

博士論文

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

平成 26 年度

東北大学生命科学研究科

生命機能科学専攻

佐藤 翔

# 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

要旨

序論

本論

## 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

1-1. 背景と目的

1-2. 材料と方法

1-3. 結果

1-3-1. 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの作製と性状評価

1-3-2. 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの転写機能の解析

1-4. 考察

## 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

2-1. 背景と目的

2-2. 材料と方法

2-3. 結果

2-3-1. 高頻度逆行性標識を可能にする G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター回収法の開発

2-3-2. 蛍光タンパク質を発現する G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの作製

2-3-3.  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの作製

2-3-4. 2重標識法と  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングによる神経回路の構造と機能の同時観察法の開発

2-4. 考察

総合考察

謝辞

引用文献

G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター ( $\Delta$ 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。 $\Delta$ 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す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、 $\Delta$ G-RV の単シナプスに限定された逆行性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。 $\Delta$ 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、 $\Delta$ 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ G-RV を開発するための  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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、 $\Delta$ 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  $\Delta$ 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、 $\Delta$ 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、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△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た上で神経活動を計測する手法が有用である。本研究では、Ca<sup>2+</sup>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△G-RV、rHEP3.0-△G-GCaMP6m-TagBFP に加え、GCaMP6m と赤色蛍光タンパク質 mRFP を発現する△G-RV、rHEP3.0-△G-GCaMP6m-mRFP を作製した。これら 2 種の△G-RV によって、2 種の神経細胞群の投射先を、一方は TagBFP、他方は 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、神経細胞の軸索末端から感染し、かつ、高い逆行性感染能を持つよう、△G-RV のエンベロープに、狂犬病ウイルスの G タンパク質を付与することが有効である。特に、狂犬病ウイルスのうち Challenge Virus Standard (CVS) 株の G タンパク質がその候補として有望であると考えられた。この想定に基づき、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△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△G-RV を微量注入することで、その脳領域に投射す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-△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-△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する 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<sup>2+</sup>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、本研究により、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行うことが可能となった結果、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道が開けた。これらの成果は、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。

## 序論

脳は膨大な数の神経細胞が形成するネットワークで構成される複雑な器官である。この脳の情報処理機構を理解するためには、神経細胞のネットワークの構造と機能を調べるのが非常に重要である。具体的には、脳のどの領域の、どの位置に、どのような形態的、遺伝的特徴をもった神経細胞が存在するのか、また、それらがどのようなネットワークを形成しているかを調べる解剖学的研究と、それらの神経細胞の活動特性について調べる生理学的研究である。これまで、脳の領域間を跨ぐ結合関係や領域間の機能の違いについては広く研究がなされており、脳の詳細な機能地図が作られてきた。近年では同じ脳領域内で近接して存在するものの、遺伝子の発現や投射先などが異なるそれぞれの神経細胞群について、その神経結合や活動の特性を調べることを通じ、脳の情報処理機構がより詳細に解明されつつある。脳内の複雑に絡み合った神経細胞のネットワークを解きほぐし、神経ネットワークの構造とその機能の両面から脳の情報処理機構を検証できる研究ツールとして近年注目されているものに、G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターがある。そこで、本研究では、このベクターの遺伝子発現特性の解析と、その応用性についての検討を行った。

従来、脳の構造を理解するために、様々な化学物質を用いた解剖学的研究が行われてきた。例えば、色素を細胞内に注入することで神経細胞の樹状突起や軸索の形態を可視化する細胞内色素注入法や、*in situ* ハイブリダイゼーション法、あるいは、免疫染色法などを用いて特定の遺伝子を発現している神経細胞群を可視化する方法が挙げられる。また、主に細胞体から細胞内に取り込まれ軸索末端へと情報の流れに沿うように拡散する順行性トレーサー (Gerfen and Sawchenko, 1984; Izzo, 1991)、軸索末端から取り込まれ細胞体へと拡散する逆行性トレーサー (Schmued and Fallon, 1986; Horikawa and Powell, 1986) などを用いるトレーサー法は脳領域間の情報の流れを調べる上で有用な手法である。さらに、WGA-HRP など一部の化学物質はシナプスを越えて拡散していく性質があることが知られている (Mantyh and Peschanski, 1983; Harrison et al., 1984)。近年では、より詳細な脳の解剖学的研究を実現するために、神経向性ウイルスの感染特性を利用することで GFP のような外来遺伝子を標的の細胞に導入できるようにしたウイルスベクターが広く利用されている (Callaway 2008; Ohara et al., 2009; van den Pol et al., 2009)。このウイルスベクターを用いる手法は、神経細胞間の情報の流れを可視化する神経回路トレーシング法において特に有効な手法である。トレーシング法に広く用いられているアルファヘルペスウイルス亜科に属するブタヘルペスウイルス (仮性狂犬病ウイルス、PRV) と単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV 1) (Middleton and Strick et al., 2002) や、ラブドウイルス科リッサウイルス属の狂犬病ウイルス (RV) のウイルスベクターの特徴は、初期感染細胞内で遺伝子発現と自己複製を行った後、シナプスを越えて別の神経細胞へと感染伝播していくことである (Ugolini, 2010)。この特徴によって、シナプスを経た 2 次、3 次標識細胞においても強いシグナルが得られる (図 0-1)。この 3 種類のウイルスベクターの中でも、特に狂犬病ウイルスベクターは、神経細胞への初期感染および感染伝播においての特異性が高く、これらのウイルスベクターの中では比較的細胞毒性が低いというトレーシング法に適した特長をもっている。具体的には、狂犬病ウイルスは神経細胞選択的に初期感染しグリアなどには感染しないことが知られている。アルファヘルペスウイルス亜科に属する 2 種のウイルスでは、感染細胞を殺しウイルス粒子を周囲に拡散させ、周囲の神経細胞の細胞体から感染が進む局所感染伝播が見られるが、狂犬病ウイルスでは感染伝播は逆行性の経シナプス伝播に限定され

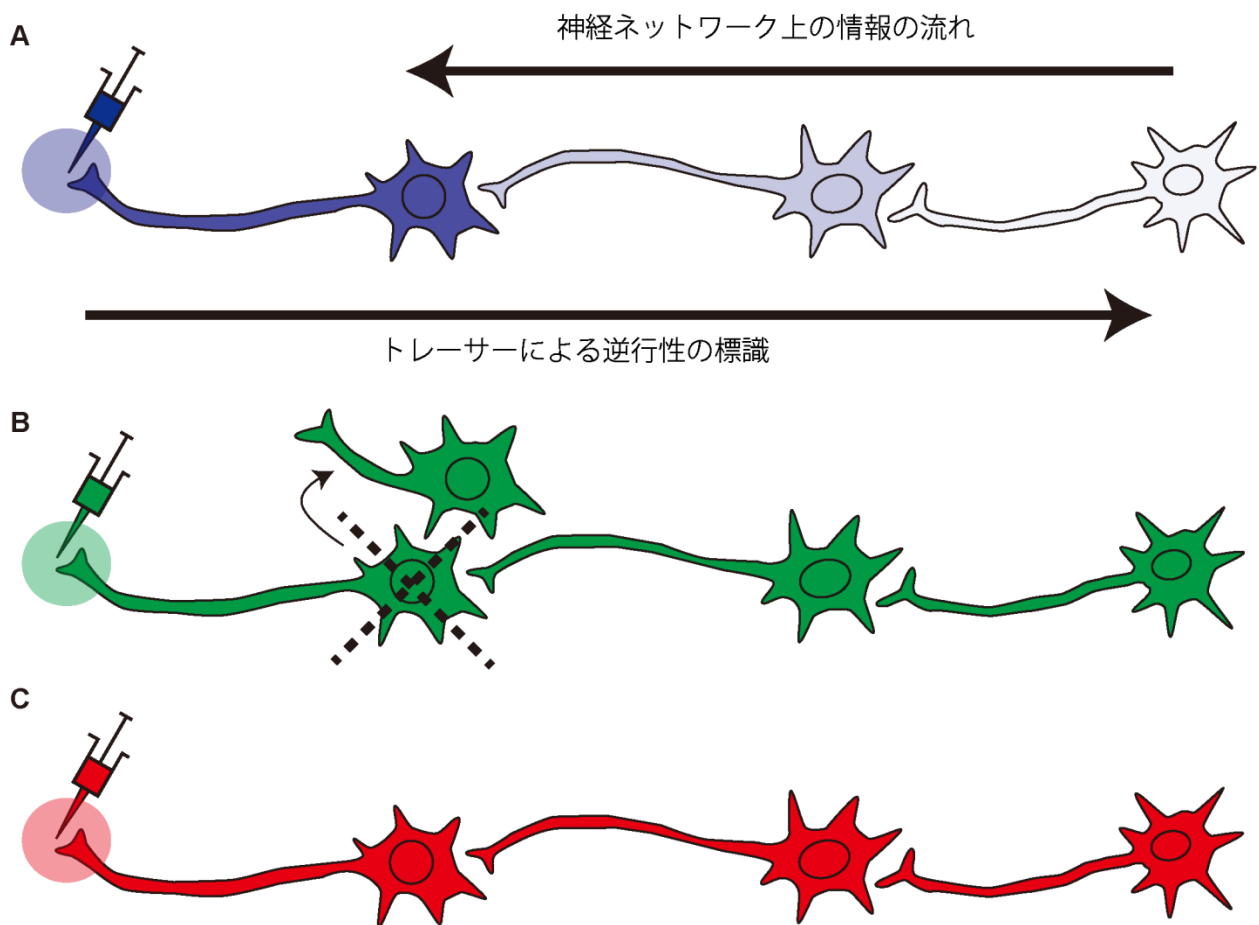


図 0-1 化学物質とヘルペス、狂犬病ウイルスベクターによる経シナプストレーシング比較

A: WGA-HRP などの化学物質はシナプスを越えて拡散するが、そのシグナル強度は低下していく。

B: ヘルペスウイルスをベクターとして用いた場合、A のようなシグナルの減弱は起こらないが、感染細胞が死ぬ際に周囲の細胞への局所感染が起こる。

C: 狂犬病ウイルスをベクターとして用いた場合、局所感染は起こらず逆行性感染のみに限定される。

る。また狂犬病ウイルスに感染した神経細胞の形態が比較的長時間維持されることも報告されている (Ugolini G, 1995; Tang et al., 1999; Kelly and Strick., 2000; Grantyn et al., 2002)。

一方、脳の機能を調べるためには電極を用いて神経細胞の電氣的活動を計測する電気生理学的手法に加え、神経伝達物質の作動薬や阻害薬を脳に注入する薬理学的手法などが用いられてきた。例えば、単一ユニット記録法では微小電極を脳内に刺入し神経細胞に十分接近させることで、単一の神経細胞の活動によって生じる細胞近傍に生じる電流を極めて高い時間分解能で記録することができる。また、神経伝達物質の作用を抑える、もしくは強める薬剤を標的の脳領域に注入することで、その脳領域の活動を操作することができる。例えば、神経細胞の活動を抑制する神経伝達物質である GABA の作動薬ムシモールを用いると、特定の脳領域の活動を抑制することができる。これらの手法によって、脳のどの領域がどのような脳の機能を担っているのかについて詳しく調べられてきた (Hubel and Wiesel, 1968; Sawaguchi and Iba., 2001)。近年では、神経細胞の活動を可視化するタンパク質や、活動を制御するタンパク質を、脳機能解

析法に応用する研究が進められている。神経細胞の活動を可視化するタンパク質として、神経細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に応じて蛍光強度が変化する $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質や神経細胞の膜電位に応じて蛍光強度が変化する膜電位感受性蛍光タンパク質が盛んに開発されている (Tian et al., 2009; Akemann et al., 2010; Zhao et al., 2011; Broussard et al., 2014)。これらの蛍光タンパク質を用いた光学的神経活動計測の利点の1つは、広範な領域から多数の神経細胞の活動をそれぞれ計測できることであり、脳の領域を跨ぐ巨視的な脳の情報処理機構を解明するための有効なツールであると考えられている (Homma et al., 2009)。神経細胞の活動を操作する方法として注目を集めているのは、光感受性のイオンチャネル、イオンポンプを応用した光遺伝学的手法である (Zemelman et al., 2002; Deisseroth et al., 2006)。特定の波長の光を当てることで神経細胞の膜を通るイオンの量を変化させ、膜電位変化を誘導するこの手法は、薬理的な手法に比べて優れた時間分解能が特長として挙げられる。脳の複雑な構造の中では、例え同じ領域の隣り合った神経細胞であってもその細胞種が異なっている場合がある。上記のような機能性タンパク質を細胞種特異的な遺伝子発現を可能にするプロモーターの下流に配置し神経細胞に導入することで、標的とする神経細胞群の機能だけを選択的に観察、制御することが可能になる (Goshen et al., 2011; Kohara et al., 2014)。

これまでに、ウイルスベクターを用いて脳の解剖学的特徴を調べる手法と並んで、機能性タンパク質の遺伝子を神経細胞に導入して脳の生理学的な特徴を調べる手法が開発され実用化されてきた。本研究ではこの二つの技術を融合し、複雑な神経ネットワークの中で特定の解剖学的特徴をもつ神経細胞群に選択的に機能性タンパク質を遺伝子導入することで、その活動特性の解析を可能にするウイルスベクターの開発を目指した。この目的を達成するためには次のような特性をもったウイルスベクターを用いることが望ましいと考えられる。

1. 神経細胞への毒性が低い
2. 適切な発現量で外来遺伝子を産生できる
3. 標的選択的な遺伝子導入が可能である

まず、最も重要な条件は、低い細胞毒性である。神経活動の計測や制御を通して、その神経細胞の機能を推定するためには、ウイルスベクターに感染した細胞が本来の生理的な特性を維持していることが必要である。次に、ウイルスベクターの発現量も重要な要素となる。ウイルスベクターは神経活動を可視化するために $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質などのプローブを十分な量発現する必要があるが、過剰な外来遺伝子の発現は感染細胞にとって有害な影響を及ぼすことが知られている (Liu et al., 1999; Wickersham et al., 2013)。標的選択的な遺伝子導入法とは、例えば、特定の遺伝子を発現する細胞群だけで発現するタンパク質のプロモーターを利用して外来遺伝子を発現させる細胞種選択的導入法 (Nathanson et al., 2009) や、特定の脳領域に投射する、または受け取る神経細胞に選択的に外来遺伝子を発現させる経路選択的遺伝子導入法である。

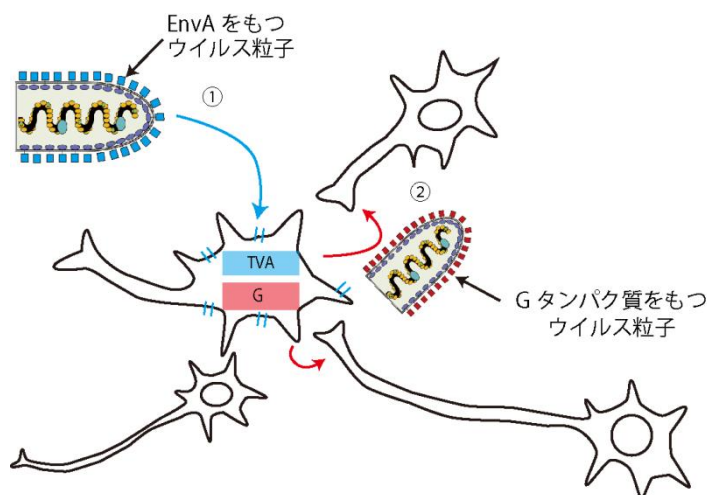
現在までに、いくつかの神経向性ウイルスベクターが実用化されている。神経細胞の機能を調べる研究に適した細胞毒性が低いウイルスベクターとしては、レンチウイルスやアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) が広く用いられている。これらのウイルスベクターの特長は、感染細胞に外来遺伝子を長期間、安定的に発現させることができる点である (van den Pol et al., 2004; Wong et al., 2006)。レンチウイルスは

RNA で構成されるゲノムをもつ RNA ウイルスであるが、感染細胞中でそのゲノム RNA から逆転写した DNA 配列を感染細胞の染色体中に導入する性質がある。DNA で構成されるゲノムを持つ AAV とレンチウイルスでは、外来遺伝子の発現は DNA から mRNA に転写され、その後タンパク質に翻訳されるというステップを経るため、mRNA への転写段階でプロモーター制御による細胞種特異的な遺伝子発現が可能である。このことは、これらのウイルスの外来遺伝子発現量が、外来遺伝子の発現に用いられるプロモーターの影響を受けることを意味している。そのため、標的とする神経細胞の種類によっては十分な外来遺伝子発現量が得られない可能性が考えられる。この問題を回避するために、特定の細胞種でのみ DNA リコンビナーゼである Cre を発現するトランスジェニック動物を用いる方法がある。レンチウイルスや AAV がもつ外来遺伝子の DNA 配列を Cre 存在下でのみ発現可能になるようにすることで、利用するプロモーターに関わらず、細胞種特異的な遺伝子発現が実現される。しかし、これらのウイルスベクターの特徴として、初期感染細胞でのウイルス粒子の再生産が起こらないため、シナプスを越えて伝播していく性質は持つことができない。シンドビスウイルスベクターは、非常に高い外来遺伝子発現能をもつことから、蛍光タンパク質を導入して細胞の形態を観察する目的のためには有用である (Huang 1996)。しかし、感染細胞への毒性が高いことから、神経細胞の活動特性を検証する目的には適していないと考えられた。これらのウイルスベクター以外に、脳神経科学にとって非常に有用なウイルスベクターとして、狂犬病ウイルスやヘルペスウイルスがある。上に述べたように、これらのウイルスベクターの特徴は、神経細胞に感染した後、シナプスを越えて伝播していく性質である。特定の神経細胞に投射する神経細胞だけに選択的に遺伝子を導入するためにはこれらのウイルスベクターを利用することが必要である。これまでに、当研究室では狂犬病ウイルスのベクター化に成功しており (Inoue et al., 2003; Khawplod et al., 2005)、そのウイルスベクターによるトレーシング法も確立されている (Ohara et al., 2009)。しかし、従来の狂犬病ウイルスベクターは神経回路の構造を調べるためには非常に強力なツールであるが、細胞毒性が高く、外来遺伝子の発現量が十分でないという問題があったため細胞活動の計測には適さなかった。

狂犬病ウイルスのゲノムから G 遺伝子を欠損させた G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター ( $\Delta$ G-RV) は近年、神経細胞の結合関係を調べるための強力な研究ツールとして注目を集めている (Miyamichi et al., 2011; Rowland et al., 2013; Wall et al., 2013)。狂犬病ウイルスの G 遺伝子は、ウイルス粒子を包むエンベロープに存在する G タンパク質をコードしている。この糖タンパク質が神経細胞のレセプターに結合することで狂犬病ウイルスの感染が可能になる。このため、G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター単体では、感染細胞内で G タンパク質を持つ感染可能なウイルス粒子を作ることができず、経シナプス伝播しない (Etessami et al., 2000; Wickersham et al., 2007a)。この性質は一見すると  $\Delta$ G-RV の非有用性を示しているように見えるが、実際にはこの性質により次の大きな利点が生まれている。まず、 $\Delta$ G-RV はゲノムにエンベロープタンパク質をコードする遺伝子を持たないことから、他のウイルスのエンベロープタンパク質をエンベロープに付与 (偽型化) することが可能である。鶏白血病のエンベロープタンパク質 EnvA を発現する細胞に  $\Delta$ G-RV を感染させることで、EnvA をエンベロープにもつ  $\Delta$ G-RV を回収することができる。EnvA で偽型化した  $\Delta$ G-RV は、EnvA に対応したレセプターである TVA を発現している細胞にのみ選択的に感染する。哺乳類の脳では TVA は発現していないため、トランスジェニック技術や他のウイルスベクターなどを用いて人工的に TVA を導入された細胞のみを標的とした  $\Delta$ G-RV の初期感染が実現される。これに



加えて、 $\Delta$ G-RV は G 遺伝子を発現している細胞内では感染可能な粒子を形成することができ、経シナプス伝播能を再獲得することができる。これらをまとめると、TVA と G 遺伝子を標的とする神経細胞に導入することで、標的選択的な $\Delta$ G-RV の初期感染と、そのシナプス前細胞への経シナプス感染が起こる。経シナプス感染した神経細胞では G 遺伝子が発現していないので $\Delta$ G-RV はそれ以上伝播することは無く、標識される神経細胞群は、初期感染細胞に直接投射するシナプス前細胞に限定される(図 0-2) (Wickersham et al., 2007b; Marshel et al., 2010)。G タンパク質は細胞毒性を持つことが知られており (Ohara et al., 2013a)、一定以上の G タンパク質の発現が感染細胞にアポトーシスを誘導することも報告されている (Faber et al., 2002)。 $\Delta$ G-RV は感染細胞内で G タンパク質を発現しないため、その細胞毒性は G 遺伝子を持つ狂犬病ウイルスに比べて低くなっている (Ohara et al., 2013a)。また、G タンパク質が狂犬病ウイルスの遺伝子発現機構にどのように関わるのかは詳しく分かっていないが、 $\Delta$ G-RV は G 遺伝子を持つ狂犬病ウイルスに比べて、高い外来遺伝子発現量を持つことも報告されている (Ohara et al., 2013a)。これら $\Delta$ G-RV の優れた特性から、このウイルスベクターが神経細胞のネットワークの構造だけでなく機能を調べる上でも有効な手法になりうることを期待される。



**図 0-2 EnvA と TVA を利用した選択的初期感染と G 遺伝子の導入による単シナプス伝播**

EnvA をエンベロープにもつ $\Delta$ G-RV は TVA を発現した細胞にのみ感染する。哺乳類の脳では TVA は発現していないため、人為的に TVA が導入された細胞への選択的初期感染が起こる (①)。初期感染細胞に狂犬病ウイルスの G 遺伝子が導入されている場合、初期感染細胞内で感染性の $\Delta$ G-RV が再生産され、単シナプス性の逆行性伝播が起こる (②)。

$\Delta$ G-RV を用いた脳神経ネットワークの構造と機能の研究を実現するために、以下の 2 つの視点から研究を行った。まず、本論文の第 1 章では、G 遺伝子の除去が狂犬病ウイルスの遺伝子発現に与える影響について検証した。 $\Delta$ G-RV の遺伝子発現機構を詳しく理解することは、実験目的に適したウイルスベクターをデザインする上で非常に重要である。例えば、神経細胞の微細な構造まで可視化したい場合、蛍光タンパク質を非常に強く発現することが求められるが、一方で、長期にわたる細胞標識を目的とする実験の

場合、そのような強い外来遺伝子の発現が細胞の生存に悪影響を及ぼすことが知られている。次に第2章では、 $\Delta$ G-RV の神経科学研究への応用可能性について検証した。神経ネットワークの構造と機能の両面から脳の情報処理機構を研究することを目的に、 $\Delta$ G-RV による投射先特異的な遺伝子導入法と、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV による神経活動の計測法の開発を行った。

## 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

### 1-1. 背景と目的

狂犬病ウイルスはモノネガウイルス目、ラブドウイルス科、リッサウイルス属に分類される。狂犬病ウイルスの非分節1本鎖マイナスRNAゲノムは約1万2千塩基の長さを持ち、核タンパク質 N、RNAポリメラーゼである P と L、マトリックスタンパク質 M、糖タンパク質 G の5つのタンパク質をコードしている (Finke and Conzelmann, 2005)。図の1-1には狂犬病ウイルスのゲノムとウイルス粒子の模式図を示す。ウイルス粒子は、幅75-80 nm、長さ180 nm ほどの弾丸状の形態をしている。ウイルスゲノムは核タンパク質 N と、ウイルスのRNAポリメラーゼである P と L タンパク質と共に RNP 複合体を形成しており、これを包むようにエンベロープがウイルス粒子を形成している。このエンベロープの表面には糖タンパク質である G タンパク質が突起を形成しており、M タンパク質がエンベロープと RNP 複合体を繋ぎとめる役割を担っていると考えられている (Mebatsion et al., 1999)。

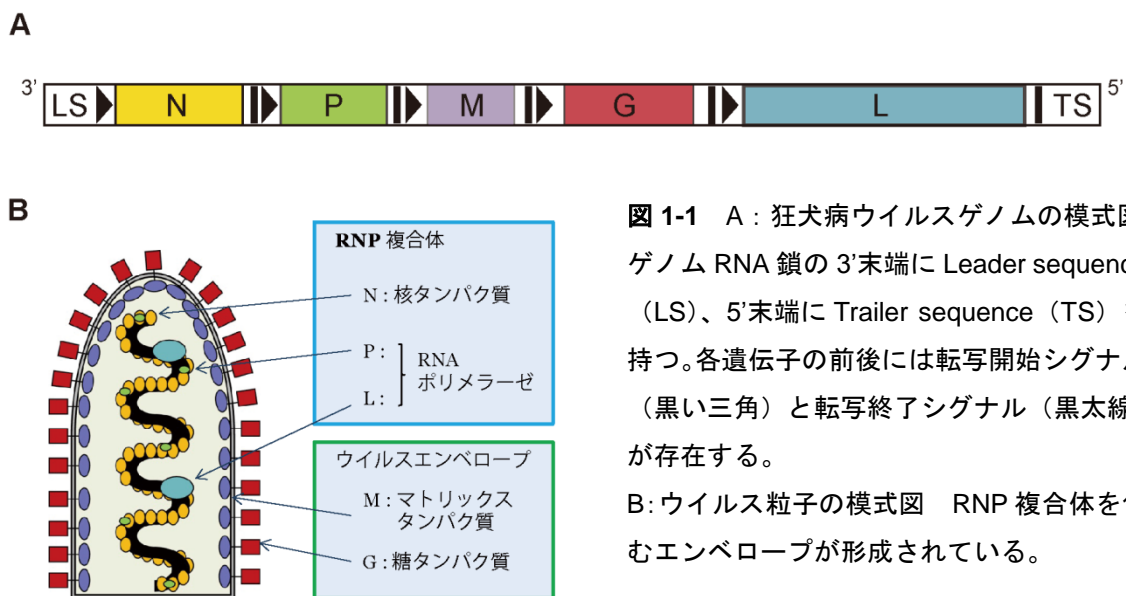


図 1-1 A: 狂犬病ウイルスゲノムの模式図  
ゲノム RNA 鎖の 3'末端に Leader sequence (LS)、5'末端に Trailer sequence (TS) を持つ。各遺伝子の前後には転写開始シグナル (黒い三角) と転写終了シグナル (黒太線) が存在する。

