

投射先特異的な単一神経細胞を起点とした  
狂犬病ウイルストレーシング法

正木 佑治

名古屋大学大学院

創薬科学研究科 基盤創薬学専攻 創薬生物科学講座

細胞薬効解析学分野



# 目次

1. 緒語.....	1
2. 実験方法.....	3
3. 内因性信号光学的イメージング.....	13
3.1 イメージングウィンドウを用いた内因性信号光学的イメージング.....	15
3.2 開頭手術を行わない内因性信号光学的イメージング.....	17
3.3 考察.....	19
4. 単一神経細胞ネットワーク標識法.....	20
4.1 単一神経細胞ネットワーク標識法の効率.....	21
4.2 TVA の発現量とアイソフォームの比較 ( <i>in vitro</i> ) .....	24
4.3 TVA800/TVA950 高発現細胞における単一神経細胞ネットワーク標識効率.....	25
4.4 考察.....	27
5. 領域特異的な単一神経細胞ネットワーク.....	29
5.1 V1 単一神経細胞ネットワークの解剖学的解析.....	30
5.2 高次視覚野単一神経細胞ネットワークの解剖学的解析.....	33
5.3 考察.....	34
6. 投射先特異的な単一神経細胞ネットワーク.....	35
6.1 領域および投射先を限定した神経細胞標識.....	35
6.2 PM 投射 V1 単一神経細胞ネットワークの標識.....	37
6.3 考察.....	38
7. 単一神経細胞ネットワークの機能的解析.....	39
7.1 覚醒行動下のスパインイメージング.....	40
7.2 単一神経細胞ネットワークの GCaMP 標識.....	42
7.3 考察.....	43
8. 総括.....	44
引用文献.....	46

# 1. 緒語

脳内では、多様な神経細胞がシナプスを介して接続し、複雑な神経回路を構成している。カハールらはゴルジ染色法を用いた脳切片の顕微鏡観察を行い、神経細胞は一つ一つが独立した細胞であり、多数の神経細胞が相互に情報伝達することで、脳内の情報処理を行っていることを予見した。以降、神経科学は神経細胞標識法と顕微鏡の開発とともに発展し、電気生理学、イメージング、光遺伝学を組み合わせることで、(1) 神経細胞、(2) 回路モチーフ、(3) 領野間をまたぐ大規模な神経回路、(4) 全脳、といった様々なスケールで脳の解析が進められてきた。

ヒト脳内にはおよそ 1000 億個の神経細胞が配置されている。単一神経細胞は、それ自体が高度な情報処理単位であるが、神経細胞同士がシナプス接続し、神経回路を構成することで、特定の機能に特化した情報処理を実行している。回路モチーフは、神経回路の基本的な演算処理構造であり、多様な動物種の様々な脳領域で共通して使用されている。つまり、神経回路は回路モチーフの組み合わせにより構成されており、神経回路の基本基盤を理解するためには、生体内の特定の回路に組み込まれた回路モチーフを同定し、その接続様式と動作原理を明らかにする必要がある。これまで、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) やレンチウイルスベクター、cholera toxin subunit B (CTB)、retrobeads などの神経細胞トレーサーを用いて大規模な神経回路の解析が行われてきた。これらのトレーサーは神経細胞の細胞体または軸索末端から取り込まれ、神経細胞を標識する。そのため、神経細胞トレーサーを特定の脳領域に微量注入し、その脳領域へ入出力する神経細胞群を標識することができる。しかしながら、これらのトレーサーではシナプスを介して接続する神経回路を直接標識することは不可能である。一方で、ウイルスベクターの一つである狂犬病ウイルスベクターは、シナプスを介してシナプス前細胞へと逆行性に感染する経シナプス感染能を有していることから、神経回路を標識する有用なツールとして広く使用されてきた。

脳の多様な機能は、神経回路における情報処理に基づいて形成されている。感覚器官から受け取った情報は電気信号に変換され、並列階層的に構成された回路で処理される。並列情報処理を行うような大規模な神経回路には、さまざまな回路モチーフから構成される独立したサブネットワークが組み込まれている。一つの脳領域内には、独立したサブネットワークが空間的に重なり合って存在し、サブネットワークごとに異なる領域へと情報出力をしている。したがって、神経回路の接続様式と情報処理様式を理解するためには、神経回路の機能的な最小単位である回路モチーフとその投射先を対応付けた解析をする必要がある。また、脳内の単一神経細胞は数百あるいは数千のシナプス前細胞からの入力を統合し、特定の神経細胞へ出力をしている。そのため、特定の単一神経細胞へ入力する全ての神経細胞を同定し、解析可能なアプローチが必要である。

生体内の特定の単一神経細胞へシナプス接続する個々の神経細胞を同定し、解析する手法として、単一神経細胞ネットワーク標識法 (単一神経細胞を起点とした狂犬病ウイルストレーシング) がある。この手法は、生体内単一神経細胞エレクトロポレーション法による単一

神経細胞への遺伝子導入と、改変型狂犬病ウイルスベクターを用いた単シナプス性トレーシングを組み合わせることで実現される。しかし、この標識法は複雑で実験効率が低いことが課題であった。著者は、分子生物学的な改良により単一神経細胞ネットワーク標識法の効率を改善する条件を見出した。さらに、内因性信号光学的イメージングと AAV を用いた逆行性神経細胞標識を組み合わせることで、投射先を同定した単一神経細胞のさらに上流の神経細胞群を標識する狂犬病ウイルストレーシング法を考案した。本手法は、単一神経細胞がどのような細胞集団からの入力を統合し、統合した情報をどの領域へ伝達するかを明らかにすることが可能である。本研究は、生体内におけるウイルス感染様式について重要な知見を提供すると同時に、神経回路の情報処理様式の理解に大きく貢献すると期待される。

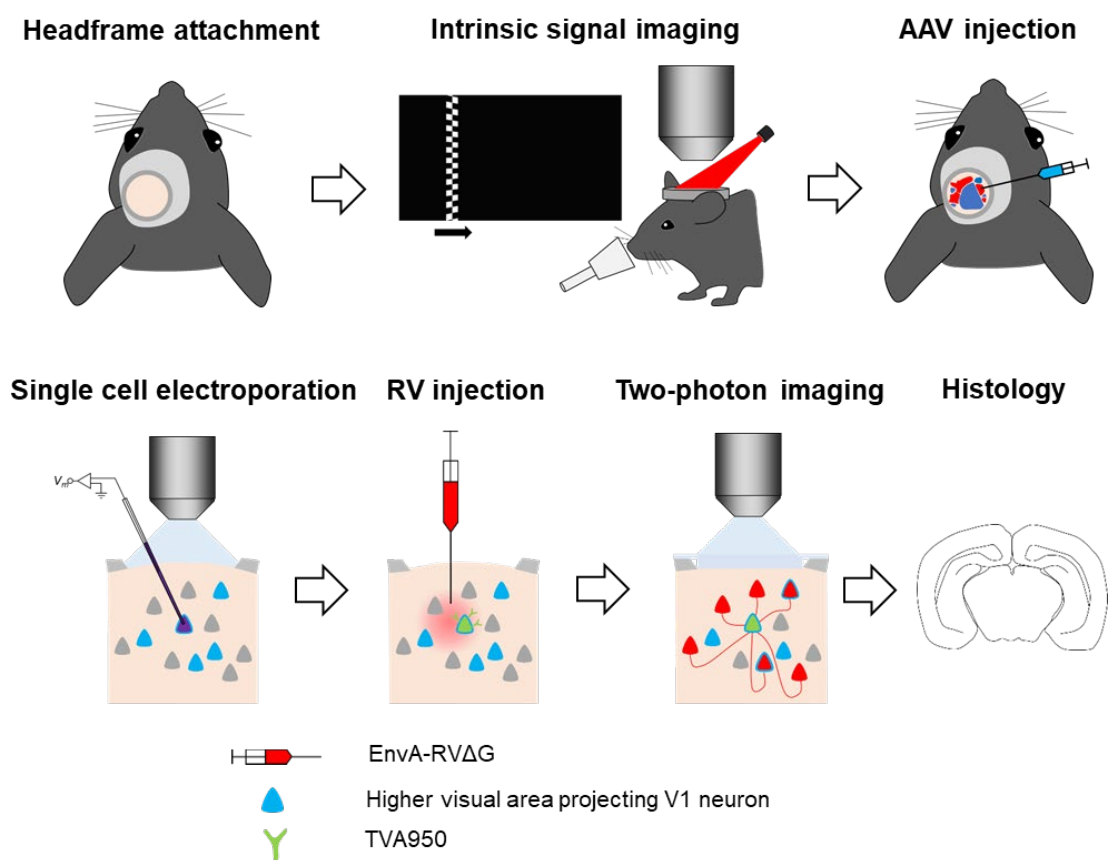


Figure 1. Graphical Abstract

## 2. 実験方法

### 2.1 プラスミドの作製

既報のプロトコールに従った (Osakada et al., 2011; Suzuki et al., 2020; Okigawa et al., 2021)。すべてのプラスミドは、PCR thermal cycler (Dice Touch, TaKaRa) と PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa, Tokyo, Japan) を使用し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により作製した。プラスミドまたは PCR 産物を制限酵素 (New England BioLabs, Ipswich, MA) 処理した後、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs) または DNA Ligation Kit Mighty Mix (TaKaRa) を用いてクローニングを行った。AAV プラスミドは stbl3 *Escherichia coli* cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、狂犬病ウイルスベクタープラスミドは XL10-Gold *Escherichia coli* cells (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)、electroporation および mRNA 発現量の定量に用いたプラスミドは *E. coli* DH5 $\alpha$  *E. coli* cells (TOYOBO, Japan) を使用して形質転換した。大腸菌は ampicillin (100  $\mu$ g/mL) 含有 LB プレートまたは LB 培地 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) で培養し、Genopure Plasmid Midi Kit (Roche, USA) を用いてプラスミド抽出を行った。プラスミドは、Eurofins Genomics 社に DNA シーケンシングを委託し、目的プラスミドが作製できていることを確認した。

生体内の単一神経細胞エレクトロポレーションに用いるプラスミドは、以下の方法で作製した。pEF1a-TVA800 と pEF1a-TVA950 は、TVA800 (pCMMP-TVA800, cat# 15778; Addgene) と TVA950 (pCAG-YTB, cat# 26721; Addgene) をコードしている配列を pEF1a にサブクローニングして作製した。pCAG-oG は、oG (AAV-CAG-FLEX-oG-WPRE-SV40pA, cat# 74292; Addgene) をコードしている配列を pCAG-CHR2-MBD (cat# 21484; Addgene) にサブクローニングして作製した。

### 2.2 実験動物

動物の扱いは名古屋大学動物実験指針に準拠した。本研究におけるすべての動物実験は、名古屋大学動物愛護委員会の承認を得ている。動物愛護管理法で定められている動物実験に関する 3R の原則、すなわち、使用する動物数の削減 (Reduction)、代替試験法の積極的な採用 (Replacement)、苦痛の軽減 (Refinement) に、実験者の責任 (Responsibility) を加えた 4R に配慮して、研究を計画・実施した。C57BL/6J マウスは Nihon SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。これらの動物は、温度制御された部屋 (24  $\pm$  1 $^{\circ}$ C) で、12 時間の明暗サイクルのもと、餌と水を自由に摂取できる状態で飼育した。実験は、8 週齢以上の雌雄マウスを用いた。

### 2.3.1 EnvA-pseudotyped RVΔG vector の作製

EnvA-pseudotyped RVΔG (EnvA-RVΔG)は、既報のプロトコールに従い作製した (Osakada et al., 2011; Osakada and Callaway, 2013)。

### 2.3.2 cDNA から G 欠損狂犬病ウイルスベクター(RVΔG)の再構成

B7GG 細胞 を 10-cm dish に播種した ( $3.3 \times 10^6$  cells/dish, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。24 h 後、培地を 6.0 mL の serum-free DMEM (WAKO, Cat# 043-30085) に置換し、Lipofectamine2000 (Thermo fisher scientific, Cat# 11668-019) を用いて、pcDNA-B19G、pcDNA-B19N、pcDNA-B19P、pcDNA-B19L、pSAD-ΔG-DsRedexpress をトランスフェクションし、その 6 h 後に 10 mL の 10% FBS/DMEM に置換した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, overnight)。この日を Day0 とし、Day 1 に、ディッシュを 35°C, 3% CO<sub>2</sub> のインキュベータに移動した (overnight)。Day 2 に、細胞を 15-cm dish に再播種した (35°C, 3% CO<sub>2</sub>)。Day 3 に、培地を 24 mL の 10% FBS/DMEM に置換した。Day 5 に 5 mL の 10% FBS/DMEM を加え、Day 7 に培地上清を回収し、24 mL の 10% FBS/DMEM を加えた。Day 9 に 5 mL の 10% FBS/DMEM を加え、Day 11 に再び培地上清を回収した。培養期間中は、蛍光タンパク質陽性細胞がクラスター状に観察された。

### 2.3.3 G 欠損狂犬病ウイルスベクター(RVΔG)の増幅

B7GG 細胞 を 3 枚の 15-cm dish にそれぞれ播種した ( $1.2 \times 10^6$  cells/dish, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。24 h 後に、2.3.2 で回収した培地上清を 3 等分しそれぞれの 15-cm dish に添加し、6 h 後に培地を 24 mL の 1% FBS/DMEM に置換した (35°C, 3% CO<sub>2</sub>)。この日を Day 0 とし、Day 2 に 3 mL の 1% FBS/DMEM を加え、Day 4 に培地上清を回収し、24 mL の 1% FBS/DMEM を加えた。Day 6 に再度培地上清の回収を行った。

B7GG 細胞 を 10 枚の 15-cm dish にそれぞれ播種した ( $1.2 \times 10^6$  cells/dish, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。24 h 後に Day 4, 6 で回収した培地上清を 10 等分しそれぞれの 15-cm dish に添加し、6 h 後、培地を 24 mL の 1% FBS/DMEM に交換した (35°C, 3% CO<sub>2</sub>)。3 日後に 3 mL の 1% FBS/DMEM を加え、2 日間培養後に培地上清を回収した。

### 2.3.4 G 欠損狂犬病ウイルスベクター(RVΔG)エンベロープの EnvA-偽型化

BHK-EnvA 細胞を 8 枚の 15-cm dish にそれぞれ播種した ( $1.2 \times 10^6$  cells, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。24 h 後に、2.3.3 で回収した培地上清を 8 等分し、それぞれの 15-cm dish に添加した (添加する上清は 20 mL を超えないようにした)。6 h 後、15-cm dish 1 枚に対して 20 mL の phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、5 ml の 0.25% trypsin-EDTA で剥がした細胞を 10 枚の 15-cm dish に再播種した (35°C, 3% CO<sub>2</sub>)。この日を Day 0 とし、Day 1 に培地を 24 mL の 10% FBS/DMEM に置換し、Day 3 に 3 mL の 10% FBS/DMEM を加え 2 日間培養し、Day 5 に培地上清を回収した。

### 2.3.5 EnvA-RVΔG ウイルス溶液の濃縮

2.3.4 で回収した培地上清を 2 回超遠心することでウイルス液 (EnvA-RVΔG-DsRed) を濃縮した。1 回目は、6 本のチューブに培地上清を 37 mL ずつ添加し超遠心を行った (Beckman Coulter; SW 28 Ti Swinging-Bucket Aluminum Rotor, 19,400 rpm, 4°C, 2 h)。遠心後、上清を除き、氷上でそれぞれのチューブに 300 μL の HBSS (-) (Thermo Fisher Scientific, Cat# 14025092) を添加し、懸濁した。2 回目の超遠心を行うために、1 本のチューブに 2.5 ml の 20% sucrose (WAKO, Cat# 193-00025) /HBSS を添加し、300 μL × 6 tubes の再懸濁液を添加し、超遠心した (Beckman Coulter; SW 28 Ti Swinging-Bucket Aluminum Rotor, 21,000 rpm, 4°C, 2 h)。遠心後、上清を除き、チューブに 70 μL の HBSS (-) を添加し、パラフィルムで覆った状態でインキュベートした (4°C, 30 min-1 h)。ウイルス液を再懸濁後 2 μL ずつエッペンチューブに分注し、使用するまで -80 °C で保存した。

### 2.3.6 EnvA-RVΔG の力価測定

HEK-TVA 細胞 および HEK293t 細胞を 24-well plate に播種し、24 h インキュベーションした ( $5.0 \times 10^4$  cells/well, 10% FBS/DMEM; 500 μL/well, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。2.3.5 で分注したウイルス液を 10% FBS/DMEM を用いて 10 倍ずつ段階希釈し、希釈液を 250 μL/well ずつ添加した。添加した 72 h 後に、DsRed 陽性 HEK-TVA 細胞数が 200 cells/well 以内の希釈条件において、DsRed 陽性 HEK-TVA 細胞数を計数し、infectious units/mL を計算した。HEK293t 細胞は、unpseudotyped-RVΔG が混入していないかを確認するために使用した。本研究で使用した EnvA-RVΔG ベクターの力価は、 $2.4 \times 10^9$  infectious units/mL であった。

高力価のウイルスベクターは、単一神経細胞ネットワーク標識法に必須であり、 $10^9$  infectious units/mL 以上が推奨される。力価を上げるために、2.3.5 においてウイルスペレットを再懸濁する HBSS の容量を少なくした。ウイルスベクターの品質 (純度) を保証するために、以下の基準を用いた。(1) HEK293t 細胞へ感染しない、(2) TVA 非発現下でマウス脳に 200 nL 微量注入し、2 週間後に DsRed 陽性細胞が認められない。

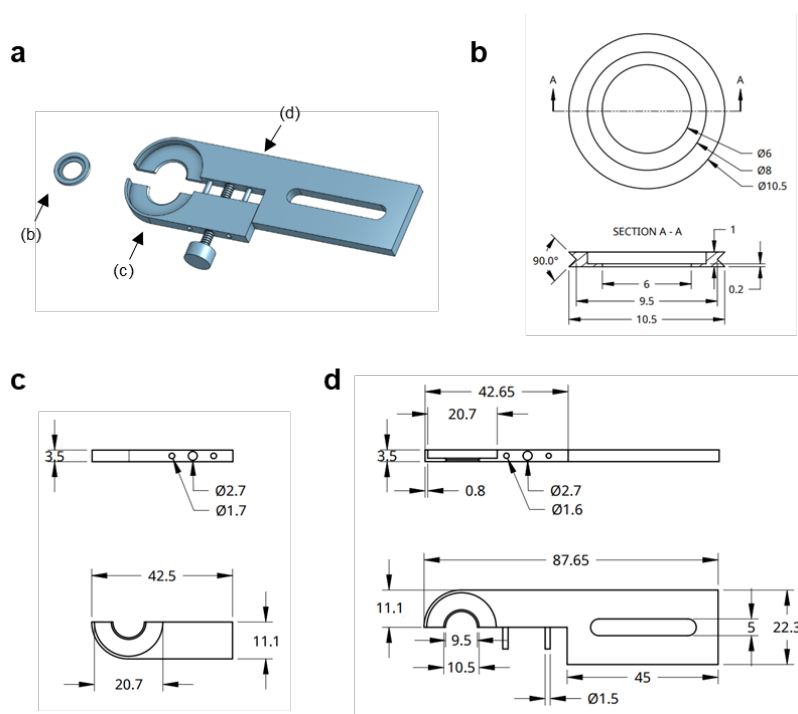
## 2.4 AAV の作製

AAV は、既報のプロトコールに従い作製した (Suzuki et al., 2020)。HEK293t 細胞を 3 枚の 15-cm dish にそれぞれ播種した ( $1.2 \times 10^7$  cells, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。24 h 後に、pHelper (7.5 μg, Cell Biolabs, USA)、AAV2-retro rep/cap vector (5.0 μg)、pAAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAG×3 (2.0 μg) を triple-transfection しウイルスベクターを作製した。トランスフェクションした 72 h 後に、ウイルス産生細胞を回収した。凍結融解法を用いて細胞破碎を行い、iodixanol OptiPrep (Alere Technologies, Scotland) の勾配に載せ、遠心分離して AAV を精製した。ウイルス液は、使用するまで -80 °C で保存した。この研究で使用した AAV2-retro ベクターの力価は、 $6.6 \times 10^{12}$  viral genome/mL であった。



## 2.5 ヘッドフレームの取り付け

既報のプロトコールに従い取り付けした (Osakada et al., 2011; Onda et al., 2021)。マウスは三種混合麻酔薬により麻酔をかけ (10 mL/kg, intraperitoneally)、眼球は眼軟膏 (Ofloxacin; TOA Pharmaceuticals, Japan) を塗布して保護した。三種混合麻酔薬は medetomidine hydrochloride (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Domitol; Meiji Seika)、midazolam (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Dormicum; Maruishi Pharm) および butorphanol (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Vetorphale; Meiji Seika) を PBS により調整した。マウスの体温は、ヒートパッドを用いて維持した。頭部を剃毛し、頭皮を除去した。局所麻酔薬 (Lidocaine, Nissin, Japan) を染み込ませた綿棒を用いて骨膜を拭き取り、除去した。チタン製のヘッドフレーム (Fig. 2-1) を頭蓋骨上に透明な歯科用セメント (Super Bond, cat# 204610402CL, cat# 204610557; Sun Medical, Japan) を用いて固定した。手術終了後に、拮抗薬 (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Mepatia; Meiji Seika) を腹腔内注射し、麻酔から回復させた。



