

令和元年9月5日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19461

研究課題名(和文)狂犬病ウイルス関連ベクター受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of receptors for rabies virus-related vectors

研究代表者

小林 和人 (Kobayashi, Kazuto)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90211903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：高頻度逆行性遺伝子導入を示すレンチウイルスベクターは、狂犬病ウイルス糖タンパク質と水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質の断片からなる融合糖タンパク質をエンベロープとして持つ。このベクターは脳内における複雑な神経回路ネットワークの機能解析に有益であるが、ベクターの神経終末への導入に関するメカニズムは不明である。本研究では、このベクター受容体の同定を試みた。候補分子に対する種々のノックアウトマウスの脳内への注入実験は、これらの分子あるいはその代謝産物が受容体である可能性を否定した。一方、種々の糖鎖切断酵素を混合した注入実験は、シアル酸がベクターの細胞表面への結合に関与する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで実体の不明であった、RVに関連するベクター系受容体にはシアル酸を持つ糖鎖が関与する可能性が示唆された。本受容体の解明は、神経科学研究に重要な高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの神経終末への結合および取り込みの機構を明らかにすることに繋がり、これらのベクターの導入効率を向上させるための有益な情報を提供すると考えられる。また、実際の狂犬病ウイルスの受容体である可能性もあり、本ウイルスの感染を防御あるいは軽減するための臨床応用にも結び付く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Highly efficient retrograde gene transfer vector is a pseudotype of lentiviral vectors with fusion envelope glycoproteins composed of segments from rabies virus and vesicular stomatitis virus glycoproteins. Although this vector system is useful for the functional analysis of the complex brain network, the mechanisms underlying vector entry into nerve terminal regions is unknown. In the present study, we tried to identify the receptors for the vector. The intracranial injection experiment into the brains of some knockout mice for the candidate molecules excluded the possibility that these candidate molecules or metabolites are the receptors. In contrast the injection experiments with some inhibitors for sugar chains suggested the possibility that sialic acids may be involved in the binding of the vector on cell surface.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：逆行性遺伝子導入 ウィルスベクター 受容体 ノックアウトマウス 結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ある種のウィルスは、神経細胞の終末部位に高い親和性を示し、そこから取り込まれて軸索の中を逆行性に輸送され、遠方に存在する細胞体へと運ばれる。この逆行性輸送の性質を利用したウィルスベクターは、脳内における神経細胞の連絡様式やその生理機能を研究するために重要な研究用ツールとなっている。我々の研究グループは、高効率な逆行性の遺伝子導入を示すレンチウィルスベクターとして、高頻度逆行性遺伝子導入 (highly efficient retrograde gene transfer/ HiRet) と神経細胞特異的逆行性遺伝子導入 (neuron-specific retrograde gene transfer/ NeuRet) ベクターを開発した。HiRet/NeuRet ベクターは、エンペロープ糖タンパク質として狂犬病ウィルス糖タンパク質 (RV-G) と水泡性口内炎ウィルス糖タンパク質 (VSV-G) の断片からなる融合糖タンパク質を利用することにより、神経細胞終末からの導入を促進する (Kato et al., Hum. Gene Ther., J. Neurosci. Methods; Kobayashi et al. Mol. Biol. Methods)。これらのベクターは、脳内における複雑な神経回路ネットワークの機能解析に有益であり (Kato et al., Rev. Neurosci.; Kobayashi et al., J. Neural Transm.)。これまでに神経連絡の標識、特定神経路の除去、神経伝達遮断、化学遺伝学的操作などの研究に利用されており、今後の神経科学研究の発展にますます重要な役割を担うことが期待されていた。そのため、本ベクター系の導入効率をより向上させるなど、ベクター性能の改善が望まれ、神経細胞への導入に関する詳細なメカニズムを解明する必要があった。