B: ウイルス粒子の模式図 RNP 複合体を包むエンベロープが形成されている。

狂犬病ウイルスとそのベクターは、哺乳類の脳内において、神経細胞の軸索末端から細胞内に取り込まれ細胞体へ逆行性に輸送される。その後、感染細胞内で遺伝子発現とウイルス粒子の複製を行い、シナプスを越えてシナプス前細胞へと逆行性に経シナプス伝播していく。この性質を利用して、脳内での神経細胞の繋がり、すなわち神経ネットワークの構造を研究するための有用なツールとして利用されている (Ugolini, 1995; Kelly and Strick, 2000; Callaway, 2008; Ohara et al., 2009; Ugolini, 2010; Ohara et al., 2013b)。この狂犬病ウイルスの感染特性を決定しているのは、ウイルスのエンベロープに位置する G タンパク質である。G タンパク質をコードする遺伝子配列をゲノムから除去した  $\Delta$ G-RV は、その感染細胞において G タンパク質を発現しないため、G タンパク質を持った感染性のウイルス粒子を産生することができない。これにより、 $\Delta$ G-RV の感染は初期感染細胞にとどまり、経シナプス伝播は観察されない (Etessami et al., 2000)。この性質を利用することで、従来の狂犬病ウイルスでは不可能であった細胞種特異的な初期感染が可能となった。これは、 $\Delta$ G-RV 粒子に異なるウイルス由来するエンベロープタンパク質を付加する

偽型化と、標的とする神経細胞への特異的ウイルスレセプターの導入によって実現される。また、その初期感染細胞に狂犬病ウイルスの G 遺伝子を導入することによって、 $\Delta$ G-RV を、シナプスを越えて伝播させることができる。この時シナプス前細胞には G 遺伝子が導入されていないので、さらなる経シナプス伝播は起こらない。つまり、初期感染細胞からの単シナプス性の限定された経シナプス伝播が実現される (Wickersham et al., 2007b; Marshel et al., 2010)。

神経活動を調べるために有用な  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク質等の機能性タンパク質を、 $\Delta$ G-RV のような標的選択的な遺伝子導入を可能にするウイルスベクターを利用して遺伝子導入することによって、神経回路の構造と機能を直接関連付ける研究の発展が期待されている。この目的のために重要になるのが、機能性タンパク質の発現量である。生きた標本、例えば生体の脳から  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク質のシグナルを取得するためには、標的とする細胞内での十分な発現量が求められる。 $\Delta$ G-RV は感染細胞において非常に強く外来遺伝子を発現することが知られている (Wickersham et al., 2007; Ohara et al., 2013a)。著者らのグループは、この高い外来遺伝子発現量が、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を発見した (Ohara et al., 2013a)。しかし、G 遺伝子が狂犬病ウイルスの遺伝子発現にどのように関わるかについては未だ不明な点が多く、ゲノムから G 遺伝子を除去することが、どのような機構でウイルスベクターの外来遺伝子発現量の増加をもたらすのかについては不明であった。狂犬病ウイルスの遺伝子発現機構を理解することは、実験目的に応じて必要十分な外来遺伝子発現量を達成できる、より実用的な  $\Delta$ G-RV を開発するために非常に重要である。本研究では、遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現能とウイルス mRNA の転写の定量的比較解析を通して、 $\Delta$ G-RV の遺伝子発現特性の解明を試みた。

狂犬病ウイルスのゲノムから G 遺伝子を除去することで、狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現能が高まる理由として、以下の 2 つが有力と考えられた。第 1、は G タンパク質の発現そのものが、外来遺伝子発現を低下させる可能性である。G タンパク質は狂犬病ウイルス感染細胞にアポトーシスを誘導する働きがあることが知られている (Faber et al., 2002) ほか、著者らのグループによって、狂犬病ウイルスのゲノムから G 遺伝子を除去すると、感染細胞の静止膜電位に与えるベクター導入の影響が軽減されることが報告されている (Ohara et al., 2013)。これらのことから、細胞の生存や膜電位のような生理的機能に影響する G タンパク質が、感染細胞においてタンパク質を産生する機能を低下させる可能性が考えられた。第 2 は、ウイルスの RNA ポリメラーゼである L タンパク質をコードする L 遺伝子の発現量変化である。狂犬病ウイルスを含むモノネガウイルスでは、ゲノム上の遺伝子の位置がその遺伝子の発現量に強く影響することが知られている (Abraham et al., 1976; Ball and White, 1976; Iverson et al., 1981; Barr et al., 2002)。モノネガウイルスの転写様式は、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus : VSV) を用いて広く調べられてきた。その様式に関していくつかのモデルが提唱されているが、そのうち、最も広く受け入れられている、スタート/ストップモデルと呼ばれる転写様式概念図を図 1-2 に示す。ゲノム上の各遺伝子は、転写開始シグナル配列と転写終了シグナル配列で挟まれている。ゲノム RNA の 3' 側末端に存在する Leader Sequence、もしくは N 遺伝子の前方にある転写開始シグナル配列が主な転写開始部位であり、ゲノムの途中から転写が始まることは稀であると考えられている (図 1-2A)。ウイルスの RNA ポリメラーゼは、ゲノム上の遺伝子間に存在する Intergenic-region (IGR) と呼ばれる領域において次の 3 通りの振る舞いを

見せる。①IGR の前方の遺伝子を転写した後、ポリメラーゼの脱離が起こる場合。ポリメラーゼはそこで転写を終了し、ゲノム上で後方に位置する遺伝子はそのポリメラーゼによっては転写されない(図 1-2B)。②IGR において離脱したポリメラーゼが再度転写を開始する場合。この時、IGR 前方の遺伝子が転写された転写産物と、IGR の後方が転写された転写産物は 2 本に分かれる (図 1-2C)。③IGR を跨いで転写が継続する場合。この場合、IGR 前後の 2 つの遺伝子の配列が転写された 1 本の転写産物が合成される (図 1-2D)。VSV では、この③の転写様式はほとんど観察されないが、本研究で用いた狂犬病ウイルス HEP 株では比較的高い割合で IGR を跨いだ転写が起こることが報告されている (Morimoto et al., 2011)。これらポリメラーゼの IGR における 3 通りの振る舞いによって、多様な転写産物が合成される。また、主に①の転写様式に起因して、ゲノムの前方、5'側に近いほど転写産物量が少なくなると考えられている (図 1-2E)。G 遺伝子を狂犬病ウイルスのゲノム上から除去すると、L 遺伝子の位置が前方に移動するため、L 遺伝子の転写が高まる可能性が考えられる。これまでに、L 遺伝子の転写が高まると、ゲノムの 3'側末端に位置する N 遺伝子と、その後方に位置する P 遺伝子がコードするタンパク質の発現量が增大することが報告されている (Finke et al., 2000)。これらのことから、狂犬病ウイルスのゲノムから G 遺伝子を除去すると、まず、L 遺伝子のゲノム上の位置の変化し、L 遺伝子の転写が高まる。そして、L 遺伝子がコードする L タンパク質の発現量が增大し、ウイルスの遺伝子発現が促進されるという可能性が考えられた。

これらの 2 つの有力な要因について検証するために、弱毒化された狂犬病ウイルス株である High egg passage-flury (HEP) 株をもとにして、以下の 3 種の遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターを作製した (図 1-1)。1 つ目の狂犬病ウイルスベクター、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP は、狂犬病ウイルスの G 遺伝子と、1 組の転写開始シグナル配列、転写終了シグナル配列を除去したものである。また、N 遺伝子と P 遺伝子の間に外来遺伝子として赤色蛍光タンパク質 (monomeric Red Fluorescent Protein, mRFP, Campbell et al., 2002) をコードする配列が挿入されている (図 1-3A)。2 つ目の狂犬病ウイルスベクター、rHEP5.0-mRFP-CVSG には、HEP 株の G 遺伝子に換えて、神経回路トレーシング研究に用いられている Challenge Virus Standard (CVS) 株の G 遺伝子が挿入された (図 1-3B)。狂犬病ウイルスの感染特性は G タンパク質によって決定されるため、この G 遺伝子の変更によって HEP 株由来の狂犬病ウイルスベクターが CVS 株に近い感染特性を示し、神経回路トレーシングにおいて有用なツールとなることが報告されている (Ohara et al., 2009)。3 つ目の狂犬病ウイルスベクターは、rHEP5.0-mRFP-CVSG の G 遺伝子をコードする配列の開始コドンから終止コドンまでを、以下に述べる BPB 遺伝子で置換した rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB (図 1-3C) である。BPB 遺伝子とは、2 つの青色蛍光タンパク質 (TagBFP, Subach et al., 2008) を、自己開裂ペプチドをコードする P2A 配列 (Ryan et al., 1991; Kim et al., 2011) で繋ぐことで、単一の遺伝子として転写される遺伝子としたものである。BPB の長さは 1482 塩基であり、CVSG の塩基数 1575 と近い。このため rHEP5.0-mRFP-CVSG と rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB のゲノムにおける L タンパク質の位置はほとんど同じである。まず、rHEP5.0-mRFP-CVSG と rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB の性状を比較することで、G タンパク質の発現が狂犬病ウイルスの遺伝子発現量に与える影響を検証した。次に、第 2 の可能性である、L タンパク質の発現上昇の有無と、外来遺伝子の発現に対するその影響を検証するために、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP と rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB の性状比較を行った。

3 種の狂犬病ウイルスベクターの性状比較は以下の 2 つの方法で行った。第 1 は、3 種の狂犬病ウイルスベクターが共通して持つ mRFP に注目し、感染細胞中でのその蛍光強度から mRFP の発現量を比較する

方法である。第 2 は、狂犬病ウイルスのゲノム上の遺伝子が転写された転写産物の量を、リアルタイム PCR 法で比較する方法である。mRFP のような外来遺伝子を感染細胞中でどれだけ発現できるかは、ベクターとして利用する上で重要な性質である。狂犬病ウイルスは自らのゲノムから mRNA を合成することができるが、タンパク質を作る段階では宿主が持つ機能を利用するため、狂犬病ウイルス遺伝子発現調節機能の大部分は、転写調節が担っていると考えられる。そのため、本研究ではウイルスゲノムに含まれる全ての遺伝子について、感染後 1、3、6 日目に感染細胞中に存在する mRNA 量を定量的に解析することで、G 遺伝子除去が狂犬病ウイルスの遺伝子発現にどのように影響するのかを検討した。

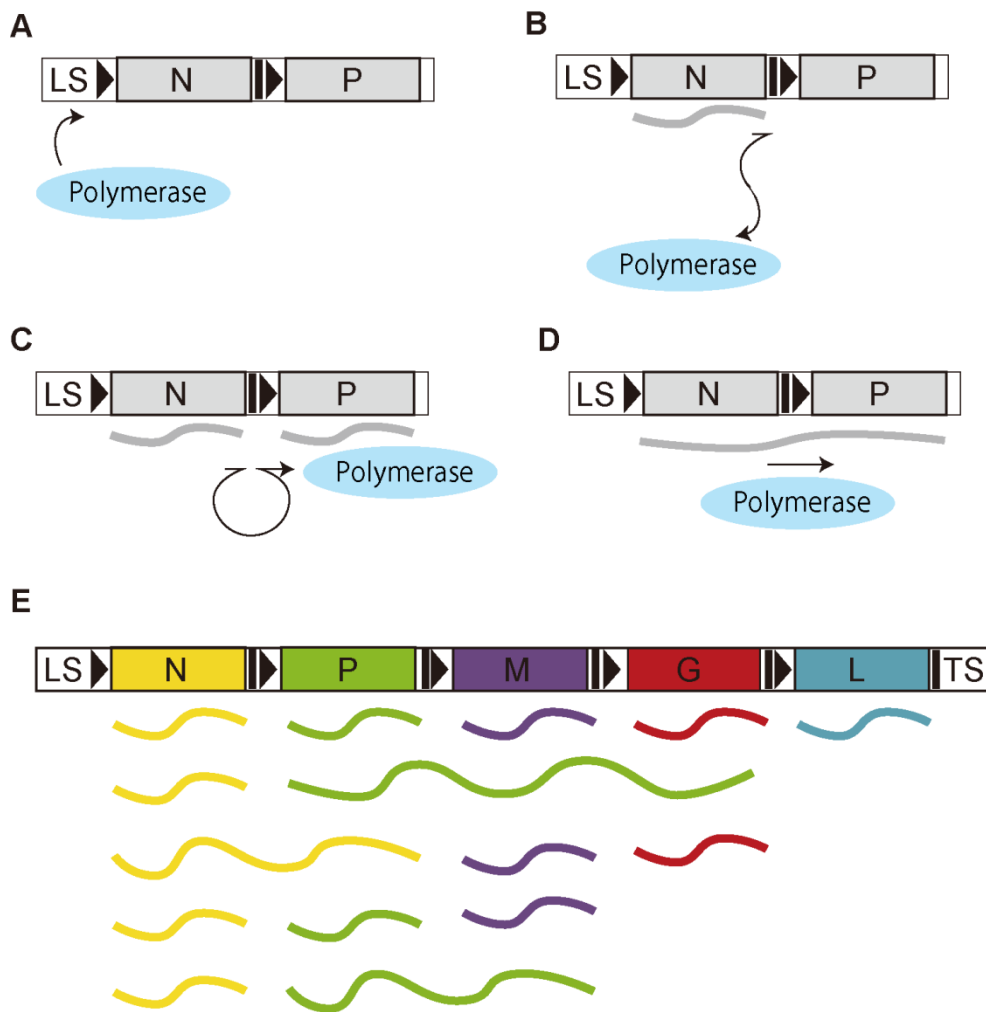


図 1-2 狂犬病ウイルスの転写様式概念図

- A: ウイルスの RNA ポリメラーゼはゲノムの 3'側末端に存在する N 遺伝子から転写を始める。
- B: IGR において一部のポリメラーゼが離脱し、転写が終了する。
- C: 離脱したポリメラーゼが再度転写を開始し、IGR 前後の遺伝子の転写産物をそれぞれ合成する。
- D: 転写終了シグナル配列で、転写が終了せず IGR を跨いだ 1 本の転写産物を合成する。この場合後方の遺伝子はタンパク質には翻訳されない。
- E: 転写産物の量は、3'側末端に位置する遺伝子ほど多くなる。転写産物の先頭の遺伝子のみが翻訳されると考えられるため、各転写産物を先頭に位置する遺伝子によって色分けした。

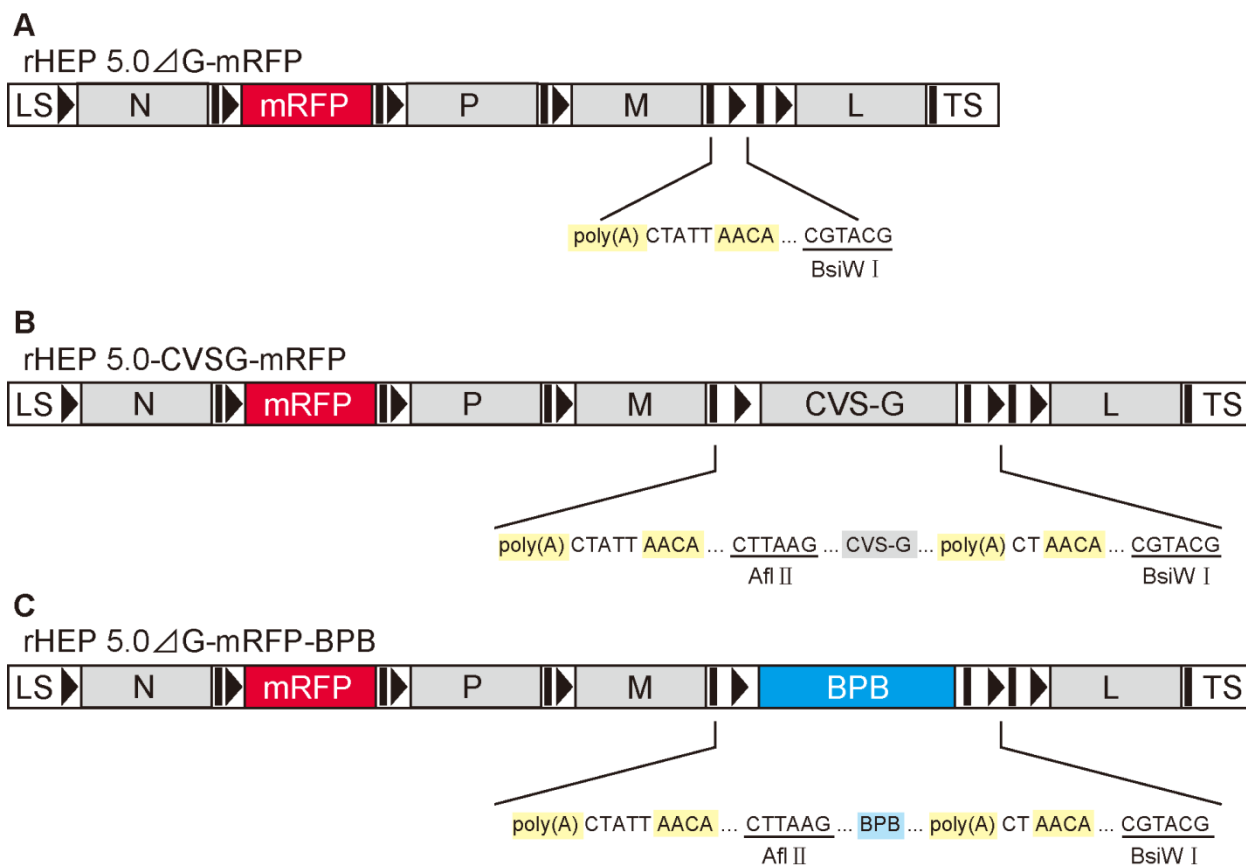


図 1-3 3種の狂犬病ウイルスのゲノムの模式図

A : G 遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスベクター rHEP5.0-CVSG-mRFP。

B : CVS 株の G 遺伝子をもつ狂犬病ウイルスベクター rHEP5.0-CVSG-mRFP。

C : G 遺伝子を除去した狂犬病ウイルスベクター rHEP5.0-CVSG-mRFP。

転写開始シグナルである“AACA”と転写終了シグナルである Poly (A) を黄色で、制限酵素の認識部位は下線で示す。

## 1-2. 材料と方法

ウイルス、及び遺伝子組換え生物を取り扱う全ての実験は「国立大学法人東北大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に従い、P2A 実験室内にて行った。

### 1-2-1. 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの作製と性状評価

#### <プラスミドの作製>

全ての制限酵素は New England BioLabs 社のものを使用した。また、PCR のための DNA ポリメラーゼには Pyrobest DNA polymerase (Takara)、と PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara) を使用した。

rHEP5.0-CVSG-mRFP (DDBJ/GenBank/EMBL accession number, AB839169) は HEP 株をベースに、G 遺伝子を CVS 株の G 遺伝子に置き換えることで作製された。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP は、rHEP5.0-CVSG-mRFP を元に、G 遺伝子とその前後の転写開始シグナル、及び、転写終了シグナルを除去することで作製された。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB は rHEP5.0-CVSG-mRFP の G 遺伝子を、BPB と置換して作製した。BPB は、TagBFP をコードする 2 つの配列を自己開裂ペプチド P2A で繋ぎ、単一の遺伝子としたもの (BPB) である。2 つの TagBFP 配列はそれぞれ以下のリンカーに Afl II と Sac II、Age I と Xba I を用いて挿入された。

5'-CCTTAAGG (1) CCGCGG (2) GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACG TGGAGGAGAACCCTGGACCTACCGGT (3) TCTAGA (4) -3'

(Afl II (1)、Sac II (2)、Age I (3)、Xba I (4) 認識部位を下線で示す)。TagBFP 配列を挿入するための PCR フラグメントの作製には、以下のプライマーを使用した。1 つ目の TagBFP を挿入するために、5'-ACCCTTAAGGAAAGATGAGCGAGCTGATTAAGGAGA-3' (Afl II 認識部位を下線で示す)、3'-GGTCCGCGGATTAAGCTTGTGCCCCAGTTTGCT-5' (Sac II 認識部位を下線で示す) を使用した。2 つ目の TagBFP を挿入するために、5'-ATTACCGGTACCATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAA-3' (Age I 認識部位を下線で示す)、3'-GGTTCTAGA (1) CGTACG (2) AGAGGTGTTAGTTTTTTTCCCGGG (3) TTTAATTAAGCTTGTGCCCCAGTTTGCT-5' (Xba I (1)、BsiW I (2)、Xma I (3) 認識部位を下線で示す) を使用した。合成された BPB 配列は、Afl II と BsiW I を使用して rHEP5.0-CVSG-mRFP に挿入された。

#### <ウイルスの回収>

rHEP5.0-CVSG-mRFP は、NA 細胞 (neuroblastoma 2a cell, A/J マウス由来神経芽細胞腫) 株を用いてリカバリーを行った (Inoue et al., 2003)。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP と rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB はゲノムに G 遺伝子を持たないことから、ウイルスの回収には HEP 株の G 遺伝子と N 遺伝子、P 遺伝子を恒常的に発現する NA 細胞株 (NA-NPHEPG) を使用した。この G 遺伝子を恒常的に発現する NA 細胞株については第 2 章で詳しく述べる。

NA 細胞は培養 1 日後に 60% コンフルエントとなるよう、12 ウェルプレート (TPP) において熱非働化 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Gibco) を含む最小必須培地 (MEM, Sigma) で一晚培養し (1 ウェルあたり約  $1.0 \times 10^5$  個)、トランスフェクション前に培養液を交換した。1.5 $\mu$ g のウイルス完全長ゲノムプラスミド、0.5 $\mu$ g の N タンパク質ヘルパープラスミド (pH-N)、0.3 $\mu$ g の P タンパク質ヘルパープ



ラスミド (pH-P)、0.3 $\mu$ g の L タンパク質ヘルパープラスミド (pH-L)、0.4 $\mu$ g の N タンパク質、P タンパク質、G タンパク質を 2A 配列で繋いだヘルパープラスミド (pH-NPG) を TransIT LT-1 (Mirus) を用いて、試薬説明書に従い同時にトランスフェクションした。24 時間後に細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で一回洗浄し、その後 10% の FBS を含む最小必須培地にて、ゲノムに挿入した蛍光タンパク質の蛍光が観察されるまで 10 日から 21 日維持した。その後、細胞上清を、NA 細胞を単層培養してある 150cm<sup>2</sup>培養フラスコ (TPP) に移し、NA 細胞の増殖を抑えつつウイルスを増殖させるために、34 °C で 5 日培養した。この間毎日培地を回収し、10ml の新しい培地と入れ替えた。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP と rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB の回収には CVS 株の G 遺伝子と HEP 株の N 遺伝子、P 遺伝子を恒常的に発現する NA 細胞株 (NA-NPCVSG) を使用した。NA 細胞から回収した培地を遠心フィルターユニット (アミコンウルトラ-15, Millipore) を使い、100 倍に遠心濃縮した後、分注して実験に使用するまで -80°C で保管した。

#### < ウイルスの力価測定 >

ウイルスの力価測定は HEP 株の G 遺伝子を恒常的に発現する NA 細胞株 (NA-HEPG) を使用した。ウイルス量を決定するため、96 ウェルに単層培養された NA-HEPG にウイルスの 10 倍希釈系列を感染させ、34 °C で培養した。プロトコルの詳細は Wiktor et al. (1984) に従った。簡潔には、感染 4~6 日後、蛍光顕微鏡で感染細胞のプラークをカウントし、focus forming unit / ml (FFU / ml) を算出した。感染細胞はウイルスのゲノムに組み込まれた蛍光タンパク質による蛍光を指標とした。

#### < 感染 NA 細胞におけるウイルス中の外来遺伝子、mRFP 遺伝子の発現量の比較 >

NA 細胞を 24 ウェルプラスチックプレート (TPP) 上に置かれたカバーガラス (No1 thickness, MATSUNAMI) 上に 10% コンフルエントとなるよう播種し、10% FBS を含む最小必須培地を用いて 34°C で培養した。感染細胞における mRFP の発現量を比較するために、それぞれのウイルスを multiplicity of infection (m.o.i) 20 で NA 細胞に感染させた。24 時間後に培養液を全量交換した。感染後 3 日、6 日後に 4% ホルムアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液を用いて NA 細胞を固定した。

mRFP の蛍光強度の測定には、カールツァイスセミオート顕微鏡、対物レンズ 20 倍と、カールツァイスコンフォーカルスキャニングモジュールを使用した。ヘリウム-ネオン (He-Ne) レーザーより 543nm のレーザー光を照射し、ロングパスフィルター LP560 (Zeiss) を通過したものを mRFP の蛍光とした。ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) を用いて個々の感染細胞の平均蛍光強度を算出した。

#### 1-2-2. 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの転写機能の解析

##### < 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの転写機能の解析 >

NA 細胞を 48 ウェルプラスチックプレート (TPP) に 90% コンフルエントとなるよう播種し、10% FBS を含む最小必須培地を用いて 34°C で培養した。ウイルスを m.o.i 10 で感染させ、1 日、3 日、6 日後に RNeasy minikit (Qiagen) を用いて RNA を回収した。

##### < リアルタイム PCR 法によるウイルス mRNA の定量 >

回収された RNA 1 $\mu$ g に DNase I (NEB) 1U を加え、総量が 10 $\mu$ l になるように H<sub>2</sub>O を加えて混和した。

37°C、15分反応させた後、最終濃度 5mM になるように EDTA を加えて 75°Cで 10分処理し DNase I を失活させた。逆転写反応には PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を使用した。H<sub>2</sub>O に RNA 500ng と Oligo dT プライマー (50μM) を 1μl、dNTP 混合液 (それぞれ 10mM) 1μl、を加えて総量 10μl とし、65°C、5分間、RNA の変性処理を行った後、逆転写酵素を 200U 加えて、42°Cで 1時間反応させ mRNA を cDNA に逆転写した。その後 70°Cで 15分間失活処理を行った。リアルタイム PCR は Light cycler® nano (Roche) を用いて行った。SYBR® Green Realtime PCR Master Mix-Plus (TOYOBO LIFE SCIENCE) を用いて PCR を行い、サンプル中に含まれる cDNA のコピー数を推定した。PCR 反応液は、サンプル cDNA 2μl、各標的配列特異的プライマー (10μM) 1.2μl、PCR Master mix 10μl、Plus ソリューション 2μl を混和して調製した。標的配列特異的プライマーとして表 1-1 に示したプライマーを使用した。それぞれの遺伝子について 10 倍希釈系列の既知濃度 cDNA をサンプルと同時に PCR 処理することで検量線を得た。その検量線を用いて、各サンプルに含まれる各ウイルス構成タンパク質遺伝子のコピー数を決定した後、それぞれのサンプルに含まれる RPL13A 遺伝子のコピー数をもとに規格化した。全てのサンプルはそれぞれ 3 本のチューブを用いて 3 度リアルタイム PCR による定量を行い、その平均値からそのサンプルに含まれるコピー数を求めた。PCR 産物の特異性は乖離曲線を用いて検証され、非特異的増殖が認められないことを確認した。

