

	さとう しょう
氏 名（本籍地）	佐藤 翔
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第305号
学位授与年月日	平成27年5月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論 文 題 目	G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現特性 の解析とその応用性の検証
博士論文審査委員	（主査） 教 授 飯島 敏夫 教 授 山元 大輔 教 授 八尾 寛

論文内容の要旨

G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター (Δ G-RV) は、狂犬病ウイルスのゲノムから感染特性を決定するエンベロープタンパク質である G タンパク質をコードする G 遺伝子を除去したウイルスベクターである。 Δ G-RV が産生するウイルス粒子はエンベロープタンパク質をもたないため、実験目的に合致した感染特性を示すエンベロープタンパク質を付与することができる。例えば、狂犬病ウイルスの G タンパク質を付与することで脳の特定の領域に投射を送る神経細胞へ逆行性遺伝子導入が可能となり、鶏白血病ウイルスのエンベロープタンパク質を付与することで特異的レセプターが導入された神経細胞へ標的選択的遺伝子導入が可能となる。さらに、感染細胞に G 遺伝子を導入することで、 Δ G-RV の単シナプスに限定された逆行性経シナプス伝播が起こり、初期感染細胞のシナプス前細胞にも外来遺伝子を導入することができる。 Δ G-RV は、この感染特性によって神経細胞の結合関係を詳細に調べるためのツールとして利用されている。この有用な感染特性に加えて、 Δ G-RV は G 遺伝子を持つ狂犬病ウイルスベクターと比較して低い細胞毒性と高い外来遺伝子発現能を示す。そのため、神経活動を可視化する Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質等のタンパク質を Δ G-RV によって導入することで特定の結合関係を持つ神経細胞の機能を調べる研究などへの幅広い応用が期待されている。

本研究では、より実用的な Δ G-RV を開発するための Δ G-RV の遺伝子発現特性の解析と、神経科学への応用性の検証として、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質と蛍光タンパク質を発現する Δ G-RV による、特定の結合関係をもつ神経細胞の同定と神経活動計測を同時に実現する手法の開発を行った。

第1章 G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現特性の解析

これまでに、 Δ G-RV の高い外来遺伝子発現能が狂犬病ウイルスのゲノムから G 遺伝子を除去したことに起因することが報告されている。しかし、狂犬病ウイルスの遺伝子発現における G タンパク質の機能はほとんど分かっておらず、どのような機構で G 遺伝子の除去が狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現能を高めるのかは不明であった。狂犬病ウイルスの遺伝子発現機構を理解することは、実験目的に適した外来遺伝子発現能を示す Δ G-RV を開発するために重要である。例えば、蛍光タンパク質を用いて感染細胞の詳細な形態を可視化する目的や、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質のような蛍光プローブを用いて脳組織中の感染細胞の活動を可視化することが目的の実験では、それらのタンパク質を十分量発現できるウイルスベクターが求められる。一方で、高すぎる外来遺伝子発現量は感染細胞の生存に悪影響を及ぼすことが知られているため、長期にわたる細胞標識が必要な実験のためには、適度に制御された外来遺伝子発現能を示すウイルスベクターを用いることが望ましい。本研究では、G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現特性を調べるため、G 遺伝子を持つ狂犬病ウイルスと、 Δ G-RV、そして、G 遺伝子を蛍光タンパク質遺伝子に置換した狂犬病ウイルスベクターの 3 種類の遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターを作製し、それらの転写産物量と外来遺伝子発現量をそれぞれ比較した。その結果、G 遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスベクターでは、ウイルス RNA ポリメラーゼをコードする L 遺伝子のゲノム上の位置が変化することで、L タンパク質をコードする転写産物の量が増加していること、及び、ウイルスの転写産物量と外来遺伝子発現量が増加していることが確かめられた。一方で、G 遺伝子を置換した狂犬病ウイルスベクターでは、L タンパク質をコードする転

写産物の量が増加していなかったにも関わらず、ウイルスの転写産物量と外来遺伝子発現量が増加していた。また、G 遺伝子を欠損した場合は、G 遺伝子を置換した場合よりも転写産物と外来遺伝子発現量の増加の程度が大きいことも確かめられた。これらの結果から Δ G-RV の高い外来遺伝子発現能は、少なくとも、L 遺伝子の発現量上昇と、G タンパク質の非存在という 2 つの要因に由来していると考えられた。このことから、L 遺伝子の発現量を調節することで、実験目的に適した外来遺伝子発現能を示す狂犬病ウイルスベクターの開発が可能になることが示唆された。

