

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22467

研究課題名（和文）組織中の細胞内分子ダイナミクスの新規トレーシング方法の開発

研究課題名（英文）A new method to trace intracellular molecular dynamics in tissue

研究代表者

三國 貴康（Mikuni, Takayasu）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：90786477

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）：本研究は、脳組織内で特定のタンパク質の新規生合成をスループット良くイメージングすることを目指した。そのために、研究代表者らが開発した生体脳内ゲノム編集・分子イメージング技術を用いて、ある時間枠に新規合成された特定のタンパク質をイメージングするための方法を開発した。この方法によって、マウスの脳組織において、わずか2時間の間に新規に生合成されたタンパク質を特異的にイメージングすることに成功した。そのうえでこの方法をスケールアップするために、10種類以上のタンパク質に対してゲノム編集用のコンストラクトを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は必要に応じて分子を新規に生合成することで、外的要因や内部需要に迅速かつ正確に対応する。脳では、タンパク質の新規合成は、神経回路の形成やリモデリングなど様々な過程に不可欠であることが知られている。ゆえに、新規合成タンパク質を特異的に観察する方法は、様々な脳内過程における細胞内プロセスを分子レベルで理解するために重要である。本研究では、これまで困難であった「特定のタンパク質の新規合成をスループット良くイメージングする方法」を開発した。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to develop a high-throughput method to image specific newly synthesized proteins in brain tissue. Toward this aim, I used an in vivo genome editing and molecular imaging technique, termed SLENDR and vSLENDR, and chemical labeling techniques to establish a method to image a specific protein that is synthesized in a distinct time window in brain tissue. Using this method, I succeeded in imaging a specific endogenous protein that is synthesized in only 2 hours in mouse brain tissue. I then tried to apply this method to more than 10 different proteins by making constructs for SLENDR and vSLENDR techniques.

研究分野：神経科学

キーワード：ゲノム編集 タンパク質 分子イメージング 新規合成

1. 研究開始当初の背景

細胞は、細胞外からの刺激に応じて特定のタンパク質を新規に合成し、刺激に応じた細胞内プロセスを時空間的に正確に実現する。脳においては、タンパク質の新規合成は、神経回路の形成やリモデリングなど様々な過程に不可欠であることが知られている。ゆえに、新規合成タンパク質を選択的に観察しその機能を操作する方法は、様々な脳内過程における細胞内プロセスをタンパク質レベルで理解するために必須である。しかしながら、これまで新規合成タンパク質を選択的に観察しその機能を操作する良い方法は存在していなかった。

研究代表者は、脳組織内の1細胞で正確なゲノム編集を行い、内在性タンパク質の局在や動態を迅速にかつ高解像度で観察する方法「SLENDR法」を開発した (Mikuni et al., Cell 2016)。また、SLENDR法を発展させて、あらゆる時期の脳の任意の細胞種、脳部位あるいは脳全体で内在性タンパク質の局在や動態を観察できる「vSLENDR法」を開発した (Nishiyama* and Mikuni* et al., Neuron 2017)。このSLENDR/vSLENDR法と、従来よりも圧倒的に高感度で分子イメージングできる「化学的ラベリング」を組み合わせることで、脳内での新規合成タンパク質の動態を調べる新しい方法を開発できると考えた。

2. 研究の目的

本研究提案では、申請者が開発した方法をベースにして、脳組織中で内在性の新規合成タンパク質をハイスループットに可視化する技術の確立を目指した。本研究で開発する方法により、脳組織での新規合成タンパク質の動態を高い時空間分解能で迅速に調べられるので、様々な脳内過程の分子メカニズムの理解が飛躍的に進むことを期待できる。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集による化学タグノックイン

マウス個体の脳細胞で目的タンパク質をコードする遺伝子座に化学タグ配列を正確にノックインするために、SLENDR法あるいはvSLENDR法を用いた (図1)。SLENDR法では、胎生12-14日齢のマウス胎児の脳室に、ゲノム編集に必要なコンポーネント (ガイドRNAおよびSpCas9発現ベクター、相同組換え用の鋳型DNA) を子宮内電気穿孔法で導入した (電圧33-50 V, 50 msecのパルスをもとに1秒おきに4回。NepaGeneエレクトロポレーターを使用)。生後5-7日齢のマウスの海馬からスライス培養を作製し、培養12-15日にイメージング実験を行った。vSLENDR法では、マウス海馬から作製したスライス培養に、ゲノム編集に必要なコンポーネント (ガイドRNAおよびSpCas9発現カセットおよび相同組換え用の鋳型DNA) を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを培養5-7日に添加し (1スライス当たり約 10^{10} ゲノムコピー)、培養12-15日にイメージング実験を行った。

