用い、プラスミド液を充填したガラスピペットを用いて麻酔下で電気生理学的記録を行い、標的とする視床外側膝状体の位置を生理学的に同定した。その後、ガラス管の位置をそのまま変えず、オートインジェクターに接続されている配線を記録用のものから電気パルスを与えるものへつなぎかえた。そして、プラスミド液を微量圧注入し、すぐにガラス管の先端から電気パルスを与えた。数日~数週間後に動物を灌流固定して、脳を取り出し、凍結脳切片を作成した。必要に応じてEGFPの免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

## 結 果

電気穿孔法を行ってから2週間後に標的とした視床外側膝状体を観察すると、プラスミ

ド溶液に混合した神経トレーサーで標識された部位付近にEGFP発現ニューロンを確認できた。また、外側膝状体ニューロンの投射先である一次視覚野を観察すると、EGFP発現軸索が見られ、軸索膨大部や軸索末端等、微細な構造も確認できた。電気穿孔のパラメーターの影響を調べるために、電圧、プラスミド濃度を変えて調べたが、成功率に変化は無く、約36%であった。また、核輸送効率を増加させる試薬であるTCHDを併用しても成功率は変化しなかった。しかし、TCHDを用いた場合、発現蛍光強度が高くなる傾向が見られ、免疫組織化学染色無しでも標識ニューロンの樹状突起や軸索を観察することができた。さらに、この方法はマウスだけでなくネコにも適用することができ、外側膝状体の特定の層を標的として数個の細胞に遺伝子導入することができた。

## 考 察

今回開発した電気穿孔法を用いると、電気生理学的に同定した脳領域において、少数のニューロンのみで遺伝子導入できるため、標的とする領域の個々のニューロンの詳細な形態解析が可能である。生後動物における少数のニューロンへの遺伝子導入法としてこれまでに単一ニューロン電気穿孔法が報告されているが、それらはパッチクランプ法や二光子励起顕微鏡を用いたin vivoイメージング法、juxtacellular記録法のような高度な技術が必要とする。今回開発した方法は一般的な細胞外記録法の技術があれば可能であり、比較的短時間で処置が完了する。

また、この方法は生後発達期の動物に用いることはできたが、生後60日齢以上の成熟動物には適用できなかった。この原因として、ニューロンの成熟により細胞膜の電気パルスへの感受性が低下したことや、細胞外マトリクスの発達によりプラスミドが細胞膜へ接触しにくいことが予想される。しかし、生後7週齢の動物では遺伝子導入が可能であることや、遺伝子導入されたニューロンにおいて処置から1か月後においても十分な蛍光発現が観察できたことから、成熟期における神経回路形態の観察も十分可能であると考えられる。さらに、この方法を他の薬理的あるいは遺伝的な操作と組み合わせることで、神経回路の発達や可塑性に関与する分子メカニズムの解明に大いに役立つと期待できる。

## 結 論

今回開発したin vivo電気穿孔法は、生後発達期動物において電気生理学的に同定した脳深部領域の数個のニューロンに遺伝子導入することが可能であった。この遺伝子導入法は、これまであまり行われていなかった脳深部領域や生後発達期の動物、様々な動物種における、遺伝子導入のための良いツールになると考えられる。