

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19444

研究課題名(和文) 生体内動態解析を可能とする網羅的タンパク質分子標識法の開発

研究課題名(英文) Development of a comprehensive tag-insertion method that enables dynamic in vivo analysis

研究代表者

崎村 建司 (Sakimura, Kenji)

新潟大学・脳研究所・フェロー

研究者番号：40162325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、生体内で機能するタンパク質分子を正確に検出する方法を新たに開発し、その手法を神経系で機能する分子群に適用することである。このために、抗体に代わる低分子量のケミカルプローブとそれを認識するペプチドタグを組み合わせた系を採用した。その結果、遺伝子編集方法を用いて、ペプチドタグを標的分子の機能に影響しないと予想される部位に迅速に挿入する方法の開発に成功した。この手法を用いて、NMDA型グルタミン酸受容体のサブユニット構造を電子顕微鏡で可視化する金粒子ラベルしたプローブが結合するhD2タグをGluN1分子にノックインしたマウスを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、低分子量のケミカルプローブを認識するペプチドタグを、遺伝子編集法により迅速に脳研究に適したマウスに組み込む方法の開発に成功した。この成果により、1)これまで抗体ができなかった分子の解析が可能になる。2)低分子のケミカルプローブは組織内への浸透性が高いので、これまでできなかった生体での分子動態解析などが可能になる。第3に、高輝度のケミカルプローブを用いることで、細胞内での分子動態の可視化が可能になる。したがって、本研究開発の成果は、生命科学、とりわけ脳機能解析に大きな変化をもたらす。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new method for accurately detecting protein molecules that function in vivo, and to apply this method to a group of molecules working in the nervous system. We adopted a system combining a low-molecular-weight chemical probe, instead of an antibody, and a peptide tag that recognizes the probe. Thus we successfully developed a method for rapidly inserting a peptide tag to a site that is not expected to affect the function of a target molecule, using a gene editing technique. With this method, we have succeeded in establishing a mouse whose GluN1 molecules are knocked in with an hD2 tag bound by a gold particle-labeled probe that can visualize the subunit structure of the NMDA-type glutamate receptor under an electron microscope.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：生体分子標識 ペプチドタグ ノックインマウス 遺伝子編集

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

1. 研究開始当初の背景

我々は、脳機能研究に適した C57BL/6 系統を用いた遺伝子改変マウス作製システムを整備し、多数の遺伝子変異マウスを樹立し、広く内外の研究者に供与して共同研究を展開してきた。その過程で、免疫組織化学やウエスタンブロット法で欠損分子が検出されるなど、誤った抗体を多く見てきた。また、高力価の抗体がないために解析を断念せざるを得ない分子も少なからずあった。それらを解消するために、いわゆるタグ配列や GFP などの蛍光分子を挿入したキメラ分子が作られ解析に供されてきたが、ロックインやトランスジェニックマウスなど遺伝子組換え動物の作製には多くの手間と時間、そして経費がかかることがネックになってきた。しかし、近年の遺伝子編集技術の進歩は、これまでできなかった速度と経費で分子標識することを可能にした。我々は、脳機能を分子レベルで解明するには、抗体を用いた標識に代わる細胞内の分子動態を可視化する技術の開発が必須であると考え、脳機能タンパク質分子群を網羅的にタグ付けする基礎技術開発をおこなうことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内に存在し機能するタンパク質分子を正確に検出する方法を新たに開発し、その手法を神経系で機能する分子群に応用することである。この目的のために、抗体に代わる低分子量のケミカルプローブとそれを認識するペプチドタグを組み合わせた系を採用する。タグ配列の挿入では、遺伝子編集方法である CRISPR/Cas9 システムをマウス胚に直接適用し、迅速かつ低コストで解析対象の動物を作出する技術を整備する。なお、ペプチドタグの挿入に関しては、標的分子の機能に影響しないと予想される部位を構造生物学の知見から想定し決定する。さらに、ケミカルプローブに関しては、九州大学大学院薬学研究院成体分析化学分野・王子田教授のグループが開発した物を中心にして、システムの開発を進める。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために次の研究をおこなった。

1) 抗体タグを用いた挿入位置の検討

高力価の抗体が存在しないグルタミン酸受容体サブユニット (GluK1、GluN2D、GluN3A) やドーパミン受容体 (D3R、D4R) などを対象に、高力価の抗体が存在するペプチドタグ (Myc、HA、PA、FLAG など) を、シングルあるいは複数タンデムの形でシグナル配列の後の N 末端、立体構造のデータベースから膜陥入部位近傍や他分子との相互作用が想定される C 末端近傍を避け、細胞外部位や抗体がアクセスし易いと想定される部分に後述する遺伝子編集法で挿入する。目的のタグ配列を挿入している個体と、in-del 変異で当該遺伝子がロックアウトした個体を選択して解析に供する。