第 2 章 G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの神経科学への応用性の検証

多数の神経細胞で構成される複雑な脳の中では、同じ領域の隣り合う神経細胞であっても、その他の神経細胞との結合関係や機能特性は異なっている。ある神経細胞が表現する情報が、どの領域から送られた情報を元に構成され、どこへ送られるのかを調べるためには、神経細胞の結合関係を同定し、同時に神経活動を計測する手法が有用である。本研究では、 Ca^{2+} 感受性緑色蛍光タンパク質 GCaMP6m と青色蛍光タンパク質 TagBFP を発現する Δ G-RV、rHEP3.0- Δ G-GCaMP6m-TagBFP と、GCaMP6m と赤色蛍光タンパク質 mRFP を発現する Δ G-RV、rHEP3.0- Δ G-GCaMP6m-mRFP を作製した。これら 2 種の Δ G-RV によって、ある領域内の 2 種の神経細胞群の投射先を TagBFP、mRFP の蛍光によって同定し、同時に GCaMP6m の蛍光によって 2 種の神経細胞群の活動を計測できる手法の開発を目指した。

神経細胞の投射関係の同定ためには、 Δ G-RV に、神経細胞の軸索末端から感染し、高い逆行性感染能を示す狂犬病ウイルス Challenge Virus Standard (CVS) 株の G タンパク質をウイルス粒子のエンベロープを付与することが有効であると考えられた。狂犬病ウイルスの転写、複製を補助するタンパク質と CVS 株の G タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立し、これをウイルス回収に用いる手法を確立した。この方法で回収された Δ G-RV の逆行性標識能は十分に高く、ラット脳内の標的となる脳領域に Δ G-RV を微量注入することで、その脳領域に投射を送る神経細胞を同定することができた。

CVS 株の G タンパク質を付与した rHEP3.0- Δ G-GCaMP6m-TagBFP をラット脳の扁桃体に、CVS 株の G タンパク質を付与した rHEP3.0- Δ G-GCaMP6m-mRFP を側坐核にそれぞれ微量注入したところ、海馬 CA1、および海馬台においてそれぞれの脳領域に投射を送る 2 つの神経細胞群を TagBFP と mRFP の蛍光によって同定することができた。同時に、GCaMP6m の蛍光強度の変化によって、神経細胞の活動に伴う個々の細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を光学的に計測することに成功した。

本研究で得られた狂犬病ウイルスの遺伝子発現特性に関する知見は、個々の実験の目的に適した、より実用的な狂犬病ウイルスベクターを開発するために有用であると考えられる。また、本研究で開発された、2 種の神経細胞群の投射関係の同定と神経活動計測を同時に実現する手法によって、どのような結合関係を持つ神経細胞がどのような機能を担っているのかについて直接検証することが可能になると考えられる。これらの成果は、今後、狂犬病ウイルスベクターを用いた脳神経科学研究のさらなる発展に寄与することが期待される。

論文審査結果の要旨

G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター (ΔG-RV) は G 遺伝子を持つ狂犬病ウイルスベクター (RV) と比較して低い細胞毒性と高い外来遺伝子発現能を有する。そのため、マーカータンパク質やシグナルセンシングのためのタンパク質を標的神経細胞に発現させるには極めて有用なウイルスベクターである。著者は、本博士論文において 1) G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現特性の解析と、2) G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの脳神経研究への応用性の検証、を行った。1) では、ΔG-RV の遺伝子発現特性を調べるため、① RV、② ΔG-RV、そして③ G 遺伝子を蛍光タンパク質遺伝子に置換した狂犬病ウイルスベクターの 3 種類の遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターを作製し、それらの転写産物量と外来遺伝子発現量をそれぞれ比較した。ΔG-RV では、ウイルス RNA ポリメラーゼをコードする L 遺伝子のゲノム上の位置が変化したことで、L タンパク質をコードする転写産物の量が増加していること、さらに、ウイルスの転写産物量と外来遺伝子発現量が増加していることを見出した。一方で、G 遺伝子を置換した狂犬病ウイルスベクターでは、L タンパク質をコードする転写産物の量が増加していないにもかかわらず、ウイルスの転写産物量と外来遺伝子発現量が増加していることを見出した。また、G 遺伝子を欠損した場合には、G 遺伝子を置換した場合よりも転写産物と外来遺伝子発現量の増加の程度が大きいという結果を得た。これらの結果から ΔG-RV の高い外来遺伝子発現能には、少なくとも L 遺伝子の発現量増大と、G タンパク質の欠損という 2 つの要因が大きく影響していると結論した。次いで 2) では 1) で得られた研究成果をもとに、ΔG-RV の脳神経研究への応用性の検証を行った。Ca²⁺感受性蛍光タンパク質とともに、青色蛍光タンパク質 TagBFP、あるいは赤色蛍光タンパク質 mRFP のいずれかを外来遺伝子として発現する 2 種の ΔG-RV を作成し、ラット脳の扁桃核、および側坐核にそれぞれを注入した。インキュベーションの後、投射ニューロンの細胞体が分布すると考えられる海馬 CA1、および海馬台において、神経活動変化に伴う細胞内 Ca²⁺シグナル変動を可視化することに成功した。

これらの成果は新しい脳神経研究の展開に大きな影響を与え、重要な技術基盤を与えるものである。同時に、これらの研究成果は、論文著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、佐藤 翔提出の論文は、博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。