

平成 17 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 18 年 3 月 6 日提出

ふりがな	おかどはるお	所属・職	財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
開発代表者名	岡戸晴生		
開発課題名	神経科学のためのウイルスベクターの開発		
<p>開発経過及び成果(開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること)</p> <p>①レンチウイルスベクターの作製 レンチウイルスベクターは GFP(Lv MSCV GFP)、calbindinD28k(CB) (Lv MSCV CB)、その両者を発現するもの(Lv MSCV CB/ EF1a GFP)の3種を作製し、超遠心による濃縮精製したところ高タイターであった(10^{10}-10^9 TU/cell、Hela細胞を用いたタイター測定系による)。Lv MSCV GFPをマウス線条体に微量注入したところ、注入部位のニューロンに GFP の発現が認められ、軸索を黒質まで追うことができた。GFP と CB の二重染色により CB 陽性、陰性両ニューロンに導入できることを確認した。同様に Lv MSCV CB/ EF1a GFP を注入したところ注入部位の GFP 陽性ニューロンのほとんどで CB の発現が認められた。従って、レンチウイルスベクターによって線条体の CB 陰性ニューロンに CB を発現させることができることが確認できた。</p> <p>転写抑制蛋白 RP58 の発現抑制のために siRNA コンストラクトの作製を開始した。RP58 の翻訳領域から5つの配列を選択し siRNA 発現ベクターを作製した。株細胞において発現抑制効果を持つものを、胎児の脳室に GFP 発現ベクターとともに注入し、脳室帯ニューロンに電気穿孔法を用いて導入し(慶応大学仲嶋先生との共同研究)、RP58 欠損マウスでみられる細胞移動障害の有無を検討した。細胞移動障害はごく軽度であり、内在性 RP58 の発現減少が不十分である可能性がある。</p> <p>②脳形態形成あるいは高次機能解析に有用なウイルスベクターを作製するために、細胞移動、回路形成に関与する転写抑制蛋白 RP58 のターゲットの検索をした。 RP58 欠損マウスと野生型の胎生 15 の大脳皮質の DNA マイクロアレイ解析をしたところタキキニン遺伝子(Tac1)が RP58 で増加していることを見出した。この遺伝子のプロモータにはランダムな DNA 断片と PCR を組み合わせて(CAST Protocol) 同定した RP58 の結合 DNA 配列を発現調節領域に含んでいることを見出した。従って Tac1 遺伝子は転写抑制蛋白 RP58 のターゲット遺伝子である可能性がある。</p> <p>③グリア細胞に発現し、学習機能に関与するクリンゴンを同定した。</p>			

開発成果を踏まえた今後の展開

1, 作製した CalbindinD28 発現アデノウイルスベクターを用いて黒質の CB 陰性ドーパミンニューロンに CB を発現させ、CB の細胞保護作用を検討する予定である(東京都神経研高田先生との共同研究)。

GluR2Q 発現レンチウイルスベクターを作製し、マウス線条体に注入し発現を確認する。アポモルフィン投与後の行動観察をおこないカルシウム透過型グルタミン酸受容体いドーパミン伝達系いおけるカルシウム透過型グルタミン酸受容体の意義を解析する。

2, RP58 の siRNA の有効性の確認ののち、レンチウイルスを用いて in vivo で発現させ、RP58 機能解析をする。この方法は、遺伝子の機能を空間時間的に限定的に解析する方法として汎用性が高いと考えられる。内存在性 RP58 の発現減少程度を評価するために RP58 の特異抗体を作製する。

レンチウイルスは発現量が低いため、RNAi のほかに、ドミナントネガティブ体を利用することを試みる。P58 は POZ ドメイン、Zn フィンガーモチーフをもつ。そこでそれらの欠損体および RP58 のスプライスバリエントを作製し、転写抑制活性を基準に RP58 に対してドミナントネガティブにはたらくコンストラクトを同定する。次に、それを発現するプラスミドベクターを用いて脳室に投与し、脳室帯ニューロンに電気穿孔法を用いて導入し、RP58 欠損マウスでみられる細胞移動障害の有無を検討する。

RP58 の機能解析のために、初代培養ニューロン RP58、およびその変異体を発現させるためにそれらのアデノウイルスベクターを作製する。

3, これまでアデノウイルスベクターをトレーサーとして有効であったが、レンチウイルスベクターでも同様の実験を試みる。レンチウイルスの場合、ゲノムに組み込まれるため、長期にわたる解析が期待できる。

4, CaMK α , β およびその変異体の GFP 融合蛋白を発現するアデノウイルスベクターを作製する。