

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22466

研究課題名(和文) 神経細胞における可逆的タンパク質高速分解システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of the reversible and rapid protein degradation system

研究代表者

竹内 春樹 (Takeuchi, Haruki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任准教授

研究者番号：70548859

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)：タンパク質の発現レベルの制御は、生体におけるタンパク質の機能解析において有望なアプローチである。オーキシン誘導性デグロン法は、真菌や哺乳類の有糸分裂細胞において標的タンパク質を迅速かつ可逆的に分解することが明らかになっている。本研究では、この技術が神経系に応用できるかどうかを検討した。その結果、*in vivo*および*in vitro*の両条件下において、植物ホルモンであるオーキシン依存的に標的タンパク質を数十分という単位で迅速に分解できることを発見した。これにより、特定の時間枠に限定したタンパク質ノックダウンが可能となり、神経系におけるより詳細な遺伝子機能解析が行われることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題では、植物細胞において生じる植物ホルモン依存的なタンパク質分解が、哺乳類の神経細胞において遺伝学的ツールとして移植可能であるかを検証した。その結果、神経細胞の培養系(*in vitro*)及び動物個体(*in vivo*)の両条件下において、植物ホルモン依存的に数十分という時間スケールで神経細胞内で発現する標的タンパク質をノックダウンできることを明らかにした。これにより、特定の時期特異的なタンパク質の機能解析が可能となり、神経科学における遺伝子機能解析の研究が飛躍的に進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic manipulation of protein levels is a promising approach to identify the function of a specific protein in living organisms. Previous studies demonstrated that the auxin-inducible degron strategy provides rapid and reversible degradation of various proteins in fungi and mammalian mitotic cells. In this study, we employed this technology to postmitotic neurons to address whether the auxin-inducible degron system could be applied to the nervous system. Using adeno-associated viruses, we simultaneously introduced enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused with an auxin-inducible degron tag and an F-box family protein, TIR1 into neurons from mice. We found that EGFP fluorescence signals rapidly decreased when adding a plant hormone, auxin under *in vivo* and *in vitro* conditions. These results open the door for neuroscientists to manipulate protein expression levels by the auxin-inducible degron system in a temporally controlled manner.

研究分野：分子神経科学

キーワード：遺伝学的ツール オーキシン誘導デグロン法 神経細胞 遺伝子発現制御 プロテインノックダウン ユビキチンプロテアソーム

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年の生物学は、特定の遺伝子の機能を欠損させる遺伝子改変技術によって目覚ましい進展を遂げた。しかし単純なノックアウト実験では、目的の遺伝子が『いつ、どこで、どのような生命現象に関わるのか』という時空間的な情報を含めた具体的なメカニズムの理解には至らない。組換え酵素 Cre を用いたコンディショナルノックアウトは特定の領域、すなわち「どこ」という情報に対して極めて有益な情報を提供しているものの、特定のタイミングで目的の遺伝子由来のタンパク質の機能を阻害する、いわゆる「いつ」に関する技術に関しては未だ改善の余地がある。

時期依存的な遺伝子発現の制御という点において、siRNA を用いたノックダウンや Cre-loxP system とウイルスインジェクションを組み合わせた時期特異的な遺伝子機能阻害の実験系が開発されている。しかし、これらの方法では標的タンパク質の発現抑制はそのタンパク質の半減期に依存しており、場合によって発現抑制に数日以上もの長い時間が要求されることが懸念される。特に神経科学の分野において、記憶、情動、それに伴う行動は発生過程に構築される複雑な神経回路を基盤として発現される。高等動物の神経回路はあまりに複雑な構造のため、解剖学的によほど明瞭な異常が観察されない限り、神経回路形成の異常を検出するのは容易ではない。従って、発生初期から特定の遺伝子が欠失した個体において高次機能の異常が観察された場合、それが脳回路の発達障害によるものか、もしくは脳内の情報処理の異常によるものなのかを区別することが極めて難しく、時間解像度の高いタンパク質の発現制御法は神経科学の分野において求められる技術である。