表 1-1 リアルタイム PCR に用いた各遺伝子配列特異的プライマー

標的遺伝子		プライマーの塩基配列
N	プライマー1	5'-AGTCGGTCTTCTCCTGAGTCTGTAC-3'
	プライマー2	3'-GTTGTCATCAGGGTGTGGTGTTC-5'
mRFP	プライマー1	5'-CCTGAAGGGCGAGATCAAGATGAG-3'
	プライマー2	3'-TAGTCCTCGTTGTGGGAGGTGATG-5'
P	プライマー1	5'-CCCAACCTCCTGTTCCAATCGTAC-3'
	プライマー2	3'-TCCTGGAGGGTTAGGAAAGTTGAC-5'
M	プライマー1	5'-ATGTCCCGCTGAAAGAACTCACAAG-3'
	プライマー2	3'-TGAGTAACCGTTCGGACTGCAC-5'
G	プライマー1	5'-AGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGAC-3'
	プライマー2	3'-ATCTTCCAGTTATACGCGGCTCTAC-5'
BPB	プライマー1	5'-GGGAAGCGGAGCTACTAAC-3'
	プライマー2	3'-TAGGTCCAGGGTTCTCCTCC-5'
L	プライマー1	5'-AACAGGAGCCGGAGATGTATAACC-3'
	プライマー2	3'-ATCGACCCTCTCAAGGCAACTTAAC-5'
RPL13A	プライマー1	5'-ATGACAAGAAAAAGCGGATG-3'
	プライマー2	3'-CTTTTCTGCCTGTTTCCGTA-5'

<ノザンプロット法によるウイルス RNA の解析>

ノザンプロット法は「DIG Application Manual for Filter Hybridization」(Roche) に従った。1.2%のアガロースを用いて、20 mM MOPS、5 mM 酢酸ナトリウム 2 mM EDTA、2%ホルムアルデヒドを含む緩衝液中で感染細胞から回収した RNA を電気泳動した。この時 RNA の分子量マーカーとして Prestain Marker for RNA High (BioDynamics) を同時に電気泳動した。RNA を Positively charged nylon membrane (Roche) にトランスファーし、ジゴキシゲニン (DIG) で標識された遺伝子配列特異的な DNA プローブを加え、50°C で 6 時間ハイブリダイズした。遺伝子配列特異的な DIG 標識 DNA プローブは、表 1-2 のプライマーを用いて PCR で増幅された。DIG 標識 DNA プローブと結合したメンブレン上の RNA は、disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'- (5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl) phenyl phosphate (CSPD) を用いて可視化された。メンブレンを Image Quant 400 (GE Healthcare) を用いて撮像し、メンブレン上のバンドの RNA 量を CSPD の発光強度から ImageJ ゲル解析ツールを用いてそれぞれのレーンについて計算した。解析に用いた画像はレーン毎に異なる露光時間で撮像された。

表 1-2 DIG プローブ作製に用いた各遺伝子配列特異的プライマー

標的遺伝子		プライマーの塩基配列
N	プライマー1	5'-CGTACTGATGTAGAAGGGAATTGG-3'
	プライマー2	3'-CCCTGGCTCAAACAT TCTCCTTATC-5'
mRFP	プライマー1	5'-CAAGCTGAAGGTGACCAAGG-3'
	プライマー2	3'-GTTGTGGGAGGTGATGTCCAG-5'
P	プライマー1	5'-GAACCCATAGAAGTGGACAATCTC-3'
	プライマー2	3'-ATGAGCGATCTCAGCCTCTAC-5'
M	プライマー1	5'-AAACTGTAGGGATGAGGACACC-3'
	プライマー2	3'-GATACACCAGATCCTGCCTTG-5'
G	プライマー1	5'-AGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGAC-3'
	プライマー2	3'-TTTCATCCACAAAGCCGCAAG-5'
BPB	プライマー1	5'-CCCCTAAGAACCTCAAGATG-3'
	プライマー2	3'-AGGTCTTGCTGCCGTAGAG-5'
L	プライマー1	5'-GATTCCTTGCCCGAGACCAC-3'
	プライマー2	3'-GTCTGTCATAGTCAGTGCCTC-5'

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの作製と性状評価

① 狂犬病ウイルスのゲノムから G 遺伝子を除去した rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP、② CV5 株の G 遺伝子を持つ rHEP5.0-CV5G-mRFP、③ rHEP5.0-CV5G-mRFP の G 遺伝子を BPB (2 つの TagBFP 遺伝子を P2A 配列で繋いだもの) に置換した rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB、の 3 種類のウイルスを作製しその性状を比較した。

まず、G 遺伝子を持つ rHEP5.0-CV5G-mRFP ② と G 遺伝子を蛍光タンパク質遺伝子に置換した rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB ③ の性状を比較することで、G 遺伝子の配列や、発現した G タンパク質がウイルス遺伝子発現機構に与える影響を検討した。次に、L 遺伝子のゲノム上の位置が前方に移った rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP ① と、L 遺伝子のゲノム上の位置がもとの狂犬病ウイルスとほぼ同じである rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB ③ との比較を通して、L 遺伝子のゲノム上の位置がウイルス遺伝子発現機構に与える影響を検討した。

作製した 3 種の狂犬病ウイルスベクターを NA 細胞に感染させたところ、ウイルスゲノム中に挿入された mRFP の発現が感染細胞中に確認された。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB 感染細胞では BFP の発現も確認された (図 1-4)。この mRFP の蛍光強度を、感染後 3、6 日目に、計測し比較した図を 1-5 に示した。いずれの条件においても、G 遺伝子を除去したベクター rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP に感染した細胞は最も高い蛍光強度を示し、G 遺伝子を持つベクターである rHEP5.0-CV5G-mRFP に感染した細胞は最も低い蛍光強度を、そして、G 遺伝子を置換したベクターである rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB に感染した細胞はその中間の蛍光強度を示した。

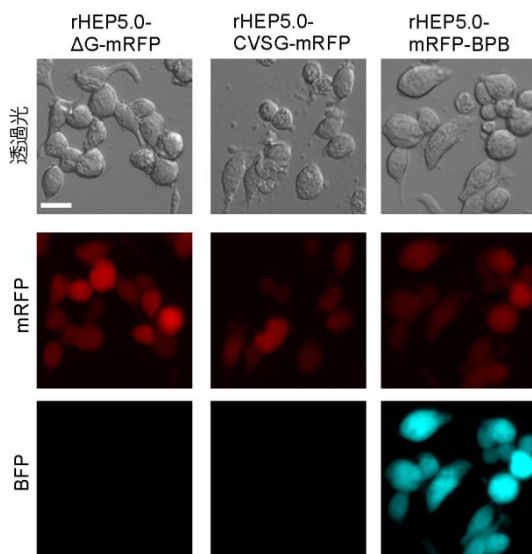
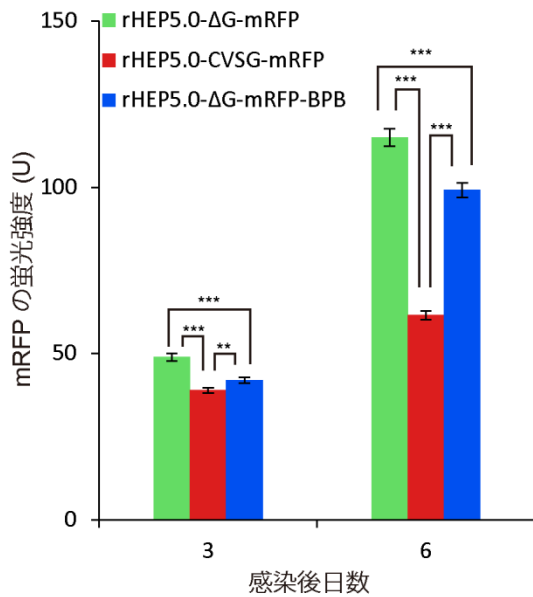


図 1-4 狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現

作製した 3 種の狂犬病ウイルスベクターが感染した NA 細胞において mRFP の発現を確認した。

rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB 感染細胞では BFP の蛍光が確認された。

スケールバー=20  $\mu$  m



**図 1-5 mRFP の発現量比較**

3 種の狂犬病ウイルスベクターについて、NA 細胞に感染後 3、6 日後に mRFP の蛍光強度を比較した。

誤差棒は平均値±標準誤差。

One-way ANOVA; post-hoc t-test Holm-corrected による検定を行った。\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001。

計測された細胞数=427、510、475 (感染後 3 日)、574、572、648 (感染後 6 日)

(rHEP5.0 $\Delta$ G-mRFP、rHEP5.0 $\Delta$ G-CVSG-mRFP、rHEP5.0 $\Delta$ G-mRFP-BPB)。

### 1-3-2. 遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターの転写機能の解析

次に、ウイルスベクターの転写産物についてノザンプロット法とリアルタイム PCR 法を用いて定量解析を行った。狂犬病ウイルスは感染細胞内において、ウイルス内在性の RNA ポリメラーゼを用い、ウイルス構成タンパク質をコードする mRNA を合成する。本研究で用いられた 3 種の狂犬病ウイルスベクターの元になった狂犬病ウイルス HEP 株は、マルチシストロニックな転写産物を多量に合成することが報告されている (Morimoto et al., 2011)。マルチシストロニックな転写産物は複数のタンパク質の遺伝子配列を含むが、そのうちタンパク質に翻訳されるのは主に転写産物中の先頭の遺伝子だけであると考えられている (Conzelmann, 2008)。そのため、転写産物中の遺伝子配列の内、最も 5'側に位置するものがどの遺伝子の配列であるかが重要である。図 1-2 で示したように、狂犬病ウイルス HEP 株は、様々な構成 (どの遺伝子からどの遺伝子までが転写されているか) の転写産物を合成する。しかし、リアルタイム PCR 法では、これら転写産物の構成の違いを検出することが困難である。そこで、各遺伝子配列特異的なプローブを用いて、ノザンプロット法を行い、異なる構成の転写産物を識別し (図 1-6)、その量比を推定した。この量比から、特定の遺伝子配列を含む転写産物の中で、その遺伝子配列が転写産物中の最も 5'側に位置する転写産物の割合を推定した (表 1-3)。次に、リアルタイム PCR 法で、各遺伝子配列を含む転写産物の量を測定した (表 1-4)。表 1-4 で示した量と、表 1-3 で示した割合から、それぞれのタンパク質に翻訳される転写産物 (すなわち、最も 5'側に位置する遺伝子によって分類された転写産物) の量を算出した。これ以降、ある遺伝子 X の配列を含む転写産物を“X 関連 mRNA” (表 1-4 で示したもの)、あるタンパク質 X に翻訳可能な転写産物を“X-mRNA”と表記する。

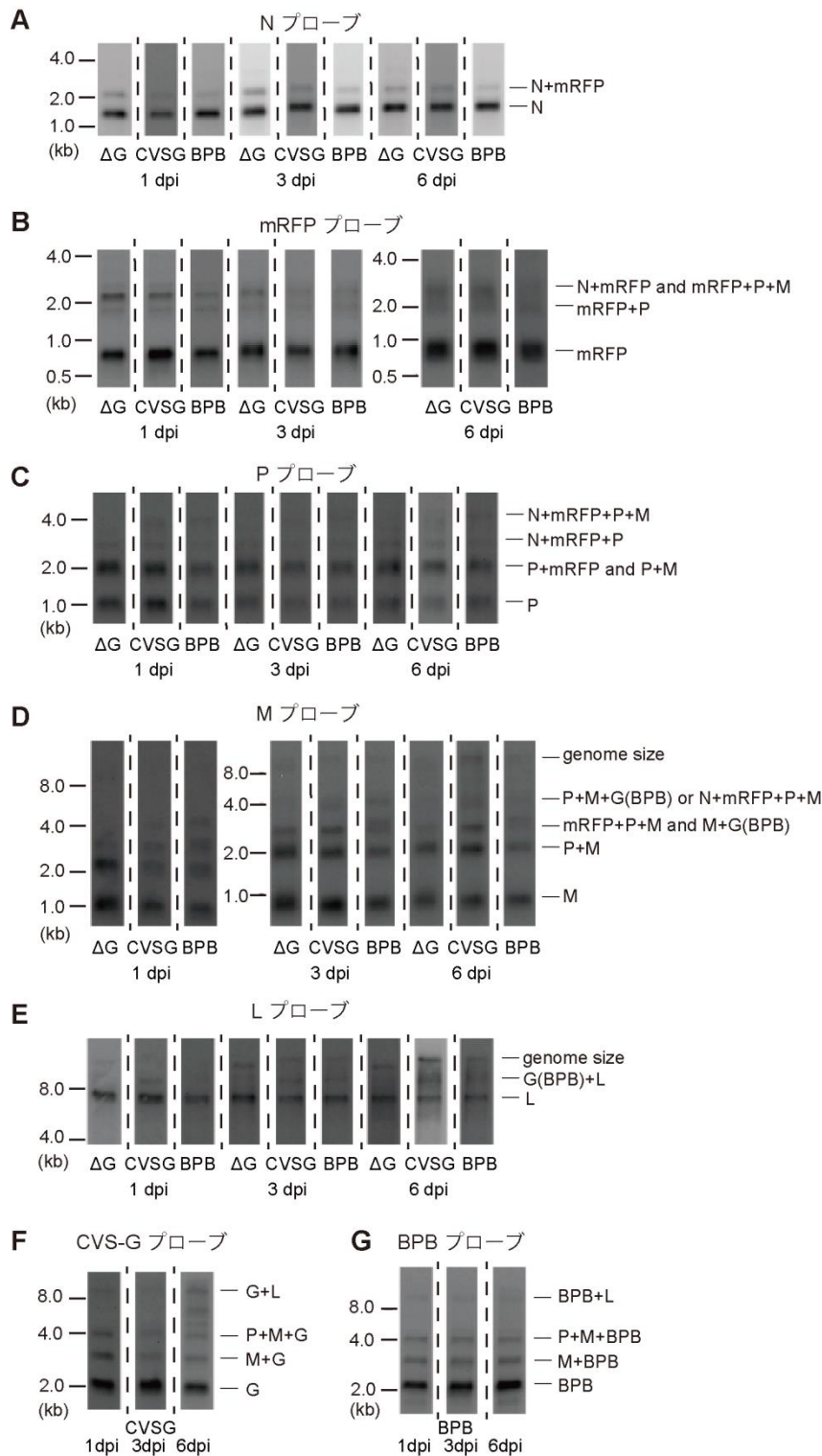


図 1-6 ノザンブロット法による転写産物の解析

3種の狂犬病ウイルスベクターに感染したNA細胞からRNAを回収し、狂犬病ウイルスの各遺伝子の配列に特異的なプローブをハイブリダイズさせた。各図の左側には核酸の長さを推定するためのマーカーの位置、右側には推定される転写産物の構成を示す。dpi: days post infection、  
 ΔG: rHEP5.0-ΔG-mRFP、CVSG: rHEP5.0-CVSG-mRFP、BPB: rHEP5.0-ΔG-mRFP-BPB

遺伝子	感染後日数	rHEP5.0-ΔG-mRFP (%)	rHEP5.0-CVSG-mRFP (%)	rHEP5.0-ΔG-mRFP-BPB (%)
N	1dpi	100.0	100.0	100.0
	3dpi	100.0	100.0	100.0
	6dpi	100.0	100.0	100.0
mRFP	1dpi	73.8	82.7	88.4
	3dpi	83.7	87.0	89.6
	6dpi	79.1	80.5	88.6
P	1dpi	79.9	78.8	79.5
	3dpi	70.6	71.1	62.0
	6dpi	65.4	56.2	59.5
M	1dpi	50.5	78.9	60.6
	3dpi	50.9	58.4	58.3
	6dpi	50.5	48.3	68.0
G (BPB)	1dpi	-	57.0	70.9
	3dpi	-	68.8	67.0
	6dpi	-	65.1	72.7
L	1dpi	91.3	81.2	87.4
	3dpi	85.9	69.0	74.2
	6dpi	87.8	58.7	73.0

**表 1-3 各遺伝子の配列を含む転写産物中の翻訳可能な転写産物の割合**

各遺伝子に特異的な配列を含む転写産物のうち、その遺伝子配列が転写産物のなかで先頭の遺伝子となっているものの割合。例えば、P 遺伝子特異的な配列を含む転写産物の中で、P が先頭になっている転写産物、P 単体、P+M などの割合。mRFP+P などの P が先頭で無い転写産物は P タンパク質には翻訳されないと考えられたため除外した。

遺伝子	感染後日数	rHEP5.0-ΔG-mRFP(U)	rHEP5.0-CVSG-mRFP(U)	rHEP5.0-ΔG-mRFP-BPB(U)
N	1dpi	16.5	6.1	10.6
	3dpi	73.4	32.9	56.1
	6dpi	104.7	32.0	58.6
mRFP	1dpi	8.2	4.1	5.3
	3dpi	56.4	29.1	41.8
	6dpi	110.0	41.3	51.0
P	1dpi	9.0	3.5	5.4
	3dpi	34.3	20.4	26.3
	6dpi	65.7	23.7	33.7
M	1dpi	3.9	1.7	2.2
	3dpi	13.3	8.2	9.7
	6dpi	36.9	13.5	17.0
G(BPB)	1dpi	-	2.0	2.2
	3dpi	-	6.4	6.6
	6dpi	-	5.7	17.0
L	1dpi	2.6	0.8	1.0
	3dpi	13.0	6.6	6.0
	6dpi	7.4	8.6	3.5

**表 1-4 各遺伝子の配列を含む転写産物の量（各遺伝子関連 mRNA）**

各遺伝子に特異的な配列を含む転写産物の量を、リアルタイム PCR 法を用いて測定した。マルチシストロニックな転写産物は複数の遺伝子を含むため、重複して計上されている。



3種のウイルスベクターをNA細胞に感染させ、感染から1、3、6日後にRNAを回収して、各ウイルス構成タンパク質をコードするmRNAの総量を比較した(図1-7)。ここでは、rHEP5.0-CVSG-mRFPを感染させて1日後(1dpi)におけるL-mRNAの量を1とし各RNAの量をプロットしている。規格化された。ウイルス構成タンパク質をコードするmRNAの産生量は、感染後1、3、6日目において、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP感染細胞のほうがはrHEP5.0-CVSG-mRFP感染細胞に比べ、有意に多かった。感染後6日目においても、ウイルス構成タンパク質をコードするmRNAの量は、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP感染細胞で最も多く、次いでrHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB感染細胞、そしてrHEP5.0-CVSG-mRFPが最も少なかった。この結果は、G遺伝子の除去と置換はどちらも狂犬病ウイルスベクターの転写機能を高めることを示している。また、G遺伝子の除去は、G遺伝子の置換に比べより転写機能に強い影響を示した。

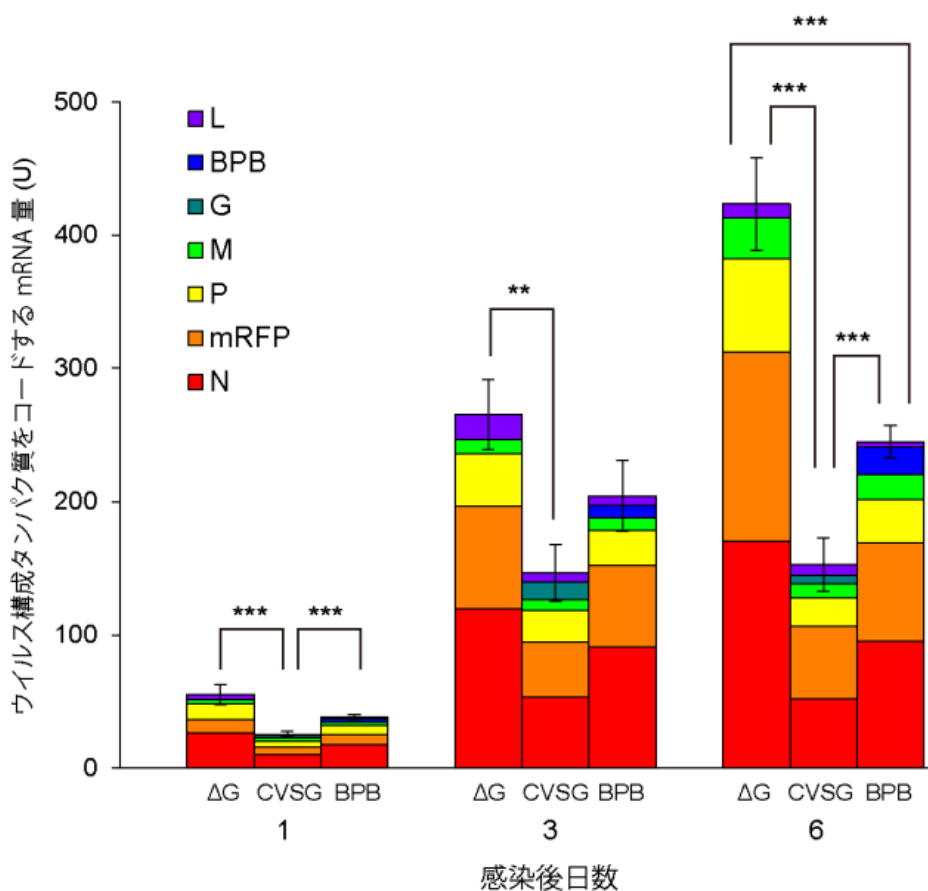


図 1-7 各ウイルスベクターに感染したNA細胞中のウイルス mRNA の定量

リアルタイム PCR 法を用いて各ウイルス構成タンパク質をコードする mRNA の量を推定し、表 1-3 の割合に基づいて補正した。

感染後 6 日目において 3 種の狂犬病ウイルスベクター全ての間で有意な差が見られた。

N=10。誤差棒は平均値±標準誤差。

Kruskal-Wallis rank sum test; Mann-Whitney U test, Holm-corrected によって検定を行った。

\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001

次に、各遺伝子の mRNA 量について比較するために、図 1-7 をそれぞれの遺伝子について分けたものを示す (図 1-8)。ゲノム的前方に位置する遺伝子 N、P、M については、狂犬病ウイルスベクターに含まれる遺伝子全体の mRNA 量と同様の傾向が見られた。それぞれの mRNA 量は感染後日数が経過するにつれ増加していた。一方でゲノムの最後方に位置する L 遺伝子の mRNA 量は他の遺伝子とは異なる傾向を示した。すなわち、L-mRNA の量は、感染後 1、3 日目において、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP 感染細胞で有意に多かった。一方、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB 感染細胞と rHEP5.0-CVSG-mRFP 感染細胞に比べ有意に多くの L-mRNA が観察された。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB 感染細胞と rHEP5.0-CVSG-mRFP 感染細胞では有意な差は観察されなかった。感染後 3 日目と 6 日目の結果を比較すると、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP 感染細胞と、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB 感染細胞において L-mRNA 量が減少していたのに対し、rHEP5.0-CVSG-mRFP 感染細胞ではそのような減少は観察されなかった。

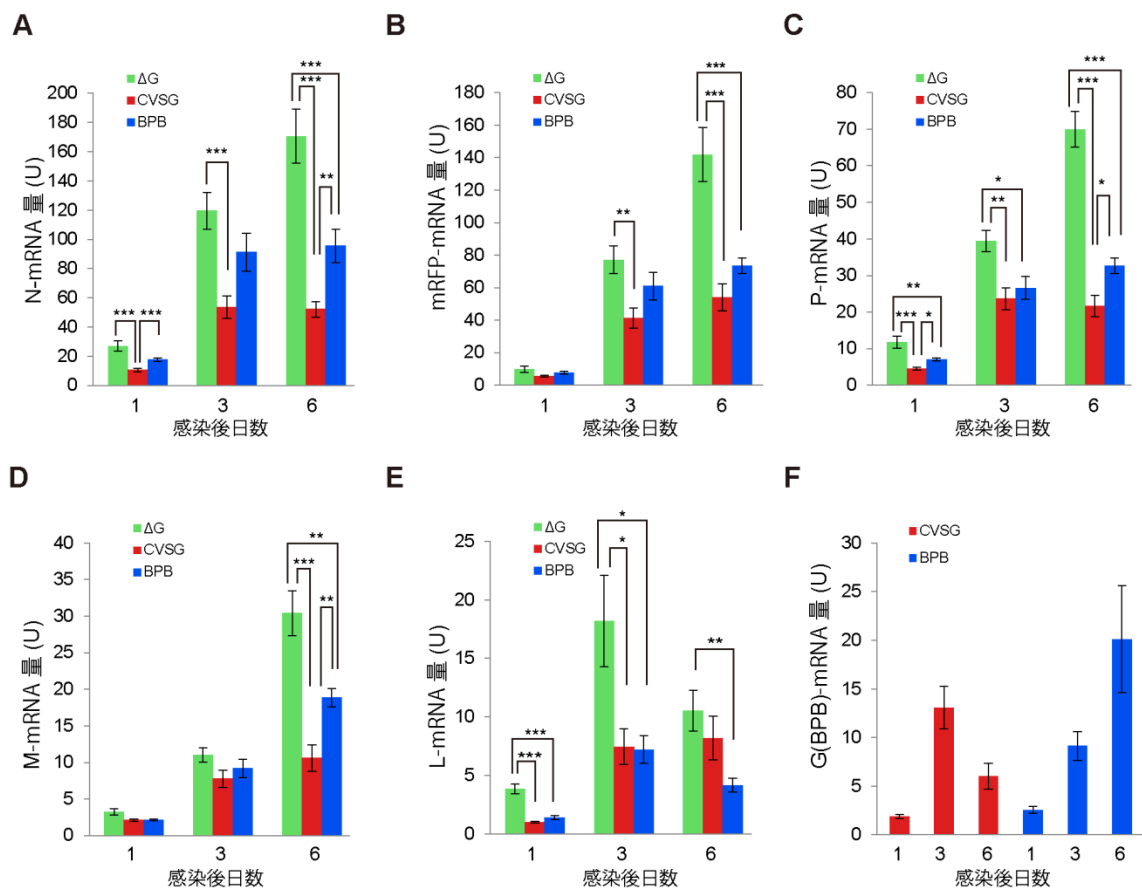


図 1-8 各ウイルスベクターに感染した NA 細胞中のウイルス mRNA 量の比較

N-, mRFP-, P-, M-mRNA の量はいずれの条件でも単調に増加していた。L-mRNA の量は G 遺伝子を除去、置換したベクターに感染した細胞で、感染後 3 日から 6 日で減少していた。

