

(様式 3)

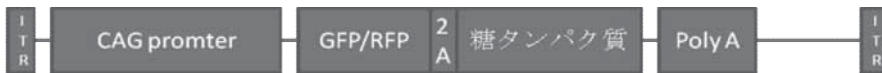
## 平成22年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	新規越シナプス性神経回路トレース法を用いた物体視に関わる神経回路の解析
応募事業区分	若手研究者支援
申請代表者氏名	森 琢磨

## ○ 研究状況報告

これまでの研究の実施状況について、当初の計画に記載した、糖タンパク質補完のための AAV ベクターの作成、および遺伝子改変狂犬病ウイルスベクターを用いた越シナプストレース法の実施について報告する。

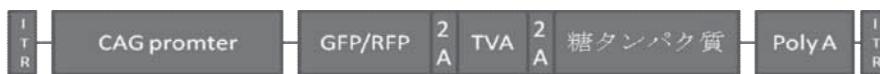
AAV ベクターは様々な血清型が存在し、動物種および脳組織の感染特性によって、利用できる血清型が異なることが知られている。一般的に中枢神経系に感染する血清型は 1 型、2 型、5 型である。申請代表者はこれまでに、血清型 1 型、2 型について視床 LGN への感染効率を評価した。下図 1 構造を持った AAV ベクターを LGN へ注入した結果、血清型 1 型では、2 型と比較してより多くの細胞に対する感染細胞が観察された。



次に糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスベクターを用いた越シナプストレース法について述べる。糖タンパク質および蛍光タンパク質を発現する血清型 1 型 AAV ベクターを注入し、その 3 週間後に糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスベクターを注入し、越シナプストレース法を実施したところ、網膜で神経細胞が観察されたのは 8 例中 1 例であった。成功しなかった 7 例は、LGN にて 2 つのウイルスベクターが共感染していなかった。網膜神経節細胞が確認されたという結果は、AAV による糖タンパク質補完は可能であることを示しているが、同時に、より効率の良い共感染法の確立の必要性を示している。この共感染法の改良については次項および平成 23 年度研究計画書に記載した。

## ○ 当該事業年度において達成された研究成果

当初の研究計画に記載された研究成果についてはすでに上記の通りである。ここでは、平成 23 年度研究計画につながる手法の準備のうち達成されたものについて記載する。平成 23 年度研究計画書に記載した通り、共感染効率を高めるための TVA 受容体を発現させるための AAV ベクターの作成(下図)をおこなった。また、より安全な狂犬病ウイルスベクターに基づく実験系を立ち上げるために、従来の SAD-Bern 株ではなく HEP 株を基にした糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスベクターの作成に必要なプラスミドなどを作成した。



## ○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付) 特になし

## 平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	新規越シナプス性神経回路トレース法を用いた物体視に関わる神経回路の解析
応募事業区分	若手研究者研究支援事業
申請代表者氏名	森 琢磨

## ○ 研究状況報告

平成23年度に実施した研究のうちから、特に研究成果として発表された、ヒトワクチン株 (HEP-Flury 株) に基づく、糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスの作成について述べる。これまでに申請者らがアメリカで開発した糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスは欧州動物実験株 (SAD 株) に基づくものであった。このウイルス株は弱毒化されているが、致死性があるため、致死性のない HEP-Flury 株を材料に糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスを作成した。

次に、糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスヒトワクチン株 (HEP-deltaG) を用いた神経トレースの実施について述べる。後述する通り、HEP-deltaG はすでに確立された SAD 株同様のトレース効率を示した。逆行性に神経細胞を可視化するという特性を生かし、長距離に軸索を投射する (例: 反対大脳半球に軸索を投射する) 神経細胞や、網膜神経節細胞が可視化され、現在その形態的特徴を解析中である。

## ○ 当該事業年度において達成された研究成果

当該年度において達成された研究成果のうち、すでに学会発表を行い、論文として掲載準備のできているものについて記載する。前述の HEP-Flury に基づく糖タンパク質欠損狂犬病ウイルス (HEP-deltaG) を作製する上で、ウイルス作成効率に影響する要因のうち、これまで明らかになっていなかったことを2つ発見した。

まず、RNA ウイルスである狂犬病ウイルスのゲノムの末端構造を正確に作製する上で使用したリボザイム配列に、狂犬病ウイルス作成に適した配列があることを見いだした。これまで RNA 5 末端を切断するハンマーヘッド型リボザイム配列のリボザイム活性は野生型狂犬病ウイルスの作成効率に影響を与えないと考えられていた。しかし、糖タンパク質欠損ウイルスという増殖能に欠けるウイルスを作成する際には、このリボザイム活性は作成効率を大きく変化させることが明らかになった。

次に、糖タンパク質欠損狂犬病ウイルスを作成するときに外来的に補完される狂犬病ウイルス糖タンパク質が由来する株の違いがウイルス作成効率に大きな影響を与えることを明らかにした。これは同じ狂犬病ウイルスであっても、アミノ酸配列のわずかな差によって、ウイルス産生が劇的に阻害されていることを示唆している。この知見は、ウイルスベクターの作成効率にとどまらず、狂犬病ウイルスの増幅阻害に関わる重要な知見であると考えている。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)  
なし