

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K19494
研究課題名(和文) 神経活動をゲノムに記録するシステムの開発

研究課題名(英文) Recording neuronal activities onto DNA

研究代表者

田中 光一(Tanaka, Kohichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80171750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳の情報処理機構を解明するためには、脳を構成する全ての神経細胞の活動を経時的に長期間記録し、機能との対応を解析することが必要である。本研究では、ゲノム編集技術を用い、神経細胞の活動履歴をDNA上に記録できる系の開発を目指した。グリオーマ細胞株を用い、神経活動で発現が上昇するc-fos遺伝子座にCas9を発現させ、神経活動の履歴をDNA上の配列変化として記録可能な細胞株の作成を試みたが、目的の細胞を作成することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳を構成する全ての神経細胞の長期間に亘る活動履歴をゲノムに記録できるれば、空間的に離れた脳領域間の機能的結合や脳全体のネットワークとしての特性を、ゲノムの配列解析からレトロスペクティブに解明できる。さらに、単一細胞分析と併用することにより、単一神経細胞レベルでの機能的結合も解析でき、細胞・局所神経回路・脳全体の機能的ネットワークを縦断的に解明できる可能性を秘めている。申請者の作成した細胞系を改良し、目的の実験系が確立されれば、脳機能の解明に大きな貢献をすると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the information processing mechanisms of the brain, it is necessary to record the activities of all the neurons that make up the brain over time for a long period of time and analyze the correspondence with their functions. In this study, we aimed to develop a system that can record the activity history of neurons on DNA using genome editing technology. Using a glioma cell line, we tried to create a cell line that could record the history of neuronal activity as DNA sequence changes by expressing Cas9 at the c-fos locus, whose expression increases with neuronal activity, but we were unable to create the desired cell line.

研究分野：神経科学

キーワード：神経活動 記録 DNA ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

脳の情報処理機構を解明するためには、脳を構成する全ての神経細胞の活動を経時的に長期間記録し、機能との対応を解析することが必要不可欠である。しかし、現在使われている神経活動の記録法には欠点があり、脳を構成する全ての神経細胞の活動を長期に亘り記録することができない。機能的磁気共鳴画像法は、全脳の活動を測定できるが、空間分解能が低い。2光子励起顕微鏡は、空間分解能は優れているが、脳全体、特に、脳の深部の活動を測定することが難しい。また、埋め込み型多点電極を用い、特定の脳領域の神経活動を経時的に記録することができるが、全脳にわたる記録は困難である。申請者は、CRISPR/Cas システムを改良することにより、個体レベルでの脳機能解析に有用な多くの遺伝子改変マウスを作成している。最近、CRISPR/Cas システムを用い、細胞に起こる様々な現象をゲノム上に記録できる方法が開発された(Science 353, aag0511, 2016)。申請者は、この方法を改良することにより、脳を構成する全ての神経細胞の活動を長期間ゲノム上に記録できると着想し、本研究を申請した。

2. 研究の目的

Perli らは、CRISPR/Cas システムを応用した genetic recording device を開発した (Science 353, aag0511, 2016)。この系は、PAM 配列を含んだ guide RNA (20-70 nt) 発現カセットをゲノムにノックインし、そこから転写された guide RNA が自分自身を標的にし(stgRNA)、カセット上に DNA 二本鎖切断(DSB)を起こし、indel として生命現象を記録することができる。

本研究ではこの系を改良し、Cas9 の発現に神経活動依存性を持たせることにより、神経活動の履歴を stgRNA 発現カセット上の indel として記録する系を開発する(図1)。

