

研 究 報 告 書

「脳組織内1細胞での内在性タンパク質の網羅的局在・動態解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 三國 貴康

1. 研究のねらい

脳の機能を分子レベルで理解するためには、脳の最小の機能単位である脳細胞の機能を、タンパク質レベルで記述する必要がある。脳細胞は、機能的にも形態的にも、高度に（マイクロからナノメートルレベルで）細胞内でコンパートメント化されているため、脳細胞の機能をタンパク質レベルで記述するには、タンパク質の細胞内局在と動態を高精度に観察しなければならない。脳組織は、複雑な突起を伸ばし合う多種多様な細胞が密に詰まっている組織なので、脳組織内でタンパク質の細胞内局在と動態を高精度に観察するには、1 細胞でのタンパク質の可視化が必須である。さらに、脳細胞の機能発現に関わるタンパク質は数多くあるので、タンパク質の細胞内局在と動態を網羅的に同定する方法が必要である。

本研究では、哺乳類の脳組織内の 1 細胞でゲノム編集を行い、任意の内在性タンパク質を任意のタグで標識し解析することができる、これまでにない汎用的かつ網羅的な技術「SLENDR2.0」を開発することを目指した。この技術により、脳組織内の 1 細胞において、内在性タンパク質を、様々なアプローチを用いて網羅的に解析できるようになる。これにより、脳の機能を細胞・分子レベルで統合的に理解するための新たなプラットフォームが確立する。

具体的には、まず、研究実施者が既に開発した SLENDR 法 (Mikuni et al., Cell, 2016) のゲノム編集の効率と標識タンパク質の検出感度を向上させることにより、発現量の低いタンパク質でさえもその局在を可視化できるようにする。これにより、マウスの脳組織内の 1 細胞において、内在性タンパク質の細胞内局在および動態を、高精度かつ網羅的に解析するための決定的な方法「SLENDR2.0」を確立する。そのうえで、SLENDR2.0 を用いて、記憶や学習に重要とされる細胞レベルの現象「シナプス可塑性」を分子レベルで記述するためのアプローチを構築する。

これまでにない汎用性とゲノムワイドな拡張性、および迅速性と低コスト性を実現する SLENDR2.0 は、将来、脳神経科学での幅広い応用が見込まれる。これにより、様々な脳領域の様々な 1 細胞でのプロテオームやインタラクトームの高精度データベースができるので、脳機能の生理および病態を分子レベルで記述し理解するための研究が、飛躍的に発展すると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究の中で、まず、生体脳内でのゲノム編集効率を向上させることに成功した。また、ゲノム編集効率の向上により、サイズに関わらず様々な種類のタグでタンパク質を標識できるようになったので、タンパク質の高感度イメージングが可能になった。これらの技術開発により、「シナプス可塑性」に関わる数多くのタンパク質の細胞内局在・動態のイメージングを行った。

具体的には、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術とアデノ随伴ウイルスベクターを組み合わせることで、胎児期から成熟期のあらゆる時期で相同組み換え修復によるゲノム編集を適用できるようになり、相同組換え修復の効率も約 5%から最大 30%まで大幅に向上し、あらゆる脳領域、細胞集団を標的できるようになった(vSLENDR 法、Nishiyama*, Mikuni* et al., Neuron 2017)。また一方で、従来の子宮内電気穿孔法を使用した SLENDR 法の効率の大幅な改善にも成功した(rSLENDR 法、未発表)。SLENDR 法、vSLENDR 法、rSLENDR 法の長所・短所を踏まえたうえで、実験ごとに最適な方法を使用することを「SLENDR2.0」とした。

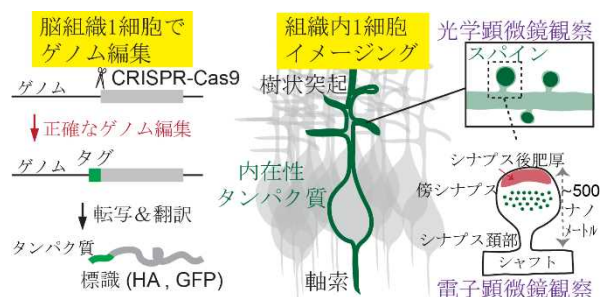
ゲノム編集効率の向上により、これまで難しかったサイズの大きなタグ配列の挿入もできるようになった。これにより、エピトープを 10 個含むスキファールドタグである Spaghetti-monster の配列を目的遺伝子座に挿入することが可能になった。これにより、シナプス可塑性に関わる様々な内在性タンパク質を Spaghetti-monster タグにより高感度にイメージングすることに成功している(未発表)。