N=10。誤差棒は平均値 $\pm$ 標準誤差。

Kruskal-Wallis rank sum test; Mann-Whitney U test, Holm-corrected によって検定を行った。

\* p < 0.05、 \*\* p < 0.01、 \*\*\* p < 0.001

図 1-8 で示した、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP に感染した後、1 日目、3 日目の高い L-mRNA 量は、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP のゲノム内の L 遺伝子の位置に起因すると考えられる。図 1-2B で示したように、狂犬病ウイルスベクターの転写では、各遺伝子間において、ポリメラーゼがある割合で離脱する。主な転写の開始部位は、ゲノム RNA の 3'側、N 遺伝子の前方であることから、ゲノムの 5'側に位置する遺伝子ほどポリメラーゼが到達する確率は低くなり、転写産物の量は低くなる。rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB、及び、rHEP5.0-CVSG-mRFP では、L 遺伝子がゲノム RNA の 3'側から数えて 6 つ目の遺伝子であるのに対し、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP では L 遺伝子がゲノム RNA の 3'側から数えて 5 つ目の遺伝子である。そのため、N 遺伝子の前方から転写を開始したポリメラーゼが、高い割合で L 遺伝子まで到達する可能性が考えられた。この可能性を検証するために、3 種のに感染した細胞中の N 関連 mRNA 量と L 関連 mRNA 量の比 (L 関連 mRNA の量を N 関連 mRNA 量で除した値、L/N) を算出した (図 1-9)。その結果、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP 感染後 1 日目では、他 2 種のベクター感染細胞と比較して、L/N が有意に高いことが確かめられた。しかし、感染後 6 日目では、rHEP5.0-CVSG-mRFP 感染細胞で、L/N が有意に高くなっていった。

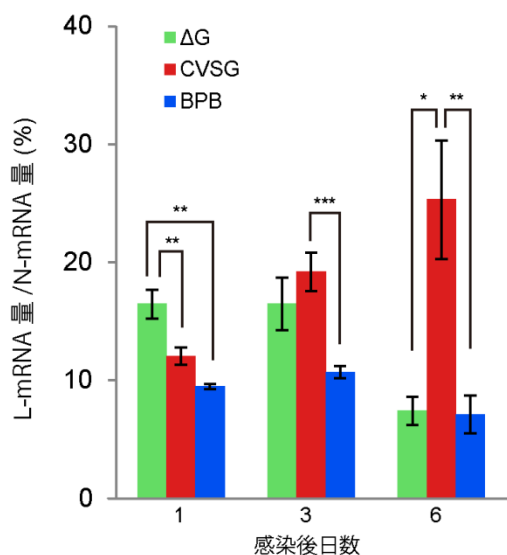


図 1-9 N 関連 mRNA と L 関連 mRNA の比

各サンプルについて、L 関連 mRNA の量と N 関連 mRNA 量の比を算出し、その平均を示した。感染後 1 日目では、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP 感染細胞で、感染後 6 日目では、rHEP5.0-CVSG-mRFP 感染細胞で有意に L 関連 mRNA 量の N 関連 mRNA 量に対する比率が高まっていた。

N=10。誤差棒は平均値 $\pm$ 標準誤差。

Kruskal-Wallis rank sum test; Mann-Whitney U test, Holm-corrected によって検定を行った。

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

本研究で作製された 3 種の狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現量と転写産物の解析結果を総合すると、G 遺伝子の除去と置換がどちらも狂犬病ウイルスの外来遺伝子発現量と転写産物量を増加させることが確かめられた。また、その増加の程度を比較すると、G 遺伝子を置換した場合よりも G 遺伝子を除去した場合のほうがその効果が大きいことも確かめられた。注目すべきは、G 遺伝子の除去後にウイルスの RNA ポリメラーゼをコードする L 遺伝子の転写産物が有意に増えていたことである。これとは対照的に、G 遺伝子を蛍光タンパク質遺伝子で置換した rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB に感染した細胞では、G 遺伝子を持つ rHEP5.0-CVSG-mRFP に感染した細胞と同程度の量の L-mRNA 量が観察された。にもかかわらず、全てのウイルス mRNA の総量を比較すると、感染後 6 日目において rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP-BPB に感染した細胞において有意に多量のウイルスのタンパク質をコードする mRNA が観察された。

#### 1-4. 考察

本研究では、3種の狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現特性を比較した。G遺伝子を持つ狂犬病ウイルスベクター、G遺伝子を除去した狂犬病ウイルスベクター、G遺伝子を同程度の大きさの蛍光タンパク質遺伝子で置換した狂犬病ウイルスベクターである。この3種の狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現と転写産物を定量的に解析・比較することで、G遺伝子の除去や置換が狂犬病ウイルスの遺伝子発現機構にどのような影響を与えるのかを検討した。その結果、G遺伝子の除去はL遺伝子の転写産物量を増加させたが、G遺伝子の置換後にはL遺伝子の転写産物量の増大は観察されなかった。そして、G遺伝子の除去と置換はどちらも、狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子発現量と転写産物の量を増加させることが確かめられた。この増加の程度を比較すると、G遺伝子除去は、G遺伝子の置換よりも大きな効果があることが確かめられた。これらの結果から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量を増大させる要因として、少なくとも以下の2つがあると考えられた。

第1の要因は、Gタンパク質が発現していること自体である。L-mRNAの量は、rHEP5.0-mRFP-CVSG感染細胞とrHEP5.0-△G-mRFP-BPB感染細胞の間で、有意な差が見られなかったにもかかわらず、これらの感染細胞におけるウイルスタンパク質をコードする転写産物の総量やmRFPの発現量には有意な差が見られた。この違いはrHEP5.0-mRFP-CVSGとrHEP5.0-△G-mRFP-BPBの相違点、つまりGタンパク質の発現による影響に起因していると考えられる。Gタンパク質の発現が狂犬病ウイルスの発現量を抑える理由の1つとして、細胞毒性が考えられる。Gタンパク質によって感染細胞の状態に変化が起き、ウイルスのタンパク質合成にも影響した可能性がある。また、本研究ではG遺伝子をゲノム中に持つ狂犬病ウイルスベクター感染細胞と、G遺伝子を持たない狂犬病ウイルスベクター感染細胞の間で、L-mRNAの量の経時変化に異なる傾向が見られた。G遺伝子を持つ狂犬病ウイルスベクターに感染した細胞では、感染後1日目から6日目にかけて単調にL-mRNA量が増加していたが、G遺伝子を持たない2種の狂犬病ウイルスベクターに感染した細胞では、どちらも感染後3日目から6日目にかけてL-mRNA量が減少していた。この傾向は、3種類の狂犬病ウイルスベクターに感染した細胞において、他のタンパク質をコードするmRNAに関してはほとんど見られなかった（ただし、rHEP5.0-CVSG-mRFP感染細胞におけるG-mRNAも感染後3日目から6日目にかけて減少していた）。Gタンパク質が狂犬病ウイルスの遺伝子発現機構にどのように関与するか、そのメカニズムについてはほとんど報告されていないが、Gタンパク質に変異を導入すると、ウイルスの転写活性が変化することが報告されている (Morimoto et al., 2000; Faber et al., 2007)。Gタンパク質がウイルスの転写を調節する機構として考えられる可能性の一つは、狂犬病ウイルスのMタンパク質との相互作用である。Mタンパク質は狂犬病ウイルスのウイルス粒子においてエンベロープとRNP複合体を結びつける働きを担っている。Mタンパク質の機能の一つは、ウイルスの転写様式の制御である (Finke et al., 2003a; Finke et al., 2003b)。狂犬病ウイルスの転写には、ウイルスタンパク質を発現するためのmRNA合成と、ウイルス粒子の複製のためにゲノムのコピーを合成する働きの2つの様式が存在する。Mタンパク質がこの2つの様式の制御していることが報告されている。Mタンパク質はGタンパク質と細胞内で結合することが知られており、Gタンパク質が発現している場合と、発現していない場合でMタンパク質の細胞内での空間的な分布に違いが異なる (Nakahara et al., 1999)。また狂犬病ウイルスのゲノムを改変し、異なる株に由来するMタンパク質とGタンパク質をもつように遺伝子改変すると、その組み合わせによって、ウイルスの転写活性が高まる場合や、逆に転写が抑えられる場合があることも

報告されている (Pulmanusahakul et al., 2008)。これらのことから、G タンパク質が M タンパク質と相互作用することで、狂犬病ウイルスの mRNA の合成を制御している可能性が示唆される。

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量を増大させる第 2 の要因は、L タンパク質の発現量の増加であると思われる。狂犬病ウイルスの L タンパク質は、ウイルスの RNA を合成するポリメラーゼである。L 遺伝子の転写産物の量が増大すると、N タンパク質、P タンパク質の発現量が増大することが報告されている (Finke et al., 2000)。狂犬病ウイルスではゲノムの先頭、3'側から転写が始まり、5'側にある遺伝子ほど発現量が下がることが知られている。L 遺伝子はゲノムの最も 5'側に位置する遺伝子なので、ゲノムから G 遺伝子を除去することで、L 遺伝子の位置はより前方へ移動する。本研究におけるウイルス転写産物の定量解析によって、G 遺伝子の除去が L-mRNA の量を増加させることが確かめられたが、G 遺伝子を同程度の大きさの遺伝子と置き換えた場合には L-mRNA の増加は見られなかった。G 遺伝子を除去した狂犬病ウイルスベクターの転写産物の量は、感染後 6 日において、G 遺伝子を置換した狂犬病ウイルスベクターの転写産物の量と比べて多くなることも確かめられた。これらのことから、G 遺伝子の除去によって L 遺伝子のゲノム上の位置が変化し、L 遺伝子の発現量が増大する。そして、その結果として狂犬病ウイルスの遺伝子転写活性が増大した可能性が高いと考えられる。また、狂犬病ウイルス HEP 株の特徴であるマルチシストロニックな転写産物の解析によって、G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターでは L 遺伝子の配列を含む転写産物の中で L タンパク質に翻訳される転写産物の割合が高いことも確かめられた。これは、G 遺伝子の除去によって L 遺伝子前方の遺伝子配列に変化が生じたことに由来すると考えられ、L タンパク質の発現量の上昇の一因となると考えられる。

本研究で明らかになった G 遺伝子の除去が狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現に与える影響は、今後実用的な狂犬病ウイルスベクターを開発するうえで非常に有用である。上記のように、G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターでは L 遺伝子の発現量が増大することが一因となって、高い外来遺伝子発現量が実現されている。これは、ゲノムに G 遺伝子をもつ、経シナプストレーサーとして用いられている狂犬病ウイルスベクターにおいても、L 遺伝子の発現量を制御することで、外来遺伝子発現量を高めることができることを示している。これまでに Finke らによって L 遺伝子の前方の遺伝子間配列 (Intergenic Region, IGR) の長さを短くすることで、L 遺伝子の発現量を高めることができることが報告されている (Finke et al., 2000)。従来の狂犬病ウイルスベクターでは、感染細胞の形態を可視化するために、抗体染色法を用いて GFP などのレポータータンパク質のシグナルを増感する必要があったが、L 遺伝子前方の IGR の長さを変えることで、そのような増感法を用いずとも十分なシグナルが得られるようになる可能性がある。また、この手法を利用してより急速に、強く外来遺伝子を発現する  $\Delta$ G-RV を作製することも可能である。しかし、一方で、高すぎる外来遺伝子発現量は、たとえ蛍光タンパク質であっても、細胞の生存に悪影響を及ぼすことが知られている (Liu et al., 1999; Wickersham et al., 2013)。著者らのこれまでの研究では、本研究で用いた rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP に感染した神経細胞の一部が *in vivo* において、感染後 21 日目までに細胞の形態に異常を示すことがわかっている (Ohara et al., 2013a)。より長期にわたる感染細胞の標識が必要となる実験のためには、L 遺伝子前方の IGR を逆に長くすることで、遺伝子発現量が抑えられた  $\Delta$ G-RV を開発することが有効であると期待される。

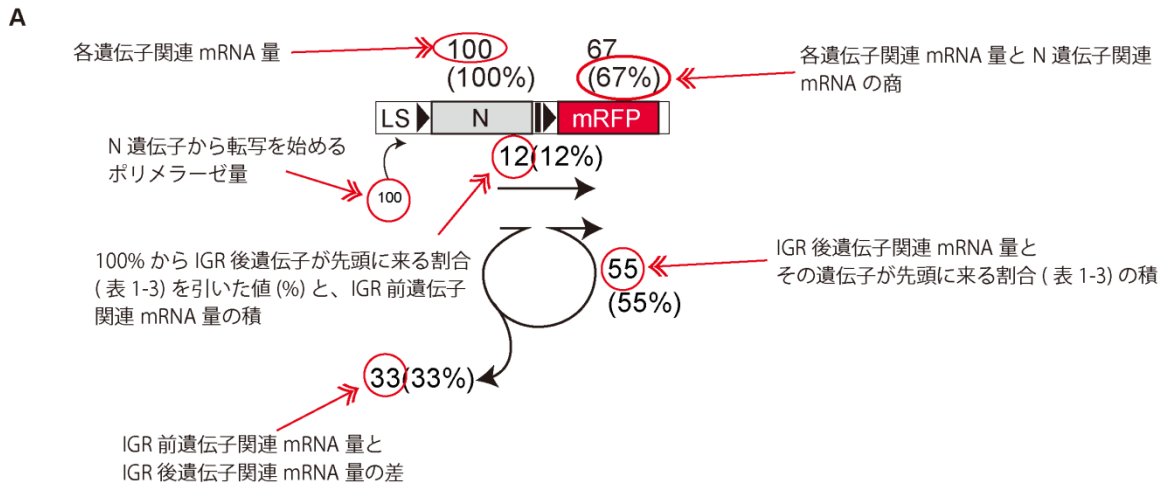
本研究で行われたノザンブロットの結果とリアルタイム PCR の結果から、各ウイルスベクターの感染 1

日後の転写様式（IGR におけるポリメラーゼの 3 種類の振る舞い）を推定し、まとめたものを図 1-10 に示す。リアルタイム PCR 法によって得られた各遺伝子関連 mRNA の量（表 1-4）は、ウイルスポリメラーゼが、それぞれの遺伝子配列の転写を行った回数に比例すると考えられる。表 1-4 で示された、ゲノム上で隣り合う遺伝子の量の比は、図 1-2B で示した、ポリメラーゼが各遺伝子間の IGR で離脱し、転写を終了する割合を示す。ノザンプロット法によって、それぞれの遺伝子特異的な配列を含む転写産物のうち、その遺伝子が転写産物の先頭に位置する転写産物の割合が得られた（表 1-3）。この割合と、表 1-4 で示された量から、図 1-2C で示した、ポリメラーゼが各遺伝子間の IGR で一旦離脱し、再度転写を開始する割合を推計することができる。具体的には、IGR 後方の遺伝子 X について、X 関連 mRNA の量に、X 遺伝子が先頭に位置する転写産物の割合を乗じた値を算出した。この値を IGR 前方の遺伝子 Y 関連 mRNA の量で割ったものを、ポリメラーゼが Y-X 間の IGR で一旦離脱し、再度転写を開始する割合とした。次に、100%から、IGR 後方の遺伝子 X について表 1-3 で示された割合を引いた値を算出した。この値を、図 1-2D で示した IGR を跨いだ転写が起こる割合とした。図 1-10 では、rHEP5.0-mRFP-CVSG の N 関連 mRNA 量を 100 とし、各遺伝子関連 mRNA 量を示した。各転写産物の細胞内での半減期の違いは考慮していない。ウイルスの RNA ポリメラーゼは主に、ゲノムの Leader sequence 側にある N 遺伝子から転写を開始すると考えられている。しかし、本研究で得られた結果から、rHEP5.0-CVSG-mRFP 感染細胞においては、M 関連 mRNA に対して G 関連 mRNA が多くなっていた。また、rHEP5.0-△G-mRFP、rHEP5.0-△G-mRFP-BPB 感染細胞においては mRFP 関連 mRNA と比べて P 関連 mRNA が多くなっていた。このことから、狂犬病ウイルスの RNA ポリメラーゼがゲノムの先頭以外の遺伝子から新規に転写を開始する可能性が示唆された。

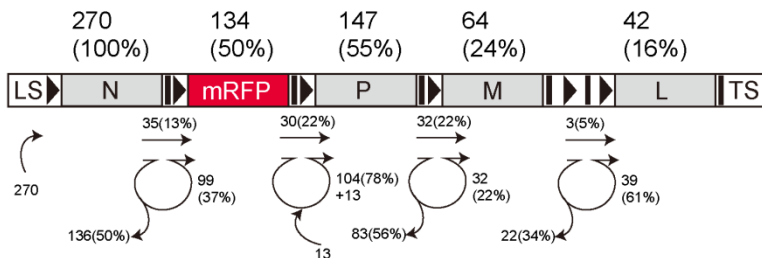
IGR でポリメラーゼが離脱する割合を低下させることは、ゲノムの後方にある G 遺伝子や L 遺伝子まで、ポリメラーゼを到達させ、ポリメラーゼがそれらの遺伝子配列の転写を行う確率を高めることに繋がると考えられる。一方で、IGR においてポリメラーゼが離脱せず、連続して複数の遺伝子の転写が起こった場合、転写産物の先頭にある遺伝子配列以外は翻訳されず、後方の遺伝子がコードするタンパク質の発現には寄与しないと考えられる。これらのことから、狂犬病ウイルス HEP 株においては、IGR でのポリメラーゼの 3 通りの振る舞いを制御することで、各タンパク質の発現量を精密に制御するような機構が存在する可能性が示唆される。ある遺伝子 X の転写産物量は、X の位置までポリメラーゼが離脱せずに転写を継続する割合と、X 前方の IGR でポリメラーゼが一旦離脱し再度転写を開始する割合、の 2 つに大きく影響を受ける。本研究で得られたデータから、N 遺伝子から転写を開始したポリメラーゼが L 遺伝子まで到達し、L 遺伝子を転写する割合は、G 遺伝子をゲノムから除去したベクターで 16%と推定された（L 関連 mRNA 量を N 関連 mRNA 量で割った値）。この割合は G 遺伝子を持つベクターでは 12%、G 遺伝子を置換したベクターでは 10%と推定された。加えて、L 遺伝子の前方の IGR を跨いでポリメラーゼが転写を継続する（IGR の後方の遺伝子は翻訳されないと考えられる）割合は、G 遺伝子をゲノムから除去したベクターでは 5%、G 遺伝子をもつベクターでは 22%と推定された（図 1-10B、C）。これら 2 つの要因が G 遺伝子を除去した狂犬病ウイルスベクターに感染した細胞で、L-mRNA 量が増大していた理由として考えられる。また、G 遺伝子を蛍光タンパク質遺伝子に置換した場合も L 遺伝子の前方の IGR を通してポリメラーゼが転写を継続する割合が 6%と推定された（図 1-10D）ことから、G タンパク質、もしくは G 遺伝子の遺伝子配列が G-L 間の IGR におけるポリメラーゼの離脱を抑制し、L-mRNA の量を低く抑える働

きをもつ可能性が示唆された。この可能性を検証するためには、今後より詳細に転写様式を調べる必要がある。

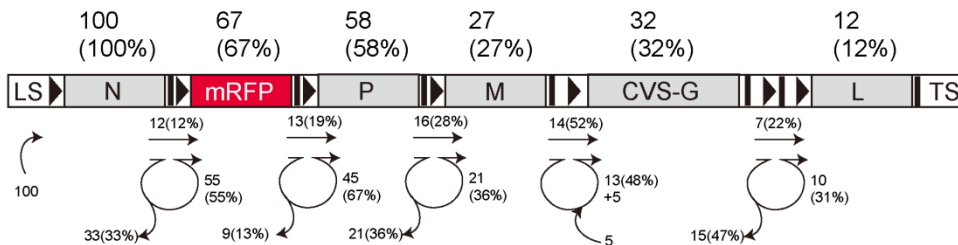
本研究で明らかになった G 遺伝子の除去、もしくは置換が狂犬病ウイルスベクターの遺伝子発現に与える影響に関する知見は、今後研究者が個々の実験に適した外来遺伝子の発現量を示す狂犬病ウイルスベクターを開発する上で非常に重要な情報であり、狂犬病ウイルスベクターを用いた神経科学研究の発展に寄与するものと期待される。



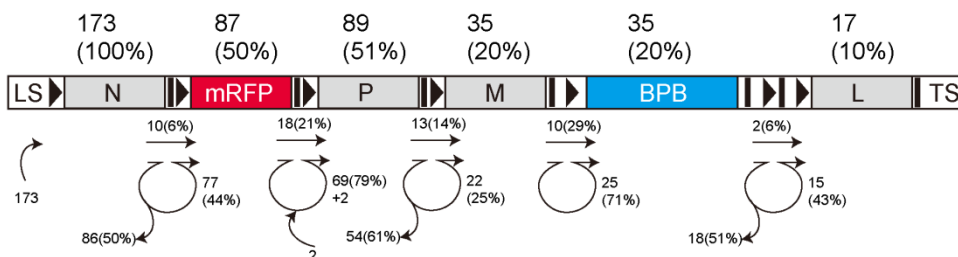
**B rHEP 5.0 $\Delta$ G-mRFP**



**C rHEP 5.0-CVSG-mRFP**



**D rHEP 5.0 $\Delta$ G-mRFP-BPB**



**図 1-10 3種の狂犬病ウイルスベクターの転写様式概念図**

IGRにおけるポリメラーゼの振る舞いの割合を推計した。ゲノムの上部には mRNA の量とその比、ゲノムの下部にはポリメラーゼの振る舞いとポリメラーゼの量、及び、その比を示した。転写を行うポリメラーゼの数と mRNA の量は比例すると仮定した。A：図に示した各数字の算出方法を示した。

B-D：本研究で用いた3種の狂犬病ウイルスベクターの転写様式



## 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

### 2-1. 背景と目的

本研究では、神経細胞のネットワークの構造と、その機能を調べるために有効であると期待される様々な遺伝子改変 $\Delta$ G-RV を作製した。本章ではそれら遺伝子改変 $\Delta$ G-RV の神経科学への応用可能性について述べる。また、これらの $\Delta$ G-RV を逆行性トレーサーとして用いるためには、高頻度逆行性標識能を示す狂犬病ウイルス CVS 株の G タンパク質 (CVS-G) をそのエンベロープに持たせることが有益である。そこで、CVS-G を有する $\Delta$ G-RV を、高い力価で回収する方法の確立を行った。

狂犬病ウイルスの G タンパク質をエンベロープに持つ $\Delta$ G-RV は、神経細胞の軸索末端から選択的に感染し、細胞体へと運ばれ自らの遺伝子を発現することから、特定の脳領域に投射する神経細胞群を標識するための逆行性トレーサーとして用いることができる。本研究で用いる $\Delta$ G-RV は、HEP 株をベースに作製されている。HEP 株は遺伝子発現量が高いという特性があり、ベクターとして非常に有用である。しかし、HEP 株の特性として、狂犬病ウイルスの軸索末端からの感染効率が低いという問題もあった。 $\Delta$ G-RV はエンベロープタンパク質をコードする遺伝子をゲノムに持たないため、実験者が任意のエンベロープタンパク質をウイルス粒子に付与することができる。ところで、狂犬病ウイルスの感染特性はエンベロープに存在する G タンパク質によって決定されている。本研究では、神経回路トレーシングに利用される非常に高効率な逆行性感染を示す狂犬病ウイルス CVS 株の G タンパク質を、 $\Delta$ G-RV のエンベロープにあてがうことで、高頻度逆行性標識能を $\Delta$ G-RV に賦与する方法の確立を目指した。とりわけ、CVS 株の G タンパク質をエンベロープに持つ $\Delta$ G-RV を高い力価で回収することが重要である。言うまでもなく、特定の脳領域に投射する神経細胞群に特異的に $\Delta$ G-RV を感染させるためには、標的とする脳領域に局限して $\Delta$ G-RV のウイルス液を注入する必要がある。この時、注入するウイルス液の量が多ければ、注入されたウイルス液は空間的に局限されることなく周囲にまで広がってしまう。つまり、少なく抑えられた注入量で、十分な数の神経細胞を標識するためには、高力価のウイルス液を用いることが必要である。

$\Delta$ G-RV を使って蛍光タンパク質を神経細胞に導入することによって、神経細胞が形成しているネットワークの構造、神経細胞同士の結合関係や、神経細胞の形態などを調べることができる。 $\Delta$ G-RV は高い外来遺伝子発現能を示すので、神経細胞の細胞体だけでなく軸索や樹状突起、さらにはスパインのような細かな構造を調べるためのツールとしても効果を発揮する (Wickersham et al., 2007a; Wickersham et al., 2013)。 $\Delta$ G-RV の最大の特長として、特異的なレセプターを発現している細胞へ選択的に初期感染させることが可能であり、さらに G 遺伝子を外部から導入することで、 $\Delta$ G-RV が初期感染細胞から単シナプス性の経シナプス伝播をすることが挙げられる。この標的神経細胞特異的なレセプター遺伝子の導入のためには、トランスジェニック法や、AAV ベクター法などの様々な方法が用いられている (Wall et al., 2010; Wall et al., 2013)。多くの場合、レセプターを発現している神経細胞は GFP などの蛍光タンパク質をマーカーとして標識されている。その際、 $\Delta$ G-RV に感染した細胞を標本内で見分けるためには、異なるマーカーで標識する必要がある。この他にも、蛍光タンパク質は、現代の生命科学研究の様々な場面で幅広く用いられている。例えば、標的となる遺伝子発現特性を示す細胞群、例えば癌細胞などを標識するためや (Hasegawa et al., 2009)、細胞内でのタンパク質分布を可視化するために標的タンパク質と融合させて発

現させるなどである (Colicos et al., 2001)。それらの蛍光と区別するために、様々な色の蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製することは、 $\Delta$ G-RV をより広い実験目的に用いるために有益だと考えられた。そこで、著者らは、青、緑、赤色蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製した。また、これらの  $\Delta$ G-RV を組み合わせて使用することで、異なる領域に投射を送る神経細胞群を 1 つの標本内でそれぞれ標識することも可能となる。この神経回路の多重標識法の利点として、複数の異なる脳領域に投射を送る神経細胞の分布や形態の違いを比較できることと、複数の脳領域に投射を送る神経細胞を可視化することができる点がある (Ohara et al., 2009a; Ohara et al., 2009b)。

次に、神経活動の光学的計測のために、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV の作製を行った。脳の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。計測した神経細胞が他の神経細胞とどのような結合関係を持つのかを同定し、同時に神経活動を計測することができる手法は、神経ネットワーク上での情報処理機構を理解するために効果的であると期待される。近年、活動電位の発生を可視化することのできるタンパク質として膜電位感受性蛍光プローブと  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光プローブの開発が進められている (Cao et al., 2013; St-Pierre et al., 2013; Inoue et al., 2015)。膜電位感受性プローブは、膜電位に応じてその蛍光強度や蛍光波長を変化させる蛍光タンパク質である。電位変化そのものを蛍光の変化に変換できるため、計測できるシグナルと実際の活動に強い相関がある一方で、一般にそのシグナル強度が低く脳組織中の神経細胞からのシグナル取得が容易ではない (Peterka et al., 2011)。 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に応じてその蛍光強度や蛍光色を変化させる。活動電位の発生に伴って起こる  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を計測するため、活動電位そのものを見ているわけではないという問題があるが、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光プローブのシグナルは膜電位感受性プローブのシグナルより強い。そのため、*in vivo* での神経活動計測を行う際に効果を発揮する (Mittmann et al., 2011; Scott et al., 2013; Chen et al., 2013; Dana et al., 2014)。この 2 種類のプローブを実験目的に応じて使い分けることで、効果的に神経活動計測を行うことができると考えられる。本研究では、神経細胞の活動電位に伴って起こる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の計測のために、近年開発が進められている様々な  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製し、その応用性を検討した。