2. 研究の目的

高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの神経細胞終末から導入される細胞機構を明らかにするために、その第一段階として、本研究では、HiRet/NeuRet ベクターを含めた狂犬病ウィルス (RV) に関連するベクター系受容体の探索に取り組むこととした。従来の研究から、RV の結合に関与するいくつかの候補分子が報告されている (Lafon, J. Neurovirol.)。それらは、膜タンパク質として、ニコチン性アセチルコリン受容体 α サブユニット (nAChR α)、神経接着因子 (neuronal cell adhesion molecule/NCAM)、低親和性神経栄養因子受容体 (p75NTR) や糖脂質のガングリオシドを含む。しかし、これらの候補分子が RV 受容体であるか否かについては十分に研究が進んでいなかった。われわれは、第一に、これらの候補分子に対するノックアウトマウスを利用し、マウスの脳内に HiRet/ NeuRet ベクターを注入し、遺伝子の導入効率を調べることにした。いずれかのノックアウトマウスにおいて、遺伝子導入効率の低下が認められれば、それがベクター受容体の可能性があり、実際の結合などについて研究を進める計画であった。しかし、以下に述べるように、いずれの候補分子に対するノックアウトマウスにおいても導入効率の顕著な変化はなく、これらはベクター受容体である可能性は低いと考えられた。本研究の進行中に、共同研究者の愛知医科大学医学部・生物学教室の武内恒成教授から、脊髄への遺伝子導入を行う過程で、ベクターの導入には細胞表面の糖鎖が関与する可能性が示唆されたとの報告を受け、本研究課題では、脳内への導入は糖鎖によって媒介されているかどうかを検討することとした。これが正しいならば、糖鎖結合タンパク質の中からベクター受容体の候補が得られることになる考えた。

3. 研究の方法

第一に、候補分子に対するノックアウトマウスを利用し、それぞれの系統の脳内(線条体)に NeuRet ベクター(導入遺伝子として GFP を搭載する)を注入し入力部位への遺伝子導

入効率を野生型マウスと比較した。中枢神経で発現する nAChR α サブユニットとして、特に、成獣期に発現の高い $\alpha 4$ と $\alpha 7$ 遺伝子のノックアウトマウスを利用した。ガングリオシドについて、その合成には多くの酵素が関わるが、前駆体のラクトセラミドを GM3 に変換する GM3 合成酵素のノックアウト (a と b シリーズのガングリオシドを欠損する) およびラクトセラミドと GM3/GD3 に N アセチルガラクトサミンを転移する GM2/GD2 合成酵素のノックアウト (複合型ガングリオシドを欠損する) を利用した。また、NCAM および pNTR75 分子のノックアウトも加え、遺伝子導入効率を検討した。遺伝子導入効率は、代表的な入力部位である大脳皮質 (運動野と体性感覚野) と視床束傍核における GFP 陽性細胞数をカウントし、コントロールとノックアウトマウスで比較した。

第二に、脳内での遺伝子導入に、糖鎖結合タンパク質が関与するかどうかをテストするために、ベクター溶液に糖鎖切断酵素を混合し、野生型マウスの線条体に注入した。糖鎖切断酵素としては、N 結合型糖鎖を切断する PNGase F、コンドロイチン硫酸を切断する ChABC、シアル酸を切断する Endo-N、コントロールとして PBS を用いて実験を行った。注入後、上記と同様の方法で入力領域での GFP 陽性細胞数をカウントし、コントロールに対する糖鎖切断酵素処理群の細胞数を比較した。

4 . 研究成果

GFP 導入遺伝子を持つ NeuRet ベクターを線条体に注入した場合、AChR $\alpha 4$ 、nAChR $\alpha 7$ 、GM3 合成酵素、GM2/GD2 合成酵素、NCAM、pNTR75 遺伝子のいずれのノックアウトマウスにおいても、野生型マウスと比較して、大脳皮質および視床束傍核における GFP 陽性細胞数に顕著な変化は認められなかった。この結果は、これらの分子あるいはその代謝産物は、ベクターの細胞への結合に関わらないことを示唆している。これまでの研究では、in vitro での RV と分子の結合実験や細胞毒性の観点から評価された結果であり、生体内での実際の結合を調べたものではない。したがって、従来の研究から提唱されていた分子は、実際のウィルス受容体とは異なることが確認された。

