

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650175

研究課題名(和文) 新奇トランスシナプス遺伝子改変技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel technique for the trans-synaptic gene manipulation

研究代表者

藤本 聡志 (Fujimoto, Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・研究員

研究者番号：50586592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路は個々の神経細胞がシナプスを介して特異的な接続をすることによって機能することができる。神経回路を接続特異的に可視化、遺伝子操作する技術は神経回路を理解するうえで強力なツールとなりうる。そこで本研究では、遺伝的にコードされ、かつ高効率にシナプスを越えるタンパク質を設計し、その遺伝子を導入した組み換えマウスを作製することにより、機能的な神経回路をシナプス接続特異的に可視化、あるいは遺伝子操作を加えることができる新奇手法の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits are established by specific neuronal connections via synapses. Therefore, gene manipulation system in a circuit level could be a powerful tool to understand the structural basis of neural computation. In this study, we attempted to make a novel genetically-encoded protein that enables us to trans-synaptically visualize and manipulate a specific neural circuit.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：神経回路形成

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路を可視化することは、ハードウェアとしての神経系を解析するうえで必要不可欠な技術である。約1世紀前、ゴルジとカハールが銀染色法を用いて神経細胞を初めて可視化することに成功し、脳が神経細胞という小さな素子で構成されていることが明らかになった。神経系は神経細胞が機能的な神経回路を形成してはじめて、外界からの入力を感じ・処理することにより認知や行動といった適切な出力を生み出すことができる。このため、一連のシナプス接続した神経回路の回路特異性が神経機能の発現の基盤となっている。よって、単一の神経細胞を可視化する技術に加えて、神経回路を接続特異的に可視化する技術は神経回路を理解するうえで強力なツールとなりうる。これまでも神経回路を可視化する試みが幾つかのアプローチから行われてきた。例えば、コムギ胚芽レクチン(WGA)はシナプス接続したニューロンへと拡散する性質を持ち、特定の神経回路を可視化することが可能である。また近年、Rabies ウイルスの糖タンパク質を他のウイルス由来の糖タンパク質に置換することにより感染性を制御した改変ウイルスを用いて、神経回路を標識する手法も開発され、数多くの応用研究がなされている。一方、マウス遺伝学の発展とともに様々な遺伝子改変マウスの作製が行われてきた。遺伝子欠損マウスや遺伝子導入マウスに加え、これまでに開発された「条件的」遺伝子改変技術は、*in vivo* 遺伝子導入法を用いた領域特異的な遺伝子改変法や、特定の細胞でのみ活性を持つプロモーター存在下で組み換えを起こす細胞種特異的な遺伝子改変法、あるいはテトラサイクリン誘導系に代表される時間的制御が可能な遺伝子改変法などが挙げられる。しかしながら、神経回路の接続特異性が個々の神経回路の機能を決定する重要な因子であるにもかかわらず、接続特異的な遺伝子改変技術はいまだに成功していない。そこで本研究では、遺伝的にコードされ、かつ高効率にシナプスを越えてタンパク質を設計し、その遺伝子を導入した組み換えマウスを作製することにより、機能的な神経回路をシナプス接続特異的に可視化し遺伝子操作を加えることができる新奇手法の開発を試みた。

## 2. 研究の目的

以下が、当初の目的であった。

(1) 膜透過性ペプチドと Cre-loxP システムを用いてシナプス接続先の細胞内への高効率なタンパク質導入が可能なたんぱく質を設計および、この原理に基づく遺伝子改変技術の開発。

ハードウェアとしての神経回路形成研究の方法論としてあらゆる生物種に応用可能であり、拡張性の高い仕組みを構築する。

(2) 上記遺伝子改変システムを組み込んだ

遺伝子改変マウスの作製および解析。

これまでに開発されてきたトランスシナプス標識法との最大の違いは、マウスの遺伝子にコードすることができるという部分であり、開発したタンパク質を用いた遺伝子改変マウスの作成を行う。

(3) 上記マウスを用いた嗅覚2次神経の入力特異性の可視化。

マウスにおいて、嗅覚1次投射神経細胞である嗅神経細胞は、約1000種類存在する嗅覚受容体のうち1種類だけが発現しており、におい分子に対して選択性の高い軸索投射パターンを示すことが知られているが、2次投射神経細胞である僧帽・房飾細胞が嗅神経細胞からのどのような入力特異性を認識して、より高次の中枢へと情報伝達を行っているのかは明らかになっていない。本研究で開発する手法を用いることで、におい分子の入力から2次投射神経までを一つのまとまりとして扱うことが可能になり、接続特異的な遺伝子改変を行うことにより、1種類の嗅神経細胞から投射を受ける僧帽・房飾細胞特異的に可視化できるようになる。将来的にはその特異性を特徴づけている分子を操作することで、今までは全くアプローチすらできなかった僧帽・房飾細胞の入力依存的な投射決定メカニズムに迫ることが可能になる。

