第 1 領域 （公募班員）			
研究課題名	光・分子イメージングを用いた運動関連領野の機能的構造の研究		
研究代表者名	飯島　敏夫	E-mail	t-iijima@mail.tains.tohoku.ac.jp
所属・職名	東北大学大学院生命科学研究科・教授		
研究分担者名			
分担者所属			

研究成果報告書

神経向性ウイルスは、シナプスを介してニューロンからニューロンへ移動し、感染細胞で複製により遺伝情報を自己増幅する。この特性から、神経ネットワークを調べる上で非常に有用なツールとして近年、注目されている。また最近、異なるレポータータンパク質を発現する二つの組み換えウイルスを用いて、経シナプス性二重標識法という新しいウイルストレーシング法が開発された。この手法を用いると、異なる神経回路をそれぞれ別種の蛍光タンパクで標識することができ、また、二つの異なるレポータータンパクの共局在から、２つの神経回路の結合を検出することができる。このような神経回路解析法は高次脳機能を支える複雑な神経回路の解析、例えば神経回路の収斂と発散を調べるなど、には非常に有用な手法であるが、これまでは抹消神経系においてのみ適用され、中枢神経系の適用例はない。そこで、我々は中枢神経系における経シナプス性二重標識法の開発を行い、中枢神経系への適用を試みた。

まずウイルスベクターの感染伝播能の特異性、及びレポータータンパク質の発現能を向上させため、幾つかの改変を加えた。はじめに狂犬病ウイルスの感染特異性に大きく関わる G 蛋白質を、HEP-Flury 株よりも病原性が高く特異的な感染伝播様式を持つ CVS 株由来のものと組換えた。これにより、ベクターの神経細胞への感染選択性や逆行性感染伝播の特異性が顕著に増大した。次に外来遺伝子の発現向上を試みた。ラブドウイルス科に属するウイルスは遺伝子の順序という非常に単純な方法で遺伝子発現量を調整しており、3’のプロモーター部位に近い遺伝子ほど転写量が高く、遠くに位置する遺伝子ほどその距離に応じて転写量が低くなることが知られている。そこで、外来遺伝子発現用転写ユニットをウイルスゲノムの 3’末端付近に持つ改変ウイルスベクターを開発した。外来遺伝子として単量体赤色蛍光タンパク質遺伝子を組み込み、性状を解析したところ、従来のベクターと比較して発現効率が大幅に上昇したことが確認できた。

次いで我々は異なるレポーター遺伝子を組み込んだ幾つかの改変狂犬病ウイルスベクターを作製し、神経回路の二重標識の確立を試みた。しかし、ここでウイルス干渉という大きな問題に直面した。ウイルス干渉とは、先行して感染したウイルスが近縁ウイルスの同一細胞への重感染を阻害する現象で、これにより二重標識効率が低下する。ウイルス干渉による二重標識阻害の実態をまず明らかにするため、異なるレポーター遺伝子を発現する二つのウイルスベクターの感染時間差と二重標識効率の関係をまず *in vitro* で、次いで *in vivo* で調べた。その結果、感染時間差が数時間以内であれば高効率な二重標識が可能であることが示され、げっ歯類、および霊長類の神経回路解析で新しい情報が得られた。