

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14553

研究課題名(和文)小脳全域のプルキンエ細胞特異的CRISPR/Cas9スクリーニング系の確立

研究課題名(英文) Establishment of Purkinje cell specific CRISPR/Cas9 screening in whole cerebellum

研究代表者

渡邊 貴樹 (Watanabe, Takaki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：90749798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、CRISPR/Cas9を用いてマウス小脳全域のプルキンエ細胞特異的に特定の遺伝子をノックアウトし、登上線維のシナプス刈り込みに関わる分子のスクリーニング系の確立を目的とした。条件検討の結果、胎生11日齢の両側小脳への2点電極を用いた子宮内エレクトロポレーション法が小脳全域への導入効率が良いと判明した。登上線維シナプスの刈り込みに必須な遺伝子をターゲットとして、小脳スライス標本を用いて電気生理学的にシナプス刈り込みへの影響を調べたが、SpCas9もeSpCas9も共に顕著なシナプス異常は見られなかった。今回の条件では遺伝子導入には成功したが、ゲノム編集の効率が低い可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I aimed to establish molecular screening for climbing fiber (CF)-Purkinje cell (PC) synapse elimination by knocking out a particular gene with CRISPR/Cas9 system in PCs of mouse whole cerebellum. As a result of testing several conditions, in utero electroporation with a double-electrode probe against both sides of cerebellum at embryonic day 11 showed the highest efficiency of gene transduction into PCs of whole cerebellum. I investigated the effects of knockout of a gene required for CF-PC synapse elimination with CRISPR/Cas9 by electrophysiologically counting the number of CFs on acute cerebellar slices. However, the knockout on PCs by either SpCas9 or eSpCas9 showed no significant impairment on CF-PC synapses. This result suggested a low efficiency of genome editing on PCs in this condition in spite of a high efficiency of gene transduction into whole cerebellar PCs.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 登上線維 CRISPR/Cas9 シナプス シナプス刈り込み

1. 研究開始当初の背景

小脳は、運動制御だけでなく高次機能にも重要な役割を持ち、精神疾患においてその構造・機能異常との関連が報告されている。一方で小脳の構造は、アルドラーゼCなどの遺伝子発現の有無と対応したコンパートメント構造があることが知られているが、その機能的役割や分子基盤には未だ謎が多い。

申請者は、精神疾患の発症に関連があると考えられている発達期のシナプス刈り込みの分子基盤の解明のために、マウス小脳プルキンエ細胞をモデルとして (Hashimoto and Kano, 2013)、RNAi スクリーニングを行ってきた。その結果、ある精神疾患に関連する遺伝子のノックダウンがプルキンエ細胞に投射する登上線維のシナプス刈り込みに異常を引き起こすことを見出した。面白いことに、この遺伝子は小脳の異なるコンパートメントに発現する。すなわち、発達におけるシナプス刈り込みがコンパートメント形成と密接しており、その異常が精神疾患様行動の発症につながる可能性が示唆された(学会発表参照)。本研究では、従来の子宮内エレクトロポレーションによる RNAi ノックダウンの難点を解消するために、近年確立された CRISPR/Cas9 系によるゲノム編集技術を応用して (Cong et al., 2013)、子宮内ウイルスインジェクション法による小脳全域のプルキンエ細胞特異的な遺伝子ノックアウトによるスクリーニング系を確立することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、CRISPR/Cas9 系を子宮内ウイルスインジェクション法によってマウス小脳全域のプルキンエ細胞特異的に導入し、特定遺伝子をノックアウトする実験系の確立を目的とした。生体内でのゲノム編集率が高いウイルス・DNA コンストラクション条件を検討後、小脳のコンパートメント構造に対応して発現する単独または複数遺伝子に対してノックアウトスクリーニングすることで、そのコンパートメント形成とシナプス刈り込みの分子基盤および行動への影響の関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

子宮内ウイルスインジェクションによってマウス小脳全域のプルキンエ細胞に CRISPR/Cas9 系が導入されるのに最適な DNA コンストラクションを作製した。CRISPR/Cas9 は従来の SpCas9 に加えて、オフターゲットを抑えるために eSpCas9 (Slaymaker et al., 2016) も試験した。機能既知の P/Q 型 Ca²⁺チャネル遺伝子についてノックアウトを行い、ゲノム編集効率、登上線維のシナプス刈り込みを調べた。

当初計画していた子宮内ウイルスインジェクション法が小脳全域に安定的に導入されることが稀であることが、平成 28 年度に予想外に判明したため、遺伝子導入法を、2点または3点電極を用いた子宮内エレクトロポレーション法と両側エレクトロポレーション法に変更して、追加で DNA コンストラクションを行い、試験した。

4. 研究成果

マウス小脳全域のプルキンエ細胞に CRISPR/Cas9 系を導入するために、子宮内ウイルスインジェクションまたは子宮内エレクトロポレーションを用いて、小脳全域への導入効率が高いウイルス・プラスミドコンストラクション・プラスミド導入時期・刺激条件等を検討した。ゲノム編集によるノックアウト効率を高めるため1遺伝子に対して3箇所をターゲットとしたレンチウイルス用・エレクトロポレーション用のベクターを構築した。従来の SpCas9 に加えて、オフターゲットを抑えるために eSpCas9 を発現するベクターも作製した。遺伝子導入マーカーとして緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いた。子宮内ウイルスインジェクション法を主体に実験系を確立しようと計画し、インジェクション時期、ウイルス濃度やプラスミドの構成と組み合わせをいくつか試したが、予想以上にプルキンエ細胞への導入効率が低く、さらに小脳全域に導入されることが稀であることが判明した。そこで、子宮内エレクトロポレーションを改良することで試験した。