## 3. 研究の方法

(1) トランスシナプス遺伝子操作が可能な膜透過性融合タンパク質の設計

本研究で使用した HIV 由来の膜透過ペプチドである TAT は、正電荷を持った 12 アミノ酸のペプチドである。TAT を融合させたタンパク質は、ゴルジ体から細胞膜へと輸送されエクソサイトーシスされる。放出された TAT 融合タンパク質はシナプスを介してターゲットの細胞にエンドサイトーシスされ、エンドソームに取り込まれた後に、脂質2重膜を透過することで細胞質や核内へ移行すると考えられる。この仕組みを利用して、本研究では Cre リコンビナーゼに TAT、分泌シグナル、糖鎖付加シグナル等を融合させ、Cre がシナプス接続された神経細胞においても高効率で作用するような条件を検討した。ただし、導入される遺伝子のコピー数が多いプラスミドによる予備実験ではうまくいっても、トランスジーンで染色体上に導入した際に Cre の発現効率やトランスシナプス効率、組換え効率の点で上手くワークしない可能性があった。そこで改善案として TEV プロテアーゼと CreER を組み合わせた遺伝子発現法や、Cre-loxP の代わりに tTA-TRE システムを利用したいくつかのコンストラクトを設計・作製した。

(2) 培養細胞を用いた設計タンパク質の評価

設計したタンパク質をコードするプラスミドを培養細胞(293細胞)に導入するとともに、

Cre が導入されたときのみ蛍光レポーターを発現する培養細胞へを用いて in vitro での評価を行った。

(3) マウス脳への遺伝子導入による設計タンパク質の評価

子宮内エレクトロポレーション法を用いて Cre 依存的に蛍光を発するマウスに in vivo 遺伝子導入を行い、培養細胞よりも大きな極性を持つ神経細胞で期待通りに Cre による組み換えが起こるかどうかを簡便に評価する方法を用いた。実際には、大脳皮質 2/3 層の錐体ニューロンへ遺伝子導入を行い、脳梁を介して反対側へと投射する軸索末端でのシナプスを越えた Cre タンパク質の移行がみられるかどうかを評価した。

(4) 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの評価。

すでに in vitro 評価系である程度の Cre 依存的なレポーターの発現が確認された設計タンパク質について遺伝子改変マウスを作製し、機能評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) まず、トランスシナプス遺伝子操作を行うための膜透過性融合タンパク質の設計、および in vivo での膜透過性融合タンパク質の有効性の評価系を確立した。すでに Cre リコンビナーゼに TAT、分泌シグナル、糖鎖付加シグナルを融合させたタンパク質 (TAT-Cre) を設計しており、培養細胞評価系を用いた予備的な実験から膜透過性が確認されていたので、さらに下流に IRES と可視化用の蛍光タンパク質を付加したものを CAG ベクターに組み込んだ。また、別のアプローチとして、変異型エストロゲンレセプターと Cre との融合タンパク質 CreER を改変し、TEV プロテアーゼ (TEVP) によって認識され切断される配列を間に挟むことによって、TAT、分泌シグナル、糖鎖付加シグナルを融合させた膜透過性 TEV プロテアーゼ (TAT-TEVP) がシナプスを介して接続先の神経細胞に移行したときのみ、タンパク質の切断を介してあらかじめ接続先の神経細胞に発現させておいた Cre の機能を有効にする仕組みを持つプラスミドを作製した。また、この仕組みについては、よりシグナルを増幅させる目的で Cre-loxP システムを介したコンストラクトだけでなく tTA-TRE システムをドライブさせるコンストラクトも作製した。さらに、実際に生体内でシナプスを介して分泌されることがわかっている脳由来神経栄養因子 (BDNF) の前駆体を持つシグナルペプチドおよび糖鎖付加シグナルを含んだ prepro 領域をクローニングし、これに Cre を融合させたコンストラクトも作製した。

(2) 上記の TAT-TEVP を用いたシステムについて培養細胞系を用いて機能評価を行ったが、膜透過性という意味においてレポーターの蛍光が確認できるほどの効率を示さなかった。

