

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21461

研究課題名(和文)免疫組織化学にとって代わる内在タンパク質の発現局在を調べるための革新的方法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for analyzing the distribution of endogenous proteins in mammalian brain tissues

研究代表者

内ヶ島 基政 (Uchigashima, Motokazu)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：10614662

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)：内在タンパク質の細胞内局在を知ることは細胞の生理機能を知る上で重要である。免疫組織化学は内在タンパク質の分布を調べる方法として広く使用されるが、プローブとなる抗体はその巨大さ故、シナプスのような高密度構造内の目的タンパク質を標識できない。本研究はこの問題を克服するため、in vivoゲノム編集を用いて目的タンパク質に融合させた化学タグを小さな蛍光リガンドで標識することで、目的タンパク質の発現分布を単一細胞レベルで高感度かつ定量的に評価できる、免疫組織化学に取って代わる新規手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された技術は、これまで検出が困難であった内在タンパク質を他のタンパク質と同じ条件で検出することを十分可能にするため、シナプス構成タンパク質の新たな理解に寄与できる。また、従来のシナプスの機能の理解は、多数のシナプスの平均化されたデータに基づいてきたが、本技術を用いて実際の学習記憶に関わるシナプスを1シナプスレベルで解析できれば、学習記憶に伴ってどのシナプスで何が起きているのかをのシナプス構成タンパク質の視点から理解可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The localization of endogenous proteins is essential for understanding cellular functions. Although immunohistochemistry is a prevalent method to examine the anatomical information of proteins of interest (POIs), it sometimes fails the detection of POIs at dense structures due to an insufficient penetration of large antibodies against POIs. To overcome this issue, we developed a novel method to quantitatively detect endogenous POIs at single cell levels via small fluorescent ligand-mediated labeling of chemical tags which were fused to POIs by in vivo genome editing techniques.

研究分野：神経解剖学

キーワード：分子標識 ゲノム編集 化学タグ 免疫組織化学 超解像顕微鏡 組織透明化 単一ニューロン シナプス

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は細胞を構成する代表的な機能素子である。それ故、内在タンパク質の細胞内における詳細な局在を知ることは細胞の生理機能を知る上で重要である。

免疫組織化学は分子特異的な抗体を用いて内在タンパク質の発現局在を調べる方法である。抗体は、無数に存在する外来微生物から生体を守るという本来の性質上、莫大な組み合わせのアミノ酸配列を識別可能なため、様々なタンパク質を特異的に認識できる抗体が生み出されてきた。これらの抗体を標識物質で可視化した上で、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いて観察することにより、内在タンパク質の細胞内分布をミクロからナノのスケールにも及ぶ解像度で理解することが可能になる。しかし、免疫組織化学にはいくつかの弱点が存在する。例えば、全ての目的タンパク質に対して特異的な抗体が利用可能でない。仮に目的タンパク質に対する特異的な抗体が利用可能であっても、目的タンパク質がシナプスや核といった多数のタンパク質が複合体を形成するような場所に局在する場合、抗体の十分な浸透は得られない。また、組織標本に厚みがある場合、抗体が組織深部まで到達するのに数日から数週間もの時間を要する上、標本全体を通じた均一な標識は容易でない。

一方、免疫組織化学に依らないで内在タンパク質の発現局在を調べる手法として、ゲノム編集を介して目的タンパク質の遺伝子座にタグ配列をノックインする方法が注目を浴びている<sup>1,2</sup>。この方法は、理論上ほぼ全ての目的タンパク質にタグを融合することが可能である。タグ配列として最も用いられる抗原エピトープは、その検出に免疫組織化学が必要となるが、蛍光タンパク質を用いれば、免疫組織化学を介さずに目的タンパク質の発現局在を調べることが可能になる。しかし、内在タンパク質の発現は一般に低いため、融合に用いられる既存の蛍光タンパク質は必ずしも検出に十分な明るさを備えていない。また、金属粒子による標識が必要な電子顕微鏡による観察に応用できない。したがって、ゲノム編集技術を用いて組織における内在タンパク質の発現局在を調べるためにはさらなる改善が必要であった。

### 2. 研究の目的

本研究は化学タグに着目する。化学タグはヒト O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase やバクテリアのヒドロラーゼ等を改変して作成されたタンパク質であり、化学合成されたりガンドと非可逆的に結合する<sup>3</sup>。化学タグのリガンドは一般に分子量にしておよそ数百ダルトンほどの小分子である。故に、あらゆる組織や構造に対して十分な浸透が期待できる。化学タグのリガンドには、明るく光安定性に優れた有機蛍光色素が結合したリガンドをはじめとして、様々な標識分子を結合させた豊富なレパートリーが利用可能である。さらに、簡単な化学反応によって任意の標識分子を結合させたオリジナルのリガンドを得ることも可能である。従って、本研究はゲノム編集技術を用いて任意の内在タンパク質に化学タグを融合させ、小分子リガンドを用いて組織中の内在タンパク質を標識し、光学顕微鏡および電子顕微鏡を通じて検出することによって、組織中の内在タンパク質をスループット良く高感度かつ定量的に検出するための新規プラットフォームを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 化学タグの目的タンパク質への挿入