プラスミド導入時期は胎生期 E10, E11, E12 を試験し、子宮内エレクトロポレーションは2点電極による小脳の左右両側導入と3点電極による両側導入を試みた。その結果、一般的に子宮内ウイルスインジェクションと比較して、子宮内エレクトロポレーションによるプラスミド導入効率が高く、2点電極により2種のプラスミドベクターをE11にエレクトロポレーションした条件が最も効率よく小脳全域に CRISPR/Cas9 系を導入できることが判明した (図1)。

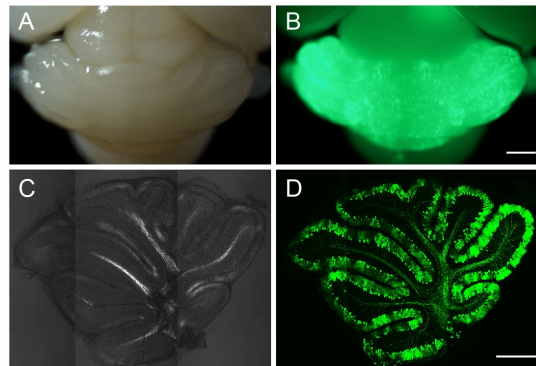


図1 子宮内エレクトロポレーション法による小脳全域のプルキンエ細胞特異的遺伝子導入

(A,B) P12 のマウス小脳両側の半球および虫部領域に GFP が導入された。(C,D)小脳虫部の切片像。GFP がプルキンエ細胞特異的に小葉の広範囲に渡って導入された。

子宮内エレクトロポレーションによりプルキンエ細胞に CRISPR/Cas9 系を導入したマウスでの電気生理学的解析を試みた。ゲノム編集によるノックアウト効率を高めるため 1 遺伝子に対して 3 箇所に gRNA を設計して、登上線維シナプスの刈り込みに必要とされる P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルをターゲットとして、小脳スライス標本を用いて電気生理学的に登上線維のシナプス刈り込みへの影響を P20 以降で調べた。しかし、SpCas9 もしくは eSpCas9 を導入しても、P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルのノックアウトマウスで見られるほどのシナプス異常は見られなかった。また、RNA 干渉によるノックダウンと比較しても有意な異常が見られなかった。したがって、小脳虫部以外の領域にも広範囲のプルキンエ細胞特異的に CRISPR/Cas9 を導入することに成功したが、今回試験した条件ではゲノム編集の効率が低い可能性が示唆された。今後はさらなる条件検討を行うとともに、ゲノム編集を伴わない dCas9 を用いた CRISPR 干渉法に切り替えることも検討する。

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 5 件)

1. Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M., Retrograde Signaling from Progranulin to Sort1 Counteracts Synapse Elimination in the Developing Cerebellum.

Neuron. 2018 Feb 21;97(4):796-805.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.018. 査読有り

2. Watanabe T, Shimazaki T, Oda Y., Coordinated expression of two types of low-threshold K⁺ channels establishes unique single-spiking of Mauthner cells among segmentally homologous neurons in the zebrafish hindbrain.

eNeuro 2017;Oct 23;4(5), doi: 10.1523/ENEURO.0249-17.2017 査読有り

3. Aikawa T, Watanabe T, Miyazaki T, Mikuni T, Wakamori M, Sakurai M, Aizawa H, Ishizu N, Watanabe M, Kano M, Mizusawa H, Watase K., Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice.

Hum Mol Genet. 2017 Aug 15;26(16):3094-3104. doi:10.1093/hmg/ddx193 査読有り

4. Kano M, Watanabe T, Type-1 metabotropic glutamate receptor signaling

in cerebellar Purkinje cells in health and disease.

F1000Res. 2017 Apr 4;6:416. Review. doi: 10.12688/f1000research.10485.1 査読有り

5. 渡邊 貴樹, 上阪 直史, 狩野 方伸
生後発達期の小脳におけるシナプス刈り込みのメカニズム

生化学 88(5) 621-629 2016 年
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880621
査読無し

[学会発表](計 6 件)

1. Reduced synaptic transmission in neurons of mouse medial prefrontal cortex by knockdown of a schizophrenia-related molecule, Setd1a, during postnatal development

Nagahama Kenichiro, Sakoori Kazuto, Watanabe Takaki, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu, 第 95 回日本生理学会大会 2018 年

2. 発達期マウス小脳の登上線維 - プルキンエ細胞シナプス刈り込みに関与する自閉スペクトラム症関連分子のスクリーニング

渡邊 貴樹, 井上 秀太郎, 上阪 直史, 狩野 方伸, 第 8 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム 2018 年

3. 発達期小脳の登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みにおける自閉スペクトラム症関連遺伝子 Pcdh10 の役割

渡邊 貴樹, 第 23 回グリアクラブ 2018 年

4. Involvement of Fndc3b, a fibronectin type III domain-containing protein, in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development

Celine Mercier, Takaki Watanabe, Taisuke Miyazaki, Masahiko Watanabe, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano, 第 40 回日本神経科学大会 2017 年

5. Phospholipase C β 3 は発達期小脳のアルドラーゼ C 陽性領域における登上線維シナプス除去に必要である

頼 友梨恵, 渡邊 貴樹, 狩野 方伸, 第 40 回日本神経科学大会 2017 年

6. 発達期マウス小脳の登上線維 - プルキンエ細胞シナプス刈り込みに関与する自閉スペクトラム症関連分子のスクリーニング

渡邊 貴樹, 井上 秀太郎, 上阪 直史, 狩野 方伸, 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年

[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://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html

6．研究組織

(1)研究代表者

渡邊 貴樹 (Watanabe Takaki)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：90749798