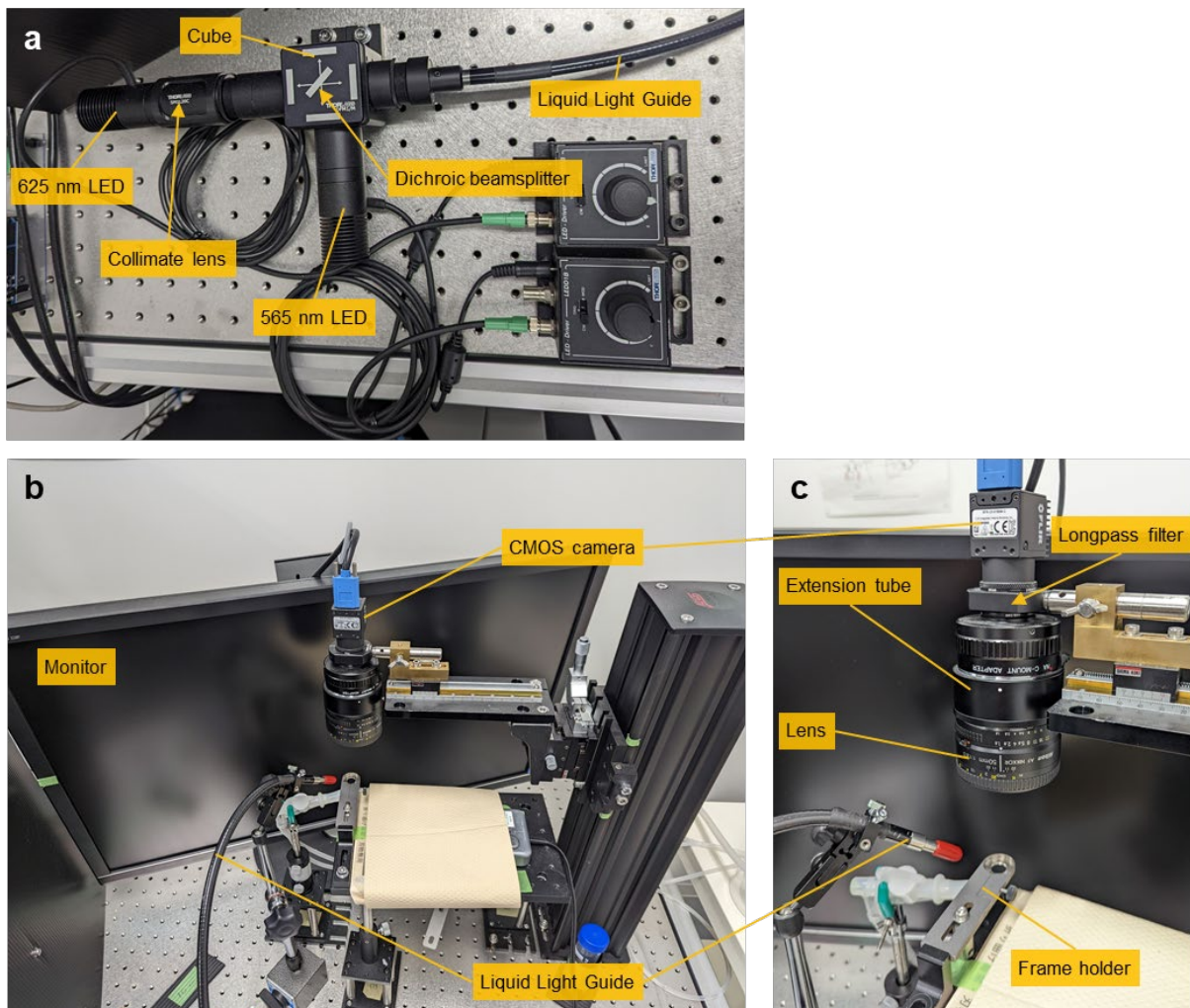
**Figure 2-1. The mouse head frame and frame holder**

(a) A 3D view of the mouse head frame and frame holder. (b–d) The blueprints of the three components. The linear measures are in units of millimeters.

## 2.6. 内因性信号光学的イメージング

既報のプロトコールに従いシステムを構築した (Kalatsky and Stryker, 2003; Garrett et al., 2014; Juavinett et al., 2017)。マウスは isoflurane (Cat# 099-06571; Wako, Japan) によって麻酔をかけ、CMOS カメラ (BFS-U3-51S5M-C; FLIR Systems, USA) 下に頭部固定した。カメラには、50 mm f/1.8D レンズ (Nikon)、接写リング (PK-13; Nikon)、495 nm ロングパスフィル

ター (FGL495M; Thorlabs) を装着した。565 nm LED (M565L2; Thorlabs) 照射下で脳表面の血管画像を、600 nm ロングパスフィルター (FELH0600; Thorlabs) 透過後の 625 nm LED (M625L3; Thorlabs) 照射下で内因性信号を取得した。LED の光量はコリメートレンズ (ACL2520U-A; Thorlabs) で増強し、ライトガイド (LLG0538-4; Thorlabs) で送達した。水平および垂直方向のレチノトピーマップを取得するために、液晶モニター (328P6A; Philips, Netherlands) へ垂直または水平のバー (チェッカーフラッグ柄) が一方向へ動く視覚刺激を呈示した。視覚刺激はモニターにて、垂直のバーが①左から右、②右から左、水平のバーが③上から下、④下から上、へ移動する刺激を用いた (各方向 10 回連続呈示)。CMOS カメラの焦点は脳表面血管より 1750  $\mu\text{m}$  下に設定した。サインマップを算出し、一次視覚野と複数の高次視覚野領域を同定した。視覚刺激は MATLAB (Mathworks) および Psychtoolbox 3 (Brainard, 1997; Pelli, 1997; Kleiner et al, 2007) を用いて生成した。



**Figure 2-2. Intrinsic signal optical imaging setup**

(a) Lighting system. (b) Imaging rig overview. (c) Camera setup.

RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
赤色 LED→キューブ		
625 nm, 700 mW (Min) Mounted LED, 1000 mA	Thorlabs	M625L3
T-Cube LED ドライバ、最大駆動電流 1200 mA (電源別売り)	Thorlabs	LEDD1B
T-Cube 用電源、1 台用、15 V	Thorlabs	TPS001
側面アクセススロット付き SM1 レンズチューブ、ネジ深さ 50.8 mm、固定リング 2 個付属	Thorlabs	SM1L20C
Aspheric Condenser Lens, Ø25 mm, f=20.1 mm, NA=0.60 ARC: 350-700 nm (SM1L20C の中に 入れる)	Thorlabs	ACL2520U-A
長さ調整機能付き レンズチューブ、Ø25 mm~Ø25.4 mm(1 インチ)光学素子用、移動量 7.9 mm	Thorlabs	SM1V05
Ø25.0 mm Premium Longpass Filter, Cut-On Wavelength: 600 nm (SM1V05 の中に入れる)	Thorlabs	FELH0600
SM1 レンズチューブスペーサ、長さ 25.4 mm	Thorlabs	SM1S10
緑色 LED→キューブ		
565 nm, 880 mW (Min) Mounted LED, 1000 mA	Thorlabs	M565L3
T-Cube LED ドライバ、最大駆動電流 1200 mA (電源別売り)	Thorlabs	LEDD1B
T-Cube 用電源、1 台用、15 V	Thorlabs	TPS001
SM1 レンズチューブスペーサ、長さ 25.4 mm	Thorlabs	SM1S10
キューブ		
30 mm ケージ用キネマティック蛍光フィルターキューブ	Thorlabs	DFM1/M
シングルエッジ Dichroic ビームスプリッター	Semrock	FF593-Di03-25x36
キューブ→ファイバー		
SM1 レンズチューブ、ネジ深さ 12.7 mm、固定リング 1 個付属	Thorlabs	SM1L05
N-BK7 Plano-Convex Lens, Ø1", f = 30.0 mm, AR Coating: 350 - 700 nm(集光レンズ, SM1L05 の中に入れる)	Thorlabs	LA1805-A
長さ調整機能付き レンズチューブ、Ø25 mm~Ø25.4 mm(1 インチ)光学素子用、移動量 7.9 mm	Thorlabs	SM1V05
SM1 ネジ変換アダプタ、Ø5 mm 液体ライトガイド用	Thorlabs	AD5LLG
Liquid Light Guide Ø5 mm Core, 340 - 800 nm, 4' (1.2 m) Length	Thorlabs	LLG0538-4
カメラ		
CMOS カメラ USB 3.1 Blackfly® S, Monochrome Camera	FLIR	BFS-U3-51S5M-C
ニコン F マウント CPU 内蔵 D タイプ、AF レンズ AI AF Nikkor 50mm f/1.8D	Nikon	JAN:496075902325 4
AI オート接写リング	Nikon	PK-13
ロングパスフィルター FGL495M - Ø25 mm GG495 Colored Glass Filter, SM1-Threaded Mount, 495 nm Longpass	Thorlabs	FGL495M

**Table 1. List of optical system parts for intrinsic signal optical imaging**

## 2.7. AAV の微量注入

マウスを isoflurane によって麻酔し、脳定位固定装置 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) にヘッドフレームとフレームホルダーを用いて頭部固定した。ウイルス注入位置は、内因性信号光学的イメージングにより算出したサインマップと脳表の血管パターンをもとに決定した。頭蓋骨にドリルを用いて直径 0.5 mm の穴をあけ、先端内径 12-15  $\mu\text{m}$  のガラスピペット (VWR, cat# 53432-706) にウイルス液を充填し、脳内に挿入した。脳表面の乾燥を防ぐため、人工脳脊髄液 (ACSF; 150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) をヘッドフレーム内に添加した。ピペットを挿入してから 5 分後、picospritzer (General Valve Corp. Fairfield, NJ, USA) を用いて 25 nL の AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAG $\times$ 3 を 50 nL/min の速度で高次視覚野へ微量注入した。注入後、ピペットを 5 分間脳内に留置した後、ゆっくりと引き抜いた。ドリルであけた穴には抗生物質軟膏を塗布した。2 週間後に、BFP 陽性の神経細胞が 2 光子顕微鏡下で観察された。標的の高次視覚野の外にウイルス液が漏れこむのを防ぐために、ウイルス液の注入量は 25 nL 以下とした (Kim et al., 2020)。

## 2.8. イメージングウィンドウの作製

直径 4 mm の丸型カバーガラス (under 0.12 mm thickness, No. 0; Matsunami) と直径 3 mm の丸型カバーガラス (0.25–0.35 mm thickness, No. 3; Matsunami) を光学接着剤 (No. 81, 屈折率 1.56, Norland) で接着してイメージングウィンドウ用カバーガラスを作製した。

## 2.9. 生体内単一細胞エレクトロポレーション

既報のプロトコールに従いシステムを構築した (Kitamura et al., 2008; Judkewitz et al., 2009)。マウスを三種混合麻酔により麻酔をかけ、眼球を眼軟膏 (Ofloxacin; TOA Pharmaceuticals, Ltd., Japan) で保護した。マウスの体温はヒートパッドで維持した。視覚野上に直径 3 mm の開頭手術を行い、精密ピンセット (NO.5-INOX; Dumont, Switzerland) を用いて硬膜を剥離した。InSight DS+ 2 光子レーザー (Dual Output 820-1300 nm and 1040 nm; Spectra-Physics) と水浸対物レンズ (MRD07420, 40 $\times$ , NA 0.8, WD 3.5 mm; Nikon, Japan) を組み込んだ 2 光子顕微鏡 (A1-MP+; Nikon, Japan) 下にマウスを頭部固定した。

ガラス電極 (10-15 M $\Omega$ , Warner Instruments) を micropipette puller (P-1000; Sutter) により作製し、細胞内溶液 (135 mM potassium gluconate, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM sodium phosphocreatine, 4 mM MgATP, 0.3 mM  $\text{Na}_3\text{GTP}$ ; adjusted to pH 7.3 with KOH) または D-PBS(-) (Cat# 045-29795; Wako, Japan) にプラスミド (pCAG-EGF, 100 ng/ $\mu\text{L}$ ; pCAG-oG, 200 ng/ $\mu\text{L}$ ; pEF1a-TVA950, 100 ng/ $\mu\text{L}$ ) および Alexa Fluor 594 (50  $\mu\text{M}$ , Cat# A10438; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を混合したものを充填した。ガラス電極はマイクロマニピュレーター (QUAD; Sutter) により操作し、電極内溶液を放出する空気圧を圧力計 (DT-8890; MK Scientific, Inc.) を用いてモニターした。AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAG $\times$ 3 で標識した標的神経細胞と非

標的神経細胞は、2つの異なる波長の2光子レーザーで可視化した。BFP非陽性細胞はガラス電極から出るAlexa Fluor 594色素の影として可視化し（shadow imaging technique, excitation wavelength 1040 nm）、BFP陽性細胞は2光子イメージングにより可視化した（excitation wavelength 820 nm）。青色蛍光はダイクロイックミラー（488 nm, Semrock）とバンドパスフィルター（450/70 nm, Semrock）で、赤色蛍光はダイクロイックミラー（685 nm, Semrock）とバンドパスフィルター（610/75 nm, Chroma）で分離し、2つのGaAsP PMTで検出した。

エレクトロポレーションの電気パルスはAxoporation 800A (Molecular Devices)により発生させた。ガラス電極に陽圧(>100 mBar)をかけて脳内に挿入し、その後、陽圧を50 mBar以下に下げた。エレクトロポレーションするBFP陽性細胞を決定した後、さらに陽圧を20 mBar以下に下げ、抵抗値が最大で30%になるまでガラス電極先端を細胞体に押し付けた。その後、陽圧を解除し、エレクトロポレーションを行った（a single pulse train at -10 V, 100 Hz, 0.5 ms pulse width, 1 s duration）。細胞内にAlexa Fluor 594が流入したことを確認した後、ガラス電極を引き抜き、脳表にイメージングウィンドウを歯科用セメント（Super Bond; Sun Medical, Japan）を使用して固定した。エレクトロポレーションした1-3日後に、2光子顕微鏡下にてエレクトロポレーションした細胞にGFP蛍光が観察された。

## 2.10. EnvA-RVΔGの微量注入

エレクトロポレーションしたGFP陽性細胞の位置を、脳表の血管パターンをもとに特定した。マウスをisofluraneで麻酔し、脳定位固定装置（David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA）にヘッドフレームとフレームホルダーを用いて頭部固定した。イメージングウィンドウを固定していた歯科用セメントをドリルで除去し、ウィンドウを取り外した。手術中、ヘッドフレーム内にACSFを添加し、脳組織が乾燥しないようにした。

ウイルス液を先端内径12-15 μmのガラスピペットに充填し、エレクトロポレーションした細胞体の近傍に挿入した（100-200 μm以内）。ピペットを挿入してから5分後に、picospritzer（General Valve Corp. Fairfield, NJ, USA）を用いて200 nLのウイルス溶液を100 nL/minの速度で注入した。注入終了後、ピペットを5分間、脳内に留置し、ピペットを引き抜き、脳表にイメージングウィンドウを歯科用セメントで固定した。エレクトロポレーションした細胞へEnvA-RVΔGが一次感染した後に、シナプス前細胞が経時的に標識された。SAD B19株のRVΔGを用いた場合、一次感染が成立した7~10日後に標識されるシナプス前細胞の数が最大となった。

## 2.11. 組織解析

エレクトロポレーションした細胞への一次感染が確認されてから7-10日後に、マウスをPBSおよび4% paraformaldehyde/PBSで灌流した。脳を取り出し、4% paraformaldehyde/PBSで後固定し（overnight, 4°C）、溶液を2% paraformaldehyde, 15% sucrose/PBS（24 h, 4°C）、30%

sucrose/PBS (24 h, 4°C) へ置換した。マイクロトーム (REM-710; Yamato, Saitama, Japan) を用いて 40 μm または 100 μm の厚さで脳切片を作製した。

一部の脳切片には免疫染色を実施した。脳切片を PBS で洗浄し (room temperature: RT, 15 min)、0.1% Triton/PBS (RT, 5-10 min, 3 times)、ブロッキング溶液 (RT, 30 min-1 h) でインキュベートした。その後、一次抗体希釈液に切片を浸した (4°C, 48 h)。次に、脳切片を PBS で洗浄し (RT, 10 min, 3 times)、二次抗体希釈液に浸した (4°C, 3-4 h)。免疫染色後、脳切片をスライドガラス上へマウントし、退色防止剤 (Fluoro-Keeper, Nakalai, Japan) を用いて封入した。蛍光標識細胞は、10× (NA 0.45, Zeiss, Jena, Germany) または 20× (NA 0.75, Zeiss, Jena, Germany) 対物レンズを用いて共焦点レーザー顕微鏡 (LSM800, Zeiss, Jena, Germany) を用いて撮像した。各溶液と使用した抗体は以下の通りだった。

- ブロッキング溶液  
1:1 mixture of Blocking One (Cat# 03953-95; Nacalai tesque, Japan) and 0.1% Triton/PBS
- 抗体希釈液  
1:19 mixture of Blocking One (Cat# 03953-95; Nacalai tesque, Japan) and 0.1% Triton/PBS
- 一次抗体  
mouse anti-FLAG M2 monoclonal (1:2000, Cat# F3165; Sigma, USA)  
chicken anti-GFP polyclonal (1:2000, Cat# ab13970; Abcam, UK)  
rabbit anti-DsRed polyclonal (1:1000, Cat# 632496; Clontech-Takara, Japan)
- 二次抗体  
Alexa 405 anti-mouse IgG (1:1000, cat# 715-475-151; Jackson, USA)  
Alexa 488 anti-chicken IgY (1:1000, Cat# 703-545-155; Jackson, USA)  
Alexa 594 anti-rabbit IgG (1:1000, Cat# 711-585-152; Jackson, USA)

## 2.12 TVA mRNA 発現量解析

Neuro-2a 細胞を 24-well plate に播種した ( $21 \times 10^4$  cells/well, 10% FBS/DMEM, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。17 h 後、培地を serum-free DMEM に置換し、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および Polyethylenimine “Max” (Polyscience Inc, Warrington, PA, USA) を用いて TVA 発現プラスミド (pCMMP-TVA800, pEF1a-TVA800, pEF1a-TVA950) をトランスフェクションした (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。トランスフェクションから 6 h 後、well を PBS で洗浄し、インキュベートし (10% FBS/DMEM, 35°C, 5% CO<sub>2</sub>)、48 h 後に培地交換を行った。Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて逆転写を行った。qPCR は、TB Green Fast qPCR Mix (TaKaRa) と LightCycler 96 system (Roche, Indianapolis, IN) を使用して行った。TVA mRNA 発現量は、GAPDH の発現量で補正した。使用したプライマーは以下の通りであった。

- TVA genes  
forward PCR primer: 5'-CGGTTCTTTGTCCCGTTGCC-3'  
reverse PCR primer: 5'-CAGTCCTGCGGGTAACACTC-3';
- GAPDH genes (OriGENE Technologies)  
forward PCR primer: 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'  
reverse PCR primer: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

## 2.13 統計解析

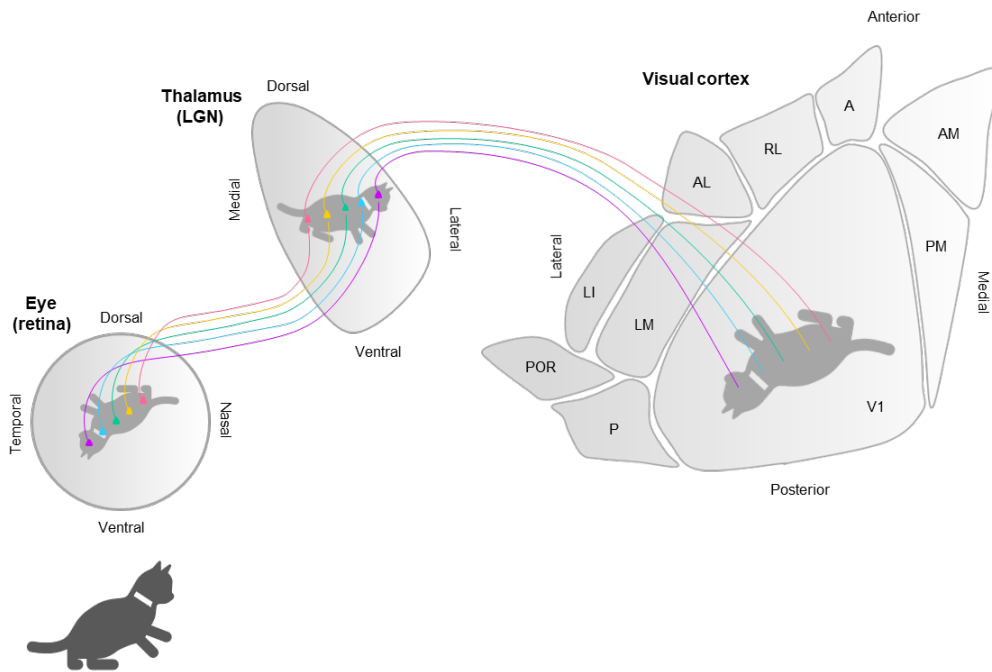
データは図の説明文に明記されていない限り、平均値 ± 標準偏差で表示した。統計解析は、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) を用いて、one-way ANOVA および Tukey's multiple-comparison test により検定した。p<0.05 を統計学的有意とした。

### 3. 内因性信号光学的イメージング

感覚器で受容された外界の情報は電気信号へと変換され、脳へと伝達される。脳内では、同一の情報を処理する細胞同士が特定の領域に集合して配置されており、特徴的な機能領域が構成されている。脳領域のおおよその位置は、頭蓋骨の矢状縫合と冠状縫合の交点であるブレグマや、矢状縫合とラムダ縫合の交点であるラムダを基準としてマウス脳アトラス(Paxinos and Franklin, the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates)を用いて特定することが可能である。そのため、標的の脳領域へ入出力する神経細胞群を AAV や CTB などを微量注入して標識する場合、動物を脳定位固定装置に固定し、ブレグマまたはラムダからの距離をもとに注入位置を決定する方法が広く用いられている。しかしながら、動物個体ごとに脳の機能領域構造は大きく異なり、小さな脳領域に精度よく神経細胞トレーサーを注入することは困難である。

内因性信号光学的イメージング (Intrinsic signal optical imaging) は、生体内の酸素消費に起因するシグナルから脳の活動領域を同定するイメージング法である (Malonek et al., 1996)。脳内の神経細胞が活動すると、局所的な酸素消費が増大する。この際、酸素を運搬している酸化型ヘモグロビンが酸素を放出し、還元型ヘモグロビンへと変換されている。還元型ヘモグロビンは酸化型ヘモグロビンと比較して、600-630 nm の波長の赤色光をよく吸収する。そのため、脳表に 600-630 nm の波長の光を照射し、その反射光強度変化をイメージングし解析することで、活動した脳領域を同定することが可能となる。視覚情報は、眼球の網膜で受容され、視床を介して、低次の一次視覚野、高次視覚野へと伝達される。また、視覚野内の神経細胞の配置は、視覚刺激を受容する網膜部位と対応しており、視野地図が脳内に再現されている。この特性は、レチノトピーと呼ばれている (Fig. 3-1)。したがって、マウスに対して様々な視野位置に視覚刺激を呈示し、各刺激に選択的に活動した脳領域をマッピングすることで、視覚野領域を同定することが可能となる。本章では、内因性信号光学的イメージングにより、動物個体ごとの視覚野構造を解析した。





**Figure 3-1. Retinotopy**

The neurons adjacent to each other in the retina project to close areas in the brain. Therefore, the image of the cat projected on the retina is transmitted to the brain retaining its topographic map. This property, in which the retinal map is also reproduced in the brain, is called 'retinotopy'. A, anterior area; AL, anterolateral area; AM, anteromedial area; LI, laterointermediate area; LM, lateromedial area; P, posterior area; PM, posteromedial area; POR, postrhinal area; RL, rostromedial area; V1, primary visual cortex.

