

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14333

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスキャプシドタンパク改変による新規感染指向性の獲得

研究課題名(英文) New infection directivity by modification of capsid proteins of adeno-associated virus.

研究代表者

日置 寛之 (Hioki, Hiroyuki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00402850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AAVキャプシドタンパクの改変により、ウイルスベクター単独で神経細胞種特異的・神経経路特異的な遺伝子導入を可能にする技術開発を行う。戦略はシンプルであり、以下二つの方針のもと研究を進めた。(1) 非特異的感染性の除去：広汎な感染指向性を規定する各種アミノ酸配列を置換することで、感染能が劇的に低下することを培養細胞で確認した。その後、初代培養神経細胞、成体マウスで検証を進めている。(2) 新規感染性の付与：キャプシドタンパクに特異的配列を付加・挿入することで、新規感染能の獲得を目指す。候補となる特異的配列を作製し、精製を行った。成体マウスにて、検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：We develop new technologies that allow neural cell type-specific and neural pathway-specific gene transduction with viral vector alone by modification of AAV capsid proteins. The strategy is simple, and we pursued research based on the following two policies. (i) Removal of nonspecific infectivity: it was confirmed by cultured cells that infectivity was dramatically decreased by replacing various amino acid sequences prescribing extensive infection directivity. Subsequently, verification is underway with primary cultured neurons and adult mice. (ii) Granting new infectivity: we aim to acquire new infectivity by adding / inserting specific sequence to capsid protein. Candidate specific sequences were prepared and purified. We are proceeding with verification in adult mouse.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経科学 神経回路網 アデノ随伴ウイルス キャプシド 特異的感染

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターを用いることで、任意のタイミング (anytime) で任意の部位 (anywhere) に遺伝子導入が可能となる。また Cre 等を発現する遺伝子改変動物と組み合わせることで神経細胞種特異的な遺伝子導入も可能となる。また、光遺伝学・薬理遺伝学・Ca イメージング等の登場により、ウイルスベクターの有用性は生理学的解析にまで拡張され、その重要性はますます高まる場所である。

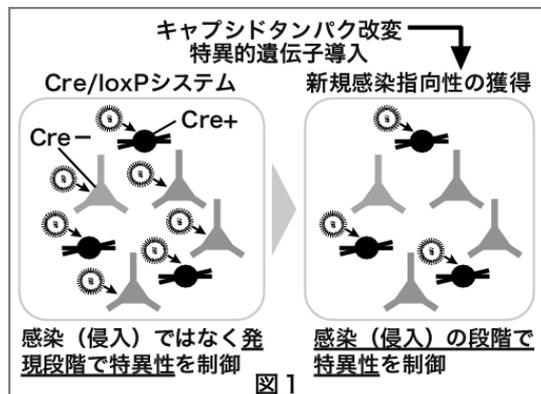
しかし一方で、細胞種特異的な遺伝子導入を実現するためには、Cre 等を発現する遺伝子改変動物の存在が前提となる。すなわち、現存する実験動物リソースによって研究が限定されるという実際的な問題がある。

## 2. 研究の目的

神経回路構造研究をさらに促進するためには、可視化法・観察法・解析法といった各要素における革新的技術の開発が必要である。本研究課題は、独自の視点から新規ウイルスベクターの開発を行い、新たな可視化法を確立するものである。ウイルスベクターを用いることで、任意のタイミング (anytime) で任意の部位 (anywhere) に遺伝子導入が可能となる。

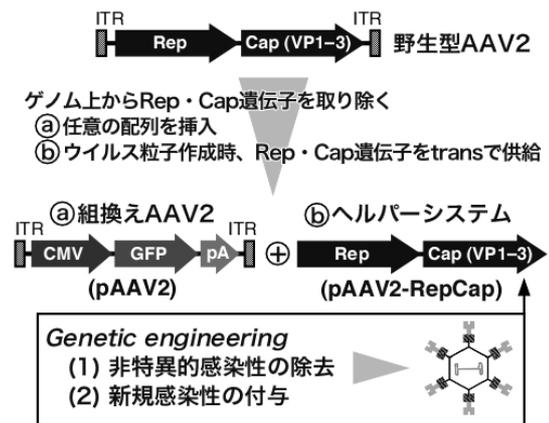
さらに Cre 等を発現する遺伝子改変動物と組み合わせると、細胞種特異的な遺伝子導入も可能になった。