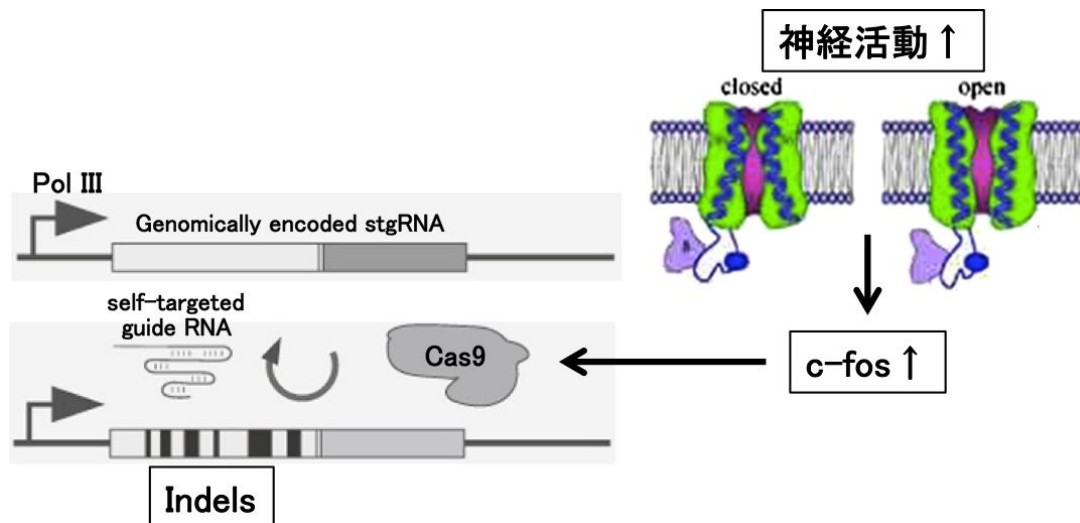


図1 神経活動をゲノムの特定の配列に indel として記録するシステム

Self-targeted guide RNA (stgRNA) 発現カセットをゲノムにノックインし、Cas9 を神経活動依存性(c-fos 依存性)に発現させ、神経活動の履歴を stgRNA 発現カセット内の indel として記録

3. 研究の方法

(1) C6 グリオーマを用いた genetic recording device の開発

C6 グリオーマは、ATP を投与することにより c-fos の発現が上昇する細胞株である。本研究では、C6 グリオーマの c-fos 遺伝子座に Cas9 をノックインした細胞株を樹立する。樹立した細胞株に、CMV プロモーター(CMVp)の下流に TetR(tet リプレッサータンパク質)をつないだベクターを導入し、c-fos 依存性に Cas9 を発現し、なおかつ、tetR を恒常的に発現している細胞株を樹立する。樹立した細胞株に、tet オペレーター-DNA 配列を含む RNA polymerase III の H1 プロモーター(H1p-1xTetO)の下流に stgRNA をつないだベクターを導入し、ATP とドキシサイクリンを添加することにより stgRNA 上に indel が起きるかどうかが、T7 E1 アッセイにより確かめる。添加する ATP の濃度を変えることにより、c-fos の発現上昇の程度を変え、それに依存し stgRNA 上に indel が起こる割合が増加するか、deep sequence により確かめる。

(2) c-fos 依存性 genetic recording devise を搭載したマウスの作成・解析

以下の 3 系統のマウスを作成し、交配することにより神経活動をゲノム上に記録できるマウスを作成する。

- a. c-fos 遺伝子座に Cas9 をノックインしたマウス
- b. β -actin 遺伝子座に H1p-1xTet0-stgRNA をノックインしたマウス
- c. CamK2 遺伝子座に TetR をノックインしたマウス (グルタミン酸作動性ニューロンに TetR が発現しているマウス)

作成したマウスにドキシサイクリン入り餌を投与し、PTZ でてんかん発作を誘発し、脳の各部位から DNA を抽出し、stgRNA ノックイン部位を PCR で増幅し、deep sequence により indel が起きている割合を解析し、神経活動がゲノム上に記録されているかを明らかにする。

4 . 研究成果

(1) C6 グリオーマを用いた genetic recording device の開発

C6 グリオーマの c-fos 遺伝子座の 3' 末端非翻訳領域に 2A ペプチドを介し、Cas9 をノックインした細胞株を樹立した。樹立した細胞株に、CMV プロモーター (CMVp) の下流に TetR (tet リプレッサータンパク質) をつないだベクターを導入し、c-fos 依存性に Cas9 を発現し、なおかつ、tetR を恒常的に発現している細胞株を樹立した。樹立した細胞株に、tet オペレーター-DNA 配列を含む RNA polymerase III の H1 プロモーター (H1p-1xTet0) の下流に stgRNA をつないだベクターを導入した細胞株を樹立した (図 2)。樹立した細胞株に ATP とドキシサイクリン (Dox) を添加し、stgRNA 上に indel が起きるかどうかが、T7 E1 アッセイや deep sequence により解析した。

しかし、stgRNA 上に indel はほとんど見られなかった。原因として、tetR および H1p-1xTet0 の挿入部位による発現抑制効果が考えられるので、挿入部位としてセーフ・ハーバー部位を選び、tetR を ROSA 遺伝子座に、H1p-1xTet0 を β -actin 遺伝子座にノックインした細胞株を樹立した。新しく樹立した細胞株を用い、同様のアッセイを行なったが、stgRNA 上に indel はほとんど見られなかった。樹立した細胞株における tetR に発現や ATP の添加により Cas9 の発現上昇は、RT-PCR や western blot により確認できたが、stgRNA の発現は確認できなかった。原因として、H1p-1xTet0 の挿入部位が考えられる。

