

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15229

研究課題名(和文) ゲノムワイドCRISPRスクリーニングによる細胞質タンパク質凝集制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of genetic regulators for intracellular aggregation by genome-wide CRISPR screening

研究代表者

富田 泰輔 (Tomita, Taisuke)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：30292957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：認知症患者脳における特徴的な病理学的所見の一つである細胞内凝集体は、タウタンパク質を構成成分としている。細胞内におけるタウ凝集体の形成や除去といった細胞内凝集体の動態を規定する分子メカニズムの解明は、治療戦略を考える上で重要と考えられる。本研究では、そのメカニズムに關与する新規分子をCRISPR/Cas9システムを用いたゲノムワイドスクリーニングにより探索することを目指し、その実験系の構築を行った。そして脳に蓄積するタウ凝集体と類似した凝集体を保持する培養細胞系を確立し、その挙動をFACSにより定量的に測定することに成功した。今後ゲノム編集を加え凝集体の量の変化を与える遺伝子の同定を目指す。

研究成果の概要(英文)：Intracellular aggregation of tau protein is one of pathological hallmarks in the brains of dementia patients. Identification of regulators for the generation or clearance of the intracellular tau aggregates is important for the development of therapeutic strategies against dementia. To screen the genetic regulators for tau aggregates in genome-wide manner by CRISPR/Cas9 system, we established the culture cell system with intracellular tau aggregation. These aggregates showed similar biochemical characters with that derived from tau transgenic animal brain. Also qualitative and quantitative changes of intracellular aggregation can be analyzed by FACS. We will perform genome-wide screening of the genetic regulators by genome editing.

研究分野：病態生化学

キーワード：認知症 凝集タンパク質 CRISPR/Cas9 タウ 脳神経疾患

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患における病理学的特徴の一つとして、異常に線維化したタンパク質による細胞内凝集体の形成があげられる。凝集体の構成タンパク質としては、それぞれタウ、 $\alpha$ -シヌクレイン、TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) など、疾患によって様々であるが、いずれの疾患においても家族性疾患においてはその遺伝子上に点突然変異が見出されており、凝集性を亢進させることが知られていることから、細胞内凝集体の形成が疾患発症の原因であると考えられている (Lee et al, Nat. Rev. Neurosci., 2012; Goedert, Science, 2015)。さらに近年、こうした異常タンパク質が細胞から細胞へ移行し正常細胞を病変細胞に変える「細胞間伝播」という概念も提唱され、病態の進行(広がり)に関与している可能性が示唆されている (Jucker et al, Nat. Rev., 2013)。こうした知見は、細胞内凝集体の動態に関する分子機構解明が、その治療戦略を考える上で重要であることを示すものであるが、いまだ明らかにはなっていない。

これは培養細胞系で細胞内凝集体を再現することが非常に困難であり、ほぼ全ての解析がリコンビナントタンパク質のインキュベーションによる *in vitro* での凝集・線維化実験であったためである。そのため、細胞質中にこれらの凝集体が形成される分子機構や、凝集体を保持することによって生じる細胞応答の変化などについてはほとんど明らかとなっておらず、プロテアソームやオートファジー、シャペロンのようなタンパク質のクオリティコントロールに関連する研究のみが為されてきた。また、遺伝子改変マウスでは細胞内凝集体が認められるが、同じタンパク質の過剰発現によっても同一個体内で凝集体を形成する細胞としない細胞が認められ、そのギャップを埋める分子機構については不明である。

近年、培養細胞を用いてタンパク質の凝集体を形成させる細胞内凝集体形成モデルが確立された (Nonaka et al, Hum. Mol. Genet., 2009; Nonaka et al, J. Biol. Chem., 2010)。凝集体構成タンパク質を過剰発現させても凝集体は形成されないが、リコンビナントタンパク質を *in vitro* で線維化させた後、トランスフェクション試薬を用いて細胞内に導入すると (プロテイントランスフェクション) 24 時間以内に細胞内に凝集体が形成される。しかしこの培養細胞モデルでは、数日のうちに大部分の凝集体が消失する。また凝集体の大きさや形態について、細胞ごとに異なることも知られている。これらの結果は、凝集体の形成・維持あるいは分解に関わる因子(群)が細胞に備わっていることを示唆しているが、その具体的な分子機構については全くの

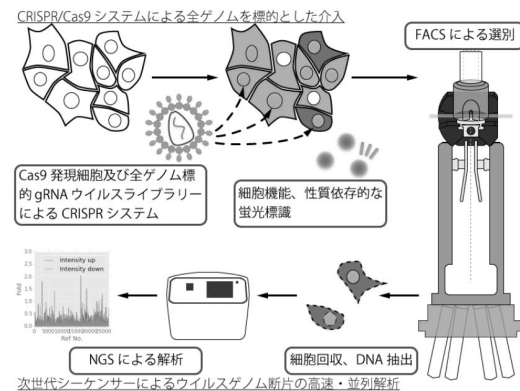
不明である。そこで申請者は、本モデルにおける凝集体の挙動を指標として細胞内凝集体の形成・維持及び分解に関わる遺伝子を同定できると考えた。