しかしこれは同時に、遺伝子改変動物が存在しなければ、細胞種特異的な遺伝子導入が困難であることを意味する。そこで本研究課題では、『AAV のキャプシドタンパクを人為的に改変』し、『感染 (侵入) のステップから特異性を獲得』する革新的技術の創出を目指す。



## 3. 研究の方法

AAV キャプシドタンパクの改変により、ウイルスベクター単独で神経細胞種特異的・神経経路特異的な遺伝子導入を可能にする技術開発を行う。戦略はシンプルであり、(1) 非特異的な感染性の除去：広汎な感染指向性を規定する各種アミノ酸配列を置換、(2) 新規感染性の付与：新規感染指向性をもつアミノ酸配列の導入、の二つからなる。ただし、任意の配列を適当にキャプシドタンパクに導入した場合、ウイルス粒子の立体構造が障害される可能性が考えられ、本研究課題ではその回避法を開発する。



## 4. 研究成果

平成 27~28 年度は以下の課題に取り組んだ。

### (1) 感染能の除去

Cap 遺伝子は、ウイルス粒子を構成する VP タンパク質をコードしている。alternative splicing により VP1-3 という 3 種のキャプシドタンパクが作られ、20 面体粒子構造を形成する。そのウイルス粒子表面から外に突き出している spike が、細胞へと感染 (侵入) する際に重要であることが分かっている。感染に関わる結合ドメインのアミノ酸を置換することで、感染能が劇的に低下することを培養細胞で確認した。その後、初代培養神経細胞、成体マウスでの検証を進めている。

### (2) 新規感染性の付与

キャプシドタンパクに特異的な配列を付加・挿入することで、新規感染能の獲得を目指す。GST-fusion で候補となる特異的な配列を作製し、精製を行った。成体マウスにて、これら合成タンパク質が特定の神経細胞種に取り込まれるかについて検証を進めている。特異性が確認された後、キャプシドタンパクに付加・挿入していく。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