次に、ベクター溶液に種々の糖鎖切断酵素を混合し、線条体へ注入した実験において、Endo-N を混合した場合にのみ、コントロールと比較して、顕著な陽性細胞数の低下が認められた。この結果は、糖鎖のうちシアル酸がベクターの結合に関与していることを示唆する。シアル酸を含む糖鎖を持つタンパク質の可能性と、今回のガングリオシド合成酵素のノックアウトではすべてのシアル酸を欠損しているわけではないため、ガングリオシドのいずれかのタイプが結合に関わっている可能性も残されている。これまで、RV 受容体について仮説はあったもののまったくその実体はまったく理解されていなかった。今回の研究で、少なくとも細胞表面のシアル酸がこの結合に関わることを明らかにすることができた。今後、研究を進め、この受容体の実体に迫りたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Pignataro, D., Sucunza, D., Rico, A.J., Dopeso-Reyes, I.G., Roda, E., Rodríguez-Perez, A.I., Labandeira-Garcia, J.L., Broccoli, V., Kato, S., Kobayashi, K., and Lanciego, J.L. (2018) Gene therapy approaches in the non-human primate model of Parkinson's disease. **J. Neural Transm.** 125: 575-589. doi: 10.1007/s00702-017-1681-3

2. Kobayashi, K., Inoue, K., Tanabe, S., Kato, S., Takada, M., and Kobayashi, K. (2018) Pseudotyped lentiviral vectors for retrograde gene delivery into target brain regions. **Front. Neuroanat.** 11:65. doi: 10.3389/fnana.2017.00065.
3. Kobayashi, K., Kato, S., and Kobayashi, K. (2018) Genetic manipulation of specific neural circuits by use of a viral vector system. **J. Neural Transm.** 125: 67-75. doi: 10.1007/s00702-016-1674-7.
4. Kato, S., Sugawara, M., Kobayashi, K., Kimura, K., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K. (2019) Enhancement of the transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene delivery through the point mutation of fusion glycoprotein type E. **J. Neurosci. Methods** 311: 147-155. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.023.
5. Tanabe, S., Uezono, S., Tsuge, H., Fujiwara, M., Miwa, M., Kato, S., Nakamura, K., Kobayashi, K., Inoue, K., and Takada, M. (2019) A note on retrograde gene transfer efficiency and inflammatory response of lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E vs. FuG-B2 glycoproteins. **Sci. Rep.** 9: 3567. doi: 10.1038/s41598-019-39535-1.

〔学会発表〕(計4件)

1. Shigeki Kato, Masateru Sugawara, Kazuto Kobayashi. Optimizing the junction of chimeric fusion glycoprotein of a lentiviral vector for highly neuron-specific retrograde gene transfer. 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/7/20-23, Makuhari.
2. Hitomi Tsuge, Shiori Uezono, Satoshi Tanabe, Maki Fujiwara, Kiyomi Nagaya, Masateru Sugawara, Miki Miwa, Naho Konoike, Shigeki Kato, Katsuki Nakamura, Kazuto Kobayashi, Kan-ichi Inoue, Masahiko Takada. The lentiviral vector pseudotyped with FuG-E glycoprotein is more suitable, compared with the FuG-B2 type, for retrograde gene transfer into the cortical input system of primates. 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/7/20-23, Makuhari.
3. Yukio Otsuka, Hitomi Tsuge, Shiori Uezono, Soshi Tanabe, Maki Fujiwara, Miki Miwa, Shigeki Kato, Katsuki Nakamura, Kazuto Kobayashi, Ken-ichi Inoue, Masahiko Takada. Lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-E2 glycoprotein suitable for retrograde gene transfer into neural networks involving cerebral cortical areas in nonhuman primates and rodents. 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2018/7/26-29, Kobe.
4. 菅原 正晃, 加藤成樹, 小林和人. 経路選択的な標識・操作技術を応用したマーモセット大脳皮質 基底核ネットワークの機能マッピング. 平成 30 年度京都大学霊長類研究所共同利用研究会, 2019 年 3 月 15-16 日, 犬山

〔その他〕ホームページ: <https://www.fmu.ac.jp/home/molgenet/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 武内 恒成

ローマ字氏名: Kosei Takeuchi

研究協力者氏名: 加藤 成樹

ローマ字氏名：Shigeki Kato

研究協力者氏名：深堀 良二

ローマ字氏名：Ryoji Fukabori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。