## 実験結果

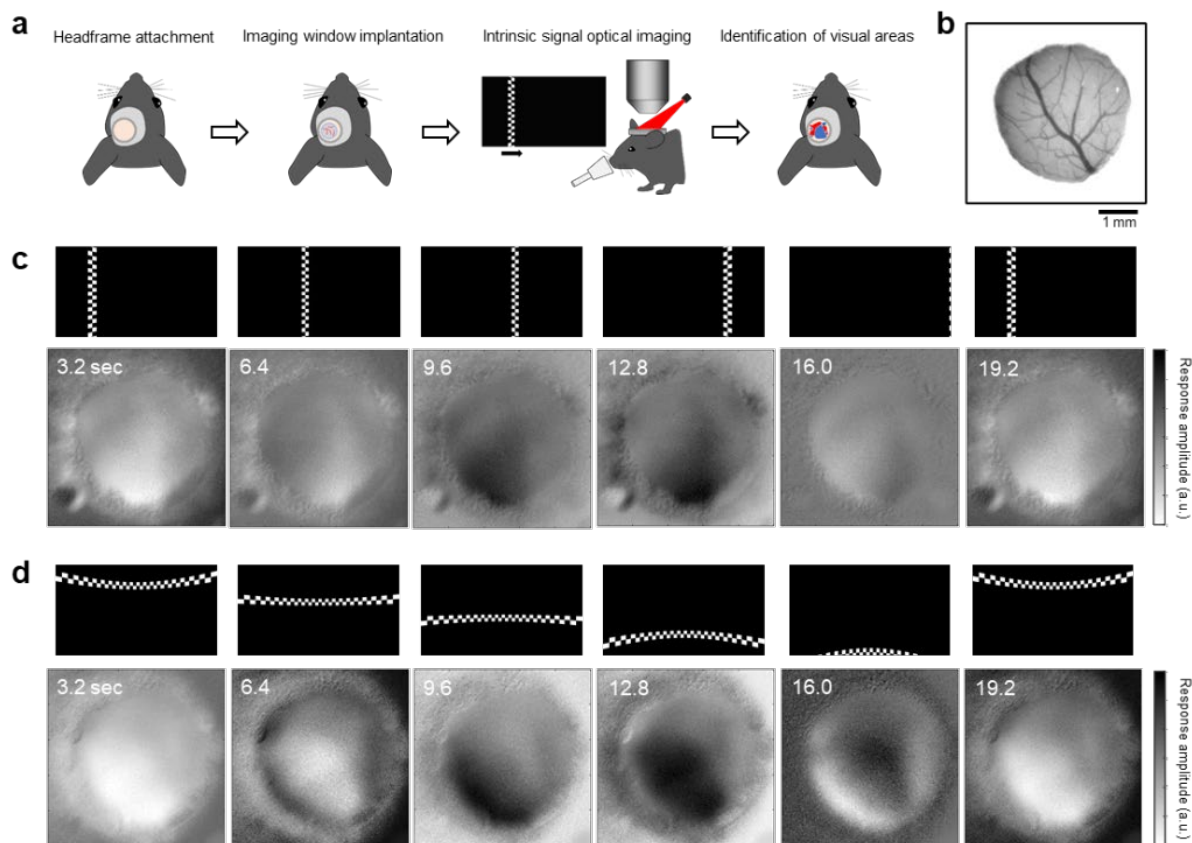
### 3.1 イメージングウィンドウを用いた内因性信号光学的イメージング

マウス視覚野の機能的構造を同定することを目的として、内因性信号光学的イメージングシステムの確立を行った。視覚刺激は垂直または水平方向のチェッカーフラッグ柄のバーが、モニターの上下・左右いずれか一方へ10回繰り返し移動する、連続的で周期的な刺激（周期:16.03 sec）を用いた。チェッカーフラッグの白黒パターンは0.1 sec毎に反転させた(Marshel et al., 2011)。マウスの左半球の視覚野上に開頭手術を実施後にイメージングウィンドウを固定し、右眼球視野にモニターを設置して視覚刺激を呈示した。脳活動を記録するために、イメージングウィンドウ下の視覚野領域へ赤色光を照射し、その反射光強度をCMOSカメラにより取得した(Fig. 3-2a)。脳表の血管パターンは、緑色光を照射し取得した(Fig. 3-2b)。視覚刺激に選択的な脳活動シグナルは、視覚刺激と同一の周期を有することを利用し、イメージング画像データをフーリエ変換し、視覚刺激と同一の周波数成分を抽出した(Kalatsky and Stryker, 2003)。したがって、視覚刺激により誘発された脳活動シグナルと生体ノイズ(心拍、呼吸、血管運動、など)が分離できる。マウスに対して、鼻側から尾側(モニターの左右方向)へと垂直方向のバーが移動する視覚刺激を呈示すると、脳の活動領域は主にイメージングウィンドウの左上から右下へと連続的に変化した(Fig. 3-2c)。また、背側から腹側(モニターの上下方向)へと水平方向のバーが移動する視覚刺激を呈示すると、脳の活動領域は主にイメージングウィンドウの左下から右上へと連続的に変化した(Fig. 3-2d)。さらに、それぞれ逆方向の視覚刺激を呈示すると、活動する脳領域の変化は反転した。以上の結果から、内因性信号光学的イメージングにより視覚刺激に選択的な脳の活動シグナルが検出されたことが示された。また、シグナルの発生する開始点と終了点においてシグナルの移動方向が反転する領域が認められた。これらの領域は、V1と高次視覚野の境界においてレチノトピーが反転している領域であると考えられる。

次に、取得した脳の活動シグナルをもとに、イメージングした領域の視野地図を算出した。視覚刺激と同一の周波数成分である脳の活動シグナルは、Figure 3-2c, dで示したイメージング領域のピクセルごとに位相が異なる。位相成分が同一のピクセルは、同一の視覚刺激で活動した脳領域である(Kalatsky and Stryker, 2003)。そこで、位相成分の最大値および最小値を、視覚刺激を呈示した最大または最小の視野角へと変換することで、レチノトピーマップを算出した(Fig. 3-3a-c, e-g)。視覚刺激に直交するバーを用いていることから、位相成分から作成したレチノトピーマップの勾配方向も直交していた。

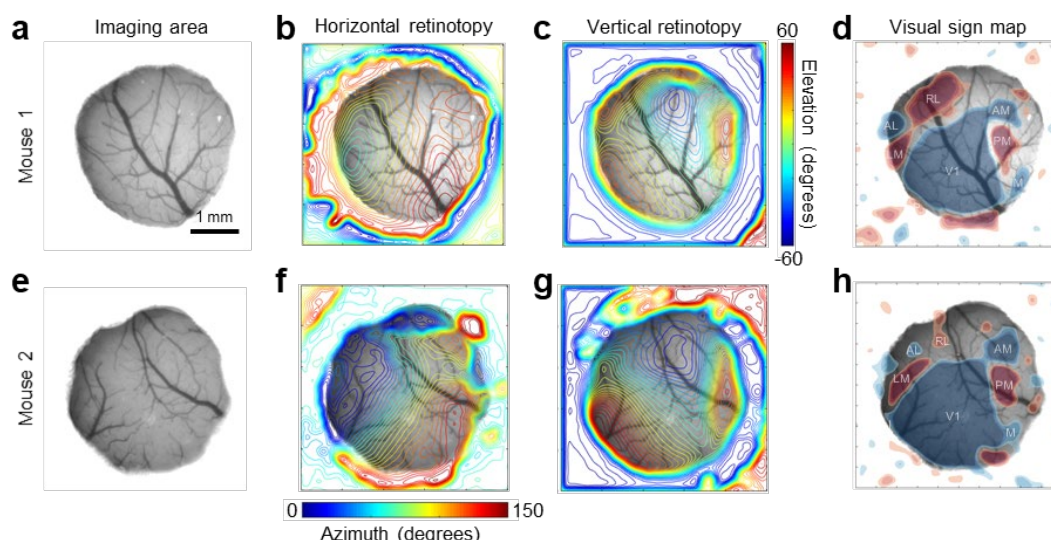
次に、視覚野の領域構造の同定を行った。マウス視覚野は低次の一次視覚野(V1)と少なくとも9つの高次視覚野から構成されており、領域ごとに視野地図が再現されている(Wang et al., 2007, 2011, 2012)。視野地図内では、水平方向と垂直方向のレチノトピーマップ勾配が直交している(Sereno et al., 1994; Garrett et al., 2014)。そこで、水平方向( $\Delta\nabla H$ )と垂直方向( $\Delta\nabla V$ )のレチノトピーの勾配差の正弦値  $S$  を取得し( $S = \sin(\Delta\nabla V - \Delta\nabla H)$ )、 $S = \pm 1$  (thresholding  $S$  at 1.5 times its SD)となる領域を算出し、サインマップを作成した(Fig. 3-3d,

h)。その結果、複数の視覚野領域構造がパッチ状に可視化され、V1 と 7 つの高次視覚野が同定された。S の値が正であるパッチ（青色）は V1 の視野地図と正像の関係となっており、負の値を示したパッチ（赤色）は鏡像の関係となっていることを示している。



**Figure 3-2. Intrinsic signal optical imaging**

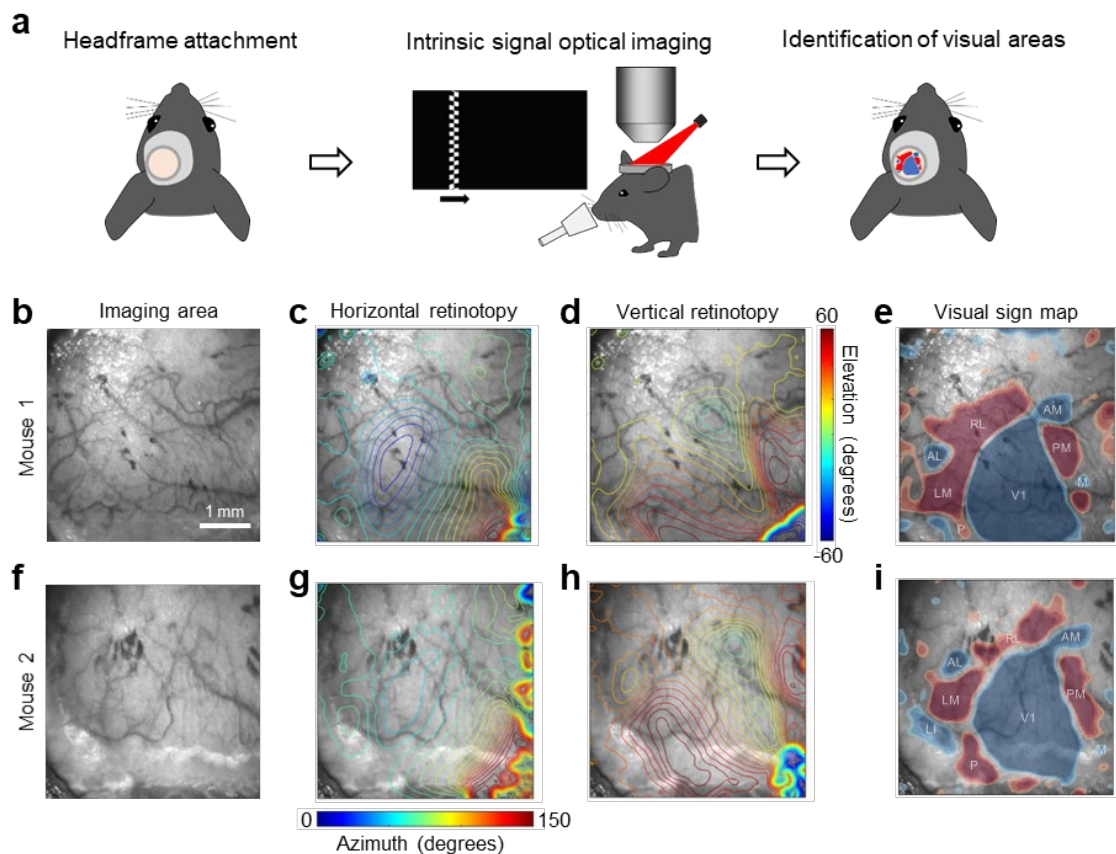
(a) Schematic of the experimental procedure. (b) The imaging area of (c and d). The vascular patterns captured through the imaging window. (c, d) Examples of brain activity signals when visual stimuli were presented with a vertical bar moving from left to right (c) or with a horizontal bar moving from up to down (d). Top: visual stimulation. Bottom: The signal of the same frequency with the visual stimulus. Areas with low intensity of reflected red light are shown in black (active brain region).  $500 \times 500$  pixels.



**Figure 3-3. Identification of visual areas with intrinsic signal optical imaging through the imaging window.** (a-d) The data for mouse 1 used in Figure 3-2. (e-h) The data for mouse 2. (a, e) The vascular pattern through the skull. Resolution:  $500 \times 500$  pixels. (b, f) Contour plots of the horizontal retinotopy map overlaid on the vascular pattern picture. (c, g) Contour plots of the vertical retinotopy map overlaid on the vascular pattern picture. (d, h) Visual sign maps computed from (b, c) and (f, g), respectively. AL, anterolateral area; AM, anteromedial area; LI, laterointermediate area; LM, lateromedial area; M, medial area; P, posterior area; PM, posteromedial area; RL, rostrolateral area; V1, primary visual cortex.

### 3.2 開頭手術を行わない内因性信号光学的イメージング

視覚野の詳細な領域構造を内因性信号光学的イメージングにより同定する場合、一般的にイメージングウィンドウの設置、または頭蓋骨をドリルで薄く削る Thinned-skull cranial window technique を用いる。しかし、同定した領域へ複数のウイルスベクターの注入や遺伝子導入を行うためには、脳や頭蓋骨などの組織構造を長期間安定に保つ必要があり、頭蓋骨の除去や薄層化は避けたい。そこで、透明な歯科用セメントを用いて頭蓋骨を平滑化し、表面散乱を低下させることで、経頭蓋条件化においても領域同定が可能かを検証した (Fig. 3-4a)。反射光強度変化を高い SN 比で検出するために、LED 光源をさらにレンズにより液体ライトガイド端面に集光し、実効的な光強度を増強してイメージングを行った。結果、Figure 3-2 と同様に視覚刺激に選択的な脳の活動シグナルが取得された。レチノトピーマップとサインマップを算出し (Fig. 3-4b-i)、複数のマウスで視覚野領域のうち posterior area (P) や medial area (M) などの小さな領域を含む 8 つの高次視覚野領域と V1 の領域構造が同定された (Fig. 3-4e, i)。経頭蓋イメージングは、イメージングウィンドウによるイメージング範囲の制限がないため、広範囲の視覚野領域の同定が可能となった。以上の結果から、経頭蓋内因性信号光学的イメージングにより、視覚野の領域構造の同定が可能であることが示された。



**Figure 3-4. Identification of visual areas with intrinsic signal optical imaging through the skull.**

(a) Schematic of the experimental procedure. (b–e) The data for mouse 1. (f–i) The data for mouse 2. (b, f) The vascular pattern through the skull. Resolution:  $500 \times 500$  pixels. (c, g) Contour plots of the horizontal retinotopy map overlaid on the vascular pattern picture. (d, h) Contour plots of the vertical retinotopy map overlaid on the vascular pattern picture. (e, i) Visual sign maps computed from (c) and (d) or (g) and (h). AL, anterolateral area; AM, anteromedial area; LI, laterointermediate area; LM, lateromedial area; M, medial area; P, posterior area; PM, posteromedial area; RL, rostromedial area; V1, primary visual cortex.

### 3.3 考察

脳にはトポグラフィックマッピングと呼ばれる特徴的な組織構造があるため、動物に感覚刺激を呈示した際に活動した脳領域をマッピングすることで、詳細な領域構造の同定が可能となる。トポグラフィックマッピングは、感覚系の情報処理における基本的な神経回路構造に由来するもので、体の特定の位置の情報を受容する神経細胞は脳内でもその位置情報を保った投射様式をしているという特性である。視覚神経経路においては、網膜の位置情報はその先の視床、V1、高次視覚野において保存されている。本研究で経イメージングウィンドウ、経頭蓋イメージングのいずれにおいても、視覚刺激に選択的な脳活動シグナルがマウスから検出され、既報と一致したレチノトピーマップおよびサインマップが算出された (Garrett et al., 2014; Juavinett et al., 2017)。血液動態の変化を利用した内因性信号は、背景光の  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  程度の小さなシグナルであるため、ノイズの影響を受けやすい。そのため、周期的な視覚刺激を用いて周期的な脳活動を誘発し、その周期に選択的なシグナルを抽出することでノイズの除去を行った。レチノトピーマップ状の視覚野領域外のシグナル成分は、視覚刺激の漏れ込みや、ウィンドウまたは頭蓋による反射光の散乱によるものだと考えられる。

神経活動に伴う血液動態の応答は、刺激を呈示した 2-4 秒後にピークとなる (Hillman, 2007)。実際に、レチノトピーマップにおける視野位置 (Fig. 3-3a)、視覚刺激呈示下における脳の活動領域 (Fig. 3-2c, d) を比較すると、視覚刺激の呈示位置に相関した視覚野領域が活動するまでに、およそ 3 秒間のずれが生じていることが示されている。

V1 神経細胞から 9 つの高次視覚野への解剖学的な神経投射強度は LM, AL, LI, PM, P, RL, POR, AM, Anterior (A) の順番で大きい (Wang et al., 2012)。内因性信号イメージングでは、A の明確な領域構造が同定されなかった。その原因として、V1 から A への投射強度が小さいこと、あるいは明確なレチノトピーを有していないことが考えられる (Wang and Burkhalter, 2007)。このことは既報とも一致している (Garrett et al., 2014)。その一方で、POR や AM の領域構造が経頭蓋イメージングにより同定されたことから、本研究で構築したシステムを用いることで、明確な視覚野領域構造の同定が可能であると結論付けられた。

光学的イメージングには、大きく 2 種類のイメージング法がある。一つは、本手法のように血液動態のような内因性信号を計測する手法であり、もう一つは外因性信号を計測する手法である。外因性信号では、神経活動に伴うカルシウム動態をカルシウムインジケーター、あるいは膜電位変化を膜電位センサーにより蛍光強度変化として信号化する。この手法では、あらかじめ実験動物の生体内にインジケーターやセンサーを導入しておく必要があるが、神経細胞活動を SN 比の高く数百ミリ秒のスケールで計測可能である。しかしながら、外因性信号イメージングと比較して、内因性信号イメージングは同等の精度で機能領域同定が可能であることが示された (Dana et al., 2018; Couto et al., 2021)。内因性信号イメージングは、ラベルフリーで実施できることから、病態モデル動物や細胞種特異的に Cre を発現する遺伝子改変動物を使用した回路解析などに有用であるといえる。

## 4. 単一神経細胞ネットワーク標識法

脳内の神経回路の構造と機能を明らかにする手法として、さまざまな神経回路標識法が開発されている (Luo, Callaway, and Svoboda, 2018)。その中でも、狂犬病ウイルスベクターを用いた経シナプストレーシング法は、標的神経細胞に入力するシナプス前細胞群を包括的に特定することが可能な唯一の神経回路標識法である (Wickersham et al., 2007; Osakada and Callaway, 2013)。狂犬病ウイルスは軸索末端から神経細胞へ感染し、シナプスを介してシナプス前細胞へと広がる特性を有している (Ugolini, 1995, 2010)。

