

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	松井 亮介
論文題目	アデノ随伴ウイルスベクターによる鳥類中枢神経系への遺伝子導入法の開発		
（論文内容の要旨） ニワトリは神経細胞の発生分化や神経回路形成のプロセスを研究するための代表的なモデルシステムであり、ニワトリ胚や個体への遺伝子操作法としてエレクトロポレーションやレンチウイルスを含むレトロウイルスベクターが従来より用いられてきた。これらの遺伝子操作法により発生初期胚に関しては効率よく遺伝子導入が可能であるが、神経細胞のような非分裂細胞に対して、障害することなく高効率に遺伝子導入するのは困難であった。この問題を解決するために、非分裂細胞の鳥類神経細胞において遺伝子導入が可能なウイルスベクターの探索をおこなった。その結果、ウズラの気管支より単離された鳥類アデノ随伴ウイルス（A3V; Avian adeno-associated virus）の組換えウイルスベクターによりニワトリの神経細胞へ効率よく遺伝子導入が可能であることを見いだした。A3Vベクターを孵化後のニワトリ脳へ注入したところ、24時間以内に神経細胞特異的に遺伝子発現を示した。このようにA3Vベクターが素早い遺伝子発現特性を有することから、A3Vベクターは孵化後数日間に限定的に観察される刷り込み学習の神経機構を研究する有用なツールとして期待できる。さらに胎生1.5～4.5日齢に神経管内腔へA3Vベクターを注入したところ、脳幹部の神経細胞では遺伝子発現は少なくとも孵化直前まで持続することが確認できた。脳幹部には両側の耳に到達する時間差、音圧差を利用して音源の位置を正確に検出する音源定位を行う聴覚系神経回路が存在するが、神経管内腔へA3Vベクターを注入する時期に応じて、聴覚系神経回路における遺伝子発現パターンが変化することを見出した。この結果に基づき、A3Vベクターを改良し、脳幹部聴覚系神経回路の中で大細胞核および層状核から構成される時間差検出回路のうち大細胞核選択的に遺伝子導入する技術の開発に成功した。これにより未解明な点が多い音源定位の神経回路形成や情報処理の分子メカニズムの解明が期待できる。以上のように従来の遺伝子導入技術に加えてA3Vベクターを用いることで神経回路形成プロセスと神経情報処理メカニズムの研究が進展すると期待できる。			

(論文審査の結果の要旨)

ニワトリ (*Gallus gallus*) は、発生生物学のみならず脳研究のモデル動物として古くから使われてきた。孵化前後のニワトリ生体への遺伝子操作法として、エレクトロポレーションやレンチウイルスを含むレトロウイルスベクターが従来より用いられてきた。これらの遺伝子操作法により発生初期の細胞へは効率よく遺伝子導入が可能であるが、最終分化した神経細胞に対して高効率かつダメージの少ない遺伝子導入は困難であった。

申請者は、初代分散培養系を用いてニワトリ中枢神経系への遺伝子導入に適したウイルスベクターの探索をおこなった。その結果、ウズラ由来の鳥類アデノ随伴ウイルス (A3V; Avian adeno-associated virus) の組換えウイルスベクターによりニワトリの神経細胞へ高効率な遺伝子導入が可能であることを見いだした。次に生体における効果を調べるために、大脳外套部 (皮質部) および線条体へA3Vベクターを注入したところ、24時間以内に神経細胞特異的に遺伝子発現を示した。このようにA3Vベクターが素早い遺伝子発現特性を有することから、A3Vベクターは孵化後数日間に限定的に観察される刷り込み学習の神経機構を研究する有用なツールとして期待できる。

さらに胎生1.5～4.5日齢に神経管内腔へA3Vベクターを注入したところ、脳幹部の神経細胞では遺伝子発現は少なくとも孵化直前まで持続することが確認できた。脳幹部には両側の耳に到達する時間差、音圧差を利用して音源の位置を正確に検出する音源定位を行う聴覚系神経回路が存在するが、神経管内腔へA3Vベクターを注入する時期に応じて、聴覚系神経回路におけるレポーター遺伝子の発現パターンが変化することを見出した。この結果に基づき、A3Vベクターを改良し、脳幹部聴覚系神経回路の中で大細胞核および層状核から構成される時間差検出回路のうち大細胞核選択的に遺伝子導入する技術の開発に成功した。これにより未解明な点が多い音源定位神経回路の成熟プロセスや情報処理に関する分子メカニズムの解明が期待できる。

以上のように従来の遺伝子導入技術に加えてA3Vベクターを用いることで、刷り込み学習や音源定位のようにマウス等小型哺乳類モデル動物では研究困難であった神経機構の解明に大いに寄与すると考えられる。以上により、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。平成25年2月6日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日