さらに、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV のゲノムに、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質とは異なる蛍光マーカータンパク質遺伝子を組み入れたベクターを構築した。ここで、異なる 2 色の蛍光を発するマーカータンパク質のそれぞれを組み込んだ 2 つの  $\Delta$ G-RV を作製することによって、神経回路の 2 重標識と神経活動の計測を同時に行う手法を開発した。2 つの  $\Delta$ G-RV のうちの 1 つは、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性緑色蛍光タンパク質である GCaMP6m と青色蛍光タンパク質 TagBFP を発現する。もう 1 つは、GCaMP6m と赤色蛍光タンパク質 mRFP を発現するものである。この 2 つの  $\Delta$ G-RV を脳の異なる領域にそれぞれ微量注入することで、それらの脳領域に投射する神経細胞群に、青または赤色蛍光タンパク質を導入することができる。これにより、2 つの異なる投射先をもつ 2 群の神経細胞が標識される。同時にこれらの神経細胞は GCaMP6m を発現しているため、その神経活動を緑色の蛍光を利用して、同時に計測、比較することが可能になる。

本章で述べる蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV の一部は、東北大学大学院生命科学研究科、脳情報処

理研究室に在籍した、山脇琢磨氏、吉松祥氏によって作製されたものである。なお、結果の一部は山脇氏の修士論文で発表された。

## 2-2. 材料と方法

ウイルス、及び遺伝子組換え生物を取り扱う全ての実験は「国立大学法人東北大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に従い、P2A 実験室内にて行った。実験動物は、特に断りの無い限り、150 g~230 g の Wistar 系ラットオスを用いた。実験に用いた全てのラットの取り扱いは「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に従った。

### <プラスミドの作製>

全ての制限酵素は New England BioLabs 社のものを使用した。また、PCR のための DNA ポリメラーゼには Pyrobest DNA polymerase (Takara)、と PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara) を使用した。

外来遺伝子が狂犬病ウイルスの N 遺伝子と P 遺伝子の間に挿入された 5'△G 系統の△G-RV の作製は、第 1 章で述べた rHEP5.0-△G-mRFP をもとに作製された。挿入する外来遺伝子配列を PCR によって増幅し、5'末端に Not I 認識配列、3'末端に Sac II 認識配列を付与した PCR フラグメントを作製した。Not I と Sac II を用いて、rHEP5.0-△G-mRFP の mRFP を外来遺伝子と置換することで作製した。

外来遺伝子が狂犬病ウイルスの M 遺伝子と L 遺伝子の間に挿入された 3'△G 系統の△G-RV の作製は、rHEP3.0-△G をもとに作製された (Inoue., 2006)。rHEP3.0-△G は、M 遺伝子と L 遺伝子の間に BsiW I 認識配列および Nhe I 認識配列を持つ。挿入する外来遺伝子配列を PCR によって増幅した後、5'末端に BsiW I 認識配列、3'末端に Nhe I 認識配列を付与した PCR フラグメントを作製し、BsiW I と Nhe I を用いて、rHEP3.0-△G に挿入した。M 遺伝子と L 遺伝子の間に 2 つの外来遺伝子をもつ△G-RV を作製するために、以下の配列を BsiW I と Nhe I で rHEP3.0-△G に挿入した。

CGTACG (1) ATTTCCCTGCAGG (2) CATGAAAAAACTAACACCCTCCTGCGGCCGC (3) TTTTCCGCGG

(4) ATAAGCTAGC (5) (BsiW I (1)、Sbf I (2)、Not I (3)、Sac II (4) 認識部位を下線で示した。転写終了シグナル AAAAAAA、転写開始シグナル AACA は太字で示した。)

挿入する遺伝子配列を PCR で増幅し、この配列に BsiW I と Sbf I を用いて GCaMP6m の遺伝子配列を、Not I と Sac II を用いて TagBFP、もしくは mRFP の遺伝子配列を挿入した。

### 2-2-1. 高頻度逆行性標識を可能にする G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター回収法の開発

#### <狂犬病ウイルスの構成タンパク質を恒常的に発現する NA 細胞株の樹立>

HEP 株の G タンパク質を恒常的に発現する NA-HEPG 細胞株を樹立するため、pcDNA3.1-zeo (+)-HEPG プラスミドを NA 細胞に TransIT LT-1 を用いてトランスフェクションした後、ゼオシン (6 µl/ml、Invitrogen) による選択を行った。その後 96 ウェルプラスチックプレート (TPP) に 1 細胞/1 ウェルの濃度で播種した。1 細胞/1 ウェルであることが確認されたウェルの細胞を継代培養し、細胞の増殖能力と△G-RV の産生能力が高いクローンを選別することで細胞株を樹立した。樹立された細胞株はゼオシン (3µl/ml) を添加した熱非働化 10%FBS 含有の MEM 中にて、5% CO<sub>2</sub> の存在下、37 °C で継代培養した。同様の手順で、pcDNA3.1-zeo (+)-CVS-G プラスミドのトランスフェクションを行い、CVS 株の G タンパク質を恒常的に発現する NA-CVSG 細胞株を作製した。HEP 株の N タンパク質と P タンパク質、G タンパク質を恒常的に発現する NA-NPHEPG 細胞株を樹立した。このために、HEP 株の N タンパク質と P タ

ンパク質、G タンパク質を 2A 配列で繋いだ遺伝子を構築した。これを組み込むことで pcDNA3.1-zeo (+) -N-P2A-P-T2A-HEPG を作製し、用いた。さらに、HEP 株の N タンパク質と P タンパク質、そして CVS 株の G タンパク質を恒常的に発現する NA-NPCVSG 細胞株を樹立した。このためには、HEP 株の N タンパク質と P タンパク質、CVS 株の G タンパク質を 2A 配列で繋いだ遺伝子を構築し、これを組み込んだ pcDNA3.1-zeo (+) -N-P2A-P-T2A-CVSG を作製した。

#### <細胞株のウイルス産生能比較>

NA-HEPG、NA-CVSGG、NA-NPHEPG、NA-NPCVSG を 12 ウェルプラスチックプレート (TPP) に 70~80% コンフルエントとなるように播種した。24h 後、rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP を m.o.i 10 で感染させた。24h 後培地を全量抜き取り、各ウェルに新しい培地を 1ml ずつ加えた。感染後 2 日目から毎日培地を全量交換し、その都度、回収された培地に含まれるウイルスの力価を測定した。力価の測定はそれぞれの条件で 8 回行った。

#### <ウイルスの回収>

ウイルスの回収は第 1 章と同様の方法で行った。

#### <ウイルスの力価測定>

第 1 章と同様の方法で行った。

#### <ウイルス液のラット脳への微量注入>

ラットは一般的な麻酔法に従い、キシラジン (Selactar, 4.8mg/kg, Byer) と塩酸ケタミン (Veterinary Ketalar 50, Sankyo) の腹腔内投与により麻酔し、脳定位固定装置に固定した。手術中はラット体温の維持に努めた。追加麻酔には塩酸ケタミン (Veterinary Ketalar 50, Sankyo) を筋肉内投与した。ラットの頭蓋骨を広く露出し、ラットの脳アトラス (Paxinos and Watson, 2004) の脳座標に従って、打ち込み部位上方の頭蓋骨にドリルで小さな穴を開けた。冷凍保存されたウイルスのストックを使用直前に解凍し、ガラスピペット付き 1 $\mu$ l ハミルトンシリンジを用いて 500~1000nl 注入した。ウイルスは 1 分あたり 200nl を圧注入し、注入後 5 分間静置してから静かにピペットを引き上げた。その際、正確に打ち込み中心を同定するため、ウイルス液と一緒に 0.1% pontamine sky blue を注入して標識とした。傷口を縫合したのち、麻酔状態から回復を確認してからラットを飼育ケージに戻した。生存期間中、感染ラットは小さな安全キャビネット内で飼育した。

## 2-2-2. 蛍光タンパク質を発現する G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの作製

#### <NA 細胞におけるウイルスの外来遺伝子発現の確認>

NA 細胞を 24 ウェルプラスチックプレート (TPP) 上に置かれたカバーガラス (No1 thickness, MATSUNAMI) 上に 10~20% コンフルエントとなるよう播種し、10% FBS を含む最小必須培地を用いて 34°C で 1 日培養した。蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を m.o.i 2 で NA 細胞に感染させた後、34°C で 3 日培養した。TagBFP の蛍光として、LED から 405nm の波長の光を照射し、バンドパスフィルター BP

420-480 (Zeiss) を通過したものを取得した。同様に、AcGFP1、mNeonGreen の蛍光として、アルゴンレーザーより 488 nm のレーザー光を照射し、バンドパスフィルターBP505-530 (Zeiss) を通過したものを取得した。tdTomato の蛍光としてヘリウム-ネオンレーザーより 543nm のレーザー光を照射し、ロングパスフィルターLP560 (Zeiss) を通過したものを取得した。全ての蛍光タンパク質の蛍光は、カールツァイスセミオート顕微鏡 (AxioVert 200M、 Zeiss)、対物レンズ 20 倍と、カールツァイスコンフォーカルスキャニングモジュール (LSM 5 PASCAL Ver. 3.0、 Zeiss)、を使用して撮像した。

### 2-2-3. Ca<sup>2+</sup>蛍光タンパク質を発現する G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの作製

#### <NA 細胞におけるウイルスの外来遺伝子発現の確認>

細胞の取り扱いとウイルスの感染については、2-2-2.と同様の方法で行った。B-GECO の蛍光として、LED から 405nm の波長の光を照射しバンドパスフィルター BP 420-480 (Zeiss) を通過したものを取得した。同様に G-GECO の蛍光として、アルゴンレーザーより 488 nm のレーザー光を照射し、バンドパスフィルター BP505-530 (Zeiss) を通過したものを取得した。R-GECO の蛍光としてヘリウム-ネオンレーザーより 543nm のレーザー光を照射し、ロングパスフィルターLP560 (Zeiss) を通過したものを取得した。

#### <初代培養神経細胞>

初代培養神経細胞は、胎生 17-19 日胚の Sprague Dawley ラット脳より摘出した大脳皮質を、パパイン酵素により分散させた後、熱非働化ウマ血清 (Gibco) を最終濃度 10%となるように添加した培地 (D-MEM) に懸濁し、カバーガラス (No1/No.2 thickness, MATSUNAMI) が底面となるよう加工した 35 mm 培養皿 (Falcon) に播いた。カバーガラスは 0.2%ポリエチレンイミン溶液 (Sigma, 1500 mM ホウ酸緩衝液、pH 8.4) により 4 時間コーティングしたものをを用いた。撒種から 4 時間半後に培地をグリア条件培地に全量置換した。グリア条件培地は、胎生 17-19 日胚の Sprague Dawley ラット大脳皮質をパパイン酵素により分散させた後、ウシ胎児血清を最終濃度 10%となるように添加した培地 (D-MEM) に懸濁し、プラスチック培養フラスコ (TPP) で培養した。一定期間培養した後に神経細胞用の培地を加え、24 時間後に回収した。神経細胞は、4 日に一度培養液を半量交換し、5%CO<sub>2</sub> 存在下、37 °Cで培養した。神経細胞へウイルスを感染させるためには、培養皿あたり、5~20ul のウイルス濃縮液を培養液に加えた。濃縮液の添加は培養液の交換 24h 前に行い、24h 後の培養液交換は全量交換とした。

#### <初代神経培養細胞の活動の光学的測定>

パッチクランプ法による計測は、細胞外液をハンクス平衡緩衝塩溶液 (HBSS) (Gibco) とし、室温で行った。パッチ電極に充填する細胞内液の組成は、140mM K-gluconate、5mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、2mM Mg-ATP、5mM HEPES、pH 7.2 である。電極には、外径 1.5mm、内径 0.86 mm のガラス管 (GC150F-10, Harvard Apparatus) を使用した。これを微小電極作製装置 (P-97 Sutterinstruments) で引き、微小ピペットにした。この微小ピペットに内液を充填し、電気抵抗が 4~10 M Ω の抵抗となったものを使用した。ホールセル状態での電流固定実験においては、パッチクランプ用ソフトウェア (Clampex 9.0, Axon Instruments) を用いて、細胞への刺激をコントロールし、インターフェース (DIGIDATA1322A, AxonInstruments) を介し、パッチクランプ用アンプ (AXOPATCH 200B, Axon Instruments) を制御した。光学的測定には、カー

ルツァイスセミオート顕微鏡 (AxioVert 200M)、対物レンズ 20 倍と、カールツァイスコンフォーカルスキャニングモジュール (LSM 5 PASCAL Ver. 3.0)、を使用した。G-GECO の蛍光を計測するために、アルゴンレーザーより 488 nm のレーザー光を照射し、バンドパスフィルター BP505-530 (Zeiss) を通過したものを G-GECO の蛍光とした。測定の際はパッチクランプソフトウェアのインターフェース (DIGIDATA1322A, Axon Instruments) から電流固定の開始シグナルを送り、コンフォーカルスキャニングモジュールで開始時間を記録した。

#### 2-2-4. 2重標識法と $\text{Ca}^{2+}$ イメージングによる神経回路の構造と機能の同時観察法の開発

<脳スライス切片からの光計測>

rHEP-3.0  $\Delta$ G-GCaMP6m-BFP を扁桃体に、rHEP-3.0  $\Delta$ G-GCaMP6m-mRFP を側坐核に注入し、8 日経過したラットを実験に使用した。ジエチルエーテルで吸入麻酔後、直ちに断頭した。正中線に沿って頭皮を切開し、続いて頭蓋骨を除去した。脳が露出したら、冷却しておいた人工脳脊髄液 (124mM NaCl, 5mM KCl, 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 22mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.25mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2mM  $\text{MgSO}_4$ , 10mM グルコース, 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  でバブリング; pH 7.4) に静かに落とし、約 5 分間冷却した。この操作により組織の代謝を低下させ、切片作製中の組織の活性低下を抑制した。低温人工脳脊髄液より取り出した大腦を片刃剃刀で正中線に沿って半切、小脳と大腦吻側部位を除去し、マイクロスライサー (D.S.K LINEARSLICER PRO7) を用いて、水平断面で切断して、脳スライス切片を作製した。スライス標本は低温人工脳脊髄液中で作製し、400 $\mu\text{m}$  の厚さで連続的に切り出した。スライス作製後各スライス標本は 28 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$  に温めた人工脳脊髄液に移し、神経活動計測前、1 時間以上のインキュベーションにより神経活性を回復させた後、神経活動計測を開始した。

BFP と mRFP による 2 重標識標本の撮像は、カールツァイスセミオート顕微鏡 (AxioVert 200M) と、カールツァイスコンフォーカルスキャニングモジュール (LSM 5 PASCAL Ver. 3.0) を用いて行った。LED から 405nm の波長の光を照射しバンドパスフィルター BP 420-480 (Zeiss) を通過したものを BFP の蛍光とした。同様に、ヘリウム-ネオンレーザーより 543nm のレーザー光を照射し、ロングパスフィルター LP560 (Zeiss) を通過したものを mRFP の蛍光とした。

神経活動の光学的計測には、オリンパス製実体顕微鏡 (MVX10, オリンパス) を用いた。光学倍率は 2~6 倍であり、計測領域は必要に応じて実験の都度変更した。水銀光源からの光を 470nm ( $\pm 10\text{nm}$ ) の帯域通過フィルターを通して励起光とし、これをダイクロイックミラー (490nm で 50%透過) で反射させて、標本に照射した。また標本からの蛍光はダイクロイックミラー、520nm ( $\pm 20\text{nm}$ ) の帯域通過フィルターを透過させ、ImagEM (HAMAMATSU) で受光した。

得られたデータは AQUACOSMOS (HAMAMATSU) を用いて解析された。具体的には、刺激の前後で各 GCaMP6m 発現細胞の蛍光強度を比較し、その蛍光強度の差 ( $\Delta F$ ) を刺激前の蛍光強度  $F$  で割ったもの ( $\Delta F/F$ ) を計算した。実験ごとに閾値を設定し、 $\Delta F/F$  がその閾値よりも高い点を反応が見られた点として表示した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 高頻度逆行性標識を可能にする G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクター回収法の開発

△G-RV はエンベロープタンパク質である G 遺伝子を欠損しているため、G タンパク質をエンベロープに持つ感染可能なウイルス粒子を回収するためには、G タンパク質を発現している細胞中において△G-RV の複製を行わせる必要がある。そのため、効率的に高濃度の△G-RV を回収するためには G 遺伝子を恒常的に発現する細胞株を利用することが望ましい。そこで、我々はまず、HEP 株の G タンパク質 (HEPG) を恒常的に発現する細胞株を樹立することを目指した。これまでに、狂犬病ウイルス SAD 株の G タンパク質を恒常的に発現する BHK 細胞を用いる方法が Wickersham らによって報告されている (Wickersham et al., 2010)。しかし、狂犬病ウイルスは、RNA ウイルスであるため、ゲノムの遺伝子変異が生じやすい。例えば脳内で継代した脳適応型狂犬病ウイルス株 CVS-23 株は、BHK 細胞で数回継代を行うのみで構成タンパク質のアミノ酸配列が変わり、脳内における感染様式が若干変化することがわかっている (Morimoto et al., 1999)。一方、より神経細胞に近い神経芽細胞腫由来の株化培養細胞である NA 細胞の場合は、継代しても、この現象が生じないことが報告されている。そこで組換えウイルスの回収中の性状変化を防ぐため、NA 細胞を元にして HEPG を恒常的に発現する細胞株を樹立した (NA-HEPG)。この細胞株を用いることで安定して△G-RV を産生させ、回収することが可能になった。しかし、HEPG は 333 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミン酸に変異している。また、狂犬病ウイルスの他の株において、この 333 番目アルギニンがグルタミン酸等に置き換わった場合には、感染・感染伝播能力が低下することが知られている (Dietzschold et al., 1983; Tuffereau et al., 1989)。このような理由から、HEPG を付与した△G-RV をラット脳に微小注入し、多くの細胞を逆行性に標識することは難しかった。

そこで、本研究では、経細胞の軸索末端からの感染特異性が高いことが知られている狂犬病ウイルス、CVS 株に着目し、その G タンパク質 (CVSG) を恒常的に発現する NA 細胞株を樹立することを目指した。しかし、樹立された細胞株 (NA-CVSG) を用いて△G-RV の回収を行ったところ、回収できたウイルス量が著しく低下していた。そこで、CVSG を持った△G-RV を高い効率で回収するために、狂犬病ウイルス HEP 株の N、P タンパク質を HEPG、もしくは CVSG と同時に発現する細胞株を樹立した (NA-NPHEPG、NA-NPCVSG)。狂犬病ウイルスの RNA 合成に関わる N、P タンパク質を細胞にあらかじめ導入しておくことで、ウイルスの遺伝子発現および、複製が促進されることが期待された。樹立した 4 種の細胞株を用いて rHEP5.0-△G-mRFP を回収したところ、図 2-1 のような結果が得られた。CVSG と同時に N、P を発現する細胞株で回収をおこなうことで、CVSG のみを発現する細胞株を用いて回収した場合と比較し、より効率的に高濃度の△G-RV を回収できることが確かめられた。

次に、CVSG をエンベロープにもつ△G-RV と HEPG をエンベロープにもつ△G-RV のラット脳内での逆行性標識能を比較した。青色蛍光タンパク質を発現する△G-RV (rHEP3.0-△G-GCaMP6m-BFP) を回収するためには NA-NPHEPG、赤色蛍光タンパク質を発現する△G-RV (rHEP3.0-△G-GCaMP6m-mRFP) を回収するためには NA-NPCVSG を用いた。これらの△G-RV を *in vitro* で NA 細胞に感染させ、その力価を決定した。その力価が一定 ( $1 \times 10^8$  FFU/ml) になるように調製後、300nl ずつ混和したもの、計 600nl を、ラット背側海馬 CA1 領域に注入した。その結果 CA1 に投射することが知られている外側嗅内皮質で CVSG をエンベロープにもつ rHEP3.0-△G-GCaMP6m-mRFP による逆行性標識が確認されたが、HEPG をエンベロープにもつ rHEP3.0-△G-GCaMP6m-BFP の逆行性標識は確認されなかった (図 2-2)。



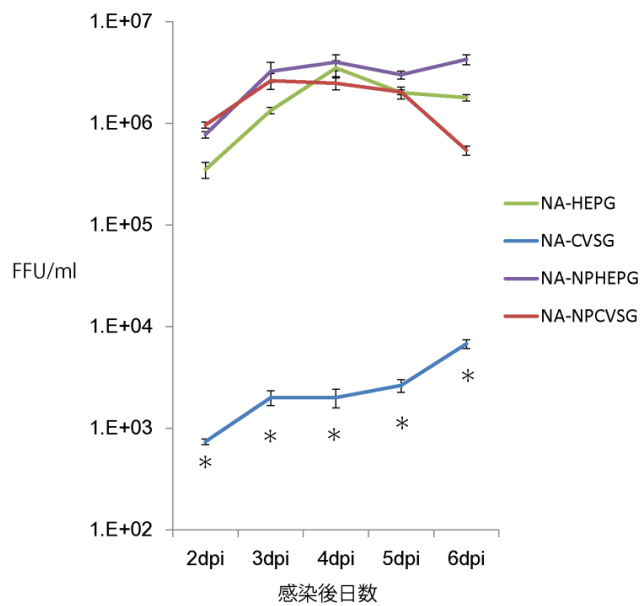


図 2-1 細胞株のウイルス産生能比較

4 種の NA 細胞株を用いて rHEP5.0- $\Delta$ G-mRFP の回収を行い、回収された培地に含まれるウイルスの力価を比較した。

NA-HEPG、NA-NPHEPG、NA-NPCVSG を用いた場合、NA-CVSG を用いた場合に比べ、有意に高い力価を示した。(\*  $p < 0.01$ )。2dpi では NA-HEPG を用いた場合、NA-NPHEPG、NA-NPCVSG と比較して低い力価を示した。6dpi での力価を比較すると、NA-NPCVSG < NA-HEPG < NANPHEPG (それぞれ  $p < 0.01$ )であった。Kruskal-Wallis rank sum test; Mann-Whitney U test, Holm-corrected.