標的神経細胞の単シナプス性トレーシングを実現するためには、狂犬病ウイルスベクターに 2 つの変更が必要である。1 つ目は、狂犬病ウイルスのエンベロープ構成タンパク質である G タンパク質の遺伝子をウイルスゲノムから欠損させる変更である。G 欠損型狂犬病ウイルス (RVΔG) は、感染細胞内で新しいウイルス粒子を形成することはできないが、外部から G タンパク質が補完されると再度ウイルス粒子を形成し、出芽する。2 つ目は、RVΔG のエンベロープを、哺乳類細胞では認識されない鳥白血病肉腫ウイルスサブタイプ A のエンベロープ (EnvA) に置換する変更である。EnvA-pseudotyped RVΔG (EnvA-RVΔG) は、EnvA の受容体である TVA 発現細胞へ特異的に感染する。したがって、EnvA-RVΔG は以下のステップで標的神経細胞の単シナプス性トレーシングを実現する。

1. 標的神経細胞へ G と TVA を発現させる。
2. EnvA-RVΔG を注入すると、EnvA-TVA の相互作用により、TVA を発現した標的神経細胞のみに EnvA-RVΔG が一次感染する。(ターゲティング)
3. 標的神経細胞内で G が補完され、ウイルス粒子が形成される。標的神経細胞をスターター細胞として、RVΔG がシナプス前細胞へと広がる。(経シナプストレーシング)
4. シナプス前細胞には G が発現していないため、それ以上のウイルス感染は起きない。(単シナプス性トレーシング)

これまで、AAV やヘルペスウイルスベクターを用いて標的神経細胞へ G や TVA を発現させ、特定の領域へ投射する神経細胞 (Stepien et al., 2010; Yonehara et al., 2011; Takatoh et al., 2013; Cruz-Martín et al., 2014)、特定の細胞種 (Haubensak et al., 2010; Wall et al., 2010; Miyamichi et al., 2011; Watabe-Uchida et al., 2012; Wall et al., 2016) へ接続するシナプス前細胞群の解析が行われてきた。このような解析から、領野間をまたぐ大規模な神経回路の理解が進められてきたが、技術的限界から神経回路の基盤をなす回路モチーフの包括的な理解はほとんど進んでいない。

Marshel らは、EnvA-RVΔG と単一神経細胞エレクトロポレーション法を組み合わせることで、標的の単一神経細胞とそのシナプス前細胞を標識する単一神経細胞ネットワーク標識法を構築し、神経回路の基盤である回路モチーフやサブネットワークを包括的に解析できる手法を提案した (Marshel et al., 2010)。単一神経細胞ネットワーク標識法は、単一神経細胞エレクトロポレーション法により G と TVA を単一神経細胞へ導入し、蛍光タンパク質をコードする EnvA-RVΔG (e.g. EnvA-RVΔG-DsRed, EnvA-RVΔG-GCaMP) により単シナプス性トレーシングを行う手法で、これまで解剖学的解析 (Marshel et al., 2010; Rancz et al., 2011; Vélez-Fort

et al., 2014; Rompani et al., 2017) と機能的解析 (Wertz et al., 2015; Rossi et al., 2020) に使用されてきた。しかし、この手法は複雑で技術的難易度が高く、標識率が低いことが課題であった。そこで本章では、①高力価の EnvA-RVΔG の作製、②生体脳の 2 光子イメージング法の確立、③イメージングウィンドウの作製、④*in vivo* 単一神経細胞エレクトロポレーション法の確立、⑤TVA アイソフォームの評価、⑥EnvA-RVΔG 注入法の検討、を行い単一神経細胞ネットワーク標識の効率を改善することを試みた。

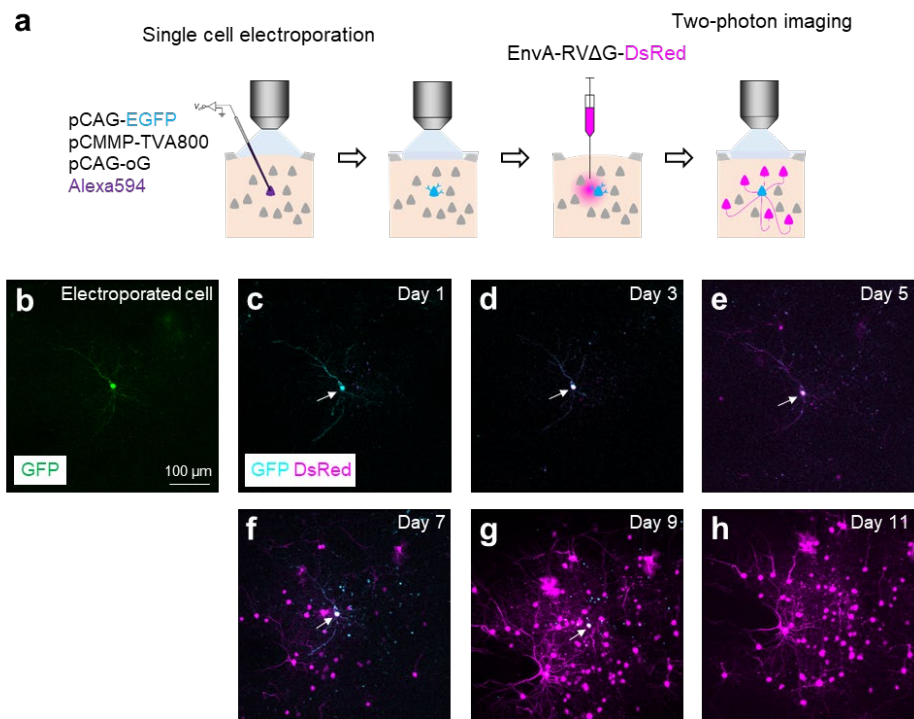
## 実験結果

### 4.1 単一神経細胞ネットワーク標識法の効率

生体内の回路モチーフを解析するために、単一神経細胞ネットワーク標識法を構築した (Fig. 4-1a)。マウス V1 の 2/3 層単一神経細胞へ 3 つのプラスミド (pCMMP-TVA800, pCAG-oG, pCAG-EGFP) を単一神経細胞エレクトロポレーション法により導入した。TVA800 は、単一神経細胞ネットワーク標識法で広く用いられているアイソフォームである (Rancz et al., 2011; Vélez-Fort et al., 2014; Wertz et al., 2015; Rompani et al., 2017; Rossi et al., 2020)。エレクトロポレーションした神経細胞に GFP が発現したことを確認後 (Fig. 4-1b)、GFP 発現細胞の近傍に EnvA-RVΔG-DsRed を注入した。その結果、GFP 陽性細胞にて DsRed が発現し、エレクトロポレーションした細胞への EnvA-RVΔG-DsRed の一次感染が認められた (Fig. 4-1c, d)。EnvA-RVΔG-DsRed を注入した 5-11 日後に、GFP 陽性の単一神経細胞の周辺に多くの DsRed 陽性細胞が 2 光子顕微鏡下で観察され、標的神経細胞とそのシナプス前細胞群が標識される様子が観察された (Fig. 4-1e-h)。DsRed 陽性のシナプス前細胞が経時的に増加したことから、標的の単一神経細胞内にて G が補完され、ウイルス粒子が形成・出芽していることが示唆された。その一方で、同様の実験を複数のマウスで実施したところ、多くのマウスでエレクトロポレーションした細胞の GFP 蛍光が EnvA-RVΔG-DsRed 注入後に消失していた。

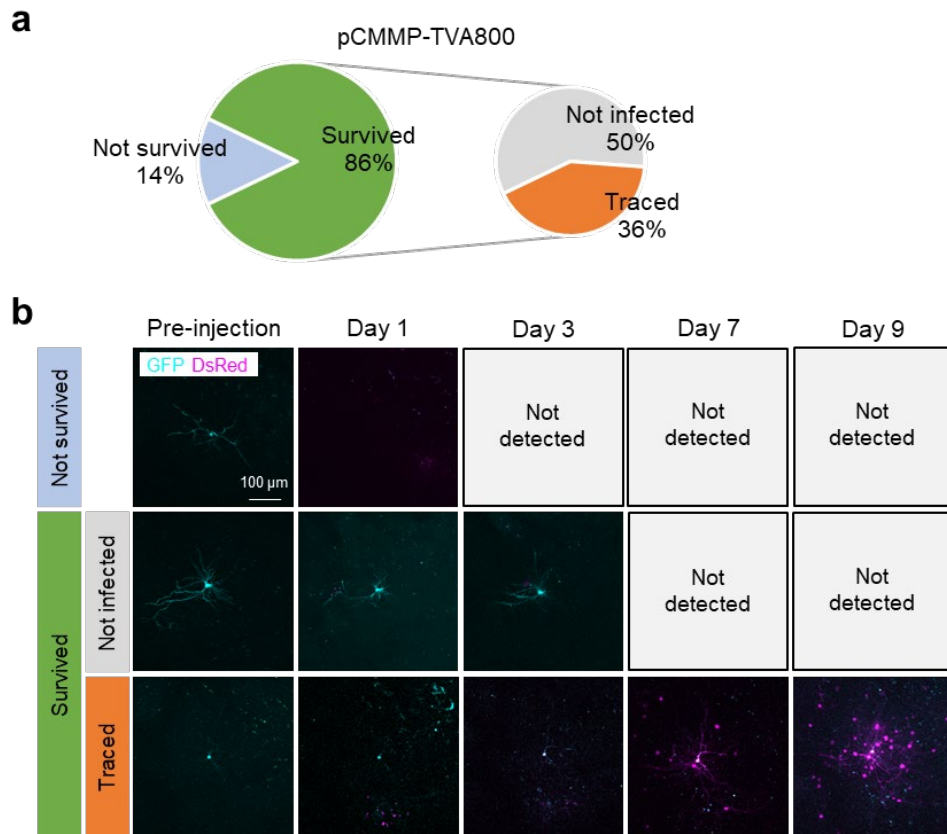
そこで、エレクトロポレーションした細胞の細胞死が、EnvA-RVΔG-DsRed 注入の物理的な障害によるものか、EnvA-RVΔG-DsRed の感染によるものかを明らかとするために、単一神経細胞ネットワーク標識の過程を 2 光子顕微鏡下で経時観察した (Fig. 4-2a-b)。n = 14 のマウスのうち n = 2 (14%) で、EnvA-RVΔG-DsRed 微量注入の 1 日後に GFP 蛍光が消失しエレクトロポレーションした細胞の細胞死が認められた (not survived)。残りのマウスのうち n = 5 (36%) で、GFP と DsRed が共発現した細胞の周りに DsRed 発現細胞が観察され、EnvA-RVΔG-DsRed に G が補完され、単シナプス性に RVΔG が広がったことが認められた (traced)。pCMMP-TVA800 を導入した神経細胞から、単シナプストレーシングにより標識された DsRed 陽性の細胞数は  $110.6 \pm 78.5$  neurons であった (n = 5)。残りの n = 7 のマウス (50%) では、GFP 陽性細胞において DsRed の発現が認められず、エレクトロポレーションした神経細胞への EnvA-RVΔG-DsRed の一次感染が成立しなかったことが示された (not infected)。以上の結果から、EnvA-RVΔG-DsRed の一次感染が成立した GFP 発現細胞の全てにおいて、経シナプストレーシングが成立したことが明らかとなった。





**Figure 4-1. Single cell-initiated monosynaptic G-deleted rabies virus tracing.**

(a) Schematic of the experimental procedure. (b–h) Two-photon maximum-intensity z projection images. (b) A typical image of a successfully electroporated cell 2 days after electroporation. (c–h) Time-series images of transsynaptic labeling from the single starter neuron after the EnvA-RVΔG-DsRed injection. White arrows indicate the starter neuron.



**Figure 4-2. Single cell-initiated monosynaptic RVΔG tracing using pCMMP-TVA800.**

(a) Single cell-initiated monosynaptic tracing efficiency depends on both the survival rate of electroporation (left) and the success rate of infection (right). (b) Examples of the two types of failures (top and middle) and a successful example (bottom) of single cell-initiated circuit tracing with RVΔG. Two-photon z projection images before and after the EnvA-RVΔG-DsRed injection. Examples of “not survived” and “survived (not infected, traced)” cells are presented.

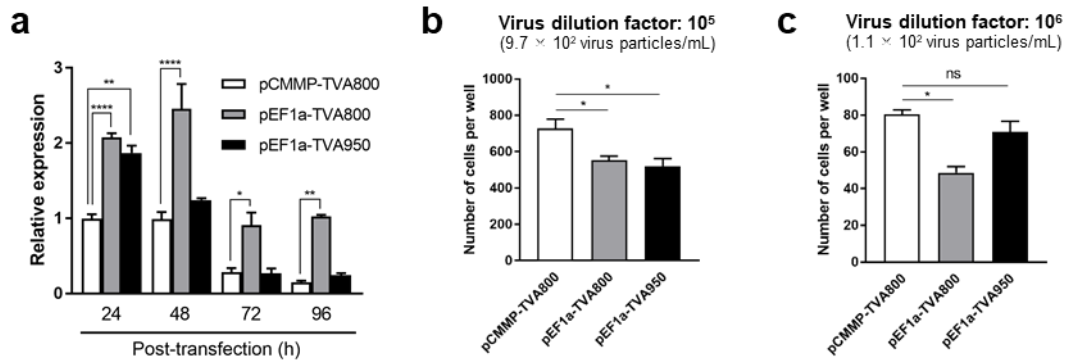
## 4.2 TVA の発現量とアイソフォームの比較(*in vitro*)

エレクトロポレーションした神経細胞の多くは EnvA-RVΔG 注入後も生存していたが、ほとんどの細胞で一次感染は成立しなかった。EnvA-RVΔG の感染は、EnvA と TVA の相互作用に依存しており、TVA の発現量と親和性が一次感染効率に重要である。そこで、一次感染効率を上昇させるために、EnvA に対して異なる親和性を有する TVA アイソフォームを検証した。TVA には GPI アンカー型の TVA800 と膜貫通型の TVA950 の 2 つのアイソフォームがクローニングされており (Bates et al., 1993; Young et al., 1993; Elleder et al., 2004)、どちらも狂犬病ウイルストレッシングに広く用いられている。その一方で、これまで 2 つのアイソフォーム間における EnvA-RVΔG のトレッシング効率の違いについて定量的な検討はされてこなかった。また、EF1a プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターよりも成熟した神経細胞を含む幅広い細胞種で高い転写活性を有することが報告されている (Qin et al., 2010; Yaguchi et al., 2013)。TVA800 または TVA950 を用いた EnvA-RVΔG トレーシングの効率を比較するために、pEF1a プロモーター下に TVA800 または TVA950 をコードするプラスミドを作製した (pEF1a-TVA800, pEF1a-TVA950)。

次に、作製したプラスミドによる TVA の発現を確認するために、*in vitro* で TVA mRNA の発現量を定量した。Neuro-2a 細胞に pCMMP-TVA800 (CMV プロモーター下で TVA800 を発現するコントロール)、pEF1a-TVA800、および pEF1a-TVA950 をトランスフェクションし、qPCR により TVA mRNA の発現量を定量した。EF1a プロモーターはトランスフェクション後 24 時間で TVA mRNA の発現を誘導した。pEF1a-TVA800 はコントロールの pCMMP-TVA800 と比較して、数日間にわたり高い TVA800 mRNA 発現を誘導した (Fig. 4-3a)。pEF1a-TVA950 も同様の傾向を示したが、48 時間後には pEF1a-TVA800 と比較して TVA mRNA の発現量が低下していた。

続いて、Neuro-2a 細胞を用いて EnvA-RVΔG の一次感染効率を検証した。Neuro-2a 細胞に pCMMP-TVA800、pEF1a-TVA800、または pEF1a-TVA950 をトランスフェクションし、24 時間後に *in vivo* の単一神経細胞ネットワーク標識にて使用した高力価の EnvA-RVΔG-DsRed (力価:  $2.4 \times 10^9$  infection units/mL) を希釈し、添加した (Fig. 4.3b, c)。その結果、コントロールの pCMMP-TVA800 トランスフェクション条件において、DsRed 陽性細胞数が最も多かった (Fig. 4-3b, c)。また、EnvA-RVΔG-DsRed の希釈倍率に関わらず、pEF1a-TVA800 は pCMMP-TVA800 よりも DsRed 陽性細胞数は少なかった。pEF1a-TVA950 は高いウイルス希釈倍率条件において pCMMP-TVA800 と同様の一次感染効率を示した。 $10^5$  倍希釈条件 (Fig. 4.3b) と  $10^6$  倍希釈条件 (Fig. 4.3c) における培地中のウイルス粒子濃度をコントロールの pCMMP-TVA800 トランスフェクション条件から算出したところ、それぞれ  $9.7 \times 10^2$  virus particles/mL、 $1.1 \times 10^2$  virus particles/mL だった。

以上の結果から、培養細胞において TVA の高発現は一次感染効率の上昇に寄与しないことが示された。また、TVA950 はウイルス希釈条件下で効率的に EnvA-RVΔG-DsRed 粒子を取り込むことが示唆された。



**Figure 4-3. Effects of promoters and TVA isoforms on *in vitro* viral infection**

(a) Relative mRNA expression of TVA genes was quantified by RT-PCR. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 3, one-way ANOVA with Tukey's test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001). (b, c) Initial infection efficiency with cultured Neuro-2a cells at different virus dilution factors. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (n = 3, one-way ANOVA with Tukey's test, \*p < 0.05).

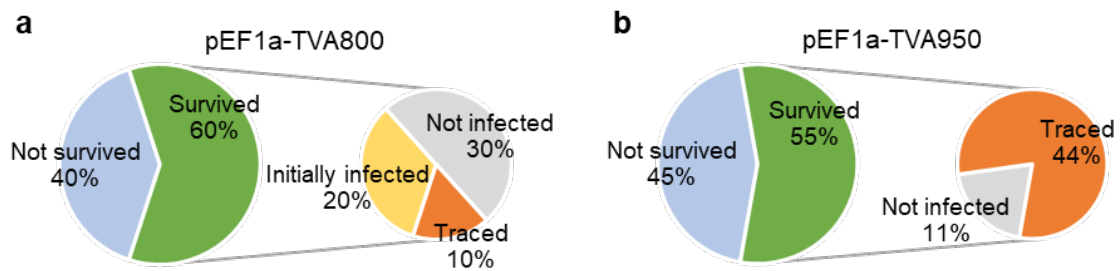
#### 4.3 TVA800/TVA950 高発現細胞における単一神経細胞ネットワーク標識効率

次に、pEF1a-TVA800 と pEF1a-TVA950 を用いて、単一神経細胞ネットワーク標識の効率を *in vivo* で検証した。pEF1a-TVA800 を用いて単一神経細胞ネットワーク標識を行ったところ (Fig.4-4 a)、n = 10 のマウスのうち n = 4 (40%) では、EnvA-RV $\Delta$ G-DsRed 微量注入の 1 日後に GFP 蛍光が消失しエレクトロポレーションした細胞の細胞死が認められた (not survived)。n = 1 (10%) のマウスでは、GFP と DsRed が共発現した細胞の周りに DsRed 発現細胞観察され、EnvA-RV $\Delta$ G-DsRed に G が補完され単シナプス性に広がったことが認められた (traced)。しかし、標識された DsRed 陽性のシナプス前細胞はごく少数であった (19 neurons)。n = 2 (20%) のマウスでは、GFP 陽性細胞に DsRed の発現し EnvA-RV $\Delta$ G-DsRed の一次感染が認められたが、一次感染後すぐに細胞死がおき経シナプストレーシングは成立しなかった (initially infected)。n = 3 (50%) のマウスでは、GFP 陽性細胞において DsRed の発現が認められず、エレクトロポレーションした神経細胞への EnvA-RV $\Delta$ G-DsRed の一次感染が成立しなかった (not infected)。以上の結果から、pEF1a-TVA800 を用いた単一神経細胞ネットワーク標識は一次感染効率、経シナプス標識効率のいずれも低いことが明らかとなった。

pEF1a-TVA950 を用いた単一神経細胞ネットワーク標識では (Fig. 4-4b)、n = 9 のマウスのうち n = 4 (44%) では、EnvA-RV $\Delta$ G-DsRed 微量注入の 1 日後に GFP 蛍光が消失しエレクトロポレーションした細胞の細胞死が認められた (not survived)。n = 4 (44%) のマウスでは、エレクトロポレーションした細胞への EnvA-RV $\Delta$ G-DsRed の一次感染後、経シナプス標識が認められた (traced)。pEF1a-TVA950 を用いた際の EnvA-RV $\Delta$ G の一次感染効率と、survived neuron に占める traced neuron の割合は高かった (4/5 “survived” cells, 80%)。pEF1a-TVA950 を導入した単一神経細胞から単シナプス標識された DsRed 陽性のシナプス前細胞数は  $77.8 \pm 59.1$  neurons (n = 4) であり、pEF1a-TVA800 より高く、pCMMP-TVA800 と同等の細胞数であった。残りの n = 1 (11%) のマウスでは、エレクトロポレーションした GFP 陽性細胞に DsRed

の発現は認められず一次感染は成立しなかった (not infected)。以上の結果から、一次感染したすべての標的細胞で経シナプストレーシングが成立したことが明らかとなった。

TVA800 の高発現は一次感染効率を上昇させず、むしろスターター細胞の細胞死を起こすことが明らかとなった。その一方で、TVA950 は一次感染効率を大きく上昇させた。このことから、pEF1a-TVA950 は pEF1a-TVA800 よりも高い単一神経細胞ネットワーク標識効率を示すことが明らかとなった。また、一次感染後の早期の段階でスターター細胞の細胞死が起きた場合、標識されるシナプス前細胞数は著しく少なかった。



**Figure 4-4. Initial infection and G-deleted rabies virus tracing efficiency**

(a, b) The single cell-initiated monosynaptic tracing efficiency using pEF1a-TVA800 and pEF1a-TVA950.

