

研究終了報告書

「コンタクトーム解析の基盤技術の確立」

研究期間:2020 年 11 月～2024 年 3 月

研究者:米原 圭祐

1. 研究のねらい

本研究ではマウス中枢神経系における神経細胞の機能ドメインと他の細胞（神経細胞、グリア細胞、免疫細胞、血管細胞など）との間の相互作用をモデルとして用い、多細胞相互作用解析のための技術基盤”コンタクトミクス”を確立する。このためにバクテリアから単離されたペプチド転移酵素である SortaseA (SrtA) タンパク質あるいはその改変型である mgSrtA を利用する。SrtA はドナー分子中のソート配列 LPETG を認識し、N 末にグリシンを有するターゲットタンパク質に共有結合で付加する。この技術を利用して、LPETG 配列を付加したビオチンやウイルス受容体を細胞から細胞へ転移させることで、細胞間相互作用を網羅的に同定することを狙う。

2. 研究成果

(1) 概要

哺乳類の培養細胞 (HEK 細胞) 表面に mgSrtA を発現させ (スターター細胞)、mgSrtA を発現していない GFP 陽性細胞 (ターゲット細胞) と混合して基質である Biotin-LPETG を加え転移反応を起こさせることで、スターター細胞のみならずターゲット細胞がビオチン標識されることを、FACS による蛍光シグナル定量や細胞の抗体染色により示した。この転移反応は LPETG を付加しないビオチンでは起こらなかった。また、ターゲット細胞に N 末にグリシン (x5) を付加した膜タンパク質を発現させると、ビオチンの転移反応が促進することが示された。さらに、この促進は G5 を A2G3 に変異させると見られなくなったことから、ターゲットタンパク質の N 末端のグリシン依存性に転移が起こることが示された。生化学的解析により、実際にビオチン化されたことが示された。これらの実験から、細胞表面に発現させた mgSrtA はドナー分子中の LPETG 配列及びターゲットタンパク質の N 末端のグリシン依存性に転移反応を起こすことで、近接細胞を標識することができることが示された。

次に、EnvA 外殻狂犬病ウイルスや EnvA 外殻レンチウイルスの特異的受容体である TVA 受容体にソート配列 LPETG を付加した TVA-LPETG をスターター細胞からターゲット細胞に転移させる実験を行った。TVA-LPETG を発現させたスターター細胞 (HEK 細胞) と GFP を発現させたターゲット細胞を混合した後に培養皿に撒き、EnvA 外殻狂犬病ウイルスを培養液中に添加することで、スターター細胞のみならずターゲット細胞が感染し蛍光タンパク質を発現した。LPETG 配列を変異させた場合は EnvA 外殻狂犬病ウイルスのターゲット細胞への感染効率が極端に悪化した。この実験から、TVA-LPETG がスターター細胞からターゲット細胞に転移されたと考えられた。これを実証するために、ターゲット細胞に G5 タンパク質を発現させ同様の転移実験を行い生化学的解析を行ったところ、G5 タンパク質が TVA-LPETG で標識されていることを確認した。これらの実験から、本さがけ研究の基盤技術である、相互作用細胞への特異

的遺伝子導入が少なくとも HEK 細胞においては確立されたと考えられた。

生体内で検証を行うために、一部の網膜神経節細胞が Cre 標識された TG マウスを用いた。網膜の Cre 細胞に TVA-LPETG と mgSrtA を AAV ベクターにより発現させて神経節細胞の軸索投射先である上丘浅層に EnvA 外殻狂犬病ウイルスを注入したところ、上丘浅層の一部の神経細胞に感染が確認された。LPETG に変異を入れた AAV ベクターを用いた場合は感染が観察されなかったことから、神経節細胞の軸索末端から上丘細胞に TVA-LPETG が転移した結果、TVA-LPETG により細胞表面が標識された上丘細胞に EnvA 外殻狂犬病ウイルスが感染したと考えられた。これらの結果から、研究目的を達成するための基盤技術は確立されたと考えられる。しかしこの技術を生体内に応用して生物学的に意義のある発見を行うところまでは時間の制約により辿り着けなかった。そのような応用研究を今後進めていく予定である。

(2) 詳細

研究テーマ A「培養細胞における接触細胞特異的なビオチン標識法の確立」

生体内での近接標識法で広く使用されているビオチン-LPETG で隣接細胞を標識する実験を行った。この実験をより挑戦的なウイルス受容体転移実験の前に行うことにより、mgSrtA の機能性を確認できるというメリットがある。神経突起が伸長した成体脳では FACS による標識細胞単離は難しい(標識された突起が単離時に千切れてしまう)が、標識されたターゲット細胞を FACS で単離できるような組織や発達の早い段階では、ビオチン-LPETG による標識で十分事足りると考えられた。ビオチン標識した細胞は Streptavidin-Alexa Fluor 蛍光色素で発色し、蛍光顕微鏡で画像取得した。