(2) c-fos 依存性 genetic recording devise を搭載したマウスの作成・解析

神経活動を DNA 上の indel として記録できるマウスを作成するため、以下の 2 系統のマウスを作成した (図 3)。

- a. c-fos 遺伝子座に Cas9 をノックインしたマウス
- b. ROSA 遺伝子座に TetR をノックインしたマウス 作成したマウス

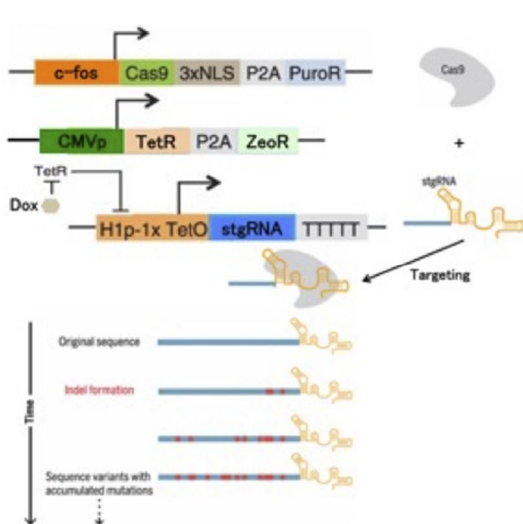


図 2 C6 グリオーマを用いた c-fos 依存性 genetic recording device の開発

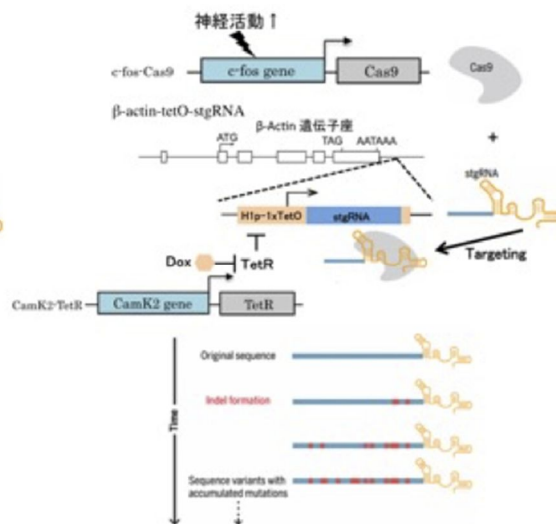


図 3 神経活動履歴をゲノム上に記録できるマウスの作成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 9.Takao, T., Hiraoka, Y., Kawabe, K., Yamada, D., Ming, L., Tanaka, K., Sato, M., Takarada, T.	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactiveatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 213-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 chida, M., Hida, H., Mori, K., Yoshimi, A., Kitagaki, S., Yamada, K., Hiraoka, Y., Aida, T., Tanaka, K., Ozaki, N., Noda, Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 Functional roles of glial glutamate transporter (GLAST) in emotional and cognitive abnormalities of mice after repeated phencyclidine administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 914-924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.euroneuro.2019.06.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakade Shota, Mochida Keiji, Kunii Atsushi, Nakamae Kazuki, Aida Tomomi, Tanaka Kohichi, Sakamoto Naoaki, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05773-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aizawa Hidenori, Sun Weinan, Sugiyama Kaori, Itou Yukiko, Aida Tomomi, Cui Wanpeng, Toyoda Saori, Terai Haruhi, Yanagisawa Michiko, Tanaka Kohichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Glial glutamate transporter GLT 1 determines susceptibility to spreading depression in the mouse cerebral cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2631 ~ 2642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.23874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cui Wanpeng, Aida Tomomi, Ito Hikaru, Kobayashi Kenta, Wada Yusaku, Kato Shigeki, Nakano Takashi, Zhu Meina, Isa Kaoru, Kobayashi Kazuto, Isa Tadashi, Tanaka Kohichi, Aizawa Hidenori	4. 巻 40
2. 論文標題 Dopaminergic Signaling in the Nucleus Accumbens Modulates Stress-Coping Strategies during Inescapable Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7241 ~ 7254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0444-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Mariko, Meyer Jan, Furukawa Kota, Hiraoka Yuichi, Aida Tomomi, Tanaka Kohichi, Tanaka Kenji F., Rose Christine R., Matsui Ko	4. 巻 41
2. 論文標題 Exacerbation of Epilepsy by Astrocyte Alkalization and Gap Junction Uncoupling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2106 ~ 2118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2365-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	Heinrich Heine University		