## 4.4 考察

単一神経細胞ネットワーク標識においては先行研究に従い TVA800 が広く使用されている。その一方で、膜貫通型受容体の TVA950 は、細胞膜内ドメインへ mCherry、GFP、iRFP などのレポーター蛍光タンパク質と融合することで TVA 発現細胞を標識・検出できるため、大規模な神経回路の標識に広く用いられてきた (Watabe-Uchida et al., 2012; Suzuki et al., 2020)。本章では、単一神経細胞ネットワーク標識における TVA800 と TVA950 間の標識効率の違いを検証した。

単一神経細胞ネットワーク標識法においてエレクトロポレーションした細胞は 4 つのパターンに分類された。(1) 1 つ目は、EnvA-RVΔG の注入後 24 時間以内にエレクトロポレーションした細胞が細胞死を引き起こす”not survived”である。これは、エレクトロポレーションのストレスを受けた細胞がウイルスベクター注入の物理的障害に耐えられなかったことが主たる原因だと考えられる。(2) 2 つ目は、エレクトロポレーションした細胞へ EnvA-RVΔG の一次感染が成立しない”not infected”である。この原因として、TVA の発現量が低かったこと、TVA 発現細胞周辺に十分なウイルス粒子を注入できていなかったことが考えられる。単一神経細胞ネットワーク標識は、通常の大規模な神経回路標識と比較して高力価の EnvA-RVΔG が必要であることが先行研究で示されている。そのため、TVA 発現細胞周辺の単位面積当たりのウイルス粒子数を上昇させることが重要であると考えられる。また、*in vitro* での一次感染効率と、*in vivo* で一次感染が成立した割合を比較すると、*in vitro* の  $10^6$  倍希釈条件が *in vivo* 条件を模倣していることが示唆された。(3) 3 つ目は、一次感染成立後にスターター細胞が細胞死し、経シナプス感染が成立しない”initially infected”である。狂犬病ウイルスベクターは一次感染細胞でウイルスゲノムを増幅し、ウイルス粒子の形成後に経シナプス感染するため、シナプス前細胞へのウイルスの広がり経時的に進行する (Fig. 4-2)。そのため、スターター細胞の生存期間が短ければウイルス粒子の形成・出芽がされず、シナプス前細胞への経シナプス感染は成立しない。(4) 4 つ目は、エレクトロポレーションした細胞にて一次感染が成立し、シナプス前細胞群が経シナプス標識される”traced”である。エレクトロポレーションした細胞への一次感染が成立し、スターター細胞が長期間生存した場合、多数のシナプス前細胞が標識された。

Rancz らは、*in vivo* パッチクランプ法により TVA800 と G をコードしたプラスミドを標的細胞へ導入し、単一神経細胞ネットワーク標識を行った。その結果、 $n = 8$  のマウスのうち  $n = 3$  (38%) で単シナプストレーシングが成立した (Rancz et al., 2011)。一方、Rossi らは、エレクトロポレーションにより pCMMP-TVA800 と G をコードしたプラスミドを標的細胞へ導入した。その結果、 $n = 36$  のマウスのうち  $n = 5$  (14%) で標識が成功した。また、エレクトロポレーションした細胞の機能イメージングにより、視覚刺激へ応答する健全な標的細胞へ EnvA-RVΔG を注入した際には標識効率が 41% (7/17) に上昇することを見出した (Rossi et al., 2018; Rossi et al., 2020)。本研究では、TVA950 と高純度かつ高力価の EnvA-RVΔG を用いることにより、成功率は 44% (4/9, Fig. 4-4b) となった。エレクトロポレーションした細胞の健全性の評価を組み合わせることで、さらなる標識効率の改善が可能だと考えられる。

TVA950 は TVA800 と比較して、*in vivo* における単一神経細胞ネットワーク標識の成功率が高かった。また、*in vitro* における Neuro-2a 細胞を用いた実験では、EnvA-RVΔG-DsRed が大幅に希釈された条件でも高い一次感染効率を示した。これは、TVA950 のウイルス粒子の取り込み速度と細胞膜での高い流動性が関連していると考えられる (Lim et al., 2004; Gray et al., 2011; Jha et al., 2011; Alsteens et al., 2017)。また、今回の結果から、TVA の発現量を増やしても、必ずしも一次感染効率は上昇しないことが示された。近年の研究により、神経細胞における mRNA の転写レベルとタンパク質の翻訳レベルは相関しない場合があることが報告されている (Moritz et al., 2019)。pEF1a-TVA800 により *TVA800* mRNA を高発現すると、エレクトロポレーションした細胞において細胞毒性が生じると考えられる。また、TVA800 は脂質ラフトに発現しており、ウイルス感染に必要な細胞膜上の TVA800 の発現量を制限され得ると考えられる (Narayan et al., 2003)。本研究から、狂犬病ウイルスベクターによる経シナプストレーシングは G タンパク質の発現レベルにより効率が変化する一方で (Kim et al., 2016; Suzuki et al., 2020)、EnvA-RVΔG の一次感染効率は TVA のアイソフォームに依存していることが示唆された。

## 5. 領域特異的な単一神経細胞ネットワーク

視覚野には、特定の方位・方向へ選択的に応答する神経細胞が存在する (Hubel and Wiesel, 1959)。ネコやサルなどの高等哺乳類の視覚野では、同一の応答選択性を有する細胞が集合してコラム構造を形成している (Hubel and Wiesel, 1974)。そのため脳には、①空間的に近い細胞同士が接続しあう、あるいは、②共通の入力を受ける細胞同士が集合して配置される、という基本的な機能構造 (機能コラム) があると考えられていた。このような原則が、脳における複雑な情報処理の基盤であるという考えが主流であった (Reid, 2012)。しかしながら、げっ歯類の V1 には多様な応答特性を持つ神経細胞が狭い領域内に混在していることが明らかにされ (Ohki et al., 2005; Mrsic-Flogel et al., 2007)、複雑な脳機能の形成には必ずしもコラム構造が必要なわけではなく、神経回路の精密な配線様式により高度な情報処理が実行されていることが示唆された。実際に、V1 神経細胞の接続様式を、脳スライスを用いた電気生理学的手法により解析した研究から、4 層神経細胞から共通入力を受ける 2/3 層の神経細胞は互いにシナプス接続し、サブネットワークを形成していること (Yoshimura et al., 2005)、同一の応答選択性を有する 2/3 層神経細胞は互いにシナプス接続し、局所回路を形成していること (Ko et al., 2011) が示され、脳内の個々の神経細胞は、近傍の神経細胞とランダムに接続するのではなく、精密なシナプス接続により複雑な神経回路を構成することで多様な応答性を獲得していることが明らかになった (Reid, 2012)。

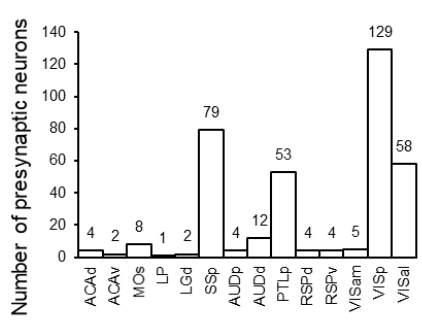
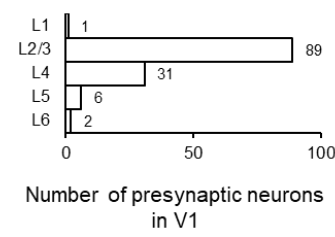
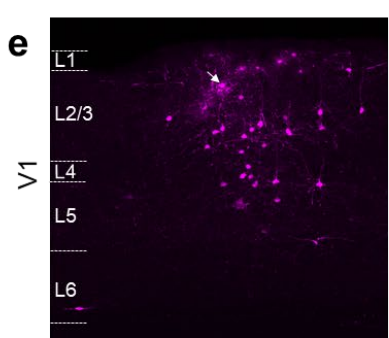
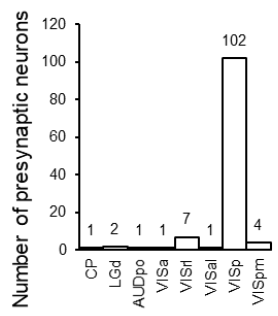
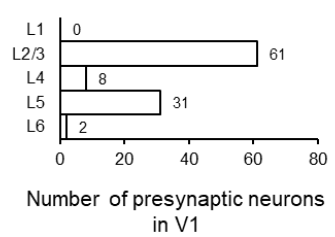
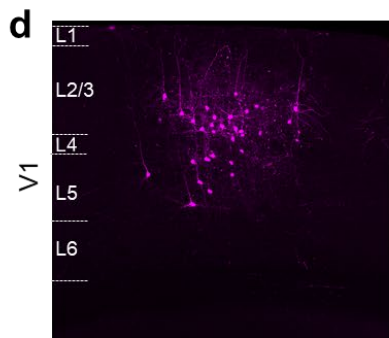
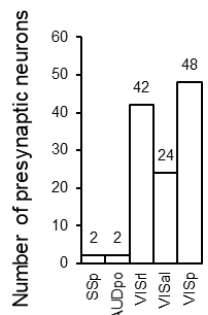
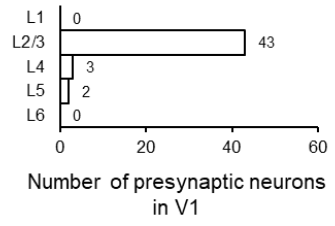
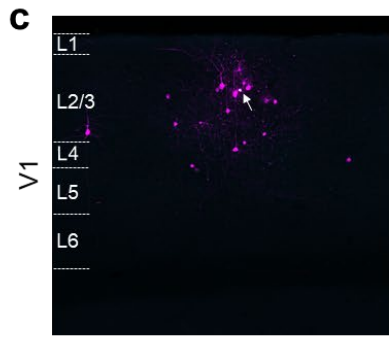
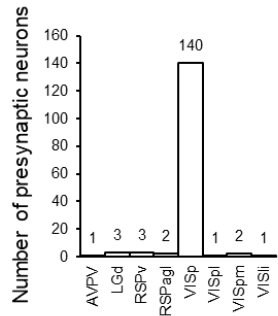
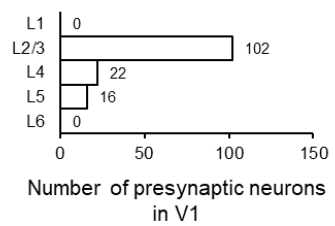
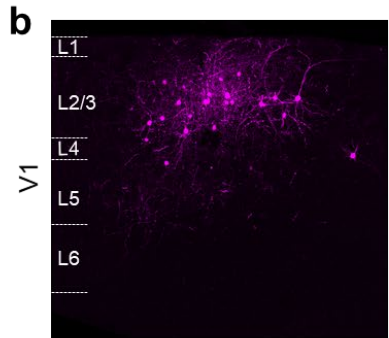
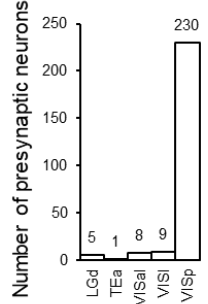
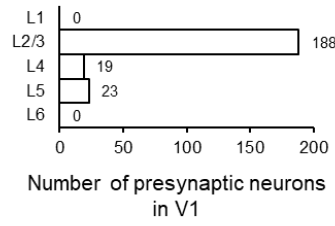
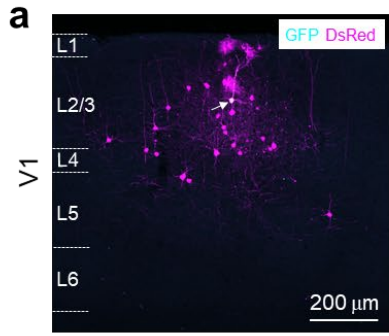
脳内には、独立したサブネットワークが空間的に重なり合って存在している。そのため、個々の単一神経細胞の応答性がどのように獲得されるかを理解するためには、その細胞へ入力するシナプス前細胞を同定し、ひとつひとつの細胞の機能を解析する必要がある。そこで Wertz らは、V1 の 2/3 層神経細胞の単一神経細胞ネットワーク標識を行い、シナプス前細胞群の機能解析を行った。その結果、類似した応答性を有する神経細胞から構成される "feature-locked" と、層ごとに異なる応答性を有する神経細胞から構成される "feature-variant" の、2 種類の回路モチーフが存在することを明らかにした (Wertz et al., 2015)。また Rossi らは、単一神経細胞ネットワークを構成するシナプス前細胞の空間的配置が、特定の方向の動きを処理する神経回路の基盤となっていることを明らかにした (Rossi et al., 2020)。これらの研究は V1 内局所回路の動作原理の一端を解明した一方で、単一神経細胞ネットワークが全脳レベルでどのように構成されているかという、構造基盤は未だ未解明である。そこで本章では、長距離投射神経細胞を効率的に標識可能な改良型の G を用いて (Kim et al., 2016)、視覚野単一神経細胞ネットワークの解剖学的解析を全脳レベルで実施した。



## 実験結果

### 5.1 V1 単一神経細胞ネットワークの解剖学的解析

V1 の 2/3 層単一神経細胞ネットワーク構造を解析するために、単一神経細胞ネットワーク標識を行った。エレクトロポレーションした細胞において一次感染が成立した 7-11 日後に脳を取り出し、脳切片を作製し、シナプス前細胞の分布領域を解析した。その結果、V1 の 2/3 層単一神経細胞は、主に V1 内の 2/3 層神経細胞から入力を受け、他の皮質領域および皮質下領域からの入力が少数であるネットワークと (Fig. 5-1a-b)、高次視覚野の rostromedial (RL, VISrl of the Allen brain atlas), anterolateral (AL, VISal of the Allen brain atlas) から多くの入力を受けているネットワークが認められた (Fig. 5-1 c)。また、V1 内の 5 層と 2/3 層から入力を受けた V1 単一神経細胞は、V1 内の局所神経細胞から多くの入力を受けていた (Fig. 5-1d)。その一方で、V1 内の 4 層と 2/3 層から入力を受けている V1 単一神経細胞は、一次体性感覚野 (SSp) や後部頭頂葉 (PTLp) から多くの入力を受けていた (Fig. 5-1e)。V1 の 2/3 層のほとんどの神経細胞は V1 外へと軸索を投射しており、各単一神経細胞は極めて多様な投射パターンを有している (Han et al., 2018)。そのため、V1 の単一神経細胞ネットワークの解剖学的構造の多様性は、ネットワークの出力先ごとに独自のモチーフ構造を形成していることが示唆される。



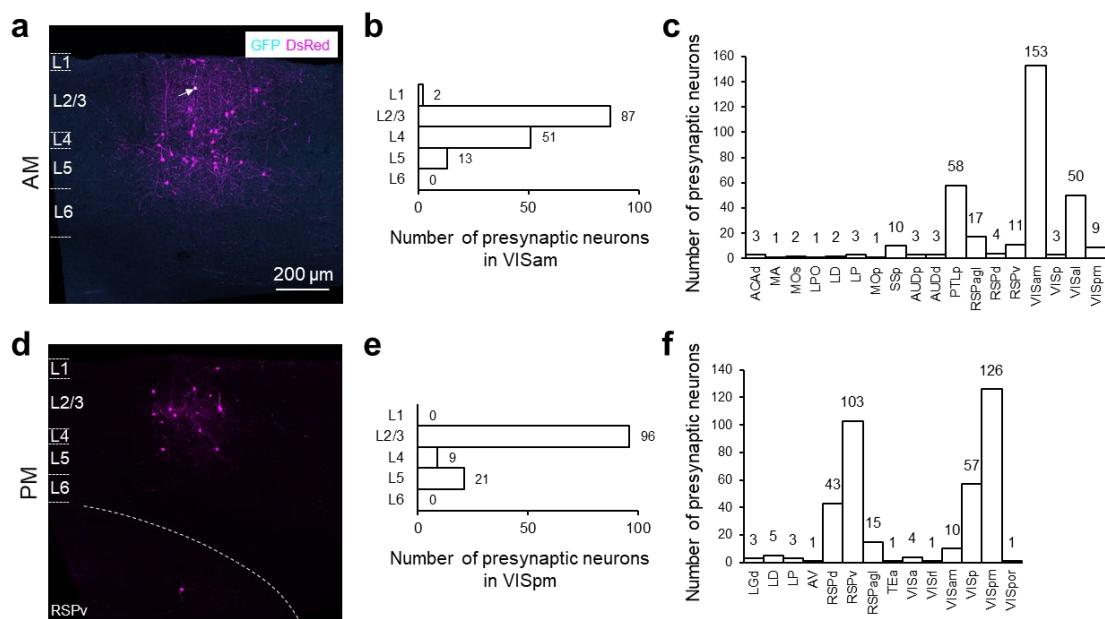
### **Figure 5-1. Monosynaptic rabies virus tracing from V1 single neurons**

(a) Left: A representative confocal image of one starter neuron and its presynaptic neurons in the mouse V1. Middle: The distribution and number of detected DsRed-labeled presynaptic neurons within the V1. Right: The brain-wide distribution of all labeled neurons providing monosynaptic input to the V1 single neurons. In a similar presentation, four more examples of virus-traced monosynaptic inputs for V1 L2/3 starter neurons are shown in (b), (c), (d), and (e), respectively. Images were taken 10 days (a), 9 days (b), 7 days (c), 9 days (d) and 11 days (e) after initial infection of the starter neurons with EnvA-RVΔG-DsRed (co-expression of GFP and DsRed) was observed by two-photon microscopy. Notice the difference between the first two examples versus the third, fourth and fifth: they represent four types of single neuronal networks, indicating a heterogeneity of V1 single neuronal networks. The Allen brain atlas was used to identify the distribution area of labeled neurons. ACAd, dorsal anterior cingulate area; ACAv, ventral anterior cingulate area; AUDp, Primary auditory area; AUDd, Dorsal auditory area; AUDpo, posterior auditory area; AVPV, anteroventral periventricular nucleus; CP, caudoputamen; MOs, Secondary motor area; LP, Lateral posterior nucleus of the thalamus; LGd, dorsal lateral geniculate complex; PTLp, Posterior parietal association areas; TEa, Temporal association areas; RSPagl, lateral agranular retrosplenial area; RSPd, dorsal retrosplenial area; RSPv, ventral retrosplenial area; SSp, primary somatosensory area; VISa, anterior visual area; VISal, anterolateral visual area; VISam, Anteromedial visual area; VISl, lateral visual area; VISli, laterointermediate area; VISp, primary visual area; VISpl, posterolateral visual area; VISpm, posteromedial visual area; VISrl, rostrolateral visual area

## 5.2 高次視覚野単一神経細胞ネットワークの構造的解析

さらに、内因性信号光学的イメージングにより領域同定した高次視覚野の anteromedial (AM, VISam of the Allen brain atlas) および posteromedial (PM, VISpm of the Allen brain atlas) において、単一神経細胞ネットワーク標識を行った。その結果、AM の 2/3 層の単一神経細胞ネットワークは、AM の 2/3 層と 4 層神経細胞の局所回路からなり、主に AL と後部頭頂葉 (PTLp) から入力を受け、一次体性感覚野 (SSp) と聴覚野 (AUDp, AUDd) から少数の入力があった (Fig. 5-2a-c)。PM の 2/3 層の単一神経細胞ネットワークは、主に PM の 2/3 層と 5 層神経細胞の局所回路からなり、V1 や腹側および背側の脳梁膨大後部皮質 (RSPd, RSPv) から入力を受けていた (Fig. 5-2d-f)。

以上より、高次視覚野はそれぞれ異なる解剖学的構造を持つ単一神経細胞ネットワークを形成していることが示された。AM の単一神経細胞ネットワークは後頭葉皮質の、より前方領域からの情報を統合しており、PM の単一神経細胞ネットワークは後頭葉皮質の、より後方領域からの情報を統合していると示唆される。PM は AM よりも V1 から多くの入力を受けており、これは V1 (下位)、PM (中間)、AM (上位) の階層的構造と一致していた (Siegle et al., 2021)。AM と PM のいずれも背側視覚経路に構成されている領域であり (Wang et al., 2011, 2012)、AM は他のモダリティとの情報統合を、PM はナビゲーションに関連した情報処理を担っていることが示唆され、マウス背側視覚経路における AM と PM の単一神経細胞ネットワークの役割が異なることが示された。



**Figure 5-2. Single cell-initiated G-deleted rabies virus tracing of monosynaptic inputs to one single neuron in the AM and one in PM**

Top: Targeted starter neuron in L2/3 of the AM. (a) A confocal image of the starter neuron (GFP-expressing cell marked by arrow) and its presynaptic neurons (labeled with DsRed) in the mouse AM. (b) The distribution and number of presynaptic neurons within the AM. (c) The brain-wide distribution and number of labeled neurons providing monosynaptic input to the AM single neuron. Bottom: Targeted starter neuron in L2/3 of the PM (in a

different animal). Panels in (d-f) are arranged similarly to (a-c). Images were taken 8 days (a) and 10 days (d) after initial infection of the starter neurons with EnvA-RVΔG-DsRed (co-expression of GFP and DsRed) was observed by two-photon microscopy. The Allen brain atlas was used to identify the distribution area of labeled neurons. ACAd, dorsal anterior cingulate area; AUDd, dorsal auditory area; AUDp, primary auditory area; AV, anteroventral nucleus of thalamus; LD, lateral dorsal nucleus of thalamus; LGd, dorsal part of the lateral geniculate complex; LP, lateral posterior nucleus of the thalamus; LPO, lateral preoptic area; MA, magnocellular nucleus; MOp, primary motor area; MOs, secondary motor area; PTLp, posterior parietal association areas; RSPagl, lateral agranular retrosplenial area; RSPd, dorsal retrosplenial area; RSPv, ventral retrosplenial area; SSp, primary somatosensory area; TEa, Temporal association areas; VISa, anterior visual area; VISal, anterolateral visual area; VISam, anteromedial visual area; VISp, primary visual area; VISpm, posteromedial visual area; VISpor, postrhinal visual area; VISrl, rostralateral visual area