1. 日置寛之、濱裕、孫在隣、黄晶媛、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史 (2017) 脳透明化技術の現状と今後の発展—ScaleS 法に焦点を当てて—. *日本薬理学雑誌*, 149: 173-179. [査読有]  
DOI: 10.1254/fpj.149.173
2. 濱裕、日置寛之、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史 (2017) 組織の透明化技術. *生体の科学*, 68: 85-93. URL: <https://www.igaku-shoin.co.jp/journal/Detail.do?journal=37356> [査読無]
3. Sohn J, Takahashi M, Okamoto S, Ishida Y, Furuta T, **Hioki H.** (2017) A Single Vector Platform for High-Level Gene Transduction of Central Neurons: Adeno-Associated Virus Vector Equipped with the Tet-Off System. *PLoS ONE*, 12: e0169611. [査読有]  
DOI: 10.1371/journal.pone.0169611
4. Hamamoto H, Kiyokage E, Sohn J, **Hioki H**, Harada T, Toida K. (2017) Structural Basis for Cholinergic Regulation of Neural Circuits in the Mouse Olfactory Bulb. *J Comp Neurol*, 525: 574-591. [査読有]  
DOI: 10.1002/cne.24088
5. Kuramoto E, Pan SX, Furuta T, Tanaka YR, Iwai H, Yamanaka A, Ohno S, Kaneko T, Goto T, **Hioki H.** (2017) Individual Mediodorsal Thalamic Neurons Project to Multiple Areas of the Rat Prefrontal Cortex: A Single Neuron-Tracing Study Using Virus Vectors. *J Comp Neurol*, 525: 166-185. [査読有]  
DOI: 10.1002/cne.24054
6. Sohn J, Okamoto S, Kataoka N, Kaneko T, Nakamura K, **Hioki H.** (2016) Differential Inputs to the Perisomatic and Distal-Dendritic Compartments of VIP-Positive Neurons in Layer 2/3 of the Mouse Barrel Cortex. *Front Neuroanat*, 10: Article 124. [査読有]  
DOI: 10.3389/fnana.2016.00124
7. Hama H, **Hioki H**, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Miyawaki A. (2016) Deep Imaging of Cleared Brain by Confocal Laser-Scanning Microscopy. *Protocol Exchange* [査読無]  
DOI: 10.1038/protex.2016.019
8. Hama H, **Hioki H**, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, \*Miyawaki A. (2015) ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*, 18: 1518-1529. [査読有]  
DOI: 10.1038/nn.4107
9. Takahashi A, Islam MS, Abe H, Okubo K, Akazome Y, Kaneko T, **Hioki H**, Oka Y. (2016) Morphological analysis of the early development of telencephalic and diencephalic gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in the enhanced green fluorescent protein-expressing transgenic medaka lines. *J Comp Neurol*, 524: 896-913.  
DOI: 10.1002/cne.23883
10. 日置寛之 (2016) 介在ニューロン. *脳科学事典* [査読有]  
DOI: 10.14931/bsd.7006
11. Peirs C, Williams SP, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, Goldring AC, **Hioki H**, Liu Z, Marell PS, Seal RP. (2015) Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron*, 87: 797-812. [査読有]  
DOI: 10.1016/j.neuron.2015.07.029
12. Ito T, **Hioki H**, Sohn J, Okamoto S, Kaneko T, Iino S, Oliver DL. (2015) Convergence of Lemniscal and Local Excitatory Inputs on Large GABAergic Tectothalamic Neurons. *J Comp Neurol*, 523: 2277-2296.  
DOI: 10.1002/cne.23789 [査読有]
13. Ueda S, Niwa M, **Hioki H**, Sohn J, Kaneko T, Sawa A, Sakurai T. (2015) Sequence of molecular events during maturation of developing mouse prefrontal cortex. *Mol Neuropsychiatry*, 1: 94-104. [査読有]  
DOI: 10.1159/000430095
14. Nakamura H, **Hioki H**, Furuta T, Kaneko T. (2015) Different Cortical Projections from Three Subdivisions of the Rat Lateral Posterior Thalamic Nucleus: A Single Neuron Tracing Study with Viral Vectors. *Eur J Neurosci*, 41: 1294-1310. [査読有]  
DOI: 10.1111/ejn.12882
15. Suzuki Y, Kiyokage E, Sohn J, **Hioki H**, Toida K. (2015) Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 523: 262-280. [査読有]  
DOI: 10.1002/cne.23680
16. **Hioki H** (2015) Compartmental Organization of Synaptic Inputs to Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Anat Sci Int*, 90: 7-21. [査読有]  
DOI: 10.1007/s12565-014-0264-8
17. Kumar S, Zimmermann K, **Hioki H**, Pfeifer A, Baader SL. (2015) Efficient and graded gene expression in glia and neurons of primary cerebellar cultures transduced by lentiviral vectors. *Histochem Cell Biol*, 143: 109-121. [査読有]

DOI: 10.1007/s00418-014-1260-8

18. Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, **Hioki H**, Kaneko T. (2015) Ventral Medial Nucleus Neurons Send Thalamocortical Afferents More Widely and More Preferentially to Layer 1 than Neurons of the Ventral Anterior-Ventral Lateral Nuclear Complex in the Rat. *Cereb Cortex*, 25: 221-235. [査読有]  
DOI: 10.1093/cercor/bht216

[学会発表] (計 29 件)

1. Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Seki H, Ohno S, Sendo R, Koyanagi K, Toyodome S, Furuta T, **Hioki H**, Goto T. Dorsal and ventral parts of the rat thalamic submedial nucleus provide two independent inputs to different areas of orbital cortex. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 28 日, 長崎.
2. **日置寛之**, 孫在隣, 高橋慧, 岡本慎一郎, 石田葉子, 古田貴寛. A Single Vector Platform for High-Level Gene Transduction of Central Neurons: AAV Vector Equipped with the Tet-Off System. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 29 日, 長崎.
3. **Hioki H**. Efficient Gene Delivery into Neuronal Cells using Adeno-Associated Virus Vector Equipped with the Tet-Off System. The 1st ABiS Symposium, 2017/2/19, Okazaki.
4. **日置寛之**. 大脳新皮質のグランドデザイン解説を目指して. 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム (招待講演) 2016 年 12 月 19 日, 東京.
5. **Hioki H**, Sohn J, Takahashi M, Okamoto S, Ishida Y, Furuta T. A Single Vector Platform for High-Level Gene Transduction of Central Neurons: Adeno-Associated Virus Vector Equipped with the Tet-Off System. The 7th International Neural Microcircuit Conference, 2016/12/9, Okazaki.
6. Sohn J, Okamoto S, Kataoka N, Kaneko T, Nakamura K, **Hioki H**. Differential Inputs to the Prismatic and Distal-Dendritic Compartments of VIP-Positive Neurons in Layer 2/3 of the Mouse Barrel Cortex. The 7th International Neural Microcircuit Conference, 2016/12/9, Okazaki.
7. **日置寛之**. Basic Architecture of Neocortical Circuits. 第 39 回日本分子生物学会 (イブニングフォーラム; 招待講演) 2016 年 11 月 30 日 横浜.
8. **日置寛之**. 大脳新皮質 GABA 細胞が構成する特異的ネットワーク構造. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演), 2016 年 9 月 4 日, 三鷹.
9. **日置寛之**, 孫在隣, 中村悠, 岡本 慎一郎, 高橋慧, 亀田浩司. Cholecystokinin-and/or vasoactive intestinal polypeptide-positive neurons preferentially innervate the somatic compartment of parvalbumin-expressing neurons in the mouse primary somatosensory cortex. 第 39 回日本神経科学学会 (Neuro2016), 2016 年 7 月 21 日, 横浜.
10. 倉本恵梨子, 岩井治樹, 山中淳之, 千堂良造, 大野幸, 古田貴寛, **日置寛之**, 後藤哲哉. Two types of orbitofrontal cortical projection from the rat submedial thalamic nucleus: Possible function in descending pain modulation. 第 39 回日本神経科学学会 (Neuro2016), 2016 年 7 月 22 日, 横浜.
11. Okamoto K, Kobayashi C, Hitora-Imamura N, **Hioki H**, Ikegaya Y. Neocortical GABAergic malfunction underlying ASD-like social deficits. The 10th FENS FORUM OF NEUROSCIENCE, 2016/7/5, Copenhagen, Denmark.
12. **Hioki H**. Basic architecture of neocortical circuits. LEICA MEETS SCIENCE (invited speaker), 2016/6/14, Mannheim, Germany.
13. **日置寛之**. かたちの意味 -形態解析から迫る神経機構の原理- (座長: 松田賢一・日置寛之). 第 121 回日本解剖学会・全国学術集会, 2016/3/30, 福島.
14. 岡本和樹, 人羅 (今村) 菜津子, **日置寛之**, 池谷裕二. ACC hyperactivity in autism leads to social deficits. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9 日, 横浜.
15. Sohn J, **Hioki H**. Dual innervation modes of inhibitory inputs to vasoactive intestinal polypeptide-positive neurons in mouse primary somatosensory cortex. 新学術領域「適応回路シフト」国際シンポジウム ACS2016, 2016/3/3, Kyoto.
16. **日置寛之**. 大脳新皮質のグランドデザインを読み解く. アドバンス生命理学特論 IGER Seminar (招待講演), 2016 年 2 月 23 日, 名古屋.
17. **Hioki H**. Dual innervation modes of inhibitory inputs to vasoactive intestinal polypeptide-positive neurons in mouse primary somatosensory cortex. 新学術領域「大脳新皮質構築」第三回国際シンポジウム NEOCORTICAL ORGANIZATION 3 (invited speaker), 2016/2/12, Tokyo.
18. **日置寛之**. 皮質抑制性神経細胞が構成する普遍的・特異的シナプス結合則. 順天堂大学医学研究科形態解析セミナー・細胞生物学セミナー共催 (招待講演), 2016

