

2. 研究成果

(1) 計画研究

A-1 霊長類脳内遺伝子導入に有益な新規ウイルスベクターの開発

小林和人, 小林憲太, 加藤成樹(福島医大・医) 所内対応者: 高田昌彦

我々は、これまでに、高田昌彦教授との共同研究により、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RV-G)の細胞外・膜貫通ドメインと水泡性口内炎ウイルス(VSV-G)の細胞内ドメインから構成される融合糖タンパク質 B 型(FuG-B)を開発し、逆行性遺伝子導入の効率を向上させることに成功した。また、RV-G 細胞外ドメイン N 末端領域と VSV-G 細胞外ドメイン C 末端領域を含み、VSV-G 膜貫通・細胞内ドメインに連結した融合糖タンパク質 C 型(FuG-C)を作製し、本ベクターは高い頻度の逆行性遺伝子導入を可能にしたばかりでなく、FuG-B を用いたベクターに認められた注入部位でのグリア細胞への導入がほとんど認められず、神経細胞に特異的な遺伝子導入が可能なことを示した。この性質は、ベクター注入による組織損傷を防止するために有益であると考えられる。本研究では、FuG-C をさらに改善することにより、逆行性遺伝子導入の効率をより向上させる糖タンパク質の開発を試みた。FuG-C における RV-G と VSV-G の融合ジャンクションを至適化するため、ジャンクションを前後に移動させた融合糖タンパク質を作製し、ウイルスベクターの逆行性遺伝子導入効率を解析した。これまでに、VSV-G の C 末端領域が 14 アミノ酸から 18 アミノ酸の範囲で、高い導入効率を示すことが判明した。今後、この範囲の中で、ジャンクションがどの位置になる時に最も導入効率が高くなるかを検討する予定である。本ベクターの開発は、経路選択的に細胞あるいは遺伝子機能を操作し、行動特性を制御する遺伝子機能や高次脳機能を解析するための霊長類モデル開発に有益な技術を提供する。

A-2 ゲノムによる霊長類における脳機能の多様性の解明

橋本亮太(大阪大・院・連合小児発達学研究所), 安田由華, 山森英長(大阪大・院・医学研究)

所内対応者: 今井啓雄

統合失調症、双極性障害、うつ病などの精神疾患に関連することがすでに知られているリスク遺伝子である COMT、BDNF、DISC1 についての検討を行った。COMT(catechol-O-methyltransferase gene)は、ドーパミンの代謝酵素であり、COMT には機能的遺伝子多型(Val158Met)があることが知られている。Val 多型は Met 多型と比較してドーパミンを代謝する酵素活性が高いことから、ヒトの前頭葉において Val 多型では Met 多型よりドーパミンが多く代謝され、ドーパミン量が低下することが想定される。そこで、統合失調症において障害されていることが知られている前頭葉課題である WCST を行い、Val 多型を持つと Met 多型を持つものより WCST の成績が低いことを見出した。さらに、前頭葉機能効率を fMRI にて測定し、Val 多型を持つものではその効率が悪いことを示した。最後に、遺伝子関連解析により、Val 遺伝子多型は統合失調症のリスクとなることを報告している。すなわち COMT 遺伝子の Val 多型は Met 多型と比較して COMT 酵素活性が高く、その結果、前頭葉のドーパミン量が低下し、前頭葉機能効率が悪くなり、統合失調症のリスクとなるということである。

マカク類において、エクソンシーケンシングを行い、COMT のミスセンス変異を発見した。次に、大規模にこのミスセンス変異をタイピングする必要があるため、タックマン法を用いて、大量タイピング法を確立した。現在は、霊長研における多種・多数のサルゲノムサンプルの調整中であり、大規模なスクリーニングを行う予定である。

ヒトにおいても、脳表現型を測定し、ゲノム多型との関連の検討を行い、有望な遺伝子については、霊長類における検討を進めたいと考えている。

A-3 行動特性を支配するゲノム基盤と脳機能の解明に向けた神経解剖学的検索

南部篤, 畑中伸彦, 知見聡美, 額額大輔(生理研・生体システム) 所内対応者: 高田昌彦

逆行性のレンチウイルスベクターとイムノトキシンを用いることにより、特定の神経経路のみを選択的に除去する方法を開発し、サルの大脳基底核に応用することにより、ハイパー直接路(大脳皮質-視床下核路)のみを除去することに成功した。具体的には、ヒトインターロイキン 2 受容体と狂犬病糖タンパク質を発現するレンチウイルスベクター(NeuRet-IL-2R α -GFP ウイルスベクター)を開発し、ニホンザルの視床下核に注入した。狂犬病糖タンパク質の働きによって、逆行性到大脳皮質-視床下核投射ニューロンの細胞体に、ヒトインターロイキン 2 受容体が発現されると考えられる。発現を待って、大脳皮質のうち、補足運動野にイムノトキシンを注入した。

大脳皮質運動野を電気刺激して、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節で神経活動を記録すると、早い興奮・抑制・遅い興奮の 3 相性の神経活動が記録できる。実際、イムノトキシン注入前は、補足運動野を刺激すると同様な 3 相性の活動が記録できた。しかし、イムノトキシン注入後は、多くの淡蒼球内節ニューロンにおいて、早い抑制は観察されず、抑制と遅い興奮の 2 相性の反応のみが観察された。これまでの研究によれば、早い興奮はハイパー直接路(大脳皮質-視床下核-淡蒼球内節路)、抑制は直接路(大脳皮質-線条体-淡蒼球内節路)、遅い興奮は間接路(大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路)を介していることが明らかになっているので、本実験結果は、直接路・間接路に影響を与えることなくハイパー直接路のみが選択的に除去されたことを示すと同時に、早い興奮がハイパー直接路を介していることも示している。また、組織学的な検索により、補足運動野から視床下核に投射