### 5.3 考察

V1 単一神経細胞ネットワーク標識により、複数の構造モチーフが存在することが明らかとなった。この構造モチーフは Wertz らによる解剖学的解析と比較して多様性に富んでいた (Wertz et al., 2015)。その理由として、(1) エレクトロポレーション前に内因性信号光学的イメージングを実施することで V1 全体の神経細胞を標的とできたこと、(2) 標的細胞を特定の応答性を有する神経細胞に限定しなかったこと、(3) コドン最適化した狂犬病ウイルス G タンパク質 (Kim et al., 2016) を使用したことで長距離投射神経細胞の標識効率が上昇したこと、(4) 高純度高力価の狂犬病ウイルスベクターを使用したことにより非特異感染がないこと、などが考えられる。

V1 の 2/3 層単一神経細胞ネットワークは、基本的に 2/3 層内の神経細胞から構成されていた。しかしながら、ネットワークを構成する V1 神経細胞の層分布や、全脳レベルでのシナプス前細胞の分布様式は多様であることが明らかとなった。視覚野内の基本的な情報の流れとして、低次領域の 2/3, 5, 6 層神経細胞から高次領域の 4 層へのボトムアップ入力と、高次領域の 2/3, 5, 6 層神経細胞から低次領域の 1, 5, 6 層へのトップダウン入力がある (Callaway, 2004)。つまり、2/3 層神経細胞は 2/3 層内の情報処理結果を高次あるいは低次領域へと出力するが、単一神経細胞ネットワークごとにボトムアップ型またはトップダウン型の回路を形成していることが示唆される。また、V1 内には視覚情報に応答する神経細胞とそうでない神経細胞が混在していることが報告されており (Parker et al., 2020)、個々の細胞の機能により独自のネットワーク構造を有していると考えられる。

高次視覚野の 2/3 層単一神経細胞ネットワークも、V1 の単一神経細胞ネットワークと同様にシナプス前細胞は同一領域の同一層内に多く分布していた。その一方で、全脳レベルでシナプス前細胞の分布領域を解析した結果、PM および AM 神経細胞の投射様式とは大きく異なっていた (Wang et al., 2011, 2012)。そのため、高次視覚野の単一神経細胞ごとに独自のネットワーク構造を形成していると考えられる。今後、領域特異的な単一神経細胞ネットワーク標識により、視覚野に構成される回路モチーフが特定されると期待される。

## 6. 投射先特異的単一神経細胞ネットワーク

大脳皮質の機能は、低次領域からのボトムアップ入力、高次領域からのトップダウン入力、領域内の局所入力の統合に基づいて形成される。そのため、脳機能の基盤となる神経回路構造やその作動メカニズムを理解するためには、長距離投射神経細胞からの入力と局所回路からの入力を同定し、解析する必要がある。これまで、様々な神経回路トレーサーを使用して領域間をまたぐ大規模な神経回路解析が行われてきた (Luo, Callaway, and Svoboda, 2018)。また、電気生理学実験によるシナプス接続の解析や (Miles and Poncer, 1996; Yoshimura et al., 2005)、単一神経細胞ネットワーク標識による局所入力レベルの回路モチーフの同定が行われてきた (Wertz et al., 2005; Rossi et al., 2020)。しかしながら、特定の回路モチーフの入力元と出力先を対応付けた解析ができていなかったことから、大規模な神経回路に回路モチーフがどのように組み込まれているかを明らかにすることはできていなかった。V1 の 2/3 層神経細胞のほとんどの細胞は V1 外へと軸索を投射しており、各単一神経細胞は極めて多様な投射パターンを有している (Han et al., 2018)。そのため、投射先を同定した単一神経細胞の単シナプストレーシングをすることで、領域間をまたぐ大規模な神経回路へ組み込まれている回路モチーフの標識が可能となる。そこで本章では、特定の高次視覚野へ投射する V1 単一神経細胞を標的とした単一神経細胞ネットワーク標識法の確立を試みた。

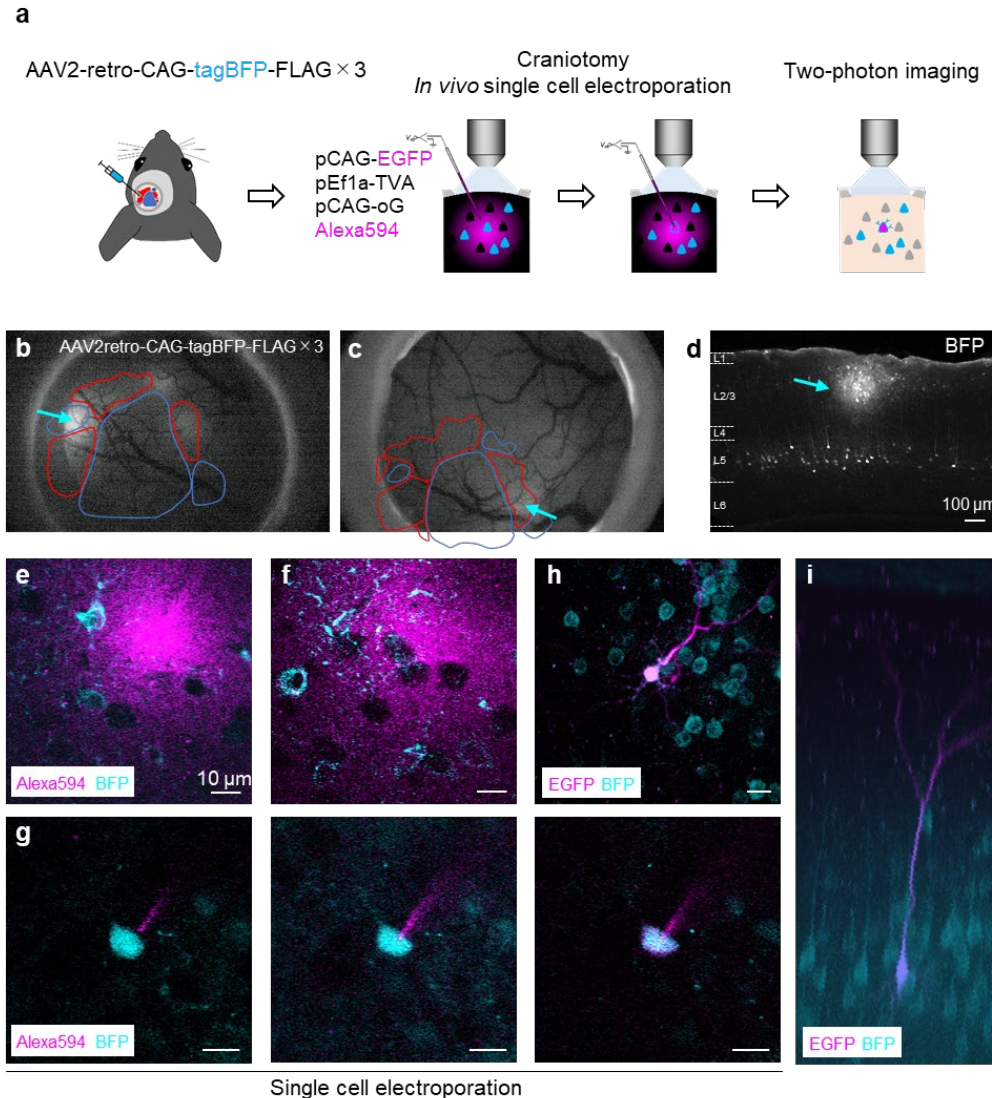
### 実験結果

#### 6.1 領域および投射先を限定した神経細胞標識

特定の高次視覚野に投射する V1 の神経細胞を標識するために、軸索終末から神経細胞へ感染し、逆行性に細胞を標識する AAV2-retro ベクターを使用した (Tervo et al., 2016)。内因性信号光学的イメージングにより視覚野の領域構造を同定し、標的の高次視覚野領域へ AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAGx3 を微量注入することで、高次視覚野投射 V1 神経細胞を逆行性に標識した (Fig. 6-1a)。高次視覚野領域のサイズを考慮すると、AAV2-retro ベクターの注入部位における局所感染細胞の蛍光が 200  $\mu\text{m}$  以内に収まれば、周辺領域へのウイルスベクターの漏れ込みがないと判断できる (Kim et al., 2020)。そこで、注入量を 25 nL 以下とすることで、標的高次視覚野内のみウイルスベクターを注入した。AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAGx3 を高次視覚野の AL または PM へ微量注入すると、注入領域において局所感染が起こり、標的領域へ正確に注入できていることが示された (Fig. 6-1b-d)。

次に、AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAGx3 で標識した PM 投射 V1 単一神経細胞へ 3 つのプラスミド (pCAG-EGFP, pCAG-oG, pEF1a-TVA950) を単一神経細胞エレクトロポレーションにより導入した。2 光子顕微鏡下で BFP 陽性の PM 投射 V1 神経細胞 (励起波長: 820 nm for BFP) と BFP 非陽性のその他の V1 神経細胞 (励起波長: 820 nm for Alexa Fluor 594) を二つの波長のレーザーを用いて可視化した (Fig. 6-1e-f)。shadow imaging 法により、ガラス電極

の先端付近に存在する全ての細胞を可視化することで、BFP 陽性神経細胞への単一神経細胞エレクトロポレーションが可能となった (Fig. 6-1g)。エレクトロポレーションした 1-3 日後に、EGFP 蛍光が確認され (Fig. 6-1h-i)、BFP 陽性神経細胞と非陽性細胞におけるエレクトロポレーションの成功率に差はなかった。



**Figure 6-1. In vivo single-cell electroporation of projection-defined neurons**

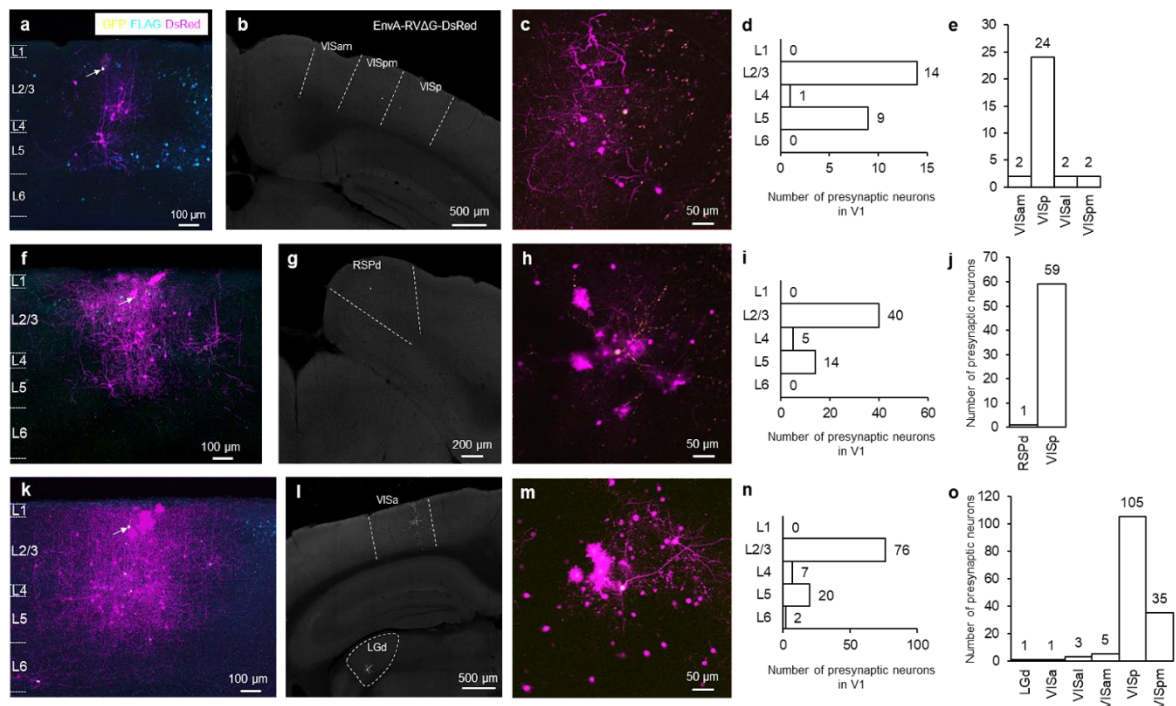
(a) Schematic of the experimental procedure of targeted injection of adeno-associated virus type 2 (AAV2)-retro after intrinsic signal optical imaging. (b, c) Fluorescence images of BFP signals derived from AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAGx3. Craniotomy was performed 2 weeks after injection into the (b) anterolateral (AL) or (c) posteromedial area (PM). BFP fluorescence was observed using a fluorescence stereomicroscope. The arrow indicates the injection site. The blue and red lines indicate the boundary between visual cortical areas identified by intrinsic signal optical imaging. (d) AAV2-retro injection site in the AL. The arrow indicates the injection site. The local fluorescence of the injection site should be no more than 300 μm in diameter to prevent leakage of the virus into other surrounding visual areas. (e) Two-photon imaging of labeled (BFP-positive) V1 neurons that project to the higher visual area PM. Leaked Alexa red forms intense halo around the tip of the electroporating pipette in which somata of unlabeled V1 neurons are seen as well-delineated dark holes. (f) Same as (e) but

positioned 10  $\mu\text{m}$  below the pipette tip. (g) Single-cell electroporation to a virally labeled neuron under the two-photon microscopy. (h) Z projection image of the electroporated neuron. (i) 3D reconstructions of the electroporated neuron projecting to the PM.

## 6.2 PM 投射 V1 単一神経細胞ネットワークの標識

次に、BFP と EGFP を共発現している PM 投射 V1 単一神経細胞の近傍に EnvA-RVΔG-DsRed を微量注入した (100-200  $\mu\text{m}$  以内、200 nL)。その結果、PM 投射 V1 単一神経細胞のネットワークが標識された。DsRed 陽性のシナプス前細胞は、主に V1 の 2/3 層と 5 層に分布し (Fig. 6-2a, d, f, i, k, n)、その他にも PM、AM、AL などの高次視覚野領域 (Fig. 6-2b, e, g, j, l, o) で観察された。生体内の単一神経細胞ネットワークは、2 光子顕微鏡下で観察された (Fig. 6-2c, h, m)。これらの結果から、PM 投射 V1 単一神経細胞ネットワークは、PM からのフィードバック入力に関わるネットワークのほかに、他領域から V1 へのフィードバック情報を PM へ出力しているネットワークが存在することが示唆された。

AAV 感染細胞を対象とした単一神経細胞ネットワーク標識は、スターター細胞が早期に細胞死し、少数のシナプス前細胞しか標識されなかった個体が多く認められた。しかしながら、pEF1a-TVA950 により TVA950 を発現することにより、AAV 感染細胞の単一神経細胞ネットワーク標識効率は上昇した。



**Figure 6-2. Single cell-initiated monosynaptic G-deleted rabies virus tracing of presynaptic neurons from AAV2-retro-labeled PM-projecting V1 single neurons**

Upper, middle, and lower row of panels represent three examples of single neuronal networks of PM-projecting layer 2/3 V1 neurons, each from a different mouse. (a) A confocal image of one PM-projecting V1 starter neuron (white arrow) and its presynaptic neurons (DsRed) in the mouse V1. The FLAG-positive starter V1 neuron projects



to the posteromedial visual area (PM, cyan). (b) The long-range projection neurons monosynaptically connected to the same PM-projecting V1 single neurons. (c) Two-photon in vivo imaging of the PM-projecting single-cell network shown in (a). (d) The distribution and number of presynaptic neurons that compose local neural circuits within V1. (e) The distribution and number of labeled neurons in locations providing long-range monosynaptic input to the same PM-projecting V1 single neuron. (f-j) A second and (k-o) a third example, respectively, with data presented as in (a-e). Images were taken 7 days (a), 5 days (f), and 10 days (k) after initial infection of the starter neurons with EnvA-RVΔG-DsRed (co-expression of GFP and DsRed) was observed by two-photon microscopy. The Allen brain atlas was used to identify the anatomical regions where labeled neurons were localized. RSPd, dorsal retrosplenial area; LGd, dorsal part of the lateral geniculate complex; VISa, anterior visual area; VISal, anterolateral visual area; VISam, anteromedial visual area; VISp, primary visual area (V1); VISpm, posteromedial visual area (PM)

### 6.3 考察

本項では、①経頭蓋の内因性光学的信号イメージング、②AAV2-retro ベクターによる逆行性標識、④生体内単一神経細胞エレクトロポレーション、④改変型狂犬病ウイルスベクターによる単シナプストレーシング、を組み合わせることで投射先特異的な単一神経細胞ネットワークの標識を実現した。AAV 感染細胞と AAV 非感染細胞ではエレクトロポレーション自体の成功率に差はなかったが、AAV 感染細胞においては EnvA-RVΔG 注入後の生存率が低下した。この最大の要因は、AAV と RVΔG の重複感染による細胞ストレスであると考えられる。そのため、実験成功率の向上にはより健全性の高いスターター細胞を選択することが重要である。エレクトロポレーションした細胞の健全性を、視覚刺激への神経応答をもとに評価をすることが一つの解決策となるが (Rossi et al., 2020)、この評価法では視覚刺激に応答しない V1 神経細胞の健全性を判断することはできない。したがって、細胞ストレスを軽減するために、TVA950 の使用と、実験手順の最適化を行うことが合わせて重要になる。

高次視覚野の神経細胞はそれぞれの領域ごとに特徴的な応答性を有している (Andermann et al., 2011; Marshel et al., 2011)。また、高次視覚野へ投射する V1 神経細胞の 2 光子イメージングを行った先行研究では、V1 神経細胞は投射先ごとに異なる視覚的特徴に応答することが報告されていることから、高次視覚野における視覚応答特性の形成には V1 からの機能特異的な入力に寄与すると考えられている (Glickfeld et al, 2013; Kim et al, 2018)。前項で示した V1 単一神経細胞ネットワークの不均一性 (Figure 5-1) と比較して、PM 投射 V1 神経細胞の単一神経細胞ネットワークはより均一であり、主要な入力元は V1 内の近い領域にある細胞群であることが分かった (Figure 6-2)。このことから、V1 内の投射先が同じ細胞群は、比較的均質なネットワークを持ち、各高次視覚野の機能形成を担っていることが示唆された。今後、V1 内に構成される投射先特異的回路モチーフを明らかにすることで、視覚神経経路に組み込まれる普遍的な回路モチーフの理解が進むことが期待される。

## 7. 単一神経細胞ネットワークの機能的解析

生体脳内の神経細胞活動を計測する手法の一つに、2光子顕微鏡を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法がある (Stosiek et al., 2003; Ohki et al., 2005)。この手法では、生体脳内の神経細胞へあらかじめ  $\text{Ca}^{2+}$  インジケーターを導入し、神経細胞活動に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  動態変化を蛍光変化として取得する。 $\text{Ca}^{2+}$  インジケーターには、神経系標識化合物の Cal-520 や OGB-1、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質の GCaMP や R-GECO1 が用いられている (Nakai et al., 2001; Zhao et al., 2011)。AAV や狂犬病ウイルスベクターを用いて  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質を発現させることで、特定の細胞種や特定の領域へ投射する細胞、シナプス接続する神経回路の機能イメージングが可能となる (Osakada et al., 2011; Wertz et al., 2015)。

通常の2光子顕微鏡は、単一平面へ2光子レーザーを走査することで、その平面に分布する蛍光標識された神経細胞を検出する。しかしながら、脳内の神経回路は三次元的に構成されているため、異なる深さに分布する細胞を同時に検出することはできず、神経回路全体がどのように動作し、演算を行っているかを包括的に解析することは不可能であった。そこで我々は、多平面同時2光子イメージングシステムを構築した (Onda et al., 2021)。本システムでは、焦点距離の異なる複数の2光子レーザーを使用することで、生体脳内の異なる深さに存在する神経細胞群、あるいは単一神経細胞のスパインの活動を同時に取得することを可能とした。

