

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 直交型感染性ウイルスベクターを用いた  
新規神経回路解析システムの開発

氏名 鈴木 俊章

## 論文内容の要旨

21世紀は「脳の世紀」と謳われて10余年が経ち、脳に関する様々な発見がなされてきた。しかし、未だ謎は多く残されている。これまでに遺伝子や分子の挙動といったミクロな視点から、領野毎の機能解析等のマクロな切り口まで様々なレベルの研究がなされてきた。しかし、個々の神経細胞を素子とする神経回路がどのように構成され機能するかというメゾスコピックな視点からの理解は遅れている。近年、このメゾスコピックな回路レベルでの解析手法として、*optogenetics* やウイルスベクター等の分子生物学ツールが開発された。しかしこれらの手法では、高次脳機能を生み出す神経回路間の相互作用を明らかにすることはできなかった。そこで著者は本研究において、単一個体で複数の神経回路を同時に標識できる G 欠損型狂犬病ウイルスベクター (RVΔG) の新規ツールを開発し、以下の新知見を得た。

RV は感染細胞からシナプスを介して逆行性に感染を拡げる。このシナプスを介した感染にはエンベロープ糖タンパク質 G が必要である。この性質により、G を発現する細胞に RVΔG が感染した際、その1次感染細胞と単シナプス結合する細胞群に RVΔG が逆行性に2次感染する。さらに、RVΔG を特定の細胞にのみ感染させるために、EnvA/TVA システムが開発された。トリ白血病肉腫ウイルス (ASLV) 由来エンベロープ EnvA で偽型した RVΔG は、EnvA 特異的な受容体である TVA を認識し、ウイルス感染が成立する。この性質を利用して、TVA を発現させた標的細胞にのみ RVΔG を1次感染させることができる。これらを組み合わせることで、TVA および G を発現する細胞 (starter cell) に入力する細胞群を標識でき、神経回路の構造を明らかにすることができる。

しかし、現行の EnvA/TVA システムでは、TVA を発現する1細胞・集団に由来する神経回路のみしか標識することができず、複数の神経回路の関係性について単一個体

を用いた解析はできない。そこで、複数の神経回路を同時に解析するために、異なる ASLV 株が有する感染系に注目した。EnvA/TVA と独立した RVΔG の感染システムの候補として、EnvB、EnvC、EnvE をエンベロープに選択した。偽型 RVΔG を作製するために、細胞内ドメインを G の細胞内ドメインに置換したキメラエンベロープ oEnvX (optimized EnvX) を作製した。これら oEnvX は、それぞれ偽型 RVΔG を効率良く産生した。oEnvX に対する受容体の特異性を検討したところ、oEnvA-、oEnvB-、oEnvE-RVΔG は各々の受容体である TVA、TVB、DR46-TVB 発現細胞にのみ感染した。

RVΔG を用いた解析では、starter cell に発現する TVX のレポーターシグナルが検出できない場合は、starter cell と 2 次感染細胞の区別ができないという問題が生じる。これは、受容体の親和性が高い場合に、受容体の発現量がレポーターシグナルの検出限界以下でもウイルス感染を起こすことに起因する。そこで、starter cell を効率的に蛍光レポーターで同定するために、受容体の親和性を変化させることで、偽型 oEnvX-RVΔG に対する受容体 TVX を最適化した。また緑色や赤色の機能性蛍光プローブタンパク質 (e.g. GCaMP、GCh) などを併用することを想定し、異なる波長域の蛍光タンパク質融合型受容体の作製を目指した。

まず oEnvA を特異的に認識する TVA<sup>950</sup> の最適化に取り組んだ。細胞外ドメインに一塩基変異を導入することで親和性を低減させた既存の TVA<sup>950E66T</sup>-mCherry をモデルとし、近赤外蛍光タンパク質である iRFP670 を融合した TVA<sup>950E66T</sup>-iRFP670 (oTVA-L-iRFP: optimized TVA with low affinity) を作製した。oTVA-L-iRFP は、TVA<sup>950E66T</sup>-mCherry と同等の親和性を *in vitro* および成体マウス脳において示した。