(2) 詳細

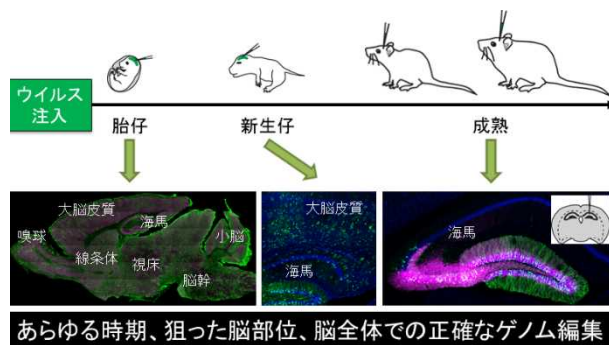
研究テーマ A:「SLENDR2.0 の開発」

研究実施者は、SLENDR 法 (single-cell labeling of endogenous proteins by CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair; 図 1)を開発し、哺乳類の生体脳内の 1 細胞で、内在性タンパク質を特異的に標識し観察することに成功していた(Mikuni et al., Cell, 2016 in press)。SLENDR 法は、脳の一部の細胞で正確なゲノム編集を行うことで目的遺伝子に標識配列を挿入し、その遺伝子産物であるタンパク質を特異的に標識できる世界初のオリジナルな技術である。この方法により、脳組織内の 1 細胞で、内在性タンパク質の局在を、迅速かつ特異的に観察できる。しかしながら、SLENDR 法のゲノム編集の効率と標識タンパク質の検出感度では、発現量の低いタンパク質の検出は難しい。ゆえに、脳組織内の 1 細胞で、内在性タンパク質の局在と動態を高精度かつ網羅的にマッピングする方法は、依然として存在していなかった。

そこで本研究では、哺乳類の脳組織内の 1 細胞でゲノム編集を行い、任意の内在性タンパク質を任意のタグで標識し解析することができる、これまでにない汎用的かつ網羅的な技術「SLENDR2.0」を開発した。まず、生体脳内でのゲノム編集効率を向上させることに成功した。このゲノム編集効率の向上により、サイズに関わらず様々な種類のタグでタンパク質を標識できるようになったので、タンパク質の高感度イメージングが可能になった。



生体脳内でのゲノム編集効率を向上させるために、まず、vSLENDR 法を開発した。細胞分裂を行わない細胞ではゲノム編集の効率が極めて低く、遺伝子配列の相同組み換えを通じて正確にゲノム配列を編集することは困難と考えられてきた。生後の脳では、殆どの神経細胞は細胞分裂を行わない



ため、脳神経科学の研究分野においては、ゲノム編集技術の応用は著しく限られてきた。本研究では、アデノ随伴ウイルスが遺伝子配列の相同組み換え効率を高める性質に注目した。アデノ随伴ウイルスを用いて、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集に必要な分子をマウス個体に導入することで、分裂を行わない成熟した神経細胞でも遺伝子配列の相同組み換えを起こすことに成功した。相同組換え修復の効率も約 5%から最大 30%まで大幅に向上した。この方法「vSLENDR」を用いることで、胎生期から成熟期まであらゆる発達段階において、生きたマウス個体の脳内の様々な細胞種、領域で遺伝子配列の組み換えを正確に起こすことに世界ではじめて成功した(図 2、Nishiyama*, Mikuni* et al., Neuron 2017)。

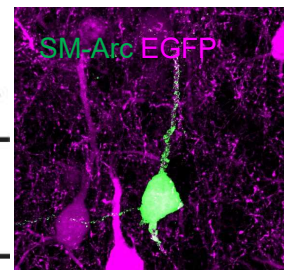
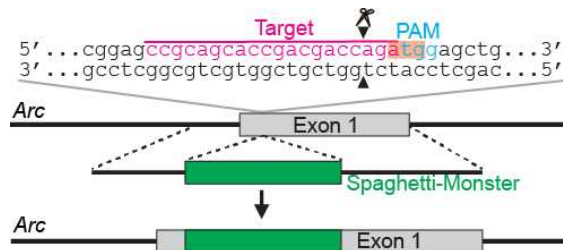
さらに本研究では、従来の子宮内電気穿孔法に基づく SLENDR 法(Mikuni et al., Cell 2016)を改良し、ゲノム編集の効率を上げることに成功した(rSLENDR 法、未発表)。SLENDR 法、vSLENDR 法、rSLENDR 法のそれぞれに長所・短所があるので、実験ごとに最適な方法を使用することをもって「SLENDR2.0」の確立とした。