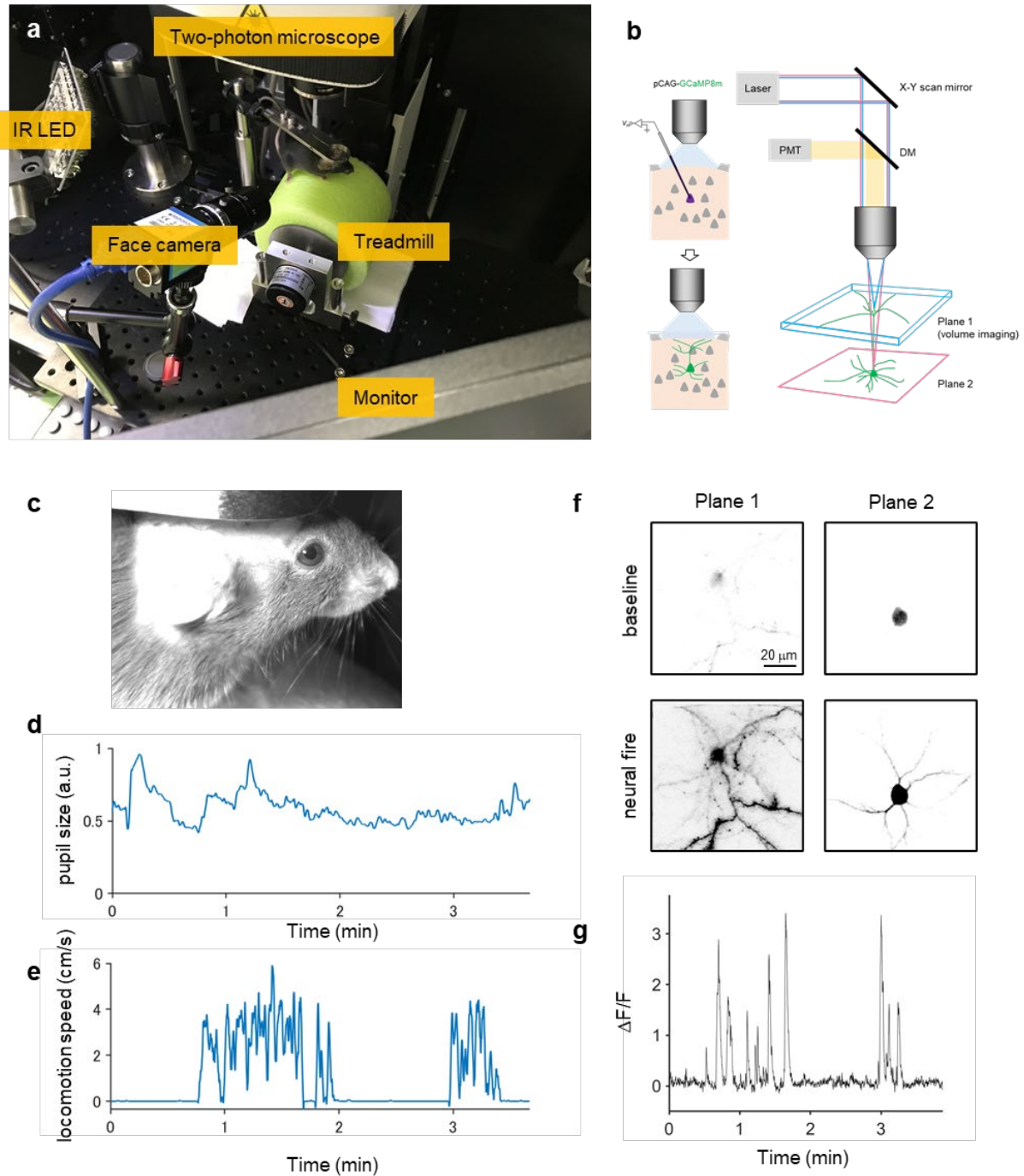
生体脳内の神経細胞を覚醒行動下において2光子  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングした研究により、動物の行動に伴う活動シグナルの存在が示された (Dombeck et al., 2007)。視覚野においては、個々の神経細胞の応答選択性は変化しないが、マウスの行動に伴い神経細胞の活動様式は大きく変化する (Niel and Stryker, 2010; Ayaz et al., 2013)。したがって、神経回路の動作基盤を明らかにするためには、(1) 回路モチーフを三次元的に機能イメージングすることで、回路を構成する神経細胞群の活動を同一時間軸で取得する多平面同時イメージングシステムと、(2) 2光子イメージング下の動物の行動(歩行速度、眼球運動、スニフリングなど)をモニターするシステム、を組み合わせ、神経細胞活動と動物の行動を対応付けて解析する必要がある。そこで本章では、2光子顕微鏡下でマウスの行動をモニターするシステムを構築し、多平面同時イメージングシステムと組み合わせた機能的解析を試みた。

## 実験結果

### 7.1 覚醒行動下のスパインイメージング

2光子顕微鏡下でマウスの行動をモニターするために、頭部固定されたマウスの歩行速度、眼球運動を記録するシステムを構築した (Fig. 7-1a)。次に、構築したシステムを用いて、覚醒行動下における2光子  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングが可能かを検証した。まず、マウス視覚野の2/3層単一神経細胞へエレクトロポレーション法により GCaMP8m を導入し、GCaMP8m の発現確認後にマウスをトレッドミル上に頭部固定した。神経細胞の細胞体底辺部から伸びる基底樹状突起 (basal dendrite) と、脳表面へ伸びる先端樹状突起 (apical dendrite) スパインの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを多平面同時イメージングにより計測した (Fig. 7-1b)

2光子顕微鏡下のマウスに赤外線 LED を照射することで、イメージング時の暗室条件下におけるマウスの顔を CMOS カメラで撮影することを可能とした (Fig. 7-1c)。瞳孔サイズは、DeepLabCut を用いた機械学習により任意の特徴点座標をトレースし (Mathis et al., 2018)、瞳孔サイズの変化量を算出した (Fig. 7-1d)。マウスの歩行速度は、ロータリーエンコーダによりトレッドミルの回転の変位量を取得することで算出した (Fig. 7-1e)。2光子レーザーにはダイバージェンスおよび位相の異なる二つのレーザーを使用し、脳表付近の基底樹状突起はベッセルビームを用いてボリュームイメージングを行った (Onda et al., 2021)。その結果、神経細胞の発火が認められ (Fig. 7-1f)、個々のスパインの蛍光強度変化が検出された (Fig. 7-1g)。およそ  $0.5 \mu\text{m}$  の微小構造であるスパインの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが取得できたことから、本システムはマウスの行動による揺れなどの影響を受けずに、安定した2光子  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングが可能であることが示された。



**Figure 7-1. *In vivo* spine imaging with multi-plane two-photon imaging system.**

(a) The experimental device for acquiring the walking speed of mice and capturing eye and nose movements. (b) Schematic of the experimental procedure of single-cell spine imaging with multi-plane two-photon imaging system. (c) The face of a mouse illuminated with IR LED. (d) Example trace of pupil size. (e) Example trace of locomotion speed. (f) Frames from multi-plane  $\text{Ca}^{2+}$  imaging. Plane 1 and plane 2 show imaging frames of apical dendrites and basal dendrites, respectively. (g) An example of spine  $\text{Ca}^{2+}$  signals of (f).

## 7.2 単一神経細胞ネットワークの GCaMP 標識

次に、単一神経細胞ネットワークの機能解析を行うことを目的として、単一神経細胞ネットワークを GCaMP6m で標識可能か検証した (Fig. 7-2a)。マウス視覚野 2/3 層の単一神経細胞へ 3 つのプラスミド (pCAG-DsRed2, pEF1a-TVA950, pCAG-oG) をエレクトロポレーションにより導入し、エレクトロポレーションした細胞に DsRed が発現したことを確認した後に (Fig. 7-2b)、EnvA-RVΔG-GCaMP6m を微量注入した。その結果、DsRed 陽性細胞に EnvA-RVΔG-GCaMP6m の一次感染が認められ、その後、経時的に GCaMP で標識されたシナプス前細胞群が観察された (Fig. 7-2c)。EnvA-RVΔG-DsRed を用いた回路標識と同様のトレーシングが成立し、単一神経細胞ネットワークの機能的解析が可能であることが示唆された。

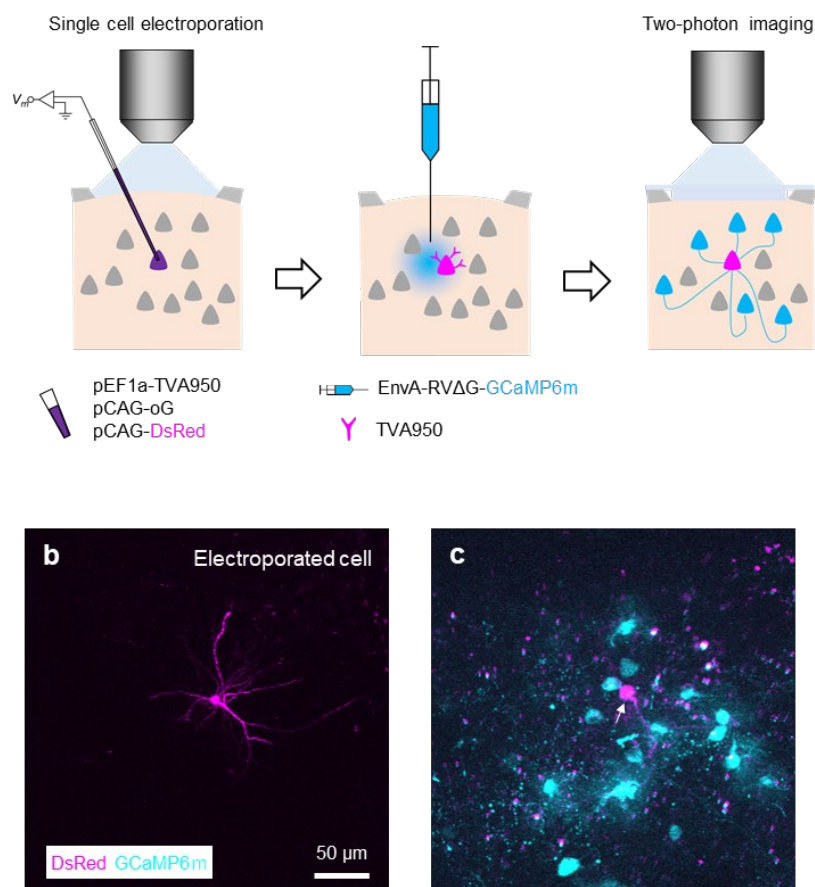


Figure 7-2. 単一神経細胞を起点とした EnvA-RVΔG-GCaMP6m トレーシング

(a) Schematic of the experimental procedure. (b, c) Two-photon maximum-intensity z projection images of electroporated neuron (b) and single-cell neural network (c). White arrow indicates the starter neuron.

### 7.3 考察

中枢神経系は、常に生体内外の環境をモニターしている。内部環境の例として、内臓筋の動き、心拍数、代謝情報などが、外部環境の例として、嗅覚、味覚、触覚、聴覚、視覚情報が中枢神経系に伝達されている。そして、これらの情報を統合し、特定の生理反応、情動表現、行動などが誘導される。そのため、神経細胞の機能イメージングを行う上で、実験動物の脳活動以外の状態をモニターし、内部環境および外部環境の変化と神経細胞活動を対応付けた解析が重要である。近年の研究では、マウスは様々な情動状態に特異的な表情を表出することが報告されている (Dolensek et al., 2020)。このことから、2光子  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング下のマウスの顔面情報や、行動をモニターすることが極めて重要であるといえる。

覚醒下の実験動物からの記録では、実験動物の歩行や呼吸により、神経細胞の画像上における位置が変化する。したがって、画像の揺れを画像処理による補正することが必要になる。xy 方向の画像の揺れは、画像処理により補正が可能である (Guizar-Sicairos et al., 2008; Onda et al., 2021)。その一方で z 方向の揺れは、そもそも観察対象が視野からはずれてしまうために、画像処理での補正は困難である。したがって、ヘッドフレームやフレームホルダー、イメージングウィンドウの最適化により、物理的に対応する必要がある。揺れ補正の精度は、算出した  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの波形が神経細胞活動のシグナルと一致していることから判断される。マウスの動きのアーチファクトの除去には、イメージングウィンドウに重層ガラスを使用すること、ヘッドフレームやフレームホルダーをチタンなどの剛性の高い金属を使用することが有効だった。

本研究結果より、生体内の特定の神経回路を多平面同時  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングし、その回路動作を網羅的に解析できることが示された。今後、投射先特異的な回路モチーフの機能的解析を、マウスの行動と対応付けて検証することで、特定の神経回路が生体内外の情報をどのように統合処理し、高次領域へと情報出力するかを明らかにされることが期待される。

## 8. 総括

神経回路の基本原理を明らかにするためには、個々の神経細胞のシナプス前ネットワークの構造と機能を全脳レベルで解析することが必要不可欠である。この解析を実現する実験手法の一つに、単一神経細胞を起点とした狂犬病ウイルストレーシングがある (Marshel et al., 2010; Wertz et al., 2015)。狂犬病ウイルスによる単シナプストレーシングは、EnvA/TVA システムによる標的神経細胞へのウイルスターゲティングと、G の補完による EnvA-RVΔG の単シナプストレーシングにより達成される。単一神経細胞を起点とした単シナプストレーシングでは、標的が単一神経細胞に限定されるため、大規模な神経回路解析と比較して精密な実験系を確立することが必要である。本研究では、単一神経細胞ネットワーク標識の効率を高める以下の 6 つの重要な因子を特定した。(1) 高力価、高純度の EnvA-RVΔG の作製、(2) pEF1a-TVA950 による TVA950 の発現、(3) 狂犬病ウイルストレーシングに最適化した oG の使用 (Kim et al., 2016)、(4) エレクトロポレーションした細胞の健全性 (レポータータンパク質により樹状突起と軸索が明確に標識されている)、(5) エレクトロポレーションした細胞の近傍への EnvA-RVΔG 微量注入、(6) それぞれの実験ステップの手順と過程の最適化。そして、投射先を限定した単一神経細胞からの単シナプス RVΔG トレーシングにより、視野における単一神経細胞ネットワークの入出力構造を明らかにした。

神経細胞のシナプス接続様式を調べる方法として、いくつかの実験手法が存在する。スライス脳における複数神経細胞の同時記録は、記録した神経細胞間のシナプス接続の有無を明らかにすることができる (Miles and Poncer, 1996; Ko et al., 2011; Kim et al., 2018)。しかし、この方法で同定できる接続は、スライスした脳切片内に残された局所的な接続に限定される。グルタミン酸アンケーシングは、スライス脳における神経細胞の接続をマッピングすることが可能であるが、細胞種レベルの解析はできない (Callaway and Katz, 1993)。光遺伝学を用いた回路マッピングでは、脳スライス中のチャンネルロドプシン発現細胞の軸索末端を光刺激することで、長距離のシナプス接続様式をマッピングすることができるが (Petreanu et al., 2007)、投射元の神経細胞の同定はできない。これらの電気生理学的手法は、接続様式を明らかにするというよりも、他の手法で示唆された接続の検証や、シナプスの特性を詳細に分析するために用いられることがほとんどである。また、脳や網膜の局所領域におけるシナプス接続を明らかにするために、電子顕微鏡による組織解析が用いられているが、スループットが低く、哺乳類の脳全体の解析には今のところ適していない (Kim et al., 2014; Lee et al., 2016)。これらの実験手法とは対照的に、単一神経細胞ネットワーク標識は、脳全体において細胞レベルのシナプス接続を明らかにし、これまで知られていなかった回路構造を特定することも可能である。さらに、TVA950 と oG の導入方法を最適化することで、標識効率が大幅に向上することが期待される。

本研究では、投射先を限定した単一神経細胞を起点とした単シナプストレーシングにより、単一神経細胞レベルでの神経回路構造を全脳レベルで解析した。この方法を機能解析に応用することで、単一神経細胞ネットワークの微細な構造と機能を関連付けることができる (Osakada et al., 2011; Tian et al., 2016; Wertz et al., 2015)。また、V1 神経細胞のトランスクリ

プトーム解析により、V1 内では同一層内でも多様な細胞種が混在していることが報告されており（Tasic et al., 2016, 2018; Gouwens et al., 2019, 2020）、単一神経細胞ネットワーク標識による神経細胞種特異的なネットワークの解明が期待される。

単一神経細胞ネットワーク標識は、多様で柔軟な脳機能の基盤となる神経回路のモチーフを明らかにする有用な手法である。今後、神経回路の構造特異性、細胞種特異性、機能特異性の理解に貢献し、回路モチーフと大規模ネットワークの橋渡しとなる理解が得られることが期待される。本手法は、生体の脳内におけるより微細な神経回路の組織化、発達、計算、病態の解明に関する理解を深めるだろう。

以上、本研究の成果は、神経回路の情報処理様式、脳の機能分化、および神経・精神疾患における回路病態の理解に貢献できると期待される。



## 引用文献

- Alsteens, D., Newton, R., Schubert, R., Martinez-Martin, D., Delguste, M., Roska, B., Müller, D.J., 2017. Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells. *Nat. Nanotechnol.* 12, 177–183. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.228>
- Andermann, M.L., Kerlin, A.M., Roumis, D.K., Glickfeld, L.L., Reid, R.C., 2011. Functional specialization of mouse higher visual cortical areas. *Neuron* 72, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.013>
- Ayaz, A., Saleem, A.B., Schölvinc, M.L., Carandini, M., 2013. Locomotion controls spatial integration in mouse visual cortex. *Curr. Biol.* 23, 890–4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.012>
- Bates, P., Young, J.A.T., Varmus, H.E., 1993. A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* 74, 1043–51. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90726-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90726-7)
- Brainard, D.H., 1997. The Psychophysics Toolbox. *Spat. Vis.* 10.
- Callaway, E.M., Katz, L.C., 1993. Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7661–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7661>
- Callaway, E.M., 2004. Feedforward, feedback and inhibitory connections in primate visual cortex. *Neural Netw.* 17, 625–32. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2004.04.004>
- Cossell, L., Iacaruso, M.F., Muir, D.R., Houlton, R., Sader, E.N., Ko, H., Hofer, S.B., Mrsic-Flogel, T.D., 2015. Functional organization of excitatory synaptic strength in primary visual cortex. *Nature* 518, 399–403. <https://doi.org/10.1038/nature14182>
- Couto, J., Musall, S., Sun, X.R., Khanal, A., Gluf, S., Saxena, S., Kinsella, I., Abe, T., Cunningham, J.P., Paninski, L., Churchland, A.K., 2021. Chronic, cortex-wide imaging of specific cell populations during behavior. *Nat. Protoc.* 16, 3241–3263. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00527-z>
- Cruz-Martín, A., El-Danaf, R.N., Osakada, F., Sriram, B., Dhande, O.S., Nguyen, P.L., Callaway, E.M., Ghosh, A., Huberman, A.D., 2014. A dedicated circuit links direction-selective retinal ganglion cells to the primary visual cortex. *Nature* 507, 358–361. <https://doi.org/10.1038/nature12989>
- Dana, H., Novak, O., Guardado-Montesino, M., Fransen, J.W., Hu, A., Borghuis, B.G., Guo, C., Kim, D.S., Svoboda, K., 2018. Thy1 transgenic mice expressing the red fluorescent calcium indicator

- jRGECO1a for neuronal population imaging in vivo. *PLoS One* 13, e0205444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205444>
- de Vries, S.E.J., Lecoq, J.A., Buice, M.A., Groblewski, P.A., Ocker, G.K., Oliver, M., Feng, D., Cain, N., Ledochowitsch, P., Millman, D., Roll, K., Garrett, M., Keenan, T., Kuan, L., Mihalas, S., Olsen, S., Thompson, C., Wakeman, W., Waters, J., Williams, D., Barber, C., Berbesque, N., Blanchard, B., Bowles, N., Caldejon, S.D., Casal, L., Cho, A., Cross, S., Dang, C., Dolbeare, T., Edwards, M., Galbraith, J., Gaudreault, N., Gilbert, T.L., Griffin, F., Hargrave, P., Howard, R., Huang, L., Jewell, S., Keller, N., Knoblich, U., Larkin, J.D., Larsen, R., Lau, C., Lee, E., Lee, F., Leon, A., Li, L., Long, F., Luviano, J., Mace, K., Nguyen, T., Perkins, J., Robertson, M., Seid, S., Shea-Brown, E., Shi, J., Sjoquist, N., Slaughterbeck, C., Sullivan, D., Valenza, R., White, C., Williford, A., Witten, D.M., Zhuang, J., Zeng, H., Farrell, C., Ng, L., Bernard, A., Phillips, J.W., Reid, R.C., Koch, C., 2020. A large-scale standardized physiological survey reveals functional organization of the mouse visual cortex. *Nat. Neurosci.* 23, 138–151. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0550-9>
- Dolensek, N., Gehrlach, D.A., Klein, A.S., Gogolla, N., 2020. Facial expressions of emotion states and their neuronal correlates in mice. *Science* 368, 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.aaz9468>
- Dombeck, D.A., Khabbaz, A.N., Collman, F., Adelman, T.L., Tank, D.W., 2007. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.003>
- Elleder, D., Melder, D.C., Trejbalova, K., Svoboda, J., Federspiel, M.J., 2004. Two Different Molecular Defects in the Tva Receptor Gene Explain the Resistance of Two tva<sup>r</sup> Lines of Chickens to Infection by Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Viruses. *J. Virol.* 78, 13489–13500. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.24.13489-13500.2004>
- Guizar-Sicairos, M., Thurman, S.T., Fienup, J.R., 2008. Efficient subpixel image registration algorithms. *Opt. Lett.* 33, 156–8. <https://doi.org/10.1364/ol.33.000156>
- Garrett, M.E., Nauhaus, I., Marshel, J.H., Callaway, E.M., Garrett, M.E., Marshel, J.H., Nauhaus, I., Garrett, M.E., 2014. Topography and Areal Organization of Mouse Visual Cortex. *J. Neurosci.* 34, 12587–12600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1124-14.2014>
- Glickfeld, L.L., Andermann, M.L., Bonin, V., Reid, R.C., 2013. Cortico-cortical projections in mouse visual cortex are functionally target specific. *Nat. Neurosci.* 16, 219–226. <https://doi.org/10.1038/nn.3300>
- Gouwens, N.W., Sorensen, S.A., Berg, J., Lee, C., Jarsky, T., Ting, J., Sunkin, S.M., Feng, D., Anastassiou, C.A., Barkan, E., Bickley, K., Blesie, N., Braun, T., Brouner, K., Budzillo, A.,