(3) 子宮内エレクトロポレーション法を用いて、妊娠 15 日齢の mT/mG マウスの大脳皮質に TAT-Cre を遺伝子導入し、錐体ニューロンの脳梁を介した反対側への投射先におけるシナプス透過性の確認を行うことを試みた。しかしながら mT/mG マウスの GFP 蛍光が観察困難であったため、適切な評価を行うことが困難であった。そこで、Cre 依存的に高輝度の tdTomato を発現することが知られている Ai9 マウスを用いて同様の実験を行った。また、BDNF の prepro 領域を融合させた Cre についても同様に遺伝子導入を行い、その投射先でのレポーターの発現をモニターしたが、いずれの場合においてもレポーターの発現は認められなかった。

(4) OMP プロモーターの下流に分泌シグナルペプチド、糖鎖付加シグナルを付与した TAT-CRE 遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作製し、このマウスを mT/mG マウスと交配させたマウスの解析を行ったが、これも当初、子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子導入の場合と同様に mT/mG マウスの GFP 蛍光が検出できず詳細な解析が困難であった。

(5) 以上の実験結果より、培養細胞系ではうまく機能するコンストラクトであっても、長い神経突起をもつ神経細胞においてはいくつかの点において機能しない可能性が考えられた。神経細胞は細胞内輸送やエンドサイトーシス、エクソサイトーシスにおいて特徴的な方向性を持っており、これらの細胞内機能を利用するような修飾が必要であると考えられる。例えば、これまでに順行性輸送されることが知られているタンパク質のシグナルペプチド等を融合するなどして、軸索先端まできちんと輸送されるような設計を行わなければならないと考えられる。また、神経伝達物質のようにシナプス末端で高効率に放出されるような小胞内に局在することも重要であり、これらの点についてその詳細なメカニズムを含めて検討が必要であることが浮き彫りとなった。

#### 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 2 件)

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai. Optical Clearing Using SeeDB. Bio-protocol ISSN:2331-8325 2014, Feb 5 査読有 <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=1042>

Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit

reconstruction. Nature Neuroscience  
2013 Vol.16, Page 1154-1161, DOI:  
10.1038/nn.3447 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

Meng-tsen Ke, Satoshi Fujimoto,  
Takeshi Imai. SeeDB – A simple and  
morphology-preserving optical  
clearing agent for neuronal circuit  
reconstruction. 43rd Annual Meeting  
Society for Neuroscience, November  
9-13.2013, San Diego, California, USA

Meng-tsen Ke, Satoshi Fujimoto,  
Takeshi Imai. SeeDB – A simple and  
morphology-preserving optical  
clearing agent for neuronal circuit  
reconstruction. 国際シンポジウム  
Optogenetics2013 2013.09.26-27, 東京  
(慶應義塾大学三田キャンパス北館ホー  
ル)

Meng-tsen Ke, Satoshi Fujimoto,  
Takeshi Imai. SeeDB – A simple and  
morphology-preserving optical  
clearing agent for neuronal circuit  
reconstruction. ECR02013, August  
26-29.2013, Leuven, Belgium.

Meng-tsen Ke, Satoshi Fujimoto,  
Takeshi Imai. SeeDB – A simple and  
morphology-preserving optical  
clearing agent for neuronal circuit  
reconstruction. Cold Spring Harbor  
Laboratory on Wiring the Brain, July  
18-22.2013, NY, USA.

Meng-tsen Ke, Satoshi Fujimoto,  
Takeshi Imai. SeeDB – A simple and  
morphology-preserving optical  
clearing agent for neuronal circuit  
reconstruction. The 6th International  
Neural Microcircuit Conference  
Functional Mechanism of Cortical  
Microcircuit, 2013.6.24-26, 愛知県岡  
崎市(自然科学研究機構岡崎コンファ  
レンスセンター)

Meng-tsen Ke, Satoshi Fujimoto,  
Takeshi Imai. SeeDB: an aqueous  
optical clearing agent for imaging  
intact fluorescence and morphology in  
the mouse brain. 2013.05.28-31, 第  
46回日本発生生物学会 島根県松江市  
(くにびきメッセ)

〔その他〕

簡便で生体試料にやさしい組織透明化試薬  
「SeeDB」を開発 プレスリリース  
[http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130201\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130201_1/)

(1)研究代表者 藤本 聡志  
(FUJIMOTO, Satoshi)  
独立行政法人理化学研究所・発生・再生科  
学総合研究センター・研究員  
研究者番号: 50586592