近年、植物由来のホルモンであるオーキシンを用いたタンパク質高速分解システム(Auxin-induced degron (AID) system)が開発された。この方法は、標的タンパク質にデグロンと呼ばれる短いタグを付加することによりオーキシン依存的に標的タンパク質をユビキチンプロテアソーム分解へと導き、数十分という短い時間スケールで標的タンパク質をノックダウンすることが可能となる(Nishimura et al., *Nat. methods*(2009))。またこのシステムは、タンパク質の産生には影響を与えないことから、オーキシンの除去により標的タンパク質の可逆的な欠失を可能とする。ところが、AID システムは比較的歴史が浅く、植物で利用される分解系を用いているため神経科学との接点が希薄であったため、神経系での導入実績は殆ど報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、植物由来ホルモンであるオーキシンを用いたタンパク質高速分解システム (AID システム)の神経細胞への導入を試みる。これにより、既存の遺伝学的ツールを凌ぐ時間解像度の高い遺伝子機能解析系を神経科学の分野に提供する。

## 3. 研究の方法

植物細胞では、オーキシン依存的に AUX/IAA タンパク質の特異的分解が引き起こされる。AID システム(図 1)を神経細胞に導入するためには、予め標的のタンパク質をデグロンと呼ばれる短いタグで標識すること、シロイヌナズナ由来のユビキチンリガーゼである TIR1 を神経細胞に発現させること、この 2 つが必要となる。そこで本研究では、緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein (GFP))を bait に、GFP にデグロンを付加した mAID-GFP とユビキチンリガーゼ TIR1 を共発現させる AAV(アデノ随伴ウイルス)を作製し、神経細胞に遺伝子導入した後、in vitro, in vivo の両条件において AID システムによるノックダウン効率を検証した。

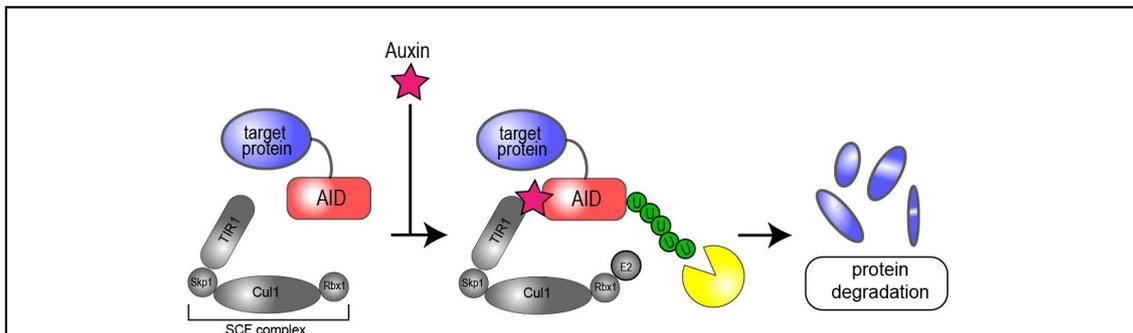


図 1 オーキシン誘導デグロン法(AID)による時期特異的タンパク質の分解

細胞にデグロン(AID)を融合したタンパク質と TIR1 を共発現させる。TIR1 はオーキシン依存的に AID にポリユビキチン化を促し、プロテアソーム(黄色)による分解を誘導する。