2) ペプチドタグの系統的挿入方法の開発

ペプチドタグを標的分子に効率的に挿入するために、C57BL/6 系統マウス胚に CRISPR/Cas9 システムを適用する。200 ベース以下のオリゴヌクレオチド (両側に相同組換え配列 60 ベースと挿入オリゴペプチド配列を持つ) と sgRNA を合成する。これら核酸と Cas9 タンパク質をコードする mRNA あるいは、sgRNA と複合体を形成させた Cas9 タンパク質を採取した受精卵や卵管内の受精卵に電気穿孔法でマウス受精卵に導入し、産子を得る。電気穿孔条件の検討や導入する複合体の形状等の検討をおこない、最適な方法を検索する。

3) 免疫電顕に代わる低分子金属プローブを用いた分子解析マウスの作製

免疫電顕では、金粒子などの重金属を用いて分子を可視化する方法があるが、特異性と力価の高い抗体が無い分子ではその検出が困難である。この問題を解決する方法として、解析対象の分子に直接金属分子をキレートする配列を挿入して検出することができれば、当該分野において革新的な技術となる。我々は、フリーズフラクチャー法を用いた電子顕微鏡分子同定にお

いては世界的第一人者である重本隆一博士（IST オーストリア）と共同で、この原理による分子同定法の可能性を検討してきた。本研究においては、他のペプチドタグと同様に、標的分子に重金属をキレート出来る 20 残基以下の配列を挿入したマウスを樹立して解析に供する。

4．研究成果

ペプチドタグ挿入位置の検討では、分子欠損になると致死に至るグルタミン酸受容体 GluN1 サブユニットの複数箇所にペプチドタグを挿入し、ホモで当該分子を持つマウス個体を出して検討をおこなった。その結果、N 末端近傍に挿入しても機能的に問題の無いことが明らかになった。

迅速なタグノックインマウス樹立法を確立するために、C57BL/6 系統のマウスを用いて、200 ベース以下の 1 本鎖 DNA と Cas9 タンパク質/gRNA 複合体を授精直後の胚に電気穿孔法で導入して組換え産子を得る方法を確立した。受精卵の採取後に電気泳動チャンバーを利用する方法と、卵管内に存在する胚に対して、卵管内に直接 CRISPR 複合体を注入して電気泳動的導入する方法のいずれでも、標的の分子に目的のタグ配列をノックインしたマウスを作出することができた。それぞれの手法には長短がある。一度に多くの産子を得たいときには、大量の受精卵を処理できる泳動チャンバーを利用する方が良いが、これはレシピエントを準備して胚移植する手間がかかる。一方、卵管内導入法は、移植の手間は不要であるが、生まれる産子数が少なく、帝王切開による産子取得の手間がかかることが多い。多くの産子を得て、迅速な解析をする場合は前者を、ライン化して解析するのであれば後者を選択すれば良いことがわかった。なお、C57BL/6 系統マウスでは、GONAD 法でのマウス作製は困難であるとされていたが、我々は穿孔パルスの電圧を低下させ、効率的に遺伝子変異が導入されたマウス産子を取得する事を可能にした。さらに、AAV ウイルスベクターを用いて蛍光タンパク質 EGFP など長鎖の挿入配列を分子内に挿入できることも確認した。これらの開発研究を通して、一定の効率で任意の部位にアミノ酸配列を挿入できるパラメーターを決定して、標準的なプロトコルを整備する体制が整備できた。

免疫電顕に代わるケミカル重金属プローブを用いた脳機能分子の解析に関しては、一定の進捗があった。このプロジェクトでは、NMDA 型グルタミン酸受容体のサブユニット構造を電子顕微鏡で可視化する。そこで標識分子の機能の低下を極力おさえ、効率的に電顕で同定可能な金属分子をキレートできるアダプター配列と導入位置の検討をおこなった。九州大学大学院薬学研究院成体分析化学分野・王子田教授のグループが開発した、金粒子ラベルした亜鉛錯体プローブが共有結合する 20 アミノ酸残基からなる hD2 タグを GluN1 分子の N 末端側にノックインしたマウスを樹立した。このマウスは、野生型と違いは無く、タグ配列挿入の影響は認められない。現在オーストリアの重本教授が形態学的な解析を進めている。

本研究の成果である、脳機能分子への低分子ケミカルプローブが認識するペプチドタグ挿入法は、当該分子を過剰に発現させないで解析できる方法を提供できる。更にこの技術は、広範な分子にも適用可能であることから、神経科学のみならず広く生命科学全体への貢献が期待できる。本研究は、申請者がこれまで蓄積してきた経験と知識を次の世代に引き継ぐものである。とりわけ支援の形で、多様な研究者に本研究で開発した手法を用いて作製した研究リソースを供与することは、その研究レベルを担保し、世界での立ち位置を高めることになる。本開発手法は、今後のリソース支援の中心となると考えている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 38 件)

Shimizu T, Osanai Y, Tanaka KF, Thai TQ, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Ikenaka K:

Mechanical regulation of oligodendrocyte morphology and maturation by the mechanosensor p130Cas. *J Neurochem* 2018, in press (査読有) DOI: 10.1111/jnc.14657.

Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S: Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. *Mol Brain* 2018, 11(1): 63 (査読有) DOI: 10.1186/s13041-018-0407-2.

Itoh M, Yamashita M, Kaneko M, Okuno H, Abe M, Yamazaki M, Natsume R, Yamada D, Kaizuka T, Suwa R, Sakimura K, Sekiguchi M, Wada K, Hoshino M, Mishina M, Hayashi T: Deficiency of AMPAR-palmitoylation aggravates seizure susceptibility. *J Neurosci* 2018, 38(47):10220-10235 (査読有) DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1590-18.2018.

Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H: Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *J Neurochem* 2018, 147: 557-572 (査読有) DOI: 10.1111/jnc.14591.

Nakayama H, Abe M, Morimoto C, Iida T, Okabe S, Sakimura K, Hashimoto K: Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nat Commun* 2018, 9(1): 2830 (査読有) DOI: 10.1038/s41467-018-05100-z.

Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Retrograde signaling from progranulin to Sort1 counteracts synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 2018, 97(4): 796-805.e5 (査読有) DOI: 10.1016/j.neuron.2018.01.018.

Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, Hait NC, Allegood JC, Tsuchida J, Yuza K, Nakajima M, Abe M, Sakimura K, Milstien S, Wakai T, Spiegel S, Takabe K: Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that links obesity, chronic inflammation, and breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2018, 78(7): 1713-1725 (査読有) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1423.

Chiu CQ, Martenson JS, Yamazaki M, Natsume R, Sakimura K, Tomita S, Tavalin SJ, Higley MJ: Input-specific NMDAR-dependent potentiation of dendritic GABAergic inhibition. *Neuron* 2018, 97(2): 368-377.e3 (査読有) DOI: 10.1016/j.neuron.2017.12.032.

Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, Tanimura A, Uesaka N, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nat Commun* 2017, 8(1): 195 (査読有) DOI: 10.1038/s41467-017-00260-w.

Soya S, Takahashi TM, McHugh TJ, Maejima T, Herlitze S, Abe M, Sakimura K, Sakurai T: Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. *Nat Commun* 2017, 8(1), 1606 (査読有) DOI: 10.1038/s41467-017-01782-z.

[学会発表](計 46 件)

夏目里恵、中務胞、崎村建司、阿部学 : C57BL/6 系統マウスにおける卵管エレクトロポレーション法を用いた遺伝子編集効率の検討 . 第 66 回日本実験動物学会総会、2019

中務胞、夏目里恵、阿部学、崎村建司：遺伝子改変ホモマウスへの過剰排卵処置方法の検討．
第 41 回日本分子生物学会年会、2018

Kleindienst D, Kawakami R, Case MJ, Kobayashi K, Komiyama N, Abe M, Sakimura K,
Shigemoto R: Differential involvement of GluN2B and GluA1 in formation of left-right
asymmetry in the hippocampus. SfN's 48th Annual Meeting Neuroscience, 2018

Watanabe M, Nakamoto C, Sakimura K, Kano M, Konno K: Extracerebellar expression of
glutamate receptor GluD2 in adult mice and marmosets. 11th FENS Forum of Neuroscience,
2018

夏目里恵、阿部学、中務胞、崎村建司：卵管膨大部エレクトロポレーション法を用いた遺伝
子組換えマウス作製の迅速化．第 65 回日本実験動物学会総会、2018

Sakimura K: The development of gene-manipulated animal models; Aiming to generate
better suited mouse, rat and marmoset for the analysis of brain function. 8th BRI
International Symposium, 2018

Sakamoto M, Inoue M, Sakai K, Kobari S, Takemoto-Kimura S, Fujii H, Abe M,
Sakimura K, Bito H: A Flp-dependent G-CaMP9a transgenic mouse for neuronal imaging
in vivo. 第 41 回日本神経科学大会、2018

Abe M, Peng F, Sakimura K: Aif1-iCre knock-in mouse line; A tool for conditional gene
manipulation in microglia. SfN's 47th Annual Meeting Neuroscience, 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：阿部 学

ローマ字氏名：(ABE, Manabu)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：脳研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10334674

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。