次いで、EnvB 受容体である TVB を最適化した。EnvB への特異性が高い TVB<sup>S3</sup> を蛍光標識するために、細胞内ドメインの C 末端の一部を青色蛍光タンパク質 tagBFP で置換した TVB<sup>S3</sup>-tagBFP を作製した。しかし、細胞内で凝集するなど異常な局在を示した。そこで、蛍光タンパク質を融合しても膜に局在する TVA<sup>950</sup> の細胞内ドメインに置換した TVB<sup>S3</sup>-TVA-tagBFP (oTVB-H-BFP: optimized TVB with high-affinity) を作製した。この oTVB-H-BFP は、tagBFP シグナルは細胞膜に認められたが、tagBFP シグナルが観察されない発現量の細胞においても oEnvB-RVΔG の感染を起こした。そこで、oTVB-H の oEnvB に対する親和性を低減させるために複数の変異体を作製した。その結果、TVB<sup>S3</sup> の細胞外領域を構成する 3 つの cysteine rich domain (CRD) の内、CRD3 を欠損させた TVB<sup>S3ΔCRD3</sup>-TVA-tagBFP (oTVB-L-BFP: optimized TVB with low affinity) が特異性を保ちながら、低い親和性を示した。この変異体に対する oEnvB-RVΔG の感染能を *in vivo* で評価したところ、レポーターの tagBFP 陽性細胞として 1 次感染細胞を同定することができた。このように 2 種の異なる親和性をもつ新規受容体 oTVB-H および oTVB-L を開発した。

さらに、EnvE を認識する DR46-TVB を最適化した。DR46-TVB は野生型 TVB と同一の細胞内ドメインを持つため、TVB と同様に細胞内ドメインを TVA<sup>950</sup> に置換した DR46-TVB-TVA-mCherry (oTVE-H-mCherry: optimized TVE with high-affinity) を作製した。*In vivo* にて oEnvE-RVΔG の感染能を評価したところ、mCherry シグナルが観察さ

れない発現量の細胞にて oEnvE-RVΔG が感染した。以上より、oTVE-H は高親和性の新規 oEnvE-RVΔG 受容体となることが示された。

以上の結果より、oTVB-H と oTVE-H は *in vivo* single cell electroporation などの高い発現量が期待できない条件で活用できる高親和性受容体であること、oTVA-L-iRFP と oTVB-L-BFP は一般的な神経回路標識に活用でき、受容体に融合した蛍光シグナルで starter cell を同定できる低親和性受容体であることが示された。

次いで、生体における oTVA-L-iRFP と oTVB-L-BFP との交差性を検証するため、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いてマウス大脳皮質一次視覚野 (V1) の異なる集団にそれぞれの受容体を発現させた。その後、oEnvA-RVΔG と oEnvB-RVΔG の混合ウイルスを V1 に注入したところ、対応する受容体特異的にウイルス感染が認められた。この結果より、これら oEnvA/oTVA-L および oEnvB/oTVB-L の感染システムは *in vivo* にて同時に使用できることが示された。

本研究にて得られた oEnvA/oTVA、oEnvB/oTVB システムを用いて、異なる 2 種の神経回路の関連を明らかにする目的で、① 投射先が異なる神経回路、② 細胞種が異なる神経回路に着目し、成体マウスの 2 種類の細胞集団について同時に経シナプス標識を行った。①中脳上丘へ投射する V1 の第 5 層神経細胞に AAV を用いて oTVA-L-iRFP と G を、高次視覚野 LM へ投射する V1 の第 5 層神経細胞に oTVB-L-BFP と G を発現させた。2 週間後に oEnvA-RVΔG-DsRed と oEnvB-RVΔG-GFP の混合ウイルスを感染させた。その結果、RVΔG-DsRed あるいは RVΔG-GFP の 2 次感染細胞は多数の脳領野に分布したが、両者の共感染細胞は認められなかった。以上の結果より、異なる領野へ出力する 2 種類の V1 の第 5 層細胞は、互いに独立した入力情報を統合・処理し、統合した情報を特定の領野へ出力していることが示唆された。

② V1 の抑制性神経細胞と第 5 層の興奮性神経細胞が構成する神経回路の違いに着目した。細胞種特異的プロモーターと Cre/loxP システムを用いて、対象の細胞に oTVA-L-iRFP と oTVB-L-BFP をそれぞれ発現させ、oEnvA-RVΔG-DsRed と oEnvB-RVΔG-GFP を注入した。その結果、RVΔG-DsRed と RVΔG-GFP の共感染細胞が、V1 だけでなく、V1 に視覚情報を入力することが知られている外側膝状体にも認められた。以上の結果より、V1 の抑制性神経細胞と第 5 層の興奮性神経細胞は、外側膝状体の神経細胞からの共通入力を受けることが示唆された。本回路解析法を用いることで、外側膝状体の神経細胞が V1 の第 5 層細胞および抑制性細胞の両者に入力する新たな情報伝達様式を見出すことに成功した。

以上、著者は新規ウイルス感染システムを開発することで、RVΔG による神経回路標識の多重化を可能にした。直交型感染性ウイルスベクターを用いた本神経回路解析法は、これまでに挑戦できなかった複合的な神経回路解析の基盤技術になり、神経回路の情報処理の仕組みの理解に大きく貢献すると期待される。本研究成果は、脳機能の解明および神経・精神疾患の病態解析や病因究明に資する極めて重要な基礎的知見を提供するものである。