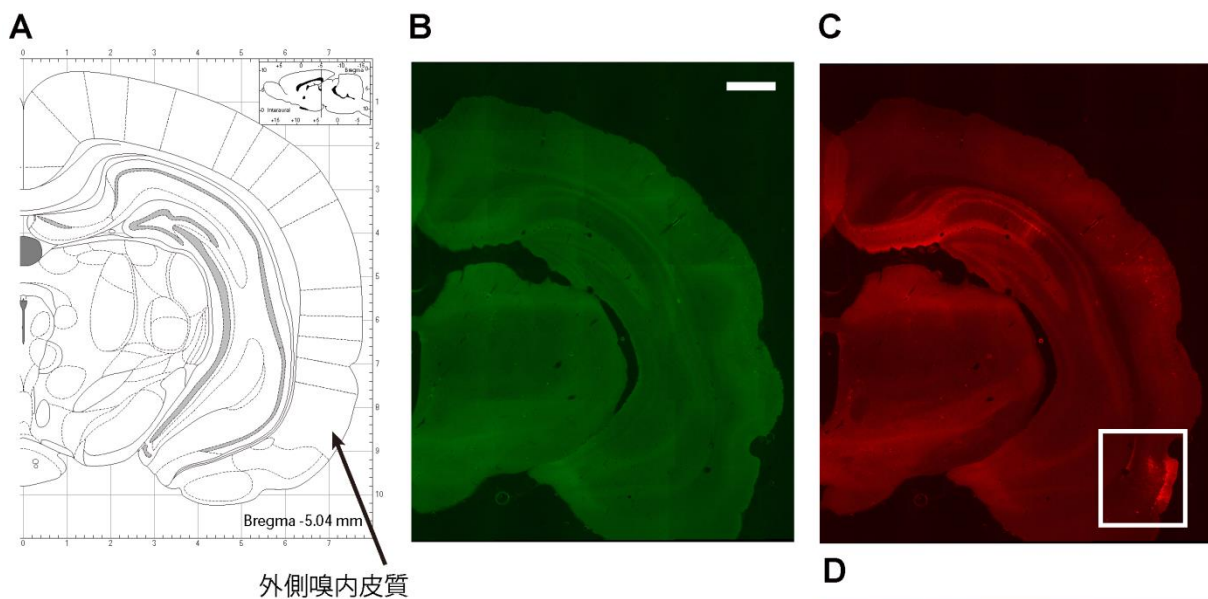


図 2-2 海馬 CA1 からの逆行性標識

A : 外側嗅内皮質の位置を示す。(The Rat Brain, Paxinos and Watson より改変)

B : HEPG でエンベロープされた  $\Delta$ G-RV が発現する BFP の蛍光を緑色で表示したが、標識細胞は確認されなかった。

C : CVSG でエンベロープされた  $\Delta$ G-RV が発現する mRFP の蛍光を赤色で示す。海馬 CA1 に注射する外側嗅内皮質で感染細胞が確認された。D : C の白枠内の領域を拡大した。

スケールバー=1mm

### 2-3-2. 蛍光タンパク質を発現する G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの作製

これまでに述べてきたように、 $\Delta$ G-RV の EnvA による偽型化と、EnvA 特異的なレセプターである TVA の標的細胞での発現を組み合わせることで、逆行性標識能だけでなく、さらに選択性の高い初期感染のコントロールが可能になる (Wickersham et al., 2007b)。この場合、 $\Delta$ G-RV は、TVA を発現させるためのトランスジェニック技術や、AAV など他のウイルスベクターと組み合わせて使用することになる。そのような実験では、TVA 発現細胞のマーカータンパク質と  $\Delta$ G-RV 感染細胞のマーカータンパク質は、異なるものを使用する必要がある。そこで本研究では、一般に広く用いられている緑色蛍光タンパク質だけではなく、青色や、赤色の蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製した。これにより、GFP などの蛍光タンパク質が発現しているトランスジェニック動物を用いた実験でも、 $\Delta$ G-RV 感染細胞が識別可能になる。

本研究で作製した各種の蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV について、そのゲノムの構成を図 2-3 に示す。第 1 章で述べたように、狂犬病ウイルスではゲノムの前方にある遺伝子ほど強く発現することが知られている。そこで本研究では蛍光タンパク質をコードする遺伝子の位置を N 遺伝子と P 遺伝子の間においた  $\Delta$ G-RV (5.0  $\Delta$ G 系統) を作製した。

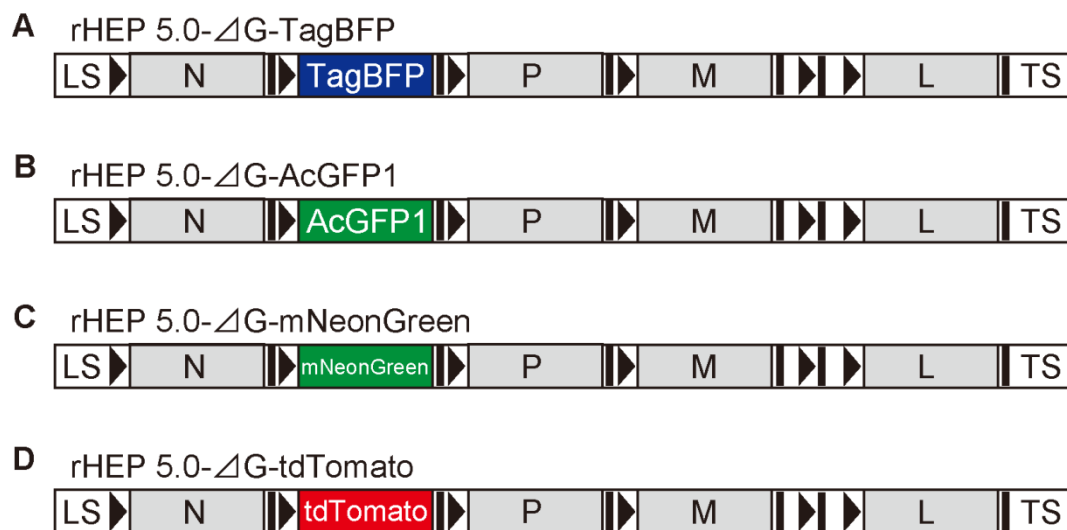


図 2-3 各種の蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV のゲノムの模式図

- A: 青色蛍光タンパク質 TagBFP を発現する  $\Delta$ G-RV。
- B: 緑色蛍光タンパク質 AcGFP1 を発現する  $\Delta$ G-RV。
- C: 最も輝度の高い緑色蛍光タンパク質である mNeonGreen を発現する  $\Delta$ G-RV。
- D: 最も輝度の高い赤色蛍光タンパク質である tdTomato を発現する  $\Delta$ G-RV。

次に、図 2-4 に、これらの  $\Delta$ G-RV に感染した NA 細胞の画像を示す。感染後 3 日においていずれの  $\Delta$ G-RV に感染した NA 細胞も、ゲノムに挿入された蛍光タンパク質遺伝子を発現していることが確認された。

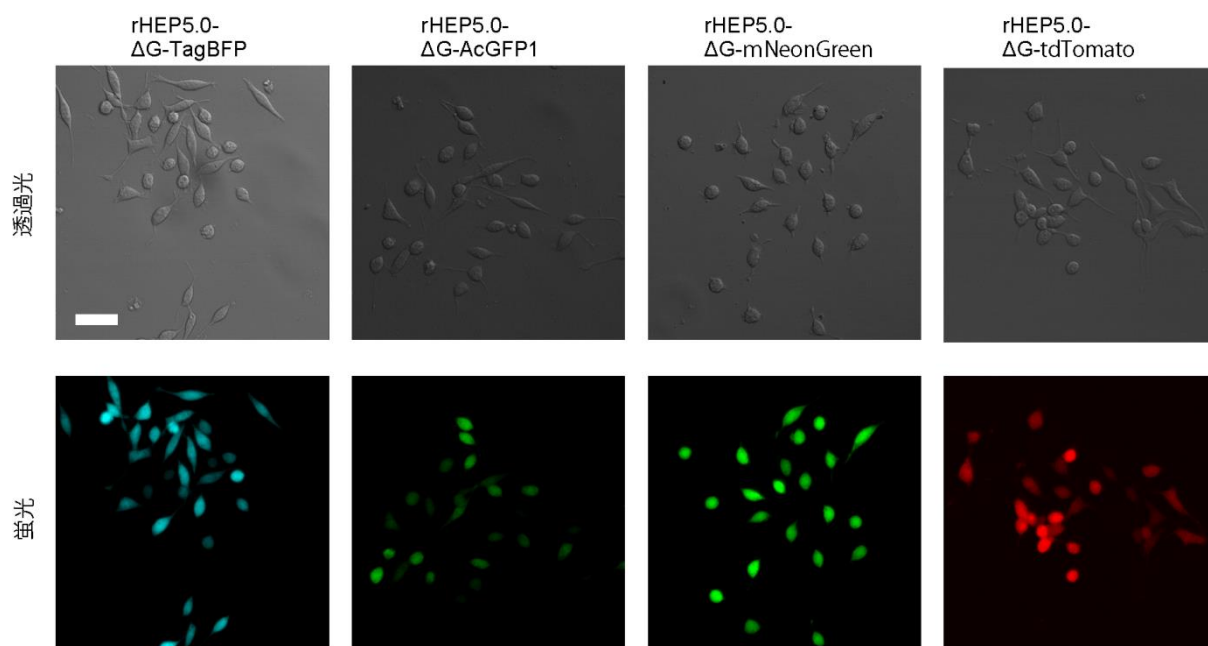


図 2-4 NA 細胞における  $\Delta$ G-RV の蛍光タンパク質の発現

いずれの  $\Delta$ G-RV も感染細胞内で蛍光タンパク質を発現することが確認された。

スケールバー=50  $\mu$ m

### 2-3-3. $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターの作製

神経活動を光学的に計測する手法のなかで、もっとも成功を収めているもののひとつが  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングである。特に近年、様々な  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質の開発が盛んに行なわれている (Akerboom et al., 2013)。その中でも、本研究では、GCaMP と呼ばれるタンパク質の構造を基にした変異体タンパク質を用いた。GCaMP は GFP とカルモジュリン、M13 ペプチドからなるおよそ 400 アミノ酸残基のタンパク質である (Nakai et al., 2001)。GCaMP を元に開発された GCaMP2 の立体構造が、Akerboom らによって報告されている (図 2-5) (Akerboom et al., 2009)。カルモジュリンは  $\text{Ca}^{2+}$ と結合するとその立体構造が変化する。そのため、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に応じて GCaMP2 の GFP 部分の立体構造が変化し、蛍光強度が変化する。この立体構造は、本研究で用いた GCaMP 型  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質でも同様であると考えられている。

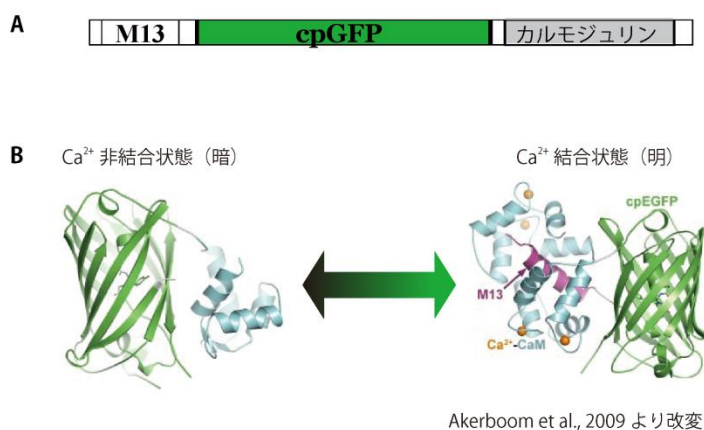


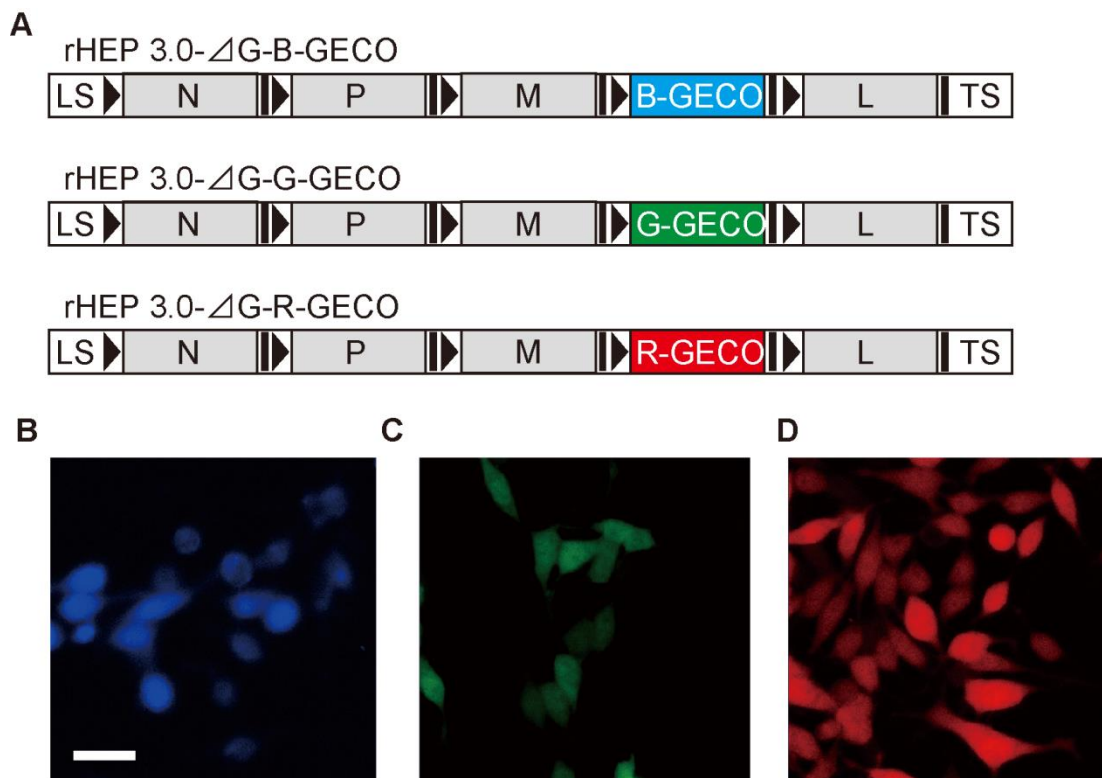
図 2-5 GCaMP 型  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質の構造

A : GCaMP 型  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質は円順列置換 GFP (cpGFP) を M13 ペプチドとカルモジュリンで挟んだ構造をしている。

B : カルモジュリンが  $\text{Ca}^{2+}$ と結合すると GCaMP の立体構造が変化し、蛍光強度も変化する。

神経細胞では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度はおよそ 50~100nM 程度に調節されているが、活動電位の発生に伴って細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。

この  $\text{Ca}^{2+}$  に反応する感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta\text{G-RV}$  を作製すれば、神経ネットワーク上の特定の結合関係をもつ神経細胞群の活動だけを選択的にできる非常に有用なツールとなることが期待される。本研究では、Zhao らによって開発された GECO と呼ばれる  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質グループ (Zhao et al., 2011) の中から、蛍光波長の異なる 3 種の変異体タンパク質、R-GECO (赤)、G-GECO (緑)、B-GECO (青) を選択し、それらが発現する  $\Delta\text{G-RV}$  を作製した (図 2-6 A)。これらの  $\Delta\text{G-RV}$  を NA 細胞に感染させたところ、ゲノムに組み込まれたマーカー遺伝子由来の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質によると考えられる蛍光が観察された (図 2-6 B-D)。



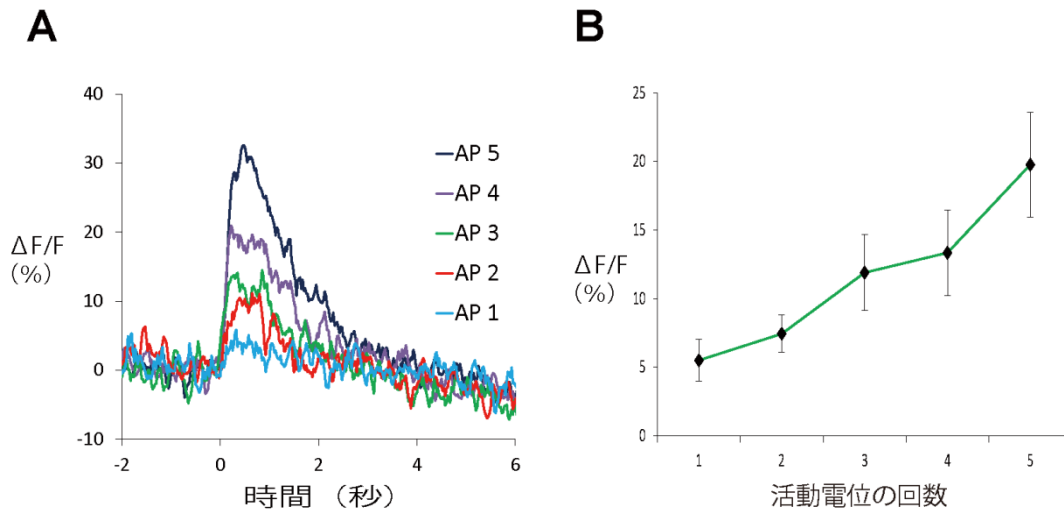
**図 2-6 GECO を発現する  $\Delta\text{G-RV}$**

A : GECO を発現する  $\Delta\text{G-RV}$  のゲノムの模式図。GECO は M 遺伝子と L 遺伝子の間に挿入された。

B : rHEP-3.0 $\Delta\text{G-B-GECO}$  に感染した NA 細胞の蛍光画像。C : rHEP-3.0 $\Delta\text{G-G-GECO}$  に感染した NA 細胞の蛍光画像。D : rHEP-3.0 $\Delta\text{G-R-GECO}$  に感染した NA 細胞の蛍光画像。

スケールバー=20 $\mu\text{m}$

次に、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質発現型  $\Delta\text{G-RV}$  に感染した初代培養神経細胞から、活動電位の発生を光学的なシグナルとして計測可能であるか、パッチクランプ下で通電刺激によって活動電位を発生させ、検討した。その結果、G-GECO 発現型  $\Delta\text{G-RV}$  に感染した初代培養神経細胞から、活動電位の発生によるものと思われる蛍光強度変化を計測することに成功した (図 2-7)。しかし、R-GECO 発現型  $\Delta\text{G-RV}$ 、B-GECO 発現型  $\Delta\text{G-RV}$  に感染した初代神経培養細胞からは活動電位の発生に伴う蛍光強度変化を



**図 2-7 G-GECO を発現する  $\Delta$ G-RV に感染した初代神経培養細胞からの光計測**

感染細胞にパッチクランプを行い、通電刺激により 1~5 発の活動電位を誘導した。

A: 活動電位 (AP) の回数と蛍光強度変化率  $\Delta F/F$ 。時間 0 を起点に、40ms 間隔で活動電位を 1~5 発誘導した。活動電位の発生回数に応じた蛍光強度変化が観察された。

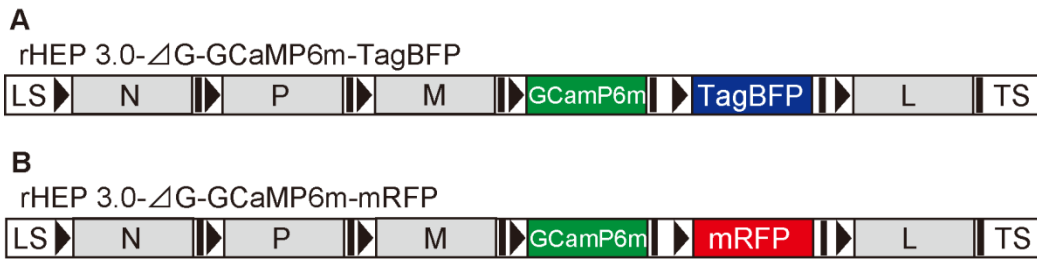
B: 感染細胞の活動電位の発生回数と蛍光強度変化率の関係。N=5、誤差棒は平均値 $\pm$ 標準誤差。

計測することができなかった。これらの結果を受けて、R-GECO、B-GECO を用いた複数の蛍光色による多重  $Ca^{2+}$  イメージングは実現が困難であると考えた。

### 2-3-5. 2 重標識法と $Ca^{2+}$ イメージングによる神経回路の構造と機能の同時観察法の開発

上記のように、青、緑、赤色  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク質を用いた 3 重  $Ca^{2+}$  イメージングの実現は困難であると考えられたことから、本研究では、狂犬病ウイルスベクターによる 2 重標識法と  $Ca^{2+}$  イメージングを組み合わせた手法の開発を目指した。ここで、狂犬病ウイルスベクターによる 2 重標識法とは、Ohara らによって報告された、2 種類の異なるレポータータンパク質を発現する狂犬病ウイルスベクターによる、2 重逆行性トレーシング法である (Ohara et al., 2009a; Ohara et al., 2009b)。2 つの異なる脳領域に 2 種の狂犬病ウイルスベクターをそれぞれ注入することで、それらの領域に情報を送る神経細胞の分布を同一の標本で比較することができる。 $Ca^{2+}$  イメージングには、GCaMP6m という、少数回の活動電位による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を捉えるために適した性質をもつ  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク質を用いることにした (Chen et al., 2013)。この GCaMP6m と同時に、青色、または赤色蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製することで、青色、赤色の蛍光による 2 重標識と、緑色蛍光による  $Ca^{2+}$  イメージングを同一の標本で、同時に実現することができると考えられた。

青色蛍光タンパク質としては TagBFP を、また、赤色蛍光タンパク質としては mRFP を用いて、GCaMP6m と共に発現する  $\Delta$ G-RV を作製することとした。まず、M タンパク質コード領域と L タンパク質コード領域の間に転写開始シグナルと転写終了シグナル、さらに制限酵素認識部位を加えて、2 種のベクター、すなわち  $\Delta$ G-RV rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-TagBFP と rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-mRFP を作製した (図 2-8)。



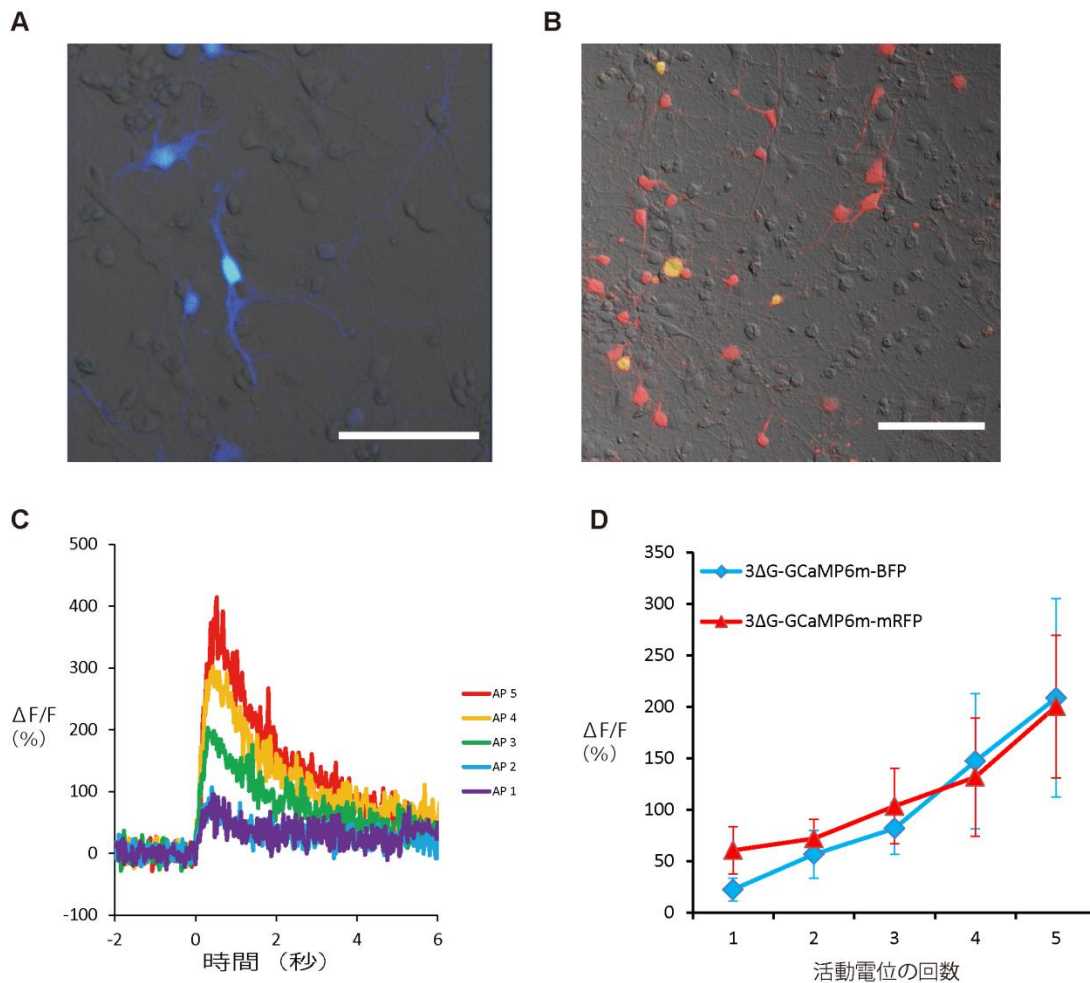
**図 2-8 GCaMP6m を発現する $\Delta$ G-RV のゲノムの模式図**

M 遺伝子と L 遺伝子の間に新たに転写開始シグナルと転写終了シグナルを挿入することで、2つの外来遺伝子を発現することができる $\Delta$ G-RV を作製した。

これら 2 種の $\Delta$ G-RV を初代培養神経細胞に感染させたところ、感染細胞において TagBFP または、mRFP の蛍光を確認することができた (図 2-9 A、B)。また、パッチクランプ法を用いて、活動電位に伴う蛍光強度変化を計測したところ、G-GECO を発現させた場合と比較して非常に大きな蛍光強度変化を観察することができた (図 2-9 C)。共発現している蛍光タンパク質が TagBFP と mRFP のどちらであっても活動電位の発生回数に応じて蛍光強度変化率も大きくなっていった (図 2-9 D)。

次に、これら 2 種の $\Delta$ G-RV をラット脳の異なる部位に注入することで、特定の領域に投射する神経細胞群を逆行性に 2 重標識することができるかを検討した。本研究で確立された CVSG をエンベロープに付与する回収法を用いることで、扁桃核と側坐核に投射を送る海馬の神経細胞を多数標識できることが確かめられた (図 2-10)。またゲノム上の GCaMP6m と L 遺伝子の間に挿入された TagBFP、mRFP の感染細胞での発現量は、感染後 8 日目の標本では個々の神経細胞の形態を可視化するに十分であることが確かめられた。

同様に、扁桃核に GCaMP6m と TagBFP を発現する $\Delta$ G-RV、側坐核に GCaMP6m と mRFP を発現する $\Delta$ G-RV を注入したラットの脳を用いて感染後 8 日目に急性スライス実験を行い、これらの 2 種の $\Delta$ G-RV に感染した海馬の神経細胞群の活動を光学的に測定できるか検討した。海馬 CA1 領域、海馬台に逆行性標識細胞が観察されたため、これらの領域に興奮性の入力を送っている神経軸索を電気刺激することで、 $\Delta$ G-RV 感染細胞に活動電位を誘導することを試みた。その結果いくつかの $\Delta$ G-RV 感染細胞で GCaMP6m の緑色の蛍光強度を計測することに成功した。また、それらの細胞が青、赤どちらの蛍光タンパク質を発現しているかも確認することができた (図 2-11)。



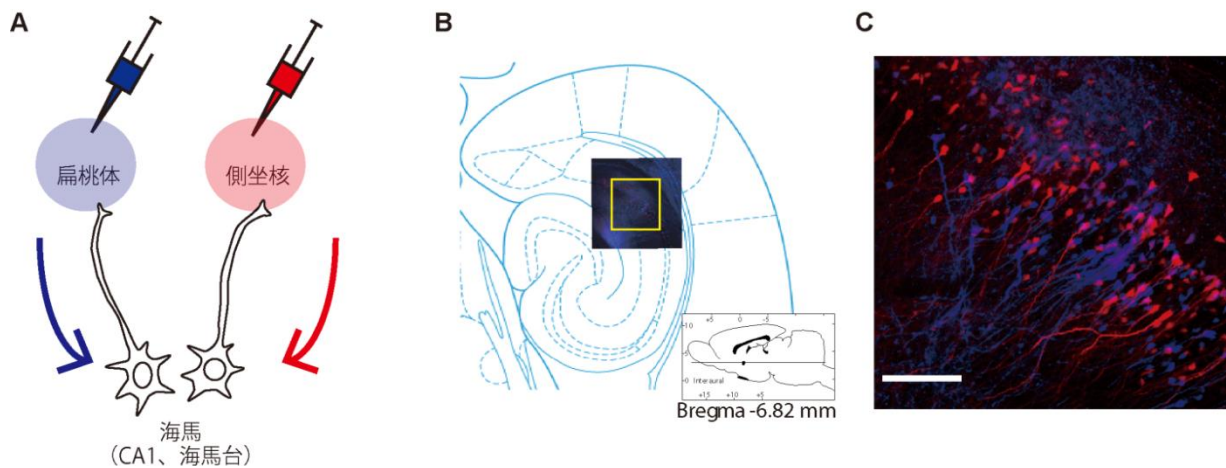
**図 2-9 GCaMP6m を発現する  $\Delta$ G-RV に感染した初代培養神経細胞からの光計測**

A : rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-TagBFP に感染した初代培養神経細胞では青色の蛍光が確認された。  
 B : rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-mRFP に感染した初代培養神経細胞では赤色の蛍光が確認された。一部の細胞では GCaMP6m の蛍光が確認された。GCaMP6m と mRFP の蛍光が確認された点は黄色で示されている。スケールバー=100nm

感染細胞にパッチクランプを施し、電流固定下で通電により活動電位を誘導した。

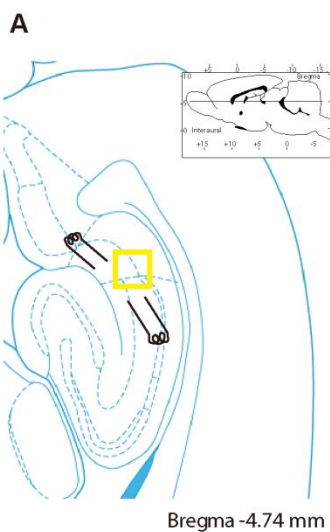
C : 活動電位 (AP) の回数と蛍光強度変化率  $\Delta F/F$ 。時間 0 を起点に 40ms 間隔で 1~5 発の活動電位を誘導した。

