

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13107

研究課題名（和文）シナプス分子のスプライスバリエーション特異的な局在を検出するための技術開発

研究課題名（英文）Application of epitope-tag insertion for the analysis of synaptic molecules splicing isoform expressions in the brain

研究代表者

井端 啓二 (Ibata, Keiji)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30462659

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）：Cbln1は小脳におけるシナプス形成分子であり、他の脳領域ではCbln2および4も重要な働きをしていると考えられているが局在は不明である。Cbln分子はスプライスサイト4を持つNeurexin (NrxSS4) に結合するが、NrxSS4の個々のシナプスでの局在に関しても、特異的な抗体が存在しないため不明であった。本研究では、抗体を作る代わりに、ゲノム編集技術を用いてエピトープタグそのものをノックインすることで、Cbln分子とNrxSS4の局在を解明する事を試みた。その結果Cbln1およびCbln2のノックインマウスは得られたが、NrxSS4では得られなかった。現在免疫組織実験を進行中である。

研究成果の概要（英文）：Cbln1 induces synapse formation in the central nervous system, especially in the cerebellum. In other brain region, it is speculated that other Cbln proteins, Cbln2 and 4, also plays an important role at synapse formations. It is known Cbln proteins bind with splice site 4 containing neurexin isoform at presynaptic site. To understand the characteristic of each synapse in the brain, it is important to know which Cbln proteins and which neurexin isoform is expressed at each presynaptic site. To date, there are no specific antibody for neurexin splice site 4 and for Cbln family proteins because of high-similarities. To overcome this difficulty, we took advantage of epitope-tag and antibody detection system. We tried to insert epitope-tag at splice site 4 of neurexin and at terminus of Cbln proteins using CRISPR/Cas9 system. In this research period, we found difficulty to get knock-in mouse for neurexin. On the other hand, we obtained epitope-tag inserted Cbln1 and Cbln2 knock-in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

神経細胞と神経細胞の繋ぎ目である「シナプス」こそが、複雑な脳神経回路の働きを知る上で必須の機能単位である。しかしシナプス研究における最大のボトルネックの一つは、シナプス分子の局在が十分に分かっていないことにある。内因性分子の局在解析には光顕および電顕レベルでの抗体染色法が必須であるが、シナプス分子に対する特異的抗体がなかなか得られないからである。多種多様な神経細胞を特異的に結合させて機能させるために、シナプス分子の多くにはわずかなアミノ酸の違いによる多様性が存在する。このような数十のアミノ酸の違いを特異的に認識する抗体を得ることは簡単ではない。例えば自閉症の原因遺伝子である Neurexin にはスプライシングの違いによって 1000 種以上の分子種が存在することがプロテオミクス解析で分かっている。しかし、これらの違いを認識する特異的抗体がほとんど存在しないため、多様な Neurexin がどの神経回路にどのように局在するのか未だに分かっていない。また、シナプスには膜タンパク質や細胞外基質が密集しており、熱処理や有機溶剤処理などさまざまな抗原露出法を用いる必要があることが多い。しかしこのような処理に耐える親和性の高い抗体を得ることも簡単ではない。

2. 研究の目的

そこで抗体を作る代わりに、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて抗原（エピトープタグ）そのものを、目的シナプス分子をコードする遺伝子にノックインすることによってシナプス分子局在解析技術を確立する。エピトープタグの種類と位置は、培養神経細胞を用いた *in vitro* シナプス形成アッセイと、子宮内電気穿孔法を用いた *in vivo* アッセイによって最適化する点の特徴である。本研究計画では、新しいシナプス分子局在解析技術を確立することに加えて、自閉症関連遺伝子

である Neurexin のスプライスサイト 4 (30 アミノ酸) バリエーションの時空間的発現プロファイルを初めて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は Neurexin SS 4 遺伝子に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いてタグ配列をノックインすること、およびノックインしたタグに対する標識で解析することの 2 つの実験を行う。そのためノックインするタグの選定を Neurexin SS 4 の他のタンパク質との結合能や、シナプス形成能などの機能が保持されているかを指標に *in vitro* のアッセイ系で行う。タグの選定後、ノックインマウス個体を作製し、個体レベルでの Neurexin SS 4 発現と局在のプロファイルを作製する。さらに、さまざまな自閉症モデルマウスにおける SS4 アイソフォームの発現パターンの差異およびシナプスのマーカータンパク質との相関を検討する。

本研究では免疫染色や蛍光化合物ラベリングで使用可能な既存のエピトープタグを用いる。世界中で広く用いられている HA、FLAG、HIS、Myc、Avi タグと蛍光化合物 FIAsh-EDT2、ReAsH-EDT2 や SNAP、CLIP タグ用の基質が結合可能なテトラシステインタグ、SNAP タグおよび CLIP タグをノックインタグの候補とする。エピトープタグの種類と挿入位置を最適化するために各々のタグとタグの位置を *in vitro* のアッセイ系で検討する。そのためタグを導入した Neurexin が野生型の Neurexin と比較して、Cbln1 や Neuroligin との結合能に影響が無いか、また、HEK 細胞を使った人工的シナプス形成アッセイを行い、シナプス形成能に影響が無いかを確認する。Neurexin 遺伝子は 3 種類存在するため、それぞれの SS 4 を将来的に明らかにする予定であるが、本申請研究では Neurexin1 遺伝子でまず実験技術を確立させる。SS 4 配列はエキソン 20 であり、SS 4 に結合するタンパク質を邪魔しな