- 年1月29日, 東京.
19. **日置寛之**, 孫在隣, 孫在隣, 岡本慎一郎, 高橋慧. Strong and specific gene expression in neurons by adeno-associated virus with Tet-Off system. 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム, 2015年12月18日, 東京.
  20. 平井大地, 柴田憲一, 中村公一, 田中琢真, **日置寛之**, 金子武嗣, 古田貴寛. ヒゲ感覚システムにおいて新しく発見した視床覚醒  $\alpha$  振動発火と皮質視床連関. 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム, 2015年12月18日, 東京.
  21. Hirai D, Shibata L, Nakamura KC, Tanaka T, **Hioki H**, Kaneko T, Furuta T. Spatiotemporal dynamics of sensory processing in the rat whisker tactile system. The 45th Society for Neuroscience Annual Meeting (Neuroscience 2015), October 17, 2015, Chicago, IL, USA.
  22. **Hioki H**, Sohn J, Takahashi M, Okamoto S, Kaneko T. A single vector platform for high-level gene transduction of central neurons with Tet-Off adeno-associated virus. The 45th Society for Neuroscience Annual Meeting (Neuroscience 2015), October 18, 2015, Chicago, IL, USA.
  23. Sohn J, Okamoto S, kataoka N, Nakamura K, Kaneko T, **Hioki H**. Excitatory and inhibitory inputs to vasoactive intestinal polypeptide-expressing neurons in the mouse barrel cortex. The 45th Society for Neuroscience Annual Meeting (Neuroscience 2015), October 20, 2015, Chicago, IL, USA.
  24. Kuramoto E, Pan S, Furuta T, **Hioki H**, Iwai H, Yamanaka A, Ohno S, Goto T, Kaneko T. A morphological analysis of thalamocortical projections arising from the rat mediodorsal nucleus: A single neuron-tracing study using viral vectors. The 45th Society for Neuroscience Annual Meeting (Neuroscience 2015), October 20, 2015, Chicago, IL, USA.
  25. Borkowski V, Tsai SY, Martin JL, **Hioki H**, Marinopoulos AE, Hsu KS, Papadopoulos CM, Kartje GL. An examination of sex differences in neocortical excitatory synapse number in the aged rat. The 45th Society for Neuroscience Annual Meeting (Neuroscience 2015), October 21, 2015, Chicago, IL, USA.
  26. **日置寛之**, 孫在隣, 高橋慧, 岡本慎一郎, 金子武嗣. A single vector platform for high-level gene transduction of neurons with Tet-Off adeno-associated virus. 第38回日本神経科学学会 (Neuro2015) 2015年7月29日, 神戸.
  27. 平井大地, 柴田憲一, 中村公一, 田中琢真, **日置寛之**, 金子武嗣, 古田貴寛. Cortical control of intrathalamic recurrent activity in the somatosensory system of rodents. 第38回日本神経科学学会 (Neuro2015) 2015年7月30日, 神戸.
  28. 孫在隣, 岡本慎一郎, 金子武嗣, **日置寛之**. Excitatory and inhibitory inputs to vasoactive intestinal polypeptide-expressing neurons in the mouse primary somatosensory cortex. 第38回日本神経科学学会 (Neuro2015) 2015年7月30日, 神戸.
  29. 岡本慎一郎, **日置寛之**, 孫在隣, 藤山文乃, 金子武嗣. The axon distribution of direct and indirect pathways in the external segment of globus pallidus. 第38回日本神経科学学会 (Neuro2015) 2015年7月30日, 神戸.
- 〔図書〕 (計2件)
1. **Hioki H**, Nakamura H, Furuta T. (2016) Application of virus vectors for anterograde tract-tracing and single-neuron labeling studies. In: Receptor and Ion Channel Detection in the Brain: Methods and Protocols (Neuromethods). R Luján and F Ciruela editors. Springer, New York, pp247-266.
  2. Furuta T, Okamoto-Furuta K, **Hioki H**. (2016) Analysis of synaptic connections at the electron microscopic level using viral vectors. In: Receptor and Ion Channel Detection in the Brain: Methods and Protocols (Neuromethods). R Luján and F Ciruela editors. Springer, New York, pp267-275.
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/>  
<http://researchmap.jp/hioki/>  
<https://www.researchgate.net/profile/Hiro-yuki-Hioki>
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
日置 寛之 (HIOKI HIROYUKI)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 00402850
  - (2) 研究分担者  
無し
  - (3) 連携研究者  
無し
  - (4) 研究協力者  
無し