D : 感染細胞の活動電位の発生回数と蛍光強度変化率の関係。共発現している蛍光タンパク質が TagBFP と mRFP のどちらであっても活動電位の発生回数に応じて蛍光強度変化率も大きくなっていった。N=4、誤差棒は平均値 $\pm$ 標準誤差



**図 2-10** rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-TagBFP と rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-mRFP による逆行性 2 重標識

A : 実験の模式図。海馬から投射を受けることが知られている扁桃体に rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-TagBFP、側坐核に rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-mRFP を注入し、海馬の神経細胞を逆行性に 2 重標識した。B : 逆行性に標識された神経細胞は腹側海馬の海馬台で特に多く観察された。C : B において黄色い四角で囲われた領域を拡大して撮像した。青は TagBFP の蛍光、赤は mRFP の蛍光を示す。個々の神経細胞の形態まで確認することができた。スケールバー=200nm



**図 2-11** 2 種の投射細胞の同定と神経活動計測

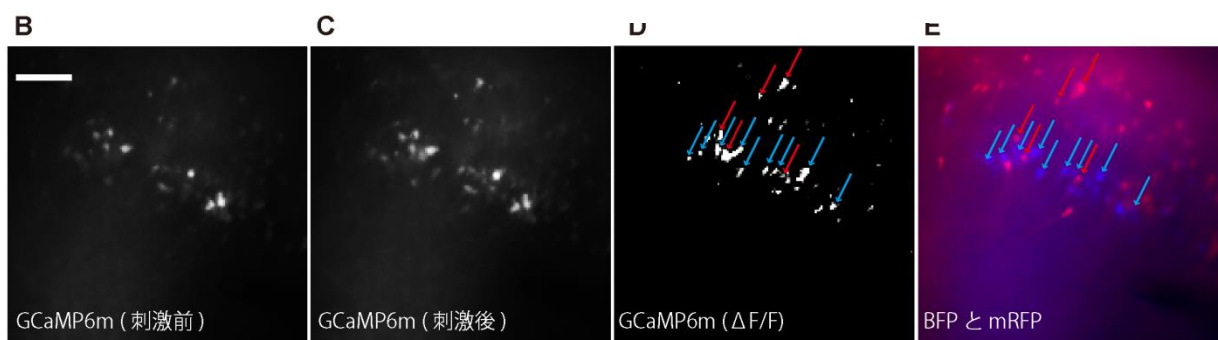
図 2-10 A と同様に扁桃体に rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-TagBFP、側坐核に rHEP3.0- $\Delta$ G-GCaMP6m-mRFP を注入し、海馬 CA1、海馬台の神経細胞を逆行性に 2 重標識した。

A : 図の位置に双極電極を 2 対配置し、CA1 と海馬台への入力繊維を電気刺激した。黄色い四角の範囲の蛍光強度を計測した。

B、C : 電気刺激の前後で GCaMP6m に由来する緑色蛍光の強度に変化が見られた。スケールバー=50 $\mu$ m

D : 撮像された画像の各点の蛍光強度変化率を計算し、変化率の特に高い点を示した。

E : 蛍光強度が大きく変化した点が青、赤どちらの色の蛍光タンパク質で標識されていることが確認することに成功した。





## 2-4. 考察

△G-RV は細胞種特異的な初期感染と、その初期感染細胞からの制御された単シナプス性の経シナプス伝播が可能であることから、複雑に絡み合う神経ネットワークの構造を調べる強力なツールである。加えて、△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量を示すことから、この△G-RV を用いて各種の有用なタンパク質を標的の神経細胞に導入すれば、その神経細胞の形態や活動特性を詳細に調べることができると期待されている。本研究では、この優れた特性を持つ△G-RV の神経科学への応用性の検討を行った。

△G-RV は、狂犬病ウイルスの G タンパク質をエンベロープに付与することで、特定の脳領域に投射する神経細胞だけに選択的に遺伝子導入できる逆行性トレーサーとして用いることができる。本研究で作製・使用された狂犬病ウイルスベクターは全て狂犬病ウイルス HEP 株を元に作製されたため、従来は、HEP 株の G タンパク質を△G-RV のエンベロープに付与していた。逆行性標識をより効果的に行うためには、より感染力が高く神経回路トレーシングに頻用される狂犬病ウイルス、CVS 株の G タンパク質によって HEP 株由来の G タンパク質を置き換えた△G-RV が有利と考えられた。そのため、CVS 株の G タンパク質を恒常的に発現する NA 細胞株 (NA-CVSG) を樹立した。しかし、HEP 株の G タンパク質を発現する NA 細胞株 (NA-HEPG) を用いた場合に比べ、NA-CVSG に△G-RV を感染させた場合、産生されるウイルス粒子の数が少なく高い力価のウイルス液を回収することが困難であった。狂犬病ウイルスのウイルス粒子の形成には、ウイルスを構成する各タンパク質の相互作用が重要となる (Mebatsion et al., 1999)。そのため、G タンパク質と他の狂犬病ウイルスのタンパク質の由来が異なることから、相互作用の効率が低下し、ウイルスの産生速度が低下したと考えられた。本研究では△G-RV の神経科学への応用を目的としているため、ウイルス液は脳内の標的とする領域へ注入することを想定している。この際、脳内に注入できる量は限られている上、ウイルス液を注入することによる脳組織へのダメージを抑えるためにも高い力価のウイルス液を使用して、注入量を抑えることが重要である。本研究では、高い力価のウイルス液を回収するために、CVS 株の G タンパク質に加え、HEP 株の N、P タンパク質を恒常的に発現する NA 細胞株 (NA-NPCVSG) を樹立し、ウイルスの回収に用いた。この NA-NPCVSG から産生されるウイルス粒子の数は、NA-CVSG を用いた場合と比べて大きく増加していた。N タンパク質と P タンパク質はどちらも、狂犬病ウイルスの転写機能に重要なタンパク質であると考えられているため、NA-NPCVSG 内では△G-RV の遺伝子発現が促進されウイルス粒子の産生が活性化されたと考えられる。この方法で回収された CVS 株の G タンパク質をエンベロープに持つ△G-RV をラット脳に微量注入したところ、ウイルス液を注入した領域に投射する神経細胞が存在することが知られている領域において△G-RV に感染した細胞が多数観察された。このことから、本研究で確立された新規△G-RV 回収法は、△G-RV を逆行性トレーサーとして用いるために有用な方法であることが確かめられた。

神経細胞の形態を可視化するためのマーカーとして、青、緑、赤色蛍光タンパク質を発現する△G-RV は、神経ネットワークの構造を理解するうえで重要なツールである。レポータータンパク質として異なる色の蛍光タンパク質を発現する△G-RV を組み合わせることで、特定の領域に投射する神経細胞群を複数種類同時に同じ標本中で標識することができる。△G-RV は、鶏白血病ウイルスのエンベロープタンパク質である EnvA による偽型化と共に、EnvA に対応するレセプター、TVA を導入することによって、標的

とする神経細胞への特異的な初期感染を実現することができる。さらに、その細胞に狂犬病ウイルスの G タンパク質を導入しておくことで、単シナプス性の制御された経シナプス伝播が起き、初期感染細胞のシナプス前細胞が標識される。この手法を用いるためには、トランスジェニック技術や他のウイルスベクターを用いて、標的とする神経細胞に TVA を導入する必要がある。これらの技術と  $\Delta$ G-RV を組み合わせるためにも、様々な蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV は有用なツールである。例えば、TVA 発現細胞のマーカーとして GFP が使用されている場合、初期感染細胞とそのシナプス前細胞を見分けるためには GFP の緑色とは異なる、赤色ないし青色の蛍光タンパク質を  $\Delta$ G-RV によって発現させる必要がある。本研究では、実際に青、緑、赤色の蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製した。これらの  $\Delta$ G-RV は、細胞の標識などの用途でいくつかの蛍光タンパク質がすでに使われていて利用できない場合などに活用できる。

本研究では、さらに、 $\Delta$ G-RV によって  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を神経細胞に導入する手法を開発した。青、緑、赤色の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製し、感染細胞における性状を検証した。その結果、緑色  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質、G-GECO を用いて神経細胞の活動電位に由来すると考えられる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に応じた光シグナルを取得することができた。しかし、青色と、赤色の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質、B-GECO、R-GECO を用いた場合には神経細胞の活動電位によって生じる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を明確なシグナルとして捉えることはできなかった。この結果から、 $\Delta$ G-RV に感染した神経細胞においても、活動電位に応じて神経細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することが確かめられ、この手法が神経ネットワーク中の標的とする神経細胞の活動を調べる上で有効であることが確かめられた。プローブが  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を持つ濃度の範囲と神経細胞で見られる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の範囲がずれている場合、神経活動に由来するシグナル捉えることが難しいと考えられ、これが、B-GECO、R-GECO 発現細胞から神経活動の光学的計測ができなかった理由となった可能性がある。今回、3種の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製したが、それらによる、青、緑、赤の3色での3重  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングは実現が難しいと考えられた。 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質の開発は現在も広く行われており、緑以外の蛍光色を与える  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質も複数報告されている (Akerboom et al., 2013)。今後、神経活動を可視化するためにより適した  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質を利用し、それを発現する  $\Delta$ G-RV を作製することで、神経活動の多重  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングが可能になると期待される。

2種類の蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を用いた2重標識法と、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質による神経活動を可視化する手法を組み合わせることで、異なる2つの脳領域に投射する異なる2群の神経細胞の神経活動比較を可能にする手法を開発した。この手法の最大の利点は、同一の標本を用いて異なる2種の標的神経細胞群の神経活動を同時に計測、比較することができる点である。本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質として、わずか1発の活動電位に由来する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化ですら捕捉できる GCaMP6m を用いた。標識のための蛍光タンパク質として TagBFP または mRFP を GCaMP6m と同時に発現する  $\Delta$ G-RV を作製した。この  $\Delta$ G-RV は、外来遺伝子として2種類のタンパク質をコードする 2000base の配列が挿入されている。本論文第一章で述べたように、狂犬病ウイルスのゲノム上に遺伝子配列を挿入することで、その遺伝子より後方に位置するタンパク質の発現量が低下することが予想される。本研究では外来遺伝子挿入部位を M 遺伝子と L 遺伝子の間に設定した。L 遺伝子はウイルスの RNA ポリメラーゼをコードして

いるため、ウイルスの外来遺伝子発現能やウイルス粒子産生能の低下が危惧された。しかし、感染細胞での外来遺伝子の発現量は、細胞の形態を見るための TagBFP や mRFP に関して、また、神経活動を見るための GCaMP6m に関しても十分であることが確かめられた。また、NA-NPCVSG 株を用いてウイルスを回収することで、高いウイルス産生速度を実現した。NA-NPCVSG 株とは、ウイルスの産生を促進することが期待される狂犬病ウイルスの N、P タンパク質と、高頻度逆行性標識能を示す CVS 株由来の G タンパク質を恒常的に発現する細胞株である。こうして、ラット脳への微量注入による逆行性標識を行うために十分な力価のウイルス液を回収することができた。GCaMP6m と TagBFP を発現する  $\Delta$ G-RV をラット脳の扁桃体に、GCaMP6m と mRFP を発現する  $\Delta$ G-RV をラット脳の側坐核に微量注入することで、それぞれの領域に投射する海馬の神経細胞を逆行性標識することができた。同時に、脳スライス切片上でその神経活動を光学的なシグナルとして取得することに成功した。以上の結果から、本研究で作製されたこの 2 種の  $\Delta$ G-RV は、複雑に絡み合う神経細胞のネットワークの中で、特定の領域に投射する 2 群の神経細胞群を標的として、神経活動の計測、比較することを可能にすることが確かめられた。今後は、 $\Delta$ G-RV に感染した細胞の詳細な生理学的特性を、非感染細胞と比較することで、 $\Delta$ G-RV が感染したことによる神経活動への影響の有無、程度を調べる必要がある。

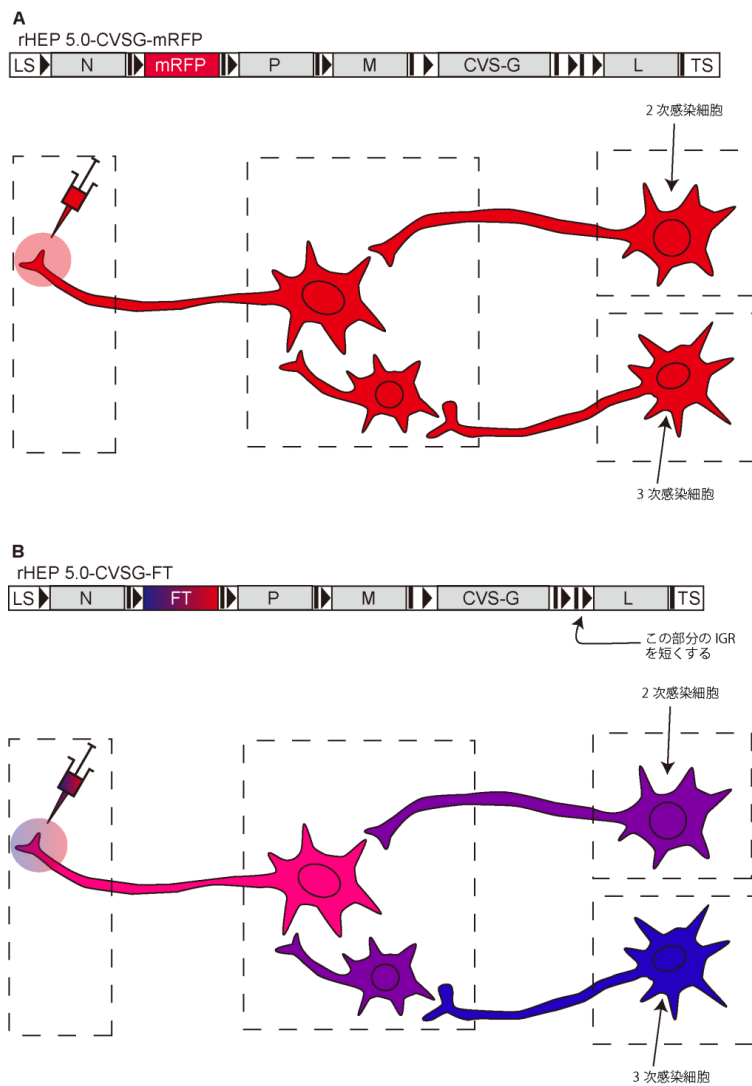
本章で述べた手法を用いて、脳の神経ネットワークの構造と機能とその両面から検証し、神経細胞の結合関係とその活動特性を直接関連付けて調べるのが可能になり、より詳細な脳機能の解析が進むことが期待される。

## 総合考察

狂犬病ウイルスは神経細胞の軸索末端から感染し、逆行性に経シナプス伝播する特性をもつことから、神経細胞のネットワークの構造を調べるための有用なツールとして広く用いられてきた。近年この狂犬病ウイルスをベクター化することで、さらに効果的な神経ネットワーク研究が可能となった (Inoue et al., 2003; Khawplod et al., 2005; Ohara et al., 2009; Ohara et al., 2013b)。特に、 $\Delta$ G-RV は、その初期感染を標的とする神経細胞に限定できることや、経シナプス伝播を制御することができることからさらに精密な解析を可能にするツールとして広く用いられている (Wickersham et al., 2007b; Miyamichi et al., 2011; Rowland et al., 2013; Wall et al., 2013)。 $\Delta$ G-RV には、その感染特性以外にも、外来遺伝子発現量の高さや、比較的抑えられた細胞毒性など、ウイルスベクターとして優れた特性を持つことが報告されてきた (Wickersham et al., 2007a; Ohara et al., 2013a)。

本研究ではまず、その高い外来遺伝子発現量に注目した。これまでに著者を含むグループによって、ウイルスゲノムから G 遺伝子を欠損させたことによってこの高い外来遺伝子発現量が引き起こされていることが示された。従来 G タンパク質が、ウイルスの転写など遺伝子発現に関わる機能をもつことはほとんど報告されておらず、なぜ G 遺伝子を欠損することで、ベクターの外来遺伝子発現量が上昇するのか、そのメカニズムは不明であった。より実用的なウイルスベクターを開発するためには、ウイルスベクターの遺伝子発現機構を詳細に理解することが重要である。実験目的によってウイルスベクターに求められる外来遺伝子発現量は様々である。例えば、蛍光タンパク質を用いて感染細胞の細かな構造まで可視化したい場合、ウイルスベクターには強い発現量が求められる。しかし一方で、外来遺伝子を多く発現することは感染細胞に与える毒性が高くなることも意味している (Liu et al., 1999; Wickersham et al., 2013)。そのため、細胞を標識した後、長期にわたってその細胞を生存させておく必要がある場合には、適度に制御された低い外来遺伝子発現能を示すウイルスベクターが求められる。本研究において  $\Delta$ G-RV の転写産物の定量解析を行った結果、 $\Delta$ G-RV で外来遺伝子発現量が高い一因が、ウイルスの RNA ポリメラーゼである L タンパク質の発現量増大にあることが示された。このことから L タンパク質の発現量を制御することで、より多く外来遺伝子を発現する  $\Delta$ G-RV や、より弱い外来遺伝子発現能を示す  $\Delta$ G-RV を作製できることが示唆された。これまでに、狂犬病ウイルスの L 遺伝子の前方にある遺伝子間配列 (IGR) の長さを変えることで、L 遺伝子の発現量を変化させることができることが Finke らによって報告されている (Finke et al., 2000)。この方法を用いて今後各々の実験に適した外来遺伝子発現能を示す  $\Delta$ G-RV が開発されることが期待される。従来の経シナプス伝播を示す狂犬病ウイルスベクターは、G 遺伝子をゲノムに持つため、その外来遺伝子発現量が十分ではなく、標識された感染細胞の観察には抗体染色などの増感法を用いる必要があった (ohara et al., 2009a; Ohara et al., 2013b)。これら G 遺伝子をもつ狂犬病ウイルスベクターについても、L 遺伝子前方の IGR をより短いものに改変することで、外来遺伝子発現能を高めることが可能であると考えられる。従来の狂犬病ウイルスベクターを用いた研究では、標識された細胞が、ウイルス液注入領域に直接投射する神経細胞なのか、それともいくつかのシナプス伝播を経て標識された細胞なのかを見分けることが難しいということが問題であった。著者らは、ベクターの L 遺伝子前方の IGR を改変することによって、この問題を解決できると考え、現在新規ウイルスベクターの回収を行っている。この技術では、翻訳後時間経過と共にその色が青から赤へと変化する蛍光タンパク質、Fluorescent Timer (FT) (Subach

et al., 2009) を、狂犬病ウイルスを介して発現させる (図 3-1)。著者らが作製した HEP 株由来狂犬病ウイルスベクターを用いた場合、ウイルス液注入部位に投射する一次感染細胞への感染後、その神経細胞内で狂犬病ウイルスの産生が起こりシナプス前細胞 (2 次感染細胞) へと狂犬病ウイルスが伝播するまでには数日を要することが分かっている。この時間差によって、1 次感染細胞と 2 次感染細胞では FT の蛍光変化が異なると考えられる。このような蛍光の違いを検出することで、標識された神経細胞がいくつのシナプスを介してウイルス注入部位に投射しているのかを推定可能になると期待された。FT の蛍光色変化は発色団のわずかな構造の変化に由来することから、その検出には抗体染色法を用いることができない。そのため、従来の G 遺伝子をもつ狂犬病ウイルスベクターでは十分なシグナル強度を得ることは難しいと考えられていたが、L 遺伝子の発現量を高める変異を導入することで、狂犬病ウイルスベクターの外来遺伝子を高めることができれば、この問題が克服される可能性がある。



**図 3-1 FT を発現する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**

A: 従来の mRFP のような蛍光タンパク質を発現する場合、2 次感染細胞と 3 次感染細胞を見分けることはできない。B: FT をマーカータンパク質として用いることで、感染後どの程度時間が経っているのかを色で推定できる可能性がある。

本研究では、異なる株に由来する G タンパク質をエンベロープに持つ  $\Delta$ G-RV を高い力価で回収する手法として、エンベロープタンパク質のほかに狂犬病ウイルスの N、P タンパク質を発現する細胞株を用いる手法を確立した。本研究では高頻度逆行性標識能を示す CVS 株に由来する G タンパク質をエンベロープタンパク質として用いたが、この回収法は他のエンベロープタンパク質を用いる上でも有効であると考えられる。これまでに、鳥類に感染する特性がある鶏白血病のエンベロープタンパク質 EnvA をもつ  $\Delta$ G-RV を回収する方法として、EnvA を恒常的に発現する BHK 細胞株を用いる方法が報告されている (Wickersham et al., 2010) が、この方法では、狂犬病ウイルスの G タンパク質を発現する BHK 細胞株を用いた方法に比べて、回収されるウイルスの力価が低い (Osakada et al., 2011)。今後、本研究で述べた方法を応用し、N、P タンパク質と EnvA を共に発現する細胞株を回収に用いることで、より効率的に高い力価の EnvA 偽型化  $\Delta$ G-RV を回収可能になることが期待される。

著者らはこれまでに、 $\Delta$ G-RV により導入された細胞膜に局在する蛍光タンパク質と、膜電位に応じて局在が変化する色素とを用いて、その両者間に生ずるエネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) を検出するハイブリット型膜電位センサー (hVOS) (González and Tsien, 1995; Chanda et al., 2005) を開発してきた (図 3-2)。hVOS では FRET のドナーとアクセプターの組み合わせが重要となる。著者らは、細胞膜に局在する GFP などの蛍光タンパク質と、膜電位に応じて細胞膜内で局在を変化させる、負に荷電した色素 Dipicrylamine (DPA) を利用した hVOS を用いた。FRET 効率はドナーとアクセプター間の距離に強く依存するため、膜電位変化によって GFP と DPA の間の距離が変化した場合、GFP の蛍光強度が大きく変化する。具体的には、細胞内が負である静止膜電位の状態では、DPA は細胞外に近い位置にあり、GFP との距離が大きいため FRET 効率は低い。そのため、GFP が獲得したエネルギーの多くが GFP の蛍光に変換される。一方、活動電位が発生すると、DPA は細胞内に近い位置に移動し、FRET 効率が上がる。その結果、GFP の獲得したエネルギーの多くが DPA に移動し、GFP の蛍光強度は減少する。この研究は著者の修士論文にて発表された。 $\Delta$ G-RV 感染細胞を利用した hVOS による膜電位計測法では、培養皿上の NA 細胞を用いた場合に膜電位変化を捉えることができたが、脳スライス切片を用いた実験では、良好な光シグナルを取得することはできなかった。原因として、蛍光タンパク質との FRET を起こすための色素、DPA が、脳組織中において標的細胞以外の組織に取り込まれてしまい、結果として標的細胞からのシグナル強度が弱くなってしまったことが考えられた。著者らは、この問題の解決策として、膜電位感受性蛍光タンパク質を発現する  $\Delta$ G-RV を作製し、現在ウイルスの回収を行っている。膜電位感受性蛍光タンパク質は、膜電位の変化に応じて蛍光タンパク質の強度等が変化するタンパク質であり、近年開発が進められている。特に St-Pierre らによって報告された ASAP1 という膜電位感受性緑色蛍光タンパク質は、活動電位の発生に対する感度が高く、優れた膜電位プローブである。ASAP1 は単体で膜電位プローブとして機能するため、標的の神経細胞で  $\Delta$ G-RV によって十分量の発現が得られれば、膜電位変化の計測が可能であると考えられる (St-Pierre et al., 2014)。そこで著者は、ASAP1 と TagBFP、ASAP1 と mRFP を発現する  $\Delta$ G-RV のゲノムを構築すべく、その配列を含むプラスミドを作製した (図 3-3)。この 2 種の  $\Delta$ G-RV が回収できれば、本論文 2-3-4. で示したのと同様に、神経回路の 2 重標識と 2 種の神経細胞群の同時活動計測が可能になると期待される。

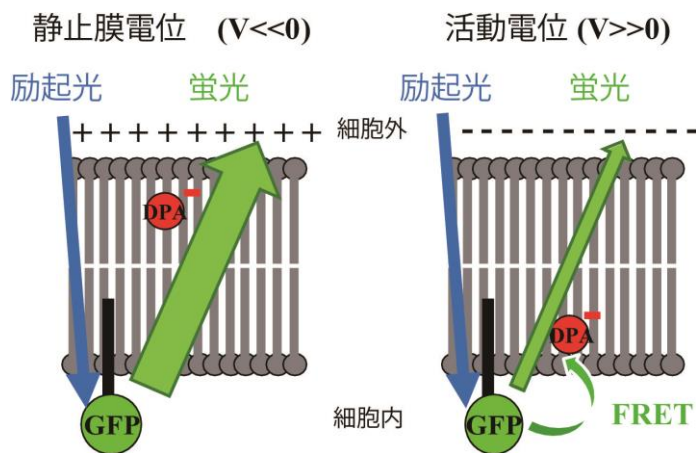


図 3-2 hVOS の概略

細胞膜に局在する GFP などの蛍光タンパク質と、膜電位に応じて細胞膜内で局在を変化させる荷電色素 Dipicrylamine (DPA) 間のエネルギー移動 (FRET) を利用する。  
2 点間 FRET 効率は 2 点間の距離に強く依存するため、膜電位によって GFP の蛍光強度が大きく変化する

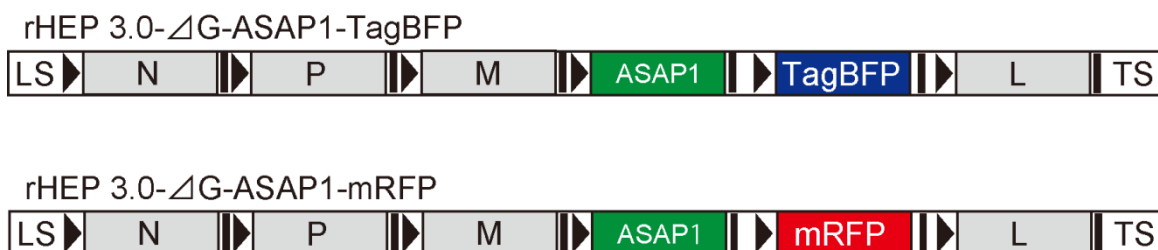


図 3-3 ASAP1 を発現する ΔG-RV のゲノムの模式図

膜電位感受性緑色蛍光タンパク質 ASAP1 を発現する ΔG-RV を用いることによって、GCaMP6m を用いた場合と同様の方法で、2 重標識法と神経活動の光学的計測が可能になると期待される。