い様に、エキソン20の両端のどちらか一方にノックインタグを導入することを第一案として計画している。化膿レンサ球菌由来のCas9によるゲノム切断のために必要なPAM配列(NGG)の候補が6カ所存在しており、このうち6番目の切断部位候補がSS4配列の末端という条件にあてはまるため、この配列をPAM配列とするCRISPR/Cas9を行う予定である。*in vitro*の系でタグの選定をし、ゲノム切断後の相同組換え用にタグを含むDNA配列を構築する。マウス受精卵へのガイドRNAとCas9の導入は一つのプラスミドで行う方法か、ノックイン効率を上げるためにガイドRNAを2種類の合成RNA(crRNAとtracrRNA)に分けて導入する改良法(Aida et al. Genome Biol. 2015)を用いる。マウス受精卵への遺伝子導入は研究協力者が行う。得られた個体に関して、ノックインの有無を遺伝子型判定し、ノックイン個体を得る。

得られたノックイン個体のタグ付きNeurexin SS4アイソフォームをタグに対する抗体や蛍光化合物でラベルして発現と局在の解析をする。Neurexin SS4と強く結合するCbln1は小脳顆粒細胞で多く発現しており、顆粒細胞の軸索上のシナプスレベルでNeurexin SS4の解析をする。また、小脳以外でもCbln1はある程度発現しており、Neurexin SS4が小脳以外の脳部位でどのような局在をしているかを解析する。さらに発達過程で変化するか、シナプス可塑性誘導前後にどのように変化するかも検討する。近年、脳神経の興奮性、抑制性シナプスのネットワーク特性や強度のバランス等が崩れることが精神疾患の原因の端緒となるのではと考えられている。自閉症関連遺伝子であるNeurexinのSS4配列はNeuroliginへの結合特性に影響を与えており、その結果、Neurexin SS4は興奮性シナプスの裏打ちタンパク質であるPSD95の集積を減らし、一方、抑制性シナプスの裏打ちタンパク質である

Gephyrinの集積には影響を与えないことが*in vitro*の系で知られている。また、SS4配列が無いNeurexin1ベータのみがポストシナプスのLRRTMタンパク質に結合出来る等、NeurexinのSS4配列の有無によって興奮性と抑制性のバランスが異なる可能性がある。そのためNeurexin SS4の発現パターンと興奮性および抑制性シナプスのマーカータンパク質との相関関係を詳細に検討する。

4. 研究成果

平成28年度は確認の実験として、既に申請者が所属する研究室で詳細に解析され、HAタグが挿入可能であることが明らかとなっているCbln1、およびタグ導入法の開発に関する報告(Mikuni et al., Cell, 2016)で示されたArcにHA配列を導入した。マウス受精卵へのガイドRNAとCas9の導入は電気穿孔法にて行った。得られた遺伝子導入受精卵に対して、ゲノム切断後のindelの有無を遺伝子型判定したところ、ガイドRNAの配列によって効率が異なるが、合成RNAはどちらの方法でも効率が高い事が明らかとなった。これらの方法でどちらの遺伝子に対してもHA配列が導入された個体が得られた。続いて免疫染色や蛍光化合物ラベリングで使用可能な既存のエピトープタグであるHA、FLAG、HIS、Myc、およびT7タグをノックインタグの候補とし、エピトープタグの種類と挿入位置を最適化するために各々のタグとタグの位置を*in vitro*のアッセイ系で検討した。タグを導入したNeurexinが野生型のNeurexinと比較して、Cbln1やNeuroliginとの結合能に影響が無いか、また、HEK細胞を使った人工的シナプス形成アッセイを行い、シナプス形成能に影響が無いかを確認した。その結果、最適なタグとタグの位置が得られた。平成29年度は、前年度に得られた結果をもとに、Neurexinスプライスサイト4へのタグの挿入を試みた。その結果3種類のガイドRNAを試

みたが、いずれもゲノム切断後の indel のみ
が起こり、タグが挿入された個体は得られな
かった。そこで他のシナプス分子へタグの導
入を試みた。シナプス形成分子である Cbln
ファミリー分子には Cbln1 から 4 の 4 種類
存在するが、高い相同性を持つ事から、特異
的な抗体を作製するのが難しい。そこで HA
タグをそれぞれの N 末端または C 末端に挿入
する事を試みた。その結果、Cbln2 のゲノム
に HA タグの配列を挿入する事が出来た。
Cbln1 に関しては、前年度に HA タグを挿入し
た個体を得られているため、マウス個体での
Cbln1 と Cbln2 の発現部位や細胞内局在の違
い、さらに同じエピトープタグを使用してい
るため、個体での発現量の違いに関しても今
後明らかにする予定である。また、同様に
Neurologin ファミリー分子の一つである
Neurologin1 に HA タグ配列が挿入された個
体を得る事が出来た。Cbln ファミリー分子と
Neurologin はどちらも Neurexin 分子に結合
する。そのため各シナプスにおける
Cbln/Neurologin タンパク質の量比に違いが
あるかに関しても今後明らかにしていく予
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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井端 啓二 (IBATA, Keiji)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・助教

研究者番号 : 30462659

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

柚崎 通介 (YUZAKI, Michisuke)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・教授

研究者番号 : 40365226

竹尾 ゆかり (TAKEO, Yukari)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・特任助

教

研究者番号 : 90624320

(4) 研究協力者

林 亜由美 (HAYASHI, Ayumi)