SLENDR 法は、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を利用し、あらゆる細胞・時期・場所で、あらゆるタンパク質をタグを介して標識する技術である<sup>1,2</sup>。胎生 14 または 15 日齢のマウス胎児脳で子宮内穿孔法を用いた SLENDR 法を行い、大脳皮質一次体性感覚野 2/3 層の単一ニューロンにて、目的タンパク質の N または C 末端に該当するゲノム部位に、化学タグをノックインした。興奮性シナプスは多数のタンパク質を高密度に含むため、抗体がその内部まで浸透できない。それ故、興奮性シナプスタンパク質の多くは免疫組織化学による検出が困難である。そのような興奮性シナプスタンパク質のうち、主要な足場タンパク質である PSD95 と、グルタミン酸受容体のうち、NMDA 受容体 GluN1 サブユニットと AMPA 受容体 GluA2 サブユニットを目的タンパク質として用いた。いずれの場合においても、ニューロン形態を可視化する目的で緑色蛍光タンパク質 mEGFP を共発現させた。

#### (2) 組織の準備

ゲノム編集を行ったマウスを 1 か月齢で還流固定した。光学顕微鏡観察用には 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液を用い、電子顕微鏡観察用にはさらに 0.1%グルタルアルデヒドを加えたものを使用した。得られた固定脳から厚さ 50-300  $\mu\text{m}$  の脳スライスを作製した。

#### (3) 光学顕微鏡を用いたシナプスタンパク質の検出

ゲノム編集された脳スライスを有機蛍光色素が結合した化学タグリガンドを用いて標識し、蛍光標識された PSD95、GluN1、GluA2 を共焦点顕微鏡あるいは超解像顕微鏡（構造化照明顕微鏡）を用いて行観察した。SLENDR 法は単一ニューロンレベルで内在タンパク質を標識できるので、1 つのニューロン丸ごとを含むような厚みのある脳スライスに対して、組織透明化処置

SeeDB2G<sup>4</sup> を施し、深部観察に適したシリコン浸レンズ ( Olympus UPLSAPO 30xS または 60xS ) を用いてイメージングすることで、GluA2 の発現分布を 1 つのニューロン丸ごとのレベルで検出した。

#### (4) 電子顕微鏡を用いたシナプスタンパク質の検出

化学タグ標識の電子顕微鏡観察への応用を示すため、市販の未標識の化学タグリガンドに対して、求核置換反応を用いて直径 0.8 nm の金コロイドを標識した。この金コロイド標識リガンドを目的タンパク質に融合した化学タグと結合させ、電子顕微鏡による可視化のための銀増感反応を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 化学タグ標識による組織中の内在シナプスタンパク質の検出方法の確立

共焦点顕微鏡を用いた標識脳スライスの観察において、化学タグ標識された PSD95 のシグナルは、単一大脳皮質ニューロンの樹状突起上に多数存在するスパインの頭部に強く集積していた ( 図 1 )。興奮性シナプス終末に選択的な発現を示す小胞膜グルタミン酸トランスポーター VGluT1 に対する免疫染色との組み合わせにより、PSD95 の化学タグシグナルの集積が VGluT1 陽性の興奮性シナプス終末と重なり合う、または接触する像も観察された。また、GluN1 および GluA2 のシグナルも PSD95 と同様に、スパイン頭部に選択的な分布を示した。特に、スパイン頭部にて 1 つの集積として捉えられた GluA2 のシグナルの一部は、超解像顕微鏡を用いた観察によって、複数の輝点から構成されていることも明らかとなった。これは発達したスパインにてしばしば認められる穿孔型のシナプス後肥厚を反映していると考えられる。このような化学タグシグナルの分布パターンから、本研究による化学タグを用いた標識方法は、内在の興奮性シナプスタンパク質を単一ニューロンレベルで高感度に可視化できることがわかった。