## 4. 研究成果

### (1) in vitro 神経細胞における AID システムの導入

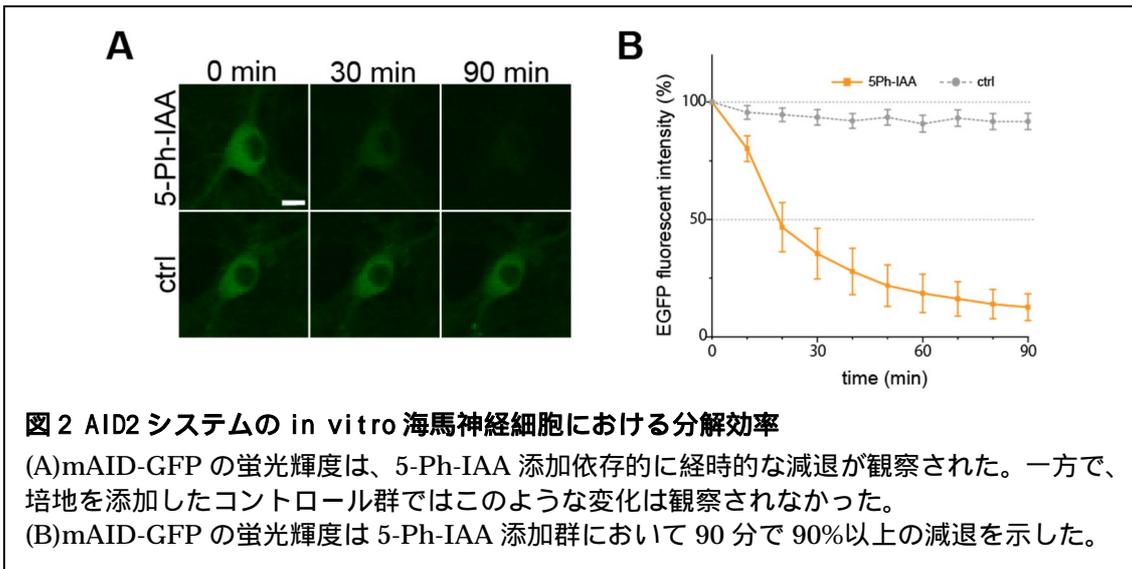
#### AID システムの導入

AID システムは酵母やヒト由来線維芽細胞において、数十分で標的タンパク質を大幅にノックダウンすることが報告されている。神経細胞における AID 法の分解効率を明らかにするために、まずマウスから単離した海馬神経細胞の初代培養系を用いて検証を行った。*mAID-GFP* 及び *TIR1* を発現させるウイルスベクター(AAV)を作製し、これを培養 7 日目の神経細胞に感染させ、培養 14 日目にオーキシンを添加して *mAID-GFP* 蛍光のライブイメージングを行った。その結果、*mAID-GFP* の蛍光輝度はオーキシンの添加により 90 分で 40%程度まで低下した。しかし、それ以降輝度の減退は見られず、減退率は 40%でプラトーに達することがわかった。この値は、他の細胞種で報告されていた数値と比較すると著しく低く、タンパク質のノックダウン系として実用的とは言い難い。既存の遺伝学的ツールを凌ぐ時間解像度の高い遺伝子機能解析系の構築を目指すにあたり、導入する技術にはより高いノックダウン効率が求められる。この問題を解決するため、我々は AID システムの改良版として近年開発された AID2 システム(Uchida et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2018, Yesbolatova et al., *Nat. Commun.*, 2020)に着目した。

#### AID2 システムの導入

AID2 システムでは *TIR1* のオーキシン依存的なデグロン認識機構に改良が加えられている。具体的には、オーキシンのインドール環 5 位にフェニル基を導入したオーキシンアナログ(5-Ph-IAA)と、*TIR1* のオーキシン結合部位に露出する 74 番目のフェニルアラニングリシンに置換した変異型 *TIR1* を組み合わせることで、両者の結合能及び *TIR1* のデグロン認識能が向上されている。我々はこの AID2 システムを神経細胞に導入することを試みた。

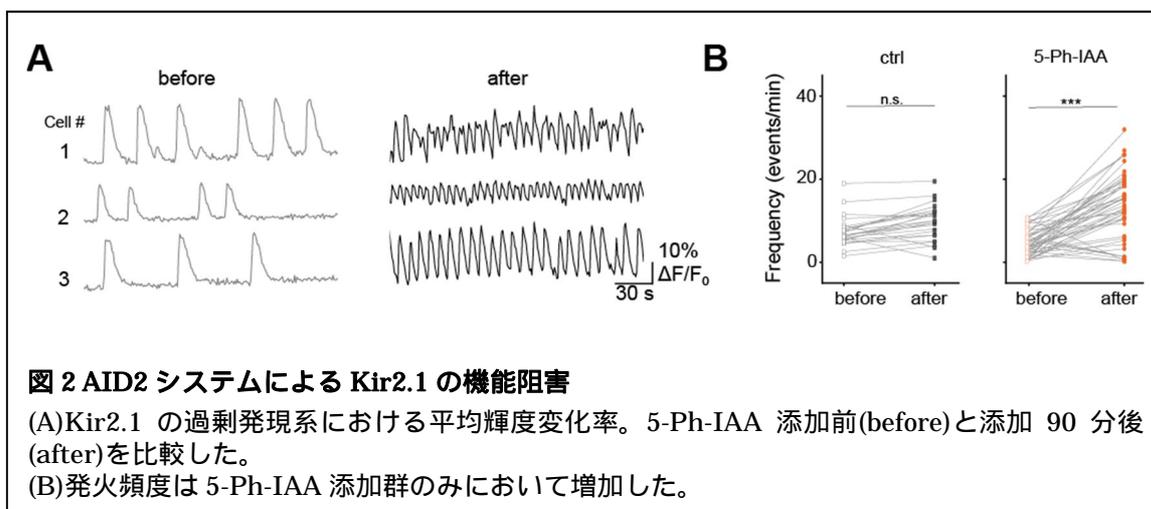
と同様に AAV を用いて *mAID-GFP* と変異型 *TIR1* を海馬神経細胞の初代培養系に発現させ、5-Ph-IAA 添加後の GFP 蛍光変化を観察した。その結果、*mAID-GFP* の蛍光輝度は 90 分で 90%以上まで減退することがわかった(図 2)。その際、添加する 5-Ph-IAA 量も既存のオーキシンと比較して 2500 分の 1 程度で十分であることが分かった。これらの結果から、改良型 AID2 システムを用いることで神経細胞において高速かつ高効率な標的タンパク質のノックダウンが可能であることが示された。



