

平成 18 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 19 年 2 月 28 日提出

ふりがな	おかどはるお	所属・職	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 CalbindinD28k の強制発現のためのレンチウイルスベクターを、より高いタイターを得る目的で pCAGkGP4.1R を新たに利用して作製した。本実験で利用したレンチウイルス作製用プラスミド (pCL20cMSCV-GFP あるいは pCL20csEF1a-GFP) は日本医大の埴先生より供与された。本ウイルスは共同研究でサル脳、黒質-線条体培養系で利用されている。</p> <p>RP58 解析のための RP58 発現レンチウイルスを作製した。RP58 のノックダウンのための shRP58 はプラスミドベクターとして作製して、転写抑制活性を有することを確認した。内存在性 RP58 の発現減少程度を評価するために RP58 の特異抗体の作製に成功した。</p> <p>②レンチウイルスベクターのプロモータ解析への利用：レンチウイルスベクターを用いて、神経細胞におけるプロモータ解析をする系の開発を試みた。RP58 は配列 (BS10) 依存的に転写を抑制することが見出されている (Aoki et al, 1998)。われわれは RP58 欠損マウスの解析から、リーリングナルが RP58 を介して RP58 の標的遺伝子を制御しているという仮説をたてた。この仮説を検討するために、SV40 のプロモータと BS10 配列を上流に持つレポータ遺伝子 (ホタルルシフェラーゼ) を有するレンチウイルスベクター作製した。また陽性コントロールベクターとして、SV40 プロモータとホタルルシフェラーゼをもつレンチウイルスベクターを作製した。さらに感染効率を標準化するためのコントロールベクターとしてシーパンジールシフェラーゼを CMV プロモータで制御したレンチウイルスベクターを作製した。RP58 欠損マウス及び野生型マウスの初代培養神経細胞に上記ウイルスを適用し、ルシフェラーゼ活性を解析中であるが、これまでの所、陽性コントロールで十分な活性が得られていない。</p> <p>③ウイルスベクターを供与している共同研究者 高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)、平野茂樹 (新潟大学)、鈴木肇 (新潟大学) 湯川和典 (和歌山県立医科)、岡部繁男 (東京医科歯科大学)、寺島俊雄 (神戸大学)</p>			

開発成果を踏まえた今後の展

作製したプロモータ解析用レンチウイルスベクターの陽性コントロールの発現が低いことを改善するためにより適切なプロモータの利用を試みる。候補として Thy-1 protein promoter 等の利用を予定している。

転写抑制因子 RP58 の標的遺伝子候補の転写制御領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に結合し、レンチウイルスベクターを作製する。神経細胞において RP58 によって実際に転写が抑制されるのか否かを明らかにする。

RP58 の発現は大脳皮質のグルタミン酸作動性ニューロンに特異的であることから、利用価値のあるプロモータである。そこで RP58 の遺伝子上流を単離し、レンチウイルスベクターを用いて、生体脳に導入しグルタミン酸作動性ニューロンに特異的に発現させるための領域を決定する。