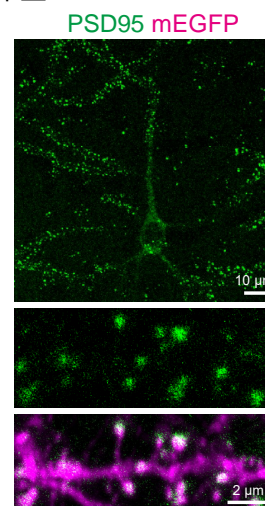


図 1

#### (2) 単一ニューロンの大部分で内在 GluA2 タンパク質の発現を検出

単一ニューロン上の GluA2 標識シグナルを全て検出する目的で、1 つの標識ニューロンが丸ごと含まれるような厚みのある脳スライスから深部観察に適した条件にて切片の上から下までのスタック画像を取得したところ、GluA2 を標識した点状のシグナルが 1 つのニューロンから伸びる多数の樹状突起に沿って密に分布する様子を捉えることに成功した ( 図 2 )。これらの輝点の 1 つ 1 つが個々の興奮性シナプスに由来するものと考えられる。さらに、それぞれの樹状突起上の輝点の強度や密度を算出することもできた。このように、本研究で開発した方法は、単一ニューロン上の内在シナプスタンパク質の発現分布を定量的に評価可能であることが実証された。

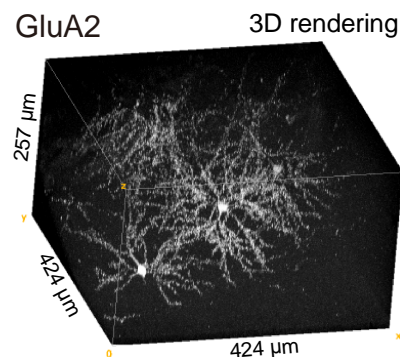


図 2

#### (3) 電子顕微鏡観察に応用可能な化学タグリガンドの検討

まず、微細構造の保持のために添加されるグルタルアルデヒドを用いた固定が化学タグ標識に対して影響がないことを確認した。次に、独自に作製した金コロイド標識リガンドを用いた化学タグ標識を行ったが、特異的なシグナルが得られなかった。失敗の原因として、金コロイドのリガンドに対する標識効率が不十分であったり、金コロイド標識リガンドの組織浸透性が不十分である可能性が考えられる。これらについては今後の検討課題である。

#### < 引用文献 >

- Mikuni et al., *Cell* 2016
- Nishiyama et al., *Neuron* 2017
- Gautier et al., *Chem Biol* 2008
- Ke et al., *Cell Rep* 2016

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uchigashima Motokazu, Konno Kohtarou, Demchak Emily, Cheung Amy, Watanabe Takuya, Keener David G, Abe Manabu, Le Timmy, Sakimura Kenji, Sasaoka Toshikuni, Uemura Takeshi, Imamura Kawasawa Yuka, Watanabe Masahiko, Futai Kensuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Specific Neuroligin3- Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e59545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59545	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 該当する
1. 著者名 Fukabori R, Iguchi Y, Kato S, Takahashi K, Eifuku S, Tsuji S, Hazama A, Uchigashima M, Watanabe M, Mizuma H, Cui Y, Onoe H, Hikishima K, Yasoshima Y, Osanai M, Inagaki R, Fukunaga K, Nishijo T, Momiyama T, Benton R, Kobayashi K	4. 巻 40
2. 論文標題 Enhanced Retrieval of Taste Associative Memory by Chemogenetic Activation of Locus Coeruleus Norepinephrine Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8367 ~ 8385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1720-20.2020	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 該当する
1. 著者名 Uchigashima Motokazu, Leung Ming, Watanabe Takuya, Cheung Amy, Le Timmy, Pallat Sabine, Dinis Alexandre Luis Marques, Watanabe Masahiko, Kawasawa Yuka Imamura, Futai Kensuke	4. 巻 295
2. 論文標題 Neuroligin3 splice isoforms shape inhibitory synaptic function in the mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8589 ~ 8595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.AC120.012571	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 該当する
1. 著者名 Mikuni Takayasu, Uchigashima Motokazu	4. 巻 54
2. 論文標題 Methodological approaches to understand the molecular mechanism of structural plasticity of dendritic spines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6902 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14734	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 Uchigashima Motokazu, Cheung Amy, Futai Kensuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Neurologin-3: A Circuit-Specific Synapse Organizer That Shapes Normal Function and Autism Spectrum Disorder-Associated Dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 749164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.749164	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 該当する

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Uchigashima Motokazu, Konno Kohtarou, Demchak Emily, Cheung Amy, Watanabe Takuya, Keener David G, Abe Manabu, Le Timmy, Sakimura Kenji, Sasaoka Toshikuni, Uemura Takeshi, Imamura Kawasaki Yuka, Watanabe Masahiko, Futai Kensuke
2. 発表標題 Specific Neurologin3- Neurexin1 Trans-synaptic Interaction Regulates GABAergic Synaptic Function in an Input Cell Type-Dependent Manner
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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

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		
米国	マサチューセッツ大学医学部		