

論文の内容の要旨

論文題目 Development of multiple pathway-specific gene transfer methods
based on the host specificity of avian sarcoma leukosis virus.
(鶏肉腫白血病ウイルスの宿主特異性に基づいた多経路選択的遺伝子
導入法の開発)

松山真

哺乳類の脳では、異なる部位に投射する神経細胞が局所に混在しています。そして近接した神経細胞であっても異った投射関係や機能を持っていることもあります。このように複数ある投射関係の機能的意義を局所で探索するためには、単に解剖学的な投射関係を明らかにするだけで無く、投射先の異なる神経細胞を遺伝学的に独立して操作できるようになることが必須といえます。

これまで経路選択的に神経細胞を制御するツールとして Cre/loxP、Tet-On/Off、TVA-EnvA といった遺伝学的ツールと逆行性ウイルスベクターとを組み合わせる方法が用いられてきました。しかし遺伝子発現を制御できる経路は同時に 2 つまでが限界で、知見が得られる神経回路の複雑性は低いままでした。そこで同時に使える遺伝学的手法を増やし、1 個体において神経回路の多数の投射をそれぞれ別個に制御できるようにすることが本研究の目標です。この同時使用という目的のためには、手法同士が相互干渉しないという条件が重要になってきます。

相互干渉のない手法を複数揃えるには基礎となる生命現象に特異性が高いものを選ぶことが重要であり、本研究ではウイルスの宿主特異性に着目しました。ウイルスが決まった感染宿主をもつのは、ウイルスが細胞内へ侵入するのに必要とする受容体の発現が限定的な組織、細胞種に限られているためです。逆にそうした受容体の発現を制御することでウイルスやウイルスベクターの感染を制御できるようになります。

私は数あるウイルスの中から、ニワトリ肉腫白血病ウイルス（以下 ASLV と略）に着目しました。ASLV には複数のサブグループがあり、ある受容体を有する鳥類細胞には特定のエンベロープを有する ASLV しか感染しないという報告があります。私は複数の神経経路に対する特異的遺伝子導入にこの性質を利用しようとしてしました。まず ASLV の感染受容体である鳥類の膜タンパク質の遺伝子配列を文献を元に収集し、鳥類細胞内でのシグナルカスケードに関係するドメインをエピトープタグと交換し、N 末端規則に沿って 2 番目のアミノ酸がバリンとなるような変更を加えました。これらの変更により異種タンパク質である鳥類受容体が哺乳類細胞に与える影響を下げつつ分解を抑えて十分量が発現するようにしました。変更を加えた受容体遺伝子 4 種類とエンベロープ遺伝子 4 種類はレンチウイルス作製のプラスミドにのせ替え、それぞれ ASLV 受容体

発現レンチウイルスと ASLV のエンベロープを持ったレンチウイルスを作製できるようにしました。

次にこれらのレンチウイルスを用いて、哺乳類細胞において特異的な感染を起し受容体-エンベロープのペアを実験的に明らかにすることにしました。まず受容体と緑色蛍光タンパク質 AcGFP1 をユビキタスプロモーターCMV の下流で発現するレンチウイルスをヒト胎児腎細胞由来 HEK293T 細胞の培地に加え、3 日後に ASLV のエンベロープでシュードタイプした赤色蛍光タンパク質 mCherry を CMV の下流で発現するレンチウイルスを培地に加えました。AcGFP1 の蛍光により受容体の発現を検出し、赤色蛍光の発現の有無をコントロールを含む全 20 通り (=エンベロープ 4 種類×コントロールと受容体 4 種類で 5 種類) について調べました。

するとそのうち 3 通りの組合わせで強い赤色蛍光を発する細胞が高頻度に観察されました。一方で一部の受容体を発現する細胞には 2 種類のエンベロープの両方において蛍光が観察され、特異性は既報と比較して厳密には保たれていないことがわかりました。

そこで哺乳類細胞に存在するホモログタンパク質 Death Receptor 5 と TVB の間で相同ドメインの交換を行うことで、受容体 DR-46-TVB を作製しました。この受容体を HEK 293T 細胞に発現させると EnvE でシュードタイプしたレンチウイルスでのみ赤色蛍光が観察されました。

ここまでの結果を定量的に測定する為、フローサイトメトリーで mCherry が発現した HEK 293T 細胞数を測定しました。その結果、全 4 通りの組み合わせでのみ受容体発現細胞の 97% 以上で赤色蛍光が検出され、それ以外の 16 通りの組合わせでは 2 % 以下の細胞でしか検出されませんでした。しかし HEK 293T 細胞は神経由来の細胞ではないため哺乳類脳で *in vitro* と同じ様に特異性が再現されるとは限りません。次の段階としてラット大脳において実際に経路依存的な遺伝子導入が出来るペアの同定を行いました。

実験系としては、ラット体性感覚野に受容体遺伝子を搭載した逆行性に感染するレンチウイルスを注入し、異なるエンベロープでシュードタイプされた異なる蛍光タンパク質 (BFP、EGFP、tdTomato) を発現するレンチウイルスの混合液を 3 週間後に視床に注入しました。体性感覚野へと投射する神経細胞には受容体が発現し、発現した蛍光タンパク質の種類で感染したエンベロープの種類が判別できます。

細胞に発現した各種蛍光タンパク質の波長を共焦点顕微鏡で分離した上で、受容体の発現をエピトープタグに対する抗体を用いた免疫組織染色で検出し、感染特異性の定量化を行いました。蛍光タンパク質を発現した神経細胞における受容体発現率は *in vitro* で同定された組合わせでは 98% 以上と非常に高く、かつそれ以外の組み合わせで感染が起こった神経細胞は存在しませんでした。この様に *in vitro* 実験で同定した 4 組のうち *in vivo* 実験で機能することが示されたのは 3 組になりました。

最後にこの新規手法が相互作用がなく同時使用できることを *in vitro* と *in vivo* 両方

において実証しました。1 種類の受容体を発現させた HEK 293T 細胞を 1 つのディッシュ上に混合して培養し、ASLV のエンベロープでコートされたレンチウイルスを 3 種類混合して加えました。特定のペアでのみ高確率で感染が起こった結果、細胞ごとに異なる蛍光タンパク質が発現しました。そしてラット脳では体性感覚野の 3 つの領域に逆行性に感染するレンチウイルスベクターを注入し 3 種類の受容体を 1 個体に発現させました。そして投射先の異なる神経細胞が入り混じる視床に、ASLV のエンベロープでコートされたレンチウイルスを 3 種類混合して注入すると、投射先の異なる神経細胞集団に異なる蛍光タンパク質が発現しました。この実験において相互作用の少ない多経路依存的遺伝子導入法が実証されました。

以上より、本研究ではニワトリ肉腫白血病ウイルスのサブグループと感染宿主の受容体との組み合わせから、特異的感染を起す組み合わせを培養細胞とラット脳を用いて 3 組同定しました。また逆行性レンチウイルスベクターと組み合わせることで、投射先の異なる神経細胞が入り混じる局所神経回路において、経路依存的な遺伝子操作が可能になることを実証的に示しました。今回開発した方法により、これまで不可能であった、複数ある神経回路の機能意義を独立して探索することが可能になると期待されます。一方で、受容体のコドンが哺乳類に最適化されていない、ASLV のエンベロープでシェードタイプしたレンチウイルスのタイターが水泡性口内炎ウイルスのエンベロープと比較して低いなど改善点も存在します。より感染効率の高い遺伝子導入システムの構築が今後の課題と考えられます。(2818 字)