#### AID2 システムによる標的タンパク質の機能阻害

次に、AID2 システムにより実際に標的タンパク質の機能阻害ができるかどうかを検証した。神経細胞において内向き整流性カリウムチャネル(*Kir2.1*)を過剰発現させると、静止膜電位がカリウムの平衡電位に近づき、より低い値をとるため(過分極)、活動電位の発生が抑制される。従って、*Kir2.1* は神経活動を阻害する遺伝学的ツールとして様々な実験に利用されている。我々は、*Kir2.1* を標的タンパク質として時期特異的な神経細胞の活動阻害が可能かどうかを検証した。前述のように AAV を用いて *Kir2.1* に *mAID* を付加した *Kir2.1-mAID*、カルシウムインジケーターである *GCaMP7f*、改変型 *TIR1* を海馬由来神経細胞の初代培養系に遺伝子導入した。培養 14 日目に 5-Ph-IAA を添加し、添加前と添加 90 分後の神経細胞の活動を、*GCaMP7f* を用いたカルシウムイメージングにより記録した。その結果、5-Ph-IAA 添加前に比べて添加後の神

経発火の頻度が上昇することがわかった(図 3)。この結果は、Kir2.1 の過剰発現により過分極していた静止膜電位が Kir2.1 の分解に伴って脱分極側にシフトすることで、神経細胞が発火しやすくなったという解釈と矛盾しない。以上から、AID2 システムを用いた標的タンパク質の機能阻害が可能であることが示唆された。



**図 2 AID2 システムによる Kir2.1 の機能阻害**

(A) Kir2.1 の過剰発現系における平均輝度変化率。5-Ph-IAA 添加前(before)と添加 90 分後(after)を比較した。

(B) 発火頻度は 5-Ph-IAA 添加群のみにおいて増加した。

### AID2 システムによる内在性タンパク質の高速分解

続いて、内在性タンパク質に対する AID2 システムの分解効率を検証した。ORANGE(Jelmer et al., *PLoS Biol.*, 2020)と呼ばれる CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を利用して、海馬由来の初代神経細胞のチューブリン  $\beta 3$  遺伝子(*Tubb3*)の C 末端に *mAID-GFP* を挿入した。*Tubb3-mAID-GFP* に由来する蛍光は神経細胞の局在(細胞体、軸索、樹状突起など)に関わらず一様に分布していた。その後、AAV を用いて改変型 TIR1 を導入し、培養 21 日目に 5-Ph-IAA を添加して *Tubb3-mAID-GFP* の蛍光変化を観察した。その結果、蛍光輝度は細胞内局在に関わらず一様に添加後 90 分で 90%以上減退した。これは、AID2 システムが内在性タンパク質を標的とした場合においても高効率なノックダウンを細胞内局在に関わらず誘導できることを示唆している。