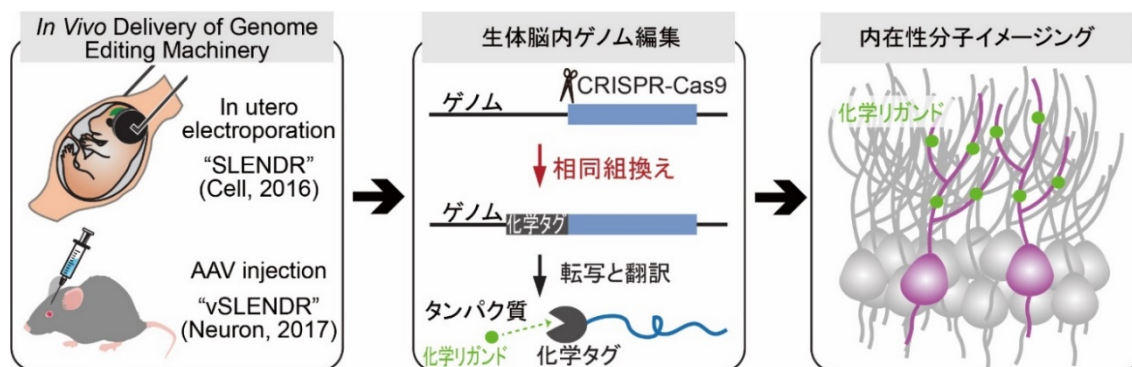


図1. SLENDR および vSLENDR 法による内在性タンパク質のラベリング

(2) スライス培養の作製

先行論文の方法に準拠して、マウス海馬あるいは大脳皮質からスライス培養を作製した。生後5-7日齢のマウスの海馬あるいは大脳皮質を切り出し、チョッパーで325 μmの厚さでスライスを作製し、培地を添加した膜上に置いて、37度5% CO₂の条件で培養した。培地は2-3日に1回交換した。

(3) 新規合成タンパク質の標識

ある時間枠に新規合成された特定のタンパク質をイメージングするために、SLENDR法およびvSLENDR法と、化学タグによるラベル方法を組み合わせた。化学タグは、低分子リガンドが特異的かつ不可逆的に結合する「受け皿タンパク質」であり、低分子リガンドとして波長の異なる様々な蛍光リガンドを使用できる。この化学タグの性質を利用して、脳組織において、SLENDR/vSLENDR法により化学タグを付加した特定の内在性タンパク質に対し、まずある色の蛍光リガンドで染色する。その後、任意の時間が経過後、異なった色の蛍光リガンドで染色する

ことで、新規合成されたタンパク質を特異的に染色した。

4. 研究成果

(1) 化学タグノックインによる内在性タンパク質の局在の高感度イメージング

本研究で開発する方法により特定の新規合成タンパク質をイメージングできるかどうかを確認するために、脳でシナプス可塑性に重要とされる CaMKII α タンパク質に着目した。子宮内電気穿孔法あるいはアデノ随伴ウイルスベクターでゲノム編集に必要なコンポーネントをマウスの大脳皮質あるいは海馬の錐体細胞に導入し、相同組換え修復によるゲノム編集で CaMKII α の遺伝子座に化学タグをエンコードする配列を正確に挿入することに成功した。そのうえで、化学リガンドを添加することで、脳組織内 1 細胞で内在性の CaMKII α タンパク質の局在を感度良くイメージングし、CaMKII α タンパク質が神経細胞内の樹状突起スパインに主に集積していることを確認した (図 2)。

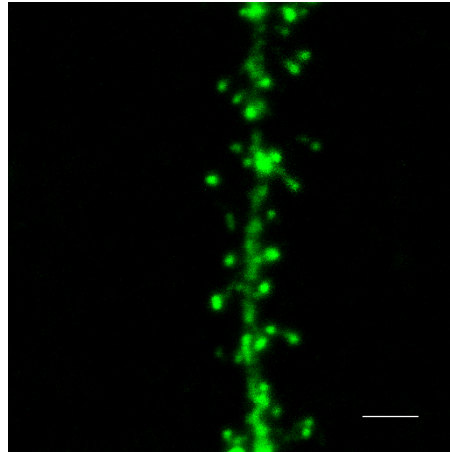


図 2. 脳組織内での内在性 CaMKII α タンパク質の標識。スケールバーは 1 μm 。

(2) 新規合成タンパク質のイメージング

化学タグで標識した CaMKII α タンパク質に、まず、ある色の化学リガンドを添加した。そのうえで、2 時間後に別の色の化学リガンドを添加し、2 時間内に新規に合成された CaMKII α タンパク質を選択的にイメージングした。タンパク質合成阻害薬であるアニソマイシン存在下では、2 回目のラベルシグナルはほとんど検出できなかったため、コントロールにおいて検出した 2 回目ラベルシグナルは確かに 2 時間内に新規に合成された CaMKII α タンパク質であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Mikuni Takayasu	4. 巻 150
2. 論文標題 Genome editing-based approaches for imaging protein localization and dynamics in the mammalian brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 2~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.04.007	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 Mikuni Takayasu, Uchigashima Motokazu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Methodological approaches to understand the molecular mechanism of structural plasticity of dendritic spines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 in press
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 Sun Ye, Thomas Connon, Mikuni Takayasu, Guerrero-Given Debbie, Yasuda Ryohei, Kamasawa Naomi	4. 巻 155
2. 論文標題 Correlative Ultrastructural Analysis of Functionally Modulated Using Automated Tape-Collecting Ultramicrotome and SEM Array Tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Volume Microscopy	6. 最初と最後の頁 121 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0691-9_7	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6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 Development and application of genome editing technologies in the mammalian brain in vivo
3. 学会等名 Neuro2019（第42回日本神経科学大会）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 内在性タンパク質の局在と動態の網羅的 1 細胞解析のための技術SLENDR
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 脳組織内 1 細胞での内在性タンパク質の網羅的局在・動態解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 生体脳内ゲノム編集技術の開発と応用
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 Genome editing-based approaches for single-cell molecular imaging in brain tissue
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三國貴康
2. 発表標題 生体脳でのゲノム編集技術の開発と脳病態の理解への応用
3. 学会等名 第62回小児神経学会学術集会（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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