Caldejon, S., Casper, T., Castelli, D., Chong, P., Crichton, K., Cuhaciyan, C., Daigle, T.L., Dalley, R., Dee, N., Desta, T., Ding, S.-L.L., Dingman, S., Doperalski, A., Dotson, N., Egdorf, T., Fisher, M., de Frates, R.A., Garren, E., Garwood, M., Gary, A., Gaudreault, N., Godfrey, K., Gorham, M., Gu, H., Habel, C., Hadley, K., Harrington, J., Harris, J.A., Henry, A., Hill, D.J., Josephsen, S., Kebede, S., Kim, L., Kroll, M., Lee, B., Lemon, T., Link, K.E., Liu, X., Long, B., Mann, R., McGraw, M., Mihalas, S., Mukora, A., Murphy, G.J., Ng, L.L., Ngo, K., Nguyen, T.N., Nicovich, P.R., Oldre, A., Park, D., Parry, S., Perkins, J., Potekhina, L., Reid, D., Robertson, M., Sandman, D., Schroedter, M., Slaughterbeck, C., Soler-Llavina, G., Sulc, J., Szafer, A., Tasic, B., Taskin, N., Teeter, C., Thatra, N., Tung, H., Wakeman, W., Williams, G., Young, R., Zhou, Z., Farrell, C., Peng, H., Hawrylycz, M.J., Lein, E., Ng, L.L., Arkhipov, A., Bernard, A., Phillips, J.W., Zeng, H., Koch, C., 2019. Classification of electrophysiological and morphological neuron types in the mouse visual cortex. *Nat. Neurosci.* 22, 1182–1195. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0417-0>

Gouwens, N.W., Sorensen, S.A., Baftizadeh, F., Budzillo, A., Lee, B.R., Jarsky, T., Alfiler, L., Baker, K., Barkan, E., Berry, K., Bertagnolli, D., Bickley, K., Bomben, J., Braun, T., Brouner, K., Casper, T., Crichton, K., Daigle, T.L., Dalley, R., de Frates, R.A., Dee, N., Desta, T., Lee, S.D., Dotson, N., Egdorf, T., Ellingwood, L., Enstrom, R., Esposito, L., Farrell, C., Feng, D., Fong, O., Gala, R., Gamlin, C., Gary, A., Glandon, A., Goldy, J., Gorham, M., Graybuck, L., Gu, H., Hadley, K., Hawrylycz, M.J., Henry, A.M., Hill, D.J., Hupp, M., Kebede, S., Kim, T.K., Kim, L., Kroll, M., Lee, C., Link, K.E., Mallory, M., Mann, R., Maxwell, M., McGraw, M., McMillen, D., Mukora, A., Ng, Lindsay, Ng, Lydia, Ngo, K., Nicovich, P.R., Oldre, A., Park, D., Peng, H., Penn, O., Pham, T., Pom, A., Popović, Z., Potekhina, L., Rajanbabu, R., Ransford, S., Reid, D., Rimorin, C., Robertson, M., Ronellenfitch, K., Ruiz, A., Sandman, D., Smith, K., Sulc, J., Sunkin, S.M., Szafer, A., Tieu, M., Torkelson, A., Trinh, J., Tung, H., Wakeman, W., Ward, K., Williams, G., Zhou, Z., Ting, J.T., Arkhipov, A., Sümbül, U., Lein, E.S., Koch, C., Yao, Z., Tasic, B., Berg, J., Murphy, G.J., Zeng, H., 2020. Integrated Morphoelectric and Transcriptomic Classification of Cortical GABAergic Cells. *Cell* 183, 935-953.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.057>

Gray, E.R., Illingworth, C.J.R., Coffin, J.M., Stoye, J.P., 2011. Binding of more than one Tva800 molecule is required for ASLV-A entry. *Retrovirology* 8, 96. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-96>

Han, Y., Kebschull, J.M., Campbell, R.A.A.A., Cowan, D., Imhof, F., Zador, A.M., Mrsic-Flogel, T.D., 2018. The logic of single-cell projections from visual cortex. *Nature* 556, 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature26159>

Haubensak, W., Kunwar, P.S., Cai, H., Ciocchi, S., Wall, N.R., Ponnusamy, R., Biag, J., Dong, H.-W., Deisseroth, K., Callaway, E.M., Fanselow, M.S., Lüthi, A., Anderson, D.J., 2010. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* 468, 270–6. <https://doi.org/10.1038/nature09553>

- Hillman, E.M.C., 2007. Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *J. Biomed. Opt.* 12, 051402. <https://doi.org/10.1117/1.2789693>
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1959. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J. Physiol.* 148, 574–91. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006308>
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1974. Sequence regularity and geometry of orientation columns in the monkey striate cortex. *J. Comp. Neurol.* 158, 267–93. <https://doi.org/10.1002/cne.901580304>
- Jha, N.K., Latinovic, O., Martin, E., Novitskiy, G., Marin, M., Miyauchi, K., Naughton, J., Young, J.A.T., Melikyan, G.B., 2011. Imaging single retrovirus entry through alternative receptor isoforms and intermediates of virus-endosome fusion. *PLoS Pathog.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001260>
- Juavinett, A., Nauhaus, I., Garrett, M.E., Zhuang, J., Callaway, E.M., 2017. Automated identification of mouse visual areas with intrinsic signal imaging. *Nat. Protoc.* 12, 32–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.158>
- Judkewitz, B., Rizzi, M., Kitamura, K., Häusser, M., 2009. Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 862–869. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.56>
- Kalatsky, V.A., Stryker, M.P., 2003. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 38, 529–45. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00286-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00286-1)
- Kim, E.J., Jacobs, M.W., Ito-Cole, T., Callaway, E.M., 2016. Improved Monosynaptic Neural Circuit Tracing Using Engineered Rabies Virus Glycoproteins. *Cell Rep.* 15, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.067>
- Kim, E.J., Zhang, Z., Huang, L., Ito-Cole, T., Jacobs, M.W., Juavinett, A.L., Senturk, G., Hu, M., Ku, M., Ecker, J.R., Callaway, E.M., 2020. Extraction of Distinct Neuronal Cell Types from within a Genetically Continuous Population. *Neuron* 107, 274-282.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.04.018>
- Kim, J.S., Greene, M.J., Zlateski, A., Lee, K., Richardson, M., Turaga, S.C., Purcaro, M., Balkam, M., Robinson, A., Behabadi, B.F., Campos, M., Denk, W., Seung, H.S., EyeWriters, 2014. Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina. *Nature* 509, 331–336. <https://doi.org/10.1038/nature13240>
- Kim, M.H., Znamenskiy, P., Iacaruso, M.F., Mrsic-Flogel, T.D., 2018. Segregated Subnetworks of Intracortical Projection Neurons in Primary Visual Cortex. *Neuron* 100, 1313-1321.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.023>

- Kitamura, K., Judkewitz, B., Kano, M., Denk, W., Häusser, M., 2008. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat. Methods* 5, 61–67. <https://doi.org/10.1038/nmeth1150>
- Kleiner M, Brainard D, Pelli D., 2007, "What's new in Psychtoolbox-3?" *Perception* 36 ECVF Abstract Supplement.
- Ko, H., Hofer, S.B., Pichler, B., Buchanan, K.A., Sjöström, P.J., Mrsic-Flogel, T.D., 2011. Functional specificity of local synaptic connections in neocortical networks. *Nature* 473, 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature09880>
- Lee, W.C.A., Bonin, V., Reed, M., Graham, B.J., Hood, G., Glattfelder, K., Reid, R.C., 2016. Anatomy and function of an excitatory network in the visual cortex. *Nature* 532, 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature17192>
- Lim, K.-I., Narayan, S., Young, J.A.T., Yin, J., 2004. Effects of lipid rafts on dynamics of retroviral entry and trafficking: Quantitative analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 650–60. <https://doi.org/10.1002/bit.20108>
- Luo, L., Callaway, E.M., Svoboda, K., 2018. Genetic Dissection of Neural Circuits: A Decade of Progress. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.040>
- Luo, L., 2021. Architectures of neuronal circuits. *Science* 373, eabg7285. <https://doi.org/10.1126/science.abg7285>
- Malonek, D., Grinvald, A., 1996. Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping. *Science* 272, 551–4. <https://doi.org/10.1126/science.272.5261.551>
- Marshall, J.H., Mori, T., Nielsen, K.J., Callaway, E.M., 2010. Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron* 67, 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.001>
- Marshall, J.H., Garrett, M.E., Nauhaus, I., Callaway, E.M., 2011. Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron* 72, 1040–1054. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.004>
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M., Abe, T., Murthy, V.N., Mathis, M.W., Bethge, M., 2018. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.* 21, 1281–1289. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y>
- Miles, R., Poncer, J.C., 1996. Paired recordings from neurones. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 387–94. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(96\)80124-3](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(96)80124-3)

- Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., He, Z., Callaway, E.M., Horowitz, M.A., Luo, L., 2011. Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472, 191–6. <https://doi.org/10.1038/nature09714>
- Moritz, C.P., Mühlhaus, T., Tenzer, S., Schulenburg, T., Friauf, E., 2019. Poor transcript-protein correlation in the brain: negatively correlating gene products reveal neuronal polarity as a potential cause. *J. Neurochem.* 149, 582–604. <https://doi.org/10.1111/jnc.14664>
- Mrsic-Flogel, T.D., Hofer, S.B., Ohki, K., Reid, R.C., Bonhoeffer, T., Hübener, M., 2007. Homeostatic regulation of eye-specific responses in visual cortex during ocular dominance plasticity. *Neuron* 54, 961–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.028>
- Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K., 2001. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137–41. <https://doi.org/10.1038/84397>
- Narayan, S., Barnard, R.J.O., Young, J.A.T., 2003. Two Retroviral Entry Pathways Distinguished by Lipid Raft Association of the Viral Receptor and Differences in Viral Infectivity. *J. Virol.* 77, 1977–1983. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1977-1983.2003>
- Niell, C.M., Stryker, M.P., 2010. Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron* 65, 472–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.033>
- Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., Reid, R.C., 2005. Functional imaging with cellular resolution reveals precise microarchitecture in visual cortex. *Nature* 433, 597–603. <https://doi.org/10.1038/nature03274>
- Okigawa, S., Yamaguchi, M., Ito, K.N., Takeuchi, R.F., Morimoto, N., Osakada, F., 2021. Cell type- and layer-specific convergence in core and shell neurons of the dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Comp. Neurol.* 529, 2099–2124. <https://doi.org/10.1002/cne.25075>
- Onda, M., Takeuchi, R.F., Isobe, K., Suzuki, T., Masaki, Y., Morimoto, N., Osakada, F., 2021. Temporally multiplexed dual-plane imaging of neural activity with four-dimensional precision. *Neurosci. Res.* 171, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.02.001>
- Osakada, F., Mori, T., Cetin, A.H., Marshel, J.H., Virgen, B., Callaway, E.M., 2011. New rabies virus variants for monitoring and manipulating activity and gene expression in defined neural circuits. *Neuron* 71, 617–631. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.005>
- Osakada, F., Callaway, E.M., 2013. Design and generation of recombinant rabies virus vectors. *Nat. Protoc.* 8, 1583–1601. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.094>

- Parker, P.R.L., Brown, M.A., Smear, M.C., Niell, C.M., 2020. Movement-Related Signals in Sensory Areas: Roles in Natural Behavior. *Trends Neurosci.* 43, 581–595. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.005>
- Pelli, D.G., 1997. The VideoToolbox software for visual psychophysics: transforming numbers into movies. *Spat. Vis.* 10, 437–42.
- Petreaanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., Svoboda, K., 2007. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat. Neurosci.* 10, 663–8. <https://doi.org/10.1038/nn1891>
- Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hular, I., Xiang, A.P., Ren, B.Z., Lahn, B.T., 2010. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Rancz, E.A., Franks, K.M., Schwarz, M.K., Pichler, B., Schaefer, A.T., Margrie, T.W., 2011. Transfection via whole-cell recording in vivo: Bridging single-cell physiology, genetics and connectomics. *Nat. Neurosci.* 14, 527–532. <https://doi.org/10.1038/nn.2765>
- Reid, R.C., 2012. From Functional Architecture to Functional Connectomics. *Neuron* 75, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.031>
- Rompani, S.B., Müllner, F.E., Wanner, A., Zhang, C., Roth, C.N., Yonehara, K., Roska, B., 2017. Different Modes of Visual Integration in the Lateral Geniculate Nucleus Revealed by Single-Cell-Initiated Transsynaptic Tracing. *Neuron* 93, 767-776.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.028>
- Rossi, L.F., 2018. Cortical circuits for visual processing and epileptic activity propagation. Doctoral thesis. <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10043096/>
- Rossi, L.F., Harris, K.D., Carandini, M., 2020. Spatial connectivity matches direction selectivity in visual cortex. *Nature* 588, 648–652. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2894-4>
- Seabrook, T.A., Burbridge, T.J., Crair, M.C., Huberman, A.D., 2017. Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, 499–538. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033842>
- Sereno, M.I., McDonald, C.T., Allman, J.M., 1994. Analysis of retinotopic maps in extrastriate cortex. *Cereb. Cortex* 4, 601–20. <https://doi.org/10.1093/cercor/4.6.601>
- Siegle, J.H., Jia, X., Durand, S., Gale, S., Bennett, C., Graddis, N., Heller, G., Ramirez, T.K., Choi, H., Luviano, J.A., Groblewski, P.A., Ahmed, R., Arkhipov, A., Bernard, A., Billeh, Y.N., Brown, D., Buice, M.A., Cain, N., Caldejon, S., Casal, L., Cho, A., Chvilicek, M., Cox, T.C., Dai, K.,

Denman, D.J., de Vries, S.E.J., Dietzman, R., Esposito, L., Farrell, C., Feng, D., Galbraith, J., Garrett, M., Gelfand, E.C., Hancock, N., Harris, J.A., Howard, R., Hu, B., Hytnen, R., Iyer, R., Jessett, E., Johnson, K., Kato, I., Kiggins, J., Lambert, S., Lecoq, J., Ledochowitsch, P., Lee, J.H., Leon, A., Li, Y., Liang, E., Long, F., Mace, K., Melchior, J., Millman, D., Mollenkopf, T., Nayan, C., Ng, L., Ngo, K., Nguyen, T., Nicovich, P.R., North, K., Ocker, G.K., Ollerenshaw, D., Oliver, M., Pachitariu, M., Perkins, J., Reding, M., Reid, D., Robertson, M., Ronellenfitch, K., Seid, S., Slaughterbeck, C., Stoecklin, M., Sullivan, D., Sutton, B., Swapp, J., Thompson, C., Turner, K., Wakeman, W., Whitesell, J.D., Williams, D., Williford, A., Young, R., Zeng, H., Naylor, S., Phillips, J.W., Reid, R.C., Mihalas, S., Olsen, S.R., Koch, C., 2021. Survey of spiking in the mouse visual system reveals functional hierarchy. *Nature* 592, 86–92. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03171-x>

Stepien, A.E., Tripodi, M., Arber, S., 2010. Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron* 68, 456–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.019>

Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., Konnerth, A., 2003. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7319–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232232100>

Suzuki, T., Morimoto, N., Akaike, A., Osakada, F., 2020. Multiplex Neural Circuit Tracing With G-Deleted Rabies Viral Vectors. *Front. Neural Circuits* 13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00077>

Takato, J., Nelson, A., Zhou, X., Bolton, M.M., Ehlers, M.D., Arenkiel, B.R., Mooney, R., Wang, F., 2013. New modules are added to vibrissal premotor circuitry with the emergence of exploratory whisking. *Neuron* 77, 346–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.010>

Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N., Kim, T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., Bertagnolli, D., Goldy, J., Shapovalova, N., Parry, S., Lee, C., Smith, K., Bernard, A., Madisen, L., Sunkin, S.M., Hawrylycz, M., Koch, C., Zeng, H., 2016. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat. Neurosci.* 19, 335–46. <https://doi.org/10.1038/nn.4216>

Tasic, B., Yao, Z., Graybiel, L.T., Smith, K.A., Nguyen, T.N., Bertagnolli, D., Goldy, J., Garren, E., Economo, M.N., Viswanathan, S., Penn, O., Bakken, T., Menon, V., Miller, J., Fong, O., Hirokawa, K.E., Lathia, K., Rimorin, C., Tieu, M., Larsen, R., Casper, T., Barkan, E., Kroll, M., Parry, S., Shapovalova, N. V., Hirschstein, D., Pendergraft, J., Sullivan, H.A., Kim, T.K., Szafer, A., Dee, N., Groblewski, P., Wickersham, I., Cetin, A., Harris, J.A., Levi, B.P., Sunkin, S.M., Madisen, L., Daigle, T.L., Looger, L., Bernard, A., Phillips, J., Lein, E., Hawrylycz, M., Svoboda,



- K., Jones, A.R., Koch, C., Zeng, H., 2018. Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature* 563, 72–78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0654-5>
- Tervo, D.G.R., Hwang, B.Y., Viswanathan, S., Gaj, T., Lavzin, M., Ritola, K.D., Lindo, S., Michael, S., Kuleshova, E., Ojala, D., Huang, C.C., Gerfen, C.R., Schiller, J., Dudman, J.T., Hantman, A.W., Looger, L.L., Schaffer, D. V., Karpova, A.Y., 2016. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 92, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.021>
- Tian, J., Huang, R., Cohen, J.Y., Osakada, F., Kobak, D., Machens, C.K., Callaway, E.M., Uchida, N., Watabe-Uchida, M., 2016. Distributed and Mixed Information in Monosynaptic Inputs to Dopamine Neurons. *Neuron* 91, 1374–1389. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.018>
- Ugolini, G., 1995. Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. *J. Comp. Neurol.* 356, 457–80. <https://doi.org/10.1002/cne.903560312>
- Ugolini, G., 2010. Advances in viral transneuronal tracing. *J. Neurosci. Methods* 194, 2–20. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.12.001>
- Vélez-Fort, M., Rousseau, C. V., Niedworok, C.J., Wickersham, I.R., Rancz, E.A., Brown, A.P.Y., Strom, M., Margrie, T.W., 2014. The stimulus selectivity and connectivity of layer six principal cells reveals cortical microcircuits underlying visual processing. *Neuron* 83, 1431–1443. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.001>
- Wall, N.R., Wickersham, I.R., Cetin, A., De La Parra, M., Callaway, E.M., 2010. Monosynaptic circuit tracing in vivo through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21848–21853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011756107>
- Wall, N.R., de la Parra, M., Sorokin, J.M., Taniguchi, H., Huang, Z.J., Callaway, E.M., 2016. Brain-wide maps of synaptic input to cortical interneurons. *J. Neurosci.* 36, 4000–4009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-15.2016>
- Wang, Q., Burkhalter, A., 2007. Area map of mouse visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 502, 339–57. <https://doi.org/10.1002/cne.21286>
- Wang, Q., Gao, E., Burkhalter, A., 2011. Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex. *J. Neurosci.* 31, 1905–1918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3488-10.2011>
- Wang, Q., Sporns, O., Burkhalter, A., 2012. Network analysis of corticocortical connections reveals ventral and dorsal processing streams in mouse visual cortex. *J. Neurosci.* 32, 4386–4399. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6063-11.2012>

- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S.K., Vamanrao, A., Uchida, N., 2012. Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* 74, 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>
- Wertz, A., Trenholm, S., Yonehara, K., Hillier, D., Raics, Z., Leinweber, M., Szalay, G., Ghanem, A., Keller, G., Rózsa, B., Conzelmann, K.K., Roska, B., 2015. PRESYNAPTIC NETWORKS. Single-cell-initiated monosynaptic tracing reveals layer-specific cortical network modules. *Science* (80-. ). 349, 70–4. <https://doi.org/10.1126/science.aab1687>
- Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J.O., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.K., Young, J.A.T., Callaway, E.M., 2007. Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons. *Neuron* 53, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.033>
- Yaguchi, M., Ohashi, Y., Tsubota, T., Sato, A., Koyano, K.W., Wang, N., Miyashita, Y., 2013. Characterization of the properties of seven promoters in the motor cortex of rats and monkeys after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther. Methods* 24, 333–344. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.238>
- Yonehara, K., Balint, K., Noda, M., Nagel, G., Bamberg, E., Roska, B., 2011. Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit. *Nature* 469, 407–410. <https://doi.org/10.1038/nature09711>
- Yoshimura, Y., Dantzker, J.L.M., Callaway, E.M., 2005. Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* 433, 868–873. <https://doi.org/10.1038/nature03252>
- Young, J.A., Bates, P., Varmus, H.E., 1993. Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J. Virol.* 67, 1811–6. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.4.1811-1816.1993>
- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A.S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., Campbell, R.E., 2011. An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science* 333, 1888–91. <https://doi.org/10.1126/science.1208592>

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始暖かい激励をいただいた名古屋大学大学院 創薬科学研究科 小坂田文隆 准教授、研究室の皆様に謹んで感謝の意を表します。多くのご助言をいただきました藤田医科大学 医学部 山下貴之 教授、理化学研究所 磯部圭祐 研究員、国立遺伝学研究所 米原圭祐 教授、モナシュ大学 バイオメディシン・デスカバリー研究所 佐藤達雄 博士に謹んで感謝申し上げます。

また、実験装置開発にご協力いただいた名古屋大学 全学技術センター装置開発技術支援室の小林和宏 様、西村良太 様、加藤渉 様、花田洋貴 様に感謝申し上げます。