ゲノム編集効率の向上により、これまで難しかったサイズの大きなタグ配列の挿入もできるようになったので、個々のタンパク質の高感度イメージングが可能になった。

研究テーマ B:「SLENDR2.0 の応用」

SLENDR2.0 により、様々なタンパク質をコードする遺伝子座に様々なタグ配列を迅速かつ高効率に挿入できるようになった。個々のタンパク質の高感度イメージングのために、本研究では、エピトープを 10 個含むスキファールドタグである Spaghetti-monster の配列を目的遺伝子座に挿入できるようにした。これにより、シナプス可塑性に関わる様々な内在性タンパク質を Spaghetti-monster タグにより高感度にイメージングすることに成功した(未発表)。SLENDR2.0 でターゲットした遺伝子は数十種類にのぼり、シナプス分子を中心に、転写因子や細胞骨格

分子、シグナル伝達分子や神経伝達物質受容体、イオンチャネル分子などを脳組織内 1 細胞でイメージングした。



このプラットフォームを使って、脳組織内 1 細胞での機能分子のライブイメージングも行った。これは、脳スライスのみならず、個体の脳でのイメージングも行った(未発表)。

3. 今後の展開

これまでにない汎用性とゲノムワイドな拡張性、および迅速性と低コスト性を実現する SLEND R2.0 を使って、研究者はこれから、学習・記憶をタンパク質の挙動で説明することを目指す。SLEND R2.0 とこれまでに習得してきた電気生理学、分子生物学、光遺伝学、イメージングの手法等を駆使することで、シナプス可塑性に重要なタンパク質の細胞内局在のハイスループット解析を行う。学習・記憶の細胞レベルの現象「シナプス可塑性」に重要なタンパク質は百種類以上知られているが、神経細胞内の局在が不明なものが未だ数多く存在している。とりわけ、イオンチャネルや GPCR などの局在は、その重要性にも関わらずよくわかっていない。研究者は、従来の方法ではアプローチが難しかったこのようなタンパク質の局在を、SLEND R2.0 を用いて迅速かつ高精度に同定する。さらに、実際に学習・記憶を行っている動物の脳で、タンパク質の動態をライブイメージングする。まず、Ca²⁺イメージングと組み合わせることで、細胞活動と分子動態の相関を解析する。次に、記憶痕跡細胞 (memory engram cell) を遺伝子工学的に同定し、痕跡細胞と非痕跡細胞の分子動態を比較する。

学習・記憶をタンパク質の挙動で説明することで、私たちのアイデンティティの源である学習・記憶の理解が深まる。また、記憶できない病態の理解と治療法の開発につながる。

4. 自己評価

SLEND R2.0、とくに vSLEND R 法の開発により、難しいとされていた生後の脳でも正確なゲノム編集を効率よく行うことを実現し、脳神経科学分野で広くゲノム編集技術を応用できるようになった (Nishiyama*, Mikuni* et al., *Neuron* 2017)。この技術開発により、あらゆる時期の任意の脳領域・細胞種でタンパク質の局在や動態を網羅的に解析するための新たな技術基盤ができ、本研究の目的は十分に達成されたと考える。これらの研究成果は、脳神経科学における研究手法のブレイクスルーであり、分子細胞神経科学の分野の発展に貢献すると期待できる。研究者は、さがけ期間中に米国から帰国し新しく研究室を立ち上げたが、そのなかで研究費を有効に使用し研究を大きく中断することなく進めることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishiyama J*, Mikuni T*†, Yasuda R†. Virus-mediated genome editing via homology-directed repair in mitotic and postmitotic cells in mammalian brain. *Neuron*. 2017; 96(4):755–68. *Co-first authors †Corresponding authors
2. Mikuni T. Genome editing-based approaches for imaging protein localization and dynamics in the mammalian brain. *Neurosci Res*. 2019 in press

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

2017 年 日本生理学会奨励賞

2017 年 プレスリリース「あらゆる発達段階のマウス脳内で狙った細胞の正確なゲノム編集に成功」 <https://www.jst.go.jp/pr/info/info1289/index.html>

2019 年 日本神経科学学会奨励賞