### 2. 研究の目的

細胞内凝集体の動態、すなわちその形成と維持及び分解に関与する遺伝子を網羅的に同定することを目的に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術と FACS 及び次世代シーケンサーを利用したゲノムワイドノックアウトスクリーニングを行うことを考えた。特に、アルツハイマー病などにおいて凝集体を形成するタウタンパク質に着目し、ゲノムワイドノックアウトスクリーニング系の構築を検討した。

### 3. 研究の方法

図1: スクリーニングストラテジー



ゲノムワイドノックアウトスクリーニング法については、図1に示すようなストラテジーを考えた。CRISPR/Cas9 システムは、ヌクレアーゼである Cas9 と標的遺伝子を規定する gRNA の発現により、特異的かつ効率的なノックアウトが可能な革新的なゲノム編集技術である (Cong et al, Science, 2013; Mali et al, Science, 2013)。蛍光強度をタウ細胞内凝集体の指標として用いることで、様々な gRNA によってゲノム編集された細胞プールに対して蛍光強度の異なる細胞集団(蛍光強度の高い集団あるいは低い集団)を FACS で検出、ソートする。それらの細胞でノックアウトされた遺伝子については次世代シーケンサーとバーコード配列が付加された gRNA ライブラリーの利用により、迅速な遺伝子同定が可能となる。

本スクリーニングを行うためには、Cas9 を恒常的に発現し、かつタウ細胞内凝集体をもつ(形成しうる)細胞を樹立することが必要である。また、蛍光強度によってタウ細胞内凝集体を評価しうる評価系の構築も必須である。

#### 4. 研究成果

まず本スクリーニング法に適切な細胞を樹立するために、タウ細胞内凝集体をもつ細胞株を樹立することを目指した。そのために、既報に従い、蛍光タンパク質を付加したタウを恒常的に発現する HEK293 細胞株を取得した。一方で大腸菌由来のリコンビナントタウを作成・精製し、37 °C で数日間インキュベーションすることにより、タウの線維を作成した。このタウ線維を蛍光タウ恒常発現細胞株にリポフェクション法によりプロテイントランスフェクションした。培養3日後に蛍光顕微鏡を用いて観察すると、細胞内に蛍光タウによって形成される凝集体をもつ細胞が30-60%の高確率で得られることがわかった。またタウ細胞内凝集体の大きさや形・数は一様ではなく、様々なパターンがあることもわかった。これは、細胞ごとにタウ細胞内凝集体形成機構に関わる分子が異なる可能性を示唆していると考えられる。

この人工的なタウ凝集体の生化学的性質を明らかにするために、上記凝集体を持つ HEK293 細胞と、タウ線維トランスフェクションを行っておらず凝集体を持たない通常のタウ恒常発現 HEK293 細胞を、不溶性を示すタウ病理の指標となる 1%サルコシル溶液で可溶化した。その結果、凝集体をもたない細胞に比べて、凝集体をもつ細胞ではサルコシル不溶画分に回収されるタウの量が多く、凝集体をもつ細胞においてタウは不溶性を獲得していることがわかった。

またこれらのタウが細胞間伝播能を示すかどうかを明らかにする目的で、特にタウの取り込みに着目した。細胞間伝播の過程では、凝集を誘引するタウがレシipient側の細胞に取り込まれる必要がある。上記の凝集体を持つ細胞と持たない細胞のホモジネートを作成し、異なる遠心条件(3000 x g, 10000 x g, 50000 x g) で遠心後それらの上清を HEK293 細胞に処理し、その取り込み量を検討した。その結果、タウ凝集体を持つ HEK293 細胞ライゼートの低速遠心後の上清(3000 x g および 10000 x g) は取り込まれたが、高速遠心後の上清では取り込みが観察されなかった。すなわち、タウモノマーは取り込まれない、もしくは速やかに分解されるのに対して凝集したタウにのみ細胞間伝播能がある可能性が示唆された。また各種細胞内オルガネラマーカに対する抗体を用いて免疫染色したところ、取り込まれたタウは主に LAMP1 陽性リソソームに局在していることも明らかとなった。

また、月齢依存的に凝集したタウが細胞内に蓄積するタウトランスジェニックマウスを用いて同様の実験を行った。その結果、培養細胞系と同じく、低速遠心後の上清中タウは取り込まれたが高速遠心後の上清中タウ