哺乳類の培養細胞(HEK 細胞)表面に mgSrtA を発現させ(スターター細胞)、mgSrtA を発現していない GFP 陽性細胞(ターゲット細胞)と混合して基質である Biotin-LPETG を加え転移反応を起こさせることで、スターター細胞のみならずターゲット細胞がビオチン標識されることを、FACS による蛍光シグナル定量や細胞の抗体染色により示した。この転移反応は LPETG を付加しないビオチンでは起こらなかった。

LPETG 依存性の機構で転移標識が起こることは示されたと考えられるが、それが mgSrtA ではなくエクソソームなどを介した想定外の機構により転移が起こっている可能性は完全には否定できない。そこで LPETG が融合した細胞表面のタンパク質配列を同定する実験を行った。ターゲット細胞に N 末にグリシン(x5)を付加した膜タンパク質を発現させると、ビオチンの転移反応が促進することが示された。さらに、この促進は G5 を A2G3 に変異させると見られなくなったことから、ターゲットタンパク質の N 末端のグリシン依存性に転移が起こることが示された。生化学的解析により、実際にビオチン化されたことが示された。これらの実験から、細胞表面に発現させた mgSrtA はドナー分子中の LPXTG 配列及びターゲットタンパク質の N 末端のグリシン

依存性に転移反応を起こすことで、近接細胞を標識することができることが示された。

また、内在性のタンパク質がビオチン化されることを確かめるために、Biotin-LPETG を用いた接触細胞の標識を行った HEK 細胞からタンパク質を抽出して、TVA に付加した V5 タグに対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、タンパク質のサイズの変化を観察した。mgSrtA を発現させた場合はスメア状のバンドが観察されたが、mgSrtA を発現しない陰性コントロールでは観察されなかったことから、さまざまなサイズの内在性タンパク質が Biotin-LPETG で標識されたと考えられた。

研究テーマ B「培養細胞における接触細胞特異的な遺伝子導入法の確立」

mgSrtA と TVA-LPXTG の会合効率を上げるために、TVA-LPXTG と mgSrtA を融合タンパク質として発現させる手法をまず追求した(Warden-Rothman et al., 2013 *Anal Chem*)。

概念実証のために、まずは培養細胞を用いた実験を行った。HEK 細胞に作成したコンストラクトやその他関連プラスミドをリポフェクションでまばらに発現させたもの(スターター細胞)と、GFP のみを発現させた細胞(ターゲット細胞)をチューブ内で混合してインキュベーションした。この細胞混合の手法により、スターター細胞以外の近接細胞にウイルス感染が起こるかどうかを明確に実証できる。細胞混合後に共培養して、まずは TVA に付加した V5 のシグナルが GFP 陽性のターゲット細胞に転移されたことを anti-V5 抗体染色と Tyramide によるシグナル増幅法により確認された。

次に、付加された TVA 量がピークに達すると考えられる時期に培養液中に mCherry 発現 EnvA 外殻ウイルスを添加し、mgSrtA 発現細胞及び GFP 陽性ターゲット細胞が特異的に標識されることを確認した。EnvA 外殻ウイルスとして SADB19(Δ G)系統の遺伝子改変狂犬病ウイルスを用いた。EnvA 外殻ウイルスは自分で産生したものを使った。ウイルス感染細胞は PFA 固定後に抗体染色して共焦点顕微鏡で観察を行った。mgSrtA 酵素活性はカルシウム濃度の影響を受けないとされているため、転移反応はカルシウムフリーの PBS 内で全て行った。

依然として標識特異性の確認や標識効率を上げるなどの課題がいくつか残っていたため、これらに取り組むために引き続き培養細胞を用いた実験を継続した。コンストラクト中の LPETG アミノ酸配列のみに変異を入れたコンストラクトでは接触細胞特異的な遺伝子導入法が起こらないことを HEK 細胞で実証できた。これらの結果から、これまで観察されていた接触細胞の標識は想定していた通り、LPETG 依存性の機構で起こることが示された。

また重要なことに、第三年次の研究により TVA-LPETG と mgSrtA を二つの別々のコンストラクトに分けて HEK 細胞に発現させた方が隣接細胞へのビオチン標識及び遺伝子導入が効率よく起こることを見出した。その理由は不明であるが、タンパク質の立体構造に由来する理由で

ある可能性を考えている。このため、二つの AAV ベクターを第三年次に作製した。これらの AAV ベクターを持ちいてマウスの網膜から上丘への標識がより効率よく起こるかの検証を最近開始したが結論はまだ得られていない。