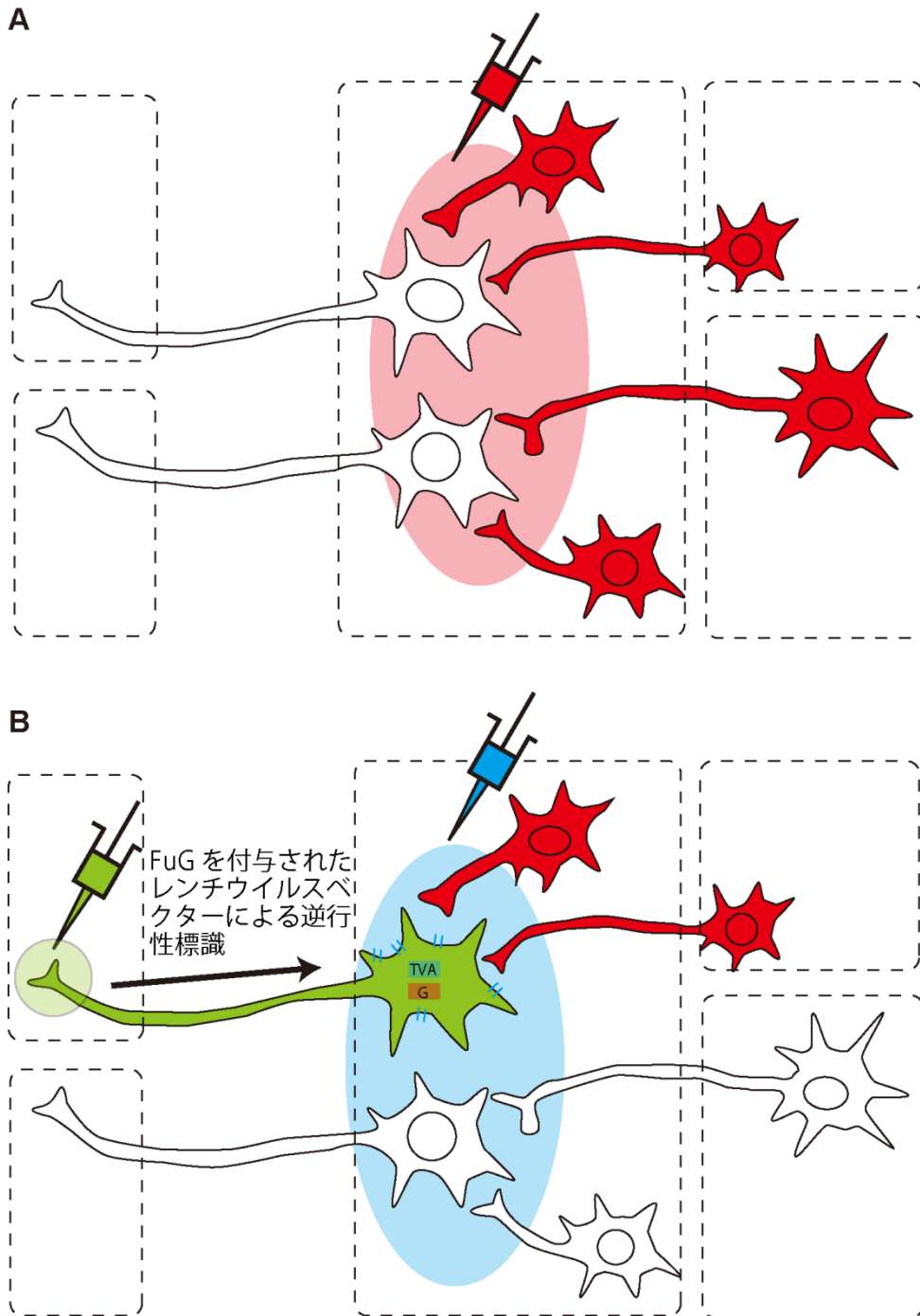
本研究では、逆行性トレーサーとしての ΔG-RV に GCaMP6m を組み込むことで、神経細胞の投射先に依存した活動特性の違いを検証する有効なツールをつくり出した。この手法と関連して、著者らはレンチウイルスベクターと ΔG-RV を組み合わせることにより、特定の脳領域に投射する神経細胞の結合関係について調べる研究手法を開発中である (図 3-4)。狂犬病ウイルスの G タンパク質の細胞外ドメインと VSV の G タンパク質の細胞内ドメインを組み合わせさせたエンベロープタンパク質、FuG (Kato et al., 2011a; Kato et al., 2011b; Kato et al., 2014) を用いて、レンチウイルスベクターを偽型化することで、レンチウイルスベクターに逆行性トレーサーとしての機能を付与することができる (Hirano et al., 2013)。まず、この方法で TVA と狂犬病ウイルスの G タンパク質を投射先特異的に導入する。次に、それらの神経細胞へ EnvA で偽型化した ΔG-RV を感染させる。その後、ΔG-RV は初期感染細胞内でウイルス粒子を産生し、シナプス前細胞へと単シナプス性経シナプス伝播する。標的となる神経細胞群の活動特性を調べた後、このレンチウイルスベクターを組み合わせることで標的となる神経細胞群へ投射する神経細胞群を標識すれば、観察された活動特性がどのような入力によって生み出されているのかを明らかにすることができる。これらの手法を組み合わせることで、標的とする神経細胞群とその周囲の神経ネットワークについて、構造と機能の両面から調べるのが可能になると期待される。

逆行性トレーサーとして機能するレンチウイルスベクターは、 $\Delta$ G-RV による神経回路トレーシング研究法にさらなる改善をもたらす可能性がある。図 3-2 で示したように、レンチウイルスベクターと  $\Delta$ G-RV を用いて、レンチウイルスベクターを注入した脳領域の神経細胞へ 2 つのシナプスを介して情報を送る神経細胞を標識することができる。 $\Delta$ G-RV は G タンパク質をコードする遺伝子を持たないので、シナプスを 2 つ以上遡って神経ネットワークを解析することができないという制限があった。著者らは、神経細胞のシナプス結合を可視化するための蛍光タンパク質 mGRASP (Kim et al., 2012) を用いて、シナプスを 3 つ遡る手法を開発中である (図 3-5)。mGRASP は GFP を分割した 2 つのポリペプチド (pre-mGRASP、post-mGRASP) からなる。pre-mGRASP をシナプス前細胞に、post-mGRASP シナプス後細胞にそれぞれ導入することで、2 つの神経細胞が形成しているシナプスでのみ mGRASP が再構築され、蛍光が観察される。まず、図 3-5 に示したようにレンチウイルス注入部位からシナプス 2 つ分の逆行性標識を行う。次に、2 次感染細胞が見られた脳領域に投射をする神経細胞に標的を定め、その脳領域の神経細胞に post-mGRASP 発現型  $\Delta$ G-RV を用いて pre-mGRASP を導入する。この時 mGRASP の蛍光が確認できれば、pre-mGRASP を導入した部位の神経細胞が 3 つのシナプスを介して最初のレンチウイルス注入部位に情報を送っていることが確かめられる。この技術は、今まで困難であった、シナプス 3 つを跨ぐような、脳のより広範囲にわたる神経ネットワークの構造の研究に効果を発揮すると考えられる。

本研究では、蛍光タンパク質と  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質の  $\Delta$ G-RV による導入によって、神経ネットワークの構造と機能の研究の水準がどのように向上するかに検証を行った。本研究では使用していないが、神経細胞の機能を調べるために非常に有用なタンパク質として、光遺伝学的手法で用いられる光感受性のイオンチャネルやイオンポンプがある。これらのタンパク質は、特定の波長の光を当てたときに神経細胞膜のイオン透過性を変化させることができる。例えば Channelrhodopsin-2 と呼ばれるタンパク質は、470nm 付近の波長の光を照射されると、神経細胞内に陽イオンを流入させ細胞膜の脱分極を誘導し、結果として活動電位を発生させる (Nagel et al., 2003)。逆に Halorhodopsin と呼ばれるタンパク質は、580nm 付近の波長の光を受けるとプロトンを出して細胞外に排出することで細胞膜の過分極を誘導し、結果として神経細胞の活動電位の発生を抑制する (Gradinaru et al., 2008)。これらが神経科学研究において非常に強力な手法として用いられている理由としては、これらのタンパク質を用いることで、神経活動を非常に高い時間分解能で操作である点が挙げられる。 $\Delta$ G-RV による標的選択的な遺伝子導入法と組み合わせることで、神経ネットワーク上の特定の神経細胞群の活動を選択的に操作することが可能になり、それらの神経細胞群の機能解明のための優れた研究ツールとなることが期待される。

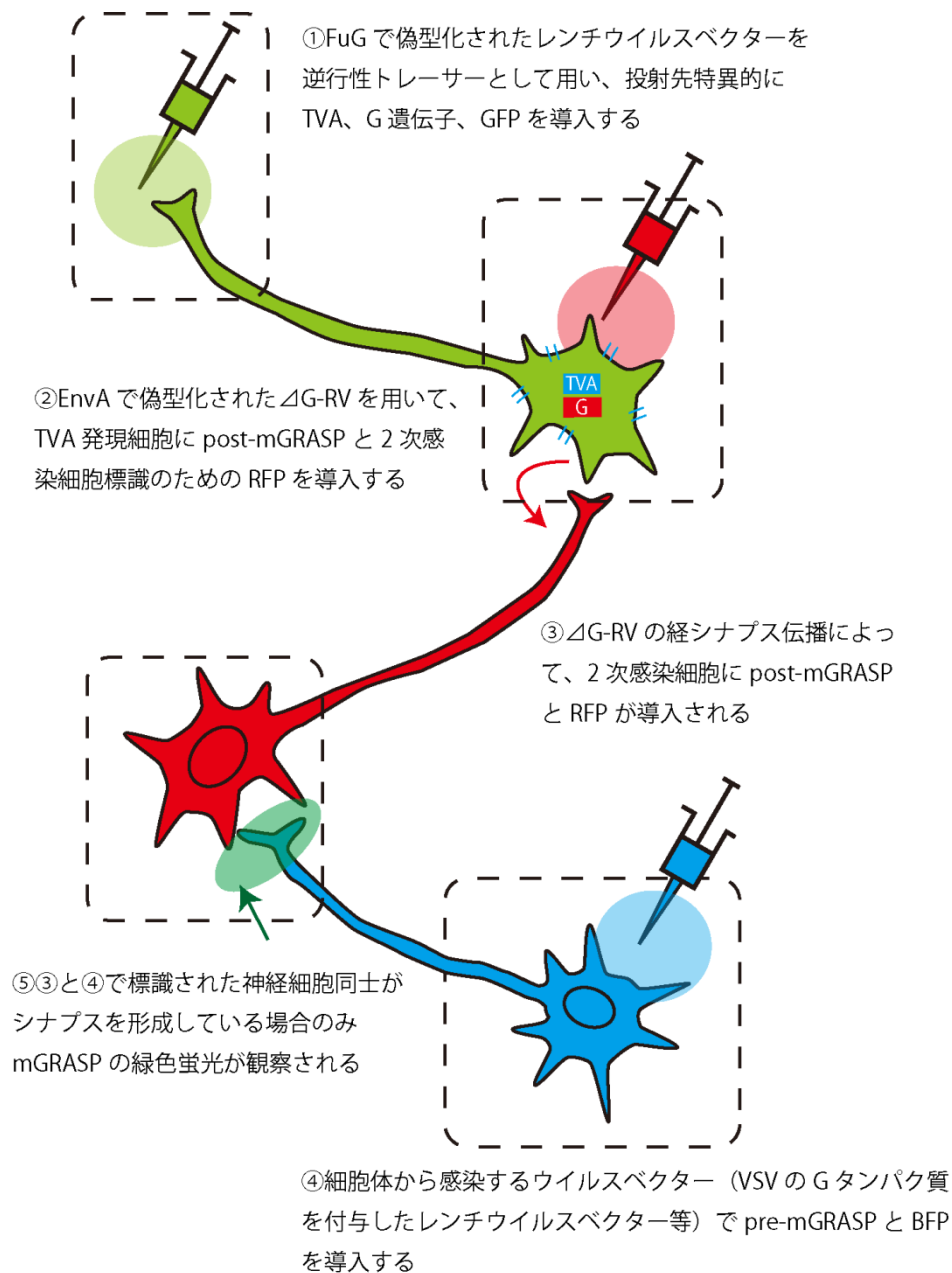
$\Delta$ G-RV の遺伝子発現特性の検証を通して本研究で得られた知見が、実験目的に合わせた望ましい外来遺伝子発現量を示すウイルスベクターの開発に役立つことが期待される。 $\Delta$ G-RV が可能にする様々な標的選択的な遺伝子導入法は、どのような機能性タンパク質の導入にそれを活用するかによって、幅広い応用の可能性がある。これにより、複雑に絡み合う神経ネットワークの中で研究者が調べたい特定の神経細胞群の性質を神経ネットワークの構造と機能の両面から検証可能となり、脳の詳細な情報処理機構の解明の一助となることが期待される。





**図 3-4 FuG で偽型化されたレンチウイルスベクターと $\Delta$ G-RV によるトレーシング**

A: 狂犬病ウイルスの G タンパク質が付与された $\Delta$ G-RV では、注入部位に投射する細胞全体が標識される可能性がある。B: FuG を付与されたレンチウイルスベクターを逆行性トレーサーとして用い、TVA と G 遺伝子を投射先特異的に導入する（緑の注射器）。その後、EnvA で偽型化した $\Delta$ G-RV を注入することで、投射先特異的に標識された初期感染細胞のシナプス前細胞だけが標識される。



**図 3-5 mGRASP を用いた  $\Delta$ G-RV による 3 シナプストレーシング**

FuG を付与されたレンチウイルスベクターを逆行性トレーサーとして用い、TVA と G 遺伝子を投射先特異的に導入する（緑の注射器）。その後 EnvA で偽型化した  $\Delta$ G-RV を注入し（赤の注射器）post-mGRASP を導入する。さらに、pre-mGRASP を、VSV の G タンパク質で偽型化されたレンチウイルスベクターのような細胞体から感染するウイルスベクターで導入する（青の注射器）。これにより、緑の注射器でレンチウイルスベクターを注入した部位と、青の注射器で注入した部位間に 3 つのシナプスを介して情報を送るネットワークが存在すれば、mGRASP の緑の蛍光がシナプスにおいて観察される。

## 謝辞

本研究の実施にあたり、惜しみないご指導・ご援助を頂きました東北大学生命科学研究科飯島敏夫教授、筒井健一郎准教授、大原慎也助教にこの場を借りて深い感謝の意を表します。

pcDNA3-Lyn-Sapphire, pcDNA-LynB-Venus プラスミドを快く提供していただいた理化学研究所脳科学総合研究センター宮脇敦史チームリーダー、pRSET-B-mRFP プラスミドを快く提供していただいたサンディエゴ大学 Roger Y Tsien 教授に深くお礼申し上げます。

本研究の一部は東北大学生命科学研究科脳情報処理分野、大原慎也助教と過去に在籍された山脇琢磨氏、吉松祥氏、伊藤和貴氏との共同研究として行われました。ここに感謝の意を表します。

本研究の一部に、ご協力と貴重なアドバイスを頂きました東北大学生命科学研究科石塚徹講師、久保田幸彦助教、春田奈美研究員、並びに発生ダイナミクス分野の皆さんにこの場を借りてお礼申し上げます。最後に、東北大学生命科学研究科脳情報処理研究室の皆さんには、本研究に関して大変お世話になったことをお礼申し上げます。

## 引用文献

1. Abraham, G. & Banerjee, A. K. Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1504–8 (1976).
2. Akemann, W., Mutoh, H., Perron, A., Rossier, J. & Knöpfel, T. Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat. Methods* 7, 643–649 (2010).
3. Akerboom, J. *et al.* Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 2 (2013).
4. Akerboom, J. *et al.* Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J. Biol. Chem.* 284, 6455–64 (2009).
5. Ball, L. A. & White, C. N. Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 442–6 (1976).
6. Barr, J. N., Whelan, S. P. J. & Wertz, G. W. Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1577, 337–53 (2002).
7. Broussard, G. J., Liang, R. & Tian, L. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 97 (2014).
8. Callaway, E. M. Transneuronal circuit tracing with neurotropic viruses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 617–23 (2008).
9. Campbell, R. E. *et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7877–82 (2002).
10. Cao, G. *et al.* Genetically targeted optical electrophysiology in intact neural circuits. *Cell* 154, 904–13 (2013).
11. Chanda, B. *et al.* A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 1619–26 (2005).
12. Chen, T.-W. *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300 (2013).
13. Colicos, M. A., Collins, B. E., Sailor, M. J. & Goda, Y. Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell* 107, 605–16 (2001).

14. Dana, H. *et al.* Thy1-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS One* 9, e108697 (2014).
15. Deisseroth, K. *et al.* Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* 26, 10380–6 (2006).
16. Dietzschold, B. *et al.* Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 70–4 (1983).
17. Etessami, R. *et al.* Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an in vitro and in vivo study. *J. Gen. Virol.* 81, 2147–53 (2000).
18. Faber, M. *et al.* Dominance of a nonpathogenic glycoprotein gene over a pathogenic glycoprotein gene in rabies virus. *J. Virol.* 81, 7041–7 (2007).
19. Faber, M. *et al.* Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* 76, 3374–81 (2002).
20. Finke, S. & Conzelmann, K.-K. Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* 111, 120–31 (2005).
21. Finke, S. & Conzelmann, K.-K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J. Virol.* 77, 12074–82 (2003).
22. Finke, S., Mueller-Waldeck, R. & Conzelmann, K.-K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J. Gen. Virol.* 84, 1613–21 (2003).
23. Gerfen, C. R. & Sawchenko, P. E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res.* 290, 219–38 (1984).
24. González, J. E. & Tsien, R. Y. Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells. *Biophys. J.* 69, 1272–80 (1995).
25. Goshen, I. *et al.* Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 147, 678–89 (2011).
26. Gradinaru, V., Thompson, K. R. & Deisseroth, K. eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol.* 36, 129–39 (2008).
27. Grantyn, A. *et al.* Density gradients of trans-synaptically labeled collicular neurons after injections of rabies virus in the lateral rectus muscle of the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 451, 346–61 (2002).

28. Harrison, P. J. *et al.* Labelling of interneurons by retrograde transsynaptic transport of horseradish peroxidase from motoneurons in rats and cats. *Neurosci. Lett.* 45, 15–9 (1984).
29. Hasegawa, S., Maruyama, K., Takenaka, H., Furukawa, T. & Saga, T. A medaka model of cancer allowing direct observation of transplanted tumor cells in vivo at a cellular-level resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13832–7 (2009).
30. Hirano, M. *et al.* Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. *PLoS One* 8, e75896 (2013).
31. Homma, R. *et al.* Wide-field and two-photon imaging of brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2453–67 (2009).
32. Horikawa, K. & Powell, E. W. Comparison of techniques for retrograde labeling using the rat's facial nucleus. *J. Neurosci. Methods* 17, 287–96 (1986).
33. Huang, H. V. Sindbis virus vectors for expression in animal cells Henry V Huang. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 531–535 (1996).
34. Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J. Physiol.* 195, 215–43 (1968).
35. Inoue, K. I. *et al.* An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J. Virol. Methods* 107, 229–36 (2003).
36. Inoue, K. 逆行性神経回路選択的ベクターとしての 高発現型狂犬病ウイルスベクターの開発と その応用性の検証. 平成 17 年度東北大学大学院生命科学研究科博士論文 (2006).
37. Inoue, M. *et al.* Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat. Methods* 12, 64–70 (2015).
38. Iverson, L. E. & Rose, J. K. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 23, 477–84 (1981).
39. Izzo, P. N. A note on the use of biocytin in anterograde tracing studies in the central nervous system: application at both light and electron microscopic level. *J. Neurosci. Methods* 36, 155–66 (1991).
40. Kato, S. *et al.* A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 22, 197–206 (2011).

41. Kato, S., Kobayashi, K. & Kobayashi, K. Improved transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer by optimizing the junction of fusion envelope glycoprotein. *J. Neurosci. Methods* 227, 151–8 (2014).
42. Kato, S. *et al.* Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 22, 1511–23 (2011).
43. Kelly, R. M. & Strick, P. L. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 103, 63–71 (2000).
44. Khawplod, P. *et al.* A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *J. Virol. Methods* 125, 35–40 (2005).
45. Kim, J. H. *et al.* High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6, e18556 (2011).
46. Kim, J. *et al.* mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat. Methods* 9, 96–102 (2012).
47. Kohara, K. *et al.* Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat. Neurosci.* 17, 269–79 (2014).
48. Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H. & Ke, N. J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 712–7 (1999).
49. Mantyh, P. W. & Peschanski, M. The use of wheat germ agglutinin--horseradish peroxidase conjugates for studies of anterograde axonal transport. *J. Neurosci. Methods* 7, 117–28 (1983).
50. Marshel, J. H., Mori, T., Nielsen, K. J. & Callaway, E. M. Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron* 67, 562–74 (2010).
51. Mebatsion, T., Weiland, F. & Conzelmann, K. K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.* 73, 242–50 (1999).
52. Mebatsion, T., Weiland, F. & Conzelmann, K. K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.* 73, 242–50 (1999).

53. Middleton, F. A. & Strick, P. L. Basal-ganglia “projections” to the prefrontal cortex of the primate. *Cereb. Cortex* 12, 926–35 (2002).
54. Miyamichi, K. *et al.* Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472, 191–6 (2011).
55. Morimoto, K., Foley, H. D., McGettigan, J. P., Schnell, M. J. & Dietzschold, B. Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *J. Neurovirol.* 6, 373–81 (2000).
56. Morimoto, K., Hooper, D. C., Spitsin, S., Koprowski, H. & Dietzschold, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* 73, 510–8 (1999).
57. Morimoto, K., Kawai, A., Sato, Y. & Ohkubo, A. A unique transcription mode of rabies virus high egg passage-Flury strain detected in infected baby hamster kidney-21 cells. *Microbiol. Immunol.* 55, 558–64 (2011).
58. Nagai, T., Sawano, a, Park, E. S. & Miyawaki, a. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3197–202 (2001).
59. Nagel, G. *et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13940–5 (2003).
60. Nakahara, K. *et al.* Intracellular behavior of rabies virus matrix protein (M) is determined by the viral glycoprotein (G). *Microbiol. Immunol.* 43, 259–70 (1999).
61. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137–41 (2001).
62. Nathanson, J. L. *et al.* Short Promoters in Viral Vectors Drive Selective Expression in Mammalian Inhibitory Neurons, but do not Restrict Activity to Specific Inhibitory Cell-Types. *Front. Neural Circuits* 3, 19 (2009).
63. Ohara, S., Inoue, K.-I., Witter, M. P. & Iijima, T. Untangling neural networks with dual retrograde transsynaptic viral infection. *Front. Neurosci.* 3, 344–9 (2009).
64. Ohara, S. *et al.* Dual transneuronal tracing in the rat entorhinal-hippocampal circuit by intracerebral injection of recombinant rabies virus vectors. *Front. Neuroanat.* 3, 1 (2009).



65. Osakada, F. *et al.* New rabies virus variants for monitoring and manipulating activity and gene expression in defined neural circuits. *Neuron* 71, 617–31 (2011).
66. Peterka, D. S., Takahashi, H. & Yuste, R. Imaging voltage in neurons. *Neuron* 69, 9–21 (2011).
67. Pulmanusahakul, R., Li, J., Schnell, M. J. & Dietzschold, B. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J. Virol.* 82, 2330–8 (2008).
68. Rowland, D. C. *et al.* Transgenically targeted rabies virus demonstrates a major monosynaptic projection from hippocampal area CA2 to medial entorhinal layer II neurons. *J. Neurosci.* 33, 14889–98 (2013).
69. Ryan, M. D., King, A. M. & Thomas, G. P. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 11, 2727–32 (1991).
70. Sawaguchi, T. & Iba, M. Prefrontal cortical representation of visuospatial working memory in monkeys examined by local inactivation with muscimol. *J. Neurophysiol.* 86, 2041–53 (2001).
71. Schmued, L. C. & Fallon, J. H. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377, 147–54 (1986).
72. Scott, B. B., Brody, C. D. & Tank, D. W. Cellular resolution functional imaging in behaving rats using voluntary head restraint. *Neuron* 80, 371–84 (2013).
73. St-Pierre, F. *et al.* High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nat. Neurosci.* 17, 884–9 (2014).
74. Subach, F. V *et al.* Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nat. Chem. Biol.* 5, 118–26 (2009).
75. Subach, O. M. *et al.* Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chem. Biol.* 15, 1116–24 (2008).
76. Tang, Y., Rampin, O., Giuliano, F. & Ugolini, G. Spinal and brain circuits to motoneurons of the bulbospongiosus muscle: retrograde transneuronal tracing with rabies virus. *J. Comp. Neurol.* 414, 167–92 (1999).
77. Tian, L. *et al.* imaging neural activity in worms , flies and mice with improved GcamP calcium indicators. *Nat. Methods* 6, 875–881 (2009).

78. Tuffereau, C. *et al.* Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172, 206–12 (1989).
79. Ugolini, G. 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 (1995).
80. Ugolini, G. Advances in viral transneuronal tracing. *J. Neurosci. Methods* 194, 2–20 (2010).
81. van den Pol, A. N. *et al.* Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatitis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression. *J. Comp. Neurol.* 516, 456–81 (2009).
82. Van den Pol, A. N. *et al.* Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatitis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression. *J. Comp. Neurol.* 516, 456–81 (2009).
83. Wall, N. R., De La Parra, M., Callaway, E. M. & Kreitzer, A. C. Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron* 79, 347–60 (2013).
84. Wall, N. R., Wickersham, I. R., Cetin, A., De La Parra, M. & Callaway, E. M. Monosynaptic circuit tracing in vivo through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21848–53 (2010).
85. Wickersham, I. R., Finke, S., Conzelmann, K.-K. & Callaway, E. M. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat. Methods* 4, 47–9 (2007).
86. Wickersham, I. R. *et al.* Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron* 53, 639–47 (2007).
87. Wickersham, I. R., Sullivan, H. a & Seung, H. S. Production of glycoprotein-deleted rabies viruses for monosynaptic tracing and high-level gene expression in neurons. *Nat. Protoc.* 5, 595–606 (2010).
88. Wickersham, I. R., Sullivan, H. a & Seung, H. S. Axonal and subcellular labelling using modified rabies viral vectors. *Nat. Commun.* 4, 2332 (2013).
89. Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Foggin, C. M. & Koprowski, H. Antigenic analysis of rabies and Mokola virus from Zimbabwe using monoclonal antibodies. *Dev. Biol. Stand.* 57, 199–211 (1984).

90. Wong, L.-F. *et al.* Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum. Gene Ther.* 17, 1–9 (2006).
91. Zemelman, B. V, Lee, G. A., Ng, M. & Miesenböck, G. Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33, 15–22 (2002).
92. Zhao, Y. *et al.* An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators. *Science* (80-. ). 1888, (2011).