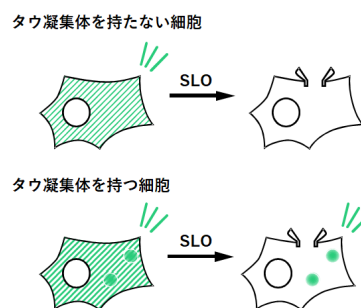
は取りこまれず、これらの性質はタウトランスジェニックマウス脳ホモジネートとタウ凝集体を持つ HEK293 細胞ホモジネートに共通していることがわかった。

スクリーニングのためには、タウ細胞内凝集体をもつ細胞をクローン化する必要がある、現在その作業を進めている。また、そのようなクローンは1つではなく複数取得することを目指しており、細胞内凝集体の形などの違いをもたらす因子の同定に結びつきたい。クローンを取得し次第、さらに Cas9 を発現させ、Cas9 恒常発現株を得る。

次に、FACS を用いて蛍光強度によりタウ細胞内凝集体を検出・評価しうる実験系の構築を検討した。まず、シート構造に富む凝集タウに特異的に結合する蛍光色素を用いて免疫染色及び FACS を検討したところ、これらの色素ではタウ細胞内凝集体を染色することができなかった。凝集したタウが細胞内に蓄積している高齢のタウトランスジェニックマウス由来の細胞に対しては、染色及び FACS による評価が可能であった。このことから、これらの蛍光色素は比較的 mature な凝集状態のタウに結合する可能性があること、HEK293 細胞内に一過性に形成されたタウ細胞内凝集体は immature な凝集状態であるため染色されない可能性が示唆された。

そこで次の手段として、蛍光タンパク質を付加したタウの凝集体形成評価を検討した。通常、蛍光タンパクの付加では、凝集体を形成しているタウも形成していないモノマーのタウもどちらにも蛍光タグが付加されていることから、凝集体とモノマーを FACS によって区別することは難しい。実際、タウ細胞内凝集体をもつ細胞群と持たない細胞群を FACS でソートしたところ、蛍光強度のみならず、細胞の状態を示すその他の指標においても両者を区別することはできないことがわかった。

図2：SLO処理の概念図



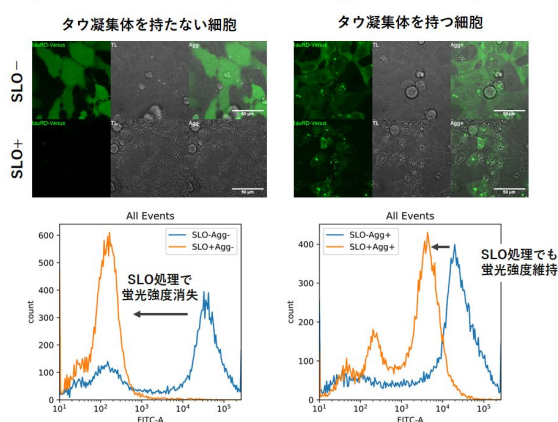
そこで、ストレプトリジン O (SLO) による細胞膜穿孔と組み合わせることにした(図2)。本手法では、SLO を用いて細胞膜に穴をあけることで、凝集体を形成していないモノマーのタンパク質は細胞外へと拡散する



(Kano et al, PLoS ONE, 2012)。細胞内には凝集体のみと核が残り、FACSにより特異的に検出することが可能となる。

タウ細胞内凝集体をもつ細胞とまたない細胞を SLO で処理し、その処理前後の染色を行ったところ、凝集体をもたない細胞では SLO 処理によって細胞内タウの染色がほぼ消失する一方、凝集体をもつ細胞では SLO 処理後もその染色が観察された(図 3 上)。また FACS により解析したところ、凝集体をもたない細胞では SLO 処理後に蛍光強度が低下する一方で、凝集体をもつ細胞ではその蛍光強度は保たれることがわかった(図 3 下)。この結果は、蛍光タグを付加したタウと SLO による細胞膜穿孔によって、FACS で蛍光強度を指標にタウ細胞内凝集体形成を評価することが可能であることを示唆している。

図3：SLO処理によるタウ凝集体の選択的な検出



申請者は既に CRISPR/Cas9 スクリーニングの初期的条件検討を進め、蛍光標識されたアミロイド タンパク質の貪食に影響を与える遺伝子群の同定と解析に成功しつつある (Ebinuma et al, in preparation)。今後、CRISPR/Cas9 システムでゲノム編集した細胞プールに対してこのタウ凝集体細胞評価系を用いることで、細胞内凝集体形成に変化が生じた細胞群をソートし、細胞質中でのタンパク質異常凝集を制御、もしくは凝集体に対して応答する分子機構の解明を迅速に進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. I. Ebinuma, Y. Hori, T. Tomita: Genome wide screening of molecules involved in A $\beta$  uptake by CRISPR/Cas9 system. Society for Neuroscience 2016 (SfN2016), November

12-16, San Diego, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsych/tomita/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

富田 泰輔 (Taisuke Tomita)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：30292957