研究テーマ C「網膜 Cre 陽性細胞から上丘への順行性シナプス近接標識」

培養細胞を用いた実験により概念が実証されたため、マウスの生体内実験を行った。網膜から脳へ動きの方向情報を伝達する方向選択性神経節細胞が特異的に Cre および蛍光により標識されたトランスジェニックマウス(Oxtr-2A-Cre 及び Cart-IRES-Cre マウス)を用い、これらの細胞が順行性に接続する視床や上丘の細胞群を同定することを狙いとした。この実験により、視覚運動情報処理の脳内メカニズムの理解が進展すると期待された。前シナプス局在化コンストラクトを Cre 依存性 AAV ベクターの硝子体内注射により起始細胞である Cre 陽性細胞に発現させた。シナプス間隙の前シナプス側に局在化した mgSrtA の近位の monoglycine を有するタンパク質に TVA 受容体の C 末端が連結することが期待された。また、蛍光タンパク質が組み込まれた高力価の EnvA 外殻狂犬病ウイルスを BHK 細胞への感染・培養上清の濃縮により調製し、この EnvA 外殻狂犬病ウイルスを上丘に注入することで、PV-Cre 細胞の後シナプス細胞と思われる上丘の神経細胞を標識することに成功した。評価には共焦点顕微鏡による組織解析で行った。さらに、LPETG アミノ酸配列に変異を入れたコンストラクトでは標識が起こらないことを実証した。標識回路の生体内イメージング実験に備えて、国立遺伝学研究所に二光子イメージング装置を設置した。

3. 今後の展開

1. ビオチン標識を用いた発達期の脳における細胞間相互作用の網羅的同定

発達期マウス脳内において Cre 標識された神経細胞と相互作用した神経細胞やグリア細胞を網羅的にビオチン標識する実験を、国際共同研究として開始しようとしている。方法組織透明化法を用いることでビオチン標識された細胞を広範囲、高解像度で可視化できると期待している。

2. 電子顕微鏡あるいは電気生理学的手法によるシナプス結合の実証

マウス網膜から上丘への転移標識が効率よく起こることが確認されたら、当初の計画通り電子顕微鏡あるいは電気生理学的に脳組織中におけるシナプス結合を実証する実験を開始する。残された時間を現実的に考えると、さきがけ研究期間内に完遂できる研究はここまでであると予想されるが、ここまでのデータをまとめて本研究の集大成となる論文を書くことを目指す。また、研究期間終了後も継続して本研究を継続して、当初提案していた発達期の標識や1細胞からの標識など様々な応用的手法の開発を行う予定である。

3. Directed evolution 法による効率的なソルターゼ A タンパク質の開発

細胞表面に発現する内在性タンパク質の N 末端は N-アセチル化を受けている可能性があり、その理由により標識効率が悪くなっている可能性がある。なお、真核生物では 50-90%のタンパク質が N-アセチル化されていると推定されている。そこで、N-アセチル化グリシンを含めた細胞表面タンパク質に効率良く転移反応を起こせるソルターゼ A を哺乳類培養細胞を用いた directed evolution により新たに作成する。これは数年がかりの実験になることが想定されるが、成功した場合はその応用範囲が大きく広がる。またそのタンパク質配列の特許を取得する。

4. 自己評価

研究の途中で研究場所をデンマークのオーフス大学に変更した。また異動の前後にパンデミックが起これ研究室のロックダウンを経験した。これらの理由により当初の予定よりも研究進展に遅れが出てしまった。しかしながらコンタクトームの基盤技術はほぼ確立できたと考えている。研究費執行状況も概ね計画通りに進行した。研究場所を遺伝研に移す際に追加で助成頂いた研究スタートアップ助成のおかげで研究室のスタートアップも順調に進展した。今後は国際共同研究などを進めながら確立した基盤技術の発展と普及に努めたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 12件

1. Matsumoto A, Agbariah W, Nolte SS, Andrawos R, Levi H, Sabbah S, Yonehara K. (2021) Direction selectivity in retinal bipolar cell axon terminals. Neuron 109: 2928-2942.e8.
2. Sethuramanujam S, Matsumoto A, McIntosh JM, Jing M, Li Y, Berson D, Yonehara K §, Awatramani GB§. (2021) Rapid 'multi-directed' cholinergic transmission at central synapses. Nature Communications 12: 1374. § shared-corresponding authors.
3. Arvin S, Rasmussen R, Yonehara K. (2021) EyeLoop: An open-source system for high-speed, closed-loop eye-tracking. Front Cell Neurosci 15: 779628.

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

主要な招待講演

1. The University of Tokyo, School of Medicine (Dec 2023)
2. Helsinki University, Finland (Sept 2023)

3. The 2nd CJK meeting, Zhuhai China (July 2023)
4. MatchPoints Conference, Aarhus University, Denmark (May 2022)
5. Microsoft Project Users Forum Seminar, Online (Feb 2022)