### (2) AID2 システムの in vivo におけるタンパク質分解効率の検証

最後に、AID2 システムが in vivo 条件下における導入の可能性について検討した。まず、*mAID-GFP* と改変型 *TIR1* を、AAV を用いて生後 1 日齢のマウス視覚皮質へと導入した。2 週間後、5-Ph-IAA の腹腔内投与または脳組織への局所投与を行った。マウスの脳で発現した GFP の蛍光は十分強く、頭蓋の上から蛍光顕微鏡を介して目視で観察できるため、この方法によって 5-Ph-IAA 投与前後における GFP 蛍光の輝度変化を調べた。その結果、局所投与よりも腹腔内投与による 5-Ph-IAA の導入が最も効率がよく、かつ高い再現性をもって GFP 蛍光の減退を誘導することがわかった。

続いて、詳細な時間分解能を明らかにするために、二光子顕微鏡を用いて単一細胞レベルでの GFP 蛍光輝度の時間変化を観察した。生後 1 日齢のマウスに先程と同様の AAV を用いて必要な遺伝子を導入し、2 週間後に外科的手術により頭蓋骨を取り除き、GFP 蛍光強度の変化を観察した。その結果、GFP の蛍光輝度は 5-Ph-IAA の腹腔内投与から 3 時間後までに 70%程度減退する様子が観察された。この結果から、AID2 システムは in vivo 条件化の神経細胞においても導入可能であり、かつ従来のノックダウン手法と比較しても格段に高速な標的タンパク質の分解を誘導できることが示された。

### <総括と展望>

ゲノム中に存在する限られた数の遺伝子で我々高等動物が持つ複雑な機能とそれを支える構造が形成されていることを考慮すると、1つの遺伝子は、複数の機能を担うことは明白である。本研究計画の最大の目的は、特定のタンパク質を短時間の間だけ可逆的に欠失させる遺伝学的ツールの開発である。これは、既存のどの遺伝学的ツールでもなし得なかった操作系であり、この AID システムが神経科学に導入することができれば、これまではっきりと結論づけることが難しかった問題に対して明確な回答を与えることができるようになる。しかし、AID システムを移植するためには、OsTIR1 の導入と標的タンパク質へのデグロン付加という二つの条件が必要であり、導入が容易であるとは言い難い。今後、CRISPR などとの組み合わせによる更なる条件検討が必要となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Risako, Ihara Naoki, Morikawa Shota, Nakashima Ai, Kanemaki Masato T., Ikegaya Yuji, Takeuchi Haruki	4. 巻 30
2. 論文標題 Auxin-mediated rapid degradation of target proteins in hippocampal neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 908～913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001299	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 Yesbolatova Aisha, Saito Yuichiro, Kitamoto Naomi, Makino-Itou Hatsune, Ajima Rieko, Nakano Risako, Nakaoka Hirofumi, Fukui Kosuke, Gamo Kanae, Tominari Yusuke, Takeuchi Haruki, Saga Yumiko, Hayashi Ken-ichiro, Kanemaki Masato T.	4. 巻 11
2. 論文標題 The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19532-z	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakano R, Ihara, N, Morikawa S, Kanemaki, M, Ikegaya, Y, Takeuchi, H
2. 発表標題 Auxin inducible rapid degradation in hippocampal neurons
3. 学会等名 Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakano R, Ihara N, Morikawa S, Nakashima A, Kanemaki MT, Ikegaya Y, and Takeuchi H
2. 発表標題 Auxin-mediated rapid degradation of target proteins in hippocampal neurons
3. 学会等名 AFMC international medicinal chemistry symposium（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野利沙子、伊原尚樹、森川勝太、中嶋藍、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経細胞における標的タンパク質高速分解システムの構築
3. 学会等名 日本味と匂学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野利沙子、伊原尚樹、森川勝太、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経細胞における可逆的タンパク質高速分解システムの構築
3. 学会等名 第140回日本薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野利沙子、森川勝太、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経系におけるオーキシン誘導性タンパク質高速分解系の構築
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野利沙子、伊原尚樹、森川勝太、中嶋藍、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 Auxin-mediated rapid degradation of target proteins in hippocampal neurons
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野利沙子、伊原尚樹、森川勝太、中嶋藍、鐘巻将人、池谷裕二、竹内春樹
2. 発表標題 神経系におけるオーキシン誘導性タンパク質高速分解システムの利用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔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
研究協力者	池谷 裕二  (Ikegaya Yuji)		
研究協力者	鐘巻 将人  (Kanemaki Masato)		

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
---------	---------